

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE BIOLOGIA



Tesis para obtener el Título Profesional de:

BIOLOGO - MICROBIOLOGO

**“ACTIVIDAD ANTIFUNGICA “IN VITRO” DEL EXTRACTO
DE TRES VARIEDADES DE Allium sativum sobre
Cryptococcus neoformans, Ayacucho - 2001”**

Presentado por:

FAUSTINO PAUCCA JAULES

AYACUCHO - PERU

2001

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

BACH. FAUSTINO PAUCCA JAULES

En la ciudad de Ayacucho, a las veinte y seis días del mes de diciembre del año dos mil uno, siendo las 12.40 p.m. los miembros del jurado calificador reunidos en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; bajo la Presidencia del MSc. César Magallanes Magallanes Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y, actuando como Secretario docente el Blgo. César Rodolfo Vargas y, miembro del jurado calificado conformado por: Blgo. Saúl Chuchón Martínez, Blgo. Serapio Romero Gavilán, Blgo. Martín Tenorio Bautista y Q.F. Enrique Aguilar Felices; para recepcionar en acto público la sustentación de tesis titulado: Actividad Antifúngica “ in vitro” del Extracto de tres Variedades de Allium sativum sobre Cryptococcus neoformans, Ayacucho 2001”. Presentado por el Bach. en Ciencias Biológicas Faustino Paucca Jaules, con el cual pretende obtener el Título profesional de Biólogo en la especialidad de Microbiología.

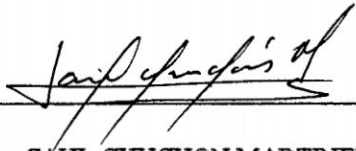
Como primer acto, el Sr. presidente del jurado invitó al Sr. Secretario docente dé lectura a la documentación sustentatoria del acto; a continuación el Sr. Presidente del jurado invitó al Sr. Sustentante a exponer su trabajo de investigación; concluido la exposición el Sr. Presidente del jurado invitó a los señores miembros del jurado calificador para que efectúen las aclaraciones y/o preguntas que crean convenientes. Finalizando el procedimiento el Sr. Presidente invitó al sustentante al público asistente a desocupar momentáneamente el auditorium para que los miembros del jurado efectúen las deliberaciones y calificaciones en privado, cuyos resultados fueron:

MIEMBROS DEL JURADO

EXPOSICION PREGUNTAS PROMEDIO

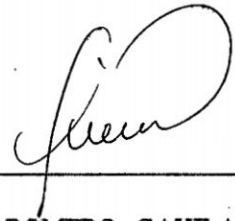
Blgo. SAUL CHUCHON MARTINEZ	16	15	16
Blgo. SERAPIO ROMERO GAVILAN	15	15	15
Blgo. MARTIN TENORIO BAUTISTA	15	16	16
Q.F. ENRIQUE AGUILAR FELICES	15	15	15

Resultó la nota promedio de DIECISEIS (16) aprobatorio, lo que fé los miembros del jurado calificador estampando sus firmas al pie del presente acta, finalizando el acto a las 2.40 p.m.




Blgo. SAUL CHUCHON MARTINEZ

MIEMBRO



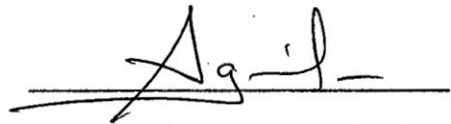
Blgo. SERAPIO ROMERO GAVILAN

MIEMBRO - ASESOR



Blgo. MARTIN TENORIO BAUTISTA

MIEMBRO



Q.F. ENRIQUE AGUILAR FELICES

MIEMBRO



MSc. CESAR MAGALLANES MAGALLANES

DECANO-PRESIDENTE



Blgo. CESAR RODOLFO VARGAS

SECRETARIO -DOCENTE

El presente trabajo, con ferviente
y profundo cariño, dedico a mi fa-
milia que hicieron posible la reali-
zación de mi profesión.

Mi gratitud eterna y sincero
agradecimiento a mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por cobijarme como estudiante en sus Aulas, en la Facultad de Ciencias Biológicas.

A los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por su valiosa contribución en mi formación académica.

A mi Asesor, Biólogo. SERAPIO ROMERO GAVILAN, por guiarme con sus consejos y brindándome su cordial apoyo para la ejecución del presente trabajo.

A la Bióloga. MIRIAM GUEVARA ROBLES, del Instituto Nacional de Salud, por su valioso apoyo en el presente trabajo.

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas por las facilidades en el uso de materiales y equipos.

Y a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta contribuyeron en el desarrollo y conclusión de la presente tesis.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	i
INTRODUCCION	ii
I.-REVISION BIBLIOGRAFICA	01
1.-Descripción Botánica de <u>Allium sativum</u> "Ajo".	01
1.1.-Taxonomía.	02
1.2.-Variedades.	03
2.-Usos Medicinales Atribuidos.	03
3.-Composición Química,Propiedades y Toxicidad.	04
4.-Clasificación Taxonómica del <u>Cryptococcus neoformans</u>	05
5.-Morfología.	06
6.-Hábitat.	07
7.-Tipos clínicos de infección en el Hombre.	08
8.- Tipos Clínicos de infección en el Animal	09
II.- MATERIALES Y METODO	10
1.- Recolección y preparación de la muestra.	10
1.1.- Esquema N° 01.	11
2.- Obtención de los diferentes Extractos.	12
2.1.- Obtención del Extracto Alcohólico.	12
2.2.- Obtención del Extracto Acuoso.	12
2.3.- Obtención del Extracto Metanólico.	12
3.-Metodología Para Determinar la Actividad Antifúngica	13

	Pag.
3.1.- Determinación de la Concentración del Extracto Antifúngico.	13
3.2.- Determinación de la Concentración inhibitoria del Ketoconazol.	13
3.3.-Preparación de <u>Cryptococcus neoformans</u> .	13
3.4.- Obtención de Halos de Inhibición por Método de Di- lución en Placa.	13
3.5.- Determinación del Porcentaje de Inhibición.	14
4.-Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Fungicida Mínima.	14
4.1.- Dilución en Agar.	14
III.-RESULTADOS	15
IV.-DISCUSIÓN	32
V.-CONCLUSIONES	39
VI.- RECOMENDACIONES	41
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
ANEXOS.	

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la "ACTIVIDAD ANTIFUNGICA "in vitro" DEL EXTRACTO DE TRES VARIEDADES DE Allium sativum SOBRE Cryptococcus neoformans.

Se utilizaron las variedades **Chuschi**, **Napuri** y **Arequipaña** de la especie Allium sativum "Ajo", que fueron identificados y seleccionadas por el laboratorio de fitopatología del Instituto Nacional de Investigación Agraria-Ayacucho.

La actividad antifúngica se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Se prepararon extractos acuoso, metanólico, de cada variedad de Allium sativum a concentraciones de 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, respectivamente.

La actividad antifúngica se determinó utilizando el método de dilución en Agar Saboraud, utilizando como estándar el ketoconazol a una concentración de (10 ug/ml).

Se logró mejor actividad fungicida y fungistática con el extracto etanólico de la variedad **Chuschi**, a una concentración de 50%.

El extracto acuoso con la variedad Napuri y Arequipena no mostró tener actividad al 100% de concentración.

INTRODUCCION

El conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas deberá ser comprobado y validado para garantizar una terapia adecuada, eficaz y con mínimos riesgos de ocasionar efectos secundarios o toxicidad que pueda resultar peor que la enfermedad (CÁCERES,A.,1996).

El "Ajo" Allium sativum es una hortaliza herbácea con bulbo utilizado durante siglos por sus propiedades saborizantes, aromáticas y medicinales. Gran cantidad de estudios realizados en los últimos 15 años confirman lo que fue dicho durante muchas generaciones " que lo que comas, sea tu medicina" las propiedades reconocidas del ajo se refieren a su poder fungicida y bactericida ,la capacidad de regular niveles de lípidos y colesterol así como las propiedades anti-tumorales (BENAVIDES, Y RAMIREZ,1999).

La trituración de las plantas constituye por lo general la cuarta operación a practicar, no ofrece dudas que si se quiere incorporar a las tisanas la mayor parte posible de los principios medicinales que las plantas contienen, estas deben utilizarse cuanto mas desmenuzados mejor. No obstante, como sea que las plantas una vez trituradas, son de mas difícil conservación, o sea que pierden sus

propiedades con mayor facilidad, creemos muy aconsejable no proceder a esta operación hasta el momento de tener que utilizarlas (VANDER, A., 1987).

Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta, se concentra preferentemente en las flores, las hojas y las raíces, con menos frecuencia en las semillas, frutos y corteza. El contenido de los principios activos de una planta medicinal varía según el hábitat de la misma, de la recolección y la preparación (DE FIOVICENZO, Z., 1992).

La distribución geográfica de los Cryptococcus neoformans es cosmopolita y es considerado problema de Salud pública, en nuestro medio se han reportado muchos casos de Criptococosis después de haber padecido las enfermedades como; tuberculosis, infecciones respiratorias, también se han encontrado en autopsias rutinarias en personas que gozaban de salud perfecta.

Ante esta realidad era necesario realizar el presente trabajo de investigación y aportar en lo posible la bioactividad in vitro de Allium sativum sobre Cryptococcus neoformans "Ajo", fijándose los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la actividad antifúngica in vitro de tres variedades de Allium sativum "Ajo" sobre Cryptococcus neoformans.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:- Probar la actividad antifúngica de cada uno de las variedades del extracto del Allium sativum "Ajo"(Acuoso, Etanólico, Metanólico) sobre el Cryptococcus neoformans.

- Encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las tres variedades del extracto del Allium sativum "Ajo".
- Encontrar la concentración mínima fungicida (CFM) de las tres variedades del extracto del Allium sativum "Ajo".
- Comparar la actividad antifúngica del extracto del "Ajo" con la capacidad de inhibición de la Ketoconazol.

L-REVISION BIBLIOGRAFICA

1.- DESCRIPCION BOTANICA DEL Allium sativum "Ajo".

Es una hortaliza herbácea forma parte del grupo de los llamados hortalizas, de comportamiento bianual con características anatómicas y fisiológicas muy particulares (MAROTO, B., 1983).

El "Ajo"; es una planta de raíces muy numerosas blancas fasciculadas y poco profundas (MAROTO, B., 1983).

El bulbo consiste en un corto tallo, con 6-12 sub tallos, generalmente en número de 10, reunidos en su base formando la "cabeza" de "Ajo" y cada uno por separado el "diente" del "Ajo" a su vez envuelta en una túnica blanca y rojiza. (PALACIOS, R., 1998).

El conjunto del disco, "dientes" (en cantidad muy variado) y túnicas se denominan "bulbo" del "Ajo" este elemento es el comercialmente aprovechable con la denominación vulgar de cabeza (GARCIA, A., 1990).

Los bulbos consta de 6 a 12 dientes generalmente en número de 10,

reunidos en su base formando la "cabeza" del "Ajo" y cada uno por separado, se halla envuelta en una túnica blanca o rojiza.

Los bulbillos o dientes se hallan recubiertos por envolturas o cáscaras rosadas, blancas o moradas según la variedad; que los mantiene adheridos, impidiendo el desgranamiento, factor importante para la exportación del producto, los dientes periféricos son arqueados y de mayor tamaño que los del centro (PALACIOS, R., 1998).

El fruto es una cápsula que contiene 1 ó 2 semillas por comportamiento es una especie que normalmente florece en climas templados, pero sobre todo aunque florezca difícilmente forma semillas, si bien en la umbela aparecen numerosos bulbillos (MAROTO, B., 1983).

1.1.-TAXONOMIA.

GARCIA, B., (1990), Menciona como la mejor clasificación a Engler y dice; El Allium sativum pertenece taxonómicamente a la familia LILIACEAE, sub familia ALLIOIDEAE. La descripción sobre la ubicación taxonómica de este cultivo en cuanto a la familia a la que pertenece radica en la estructura de la flor.

Reino	:	Vegetal
División	:	Fanerógamas
Sub - división	:	Angiospermas
Clase	:	Monocotiledones
Orden	:	Liliflorales
Familia	:	Liliaceas

Sub - familia : Alliodeas
Género : Allium
Especie : Sativum.

1.2.-VARIEDADES.

Las variedades cultivadas se puede considerar prácticamente como nacionales, estando divididas en forma general en 2 grupos; "Ajo Arequipeño" y "Ajo de la Costa", el primero es el mas cultivado; da bulbos de buen tamaño, bien compactos como bastante uniformes. La variedad denominado "Ajo criollo" o Napuri de mas ó menos 6 meses de periodo vegetativo, presenta un bulbo un tanto achatado, compuesto de 1 a 15 dientes redondeados y bastante simétricos forma una cabeza regular; rara vez se presenta dientes montados (MORIN Y HOLLE, 1969).

En nuestro país, el "Ajo" fue introducido hace muchos años y las variedades cultivadas son conocidas con diversos nombres locales. (DELGADO, D., 1988), menciona que en el Perú existen aproximadamente 6 cultivares los cuales son "Morado Arequipeño", de buena conservación, tiene aproximadamente 20 dientes por bulbo, su diámetro promedio es de 50 mm, tiene rendimiento que oscilan entre 6.5 y 9.8 TM/ha. "Napuri" ss de color violáceo y de buena conservación tiene aproximadamente 12 -15 dientes redondeados y simétricos en cada bulbo su diámetro promedio es de 40 mm y tiene un rendimiento que Oscilan entre 7-12 TM/ha.

2.-USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS

A lo largo de la historia el "Ajo" viene siendo utilizado para fines terapéuticos ;

Hipócrates el padre de la Medicina, usaba el "Ajo" como diurético, laxante y contra la lepra. Aristóteles recomendaba el "Ajo" para que los atletas aumentaran su resistencia física en las competencias deportivos y el Poeta Virgilio decía que el "Ajo" aumentaba el vigor de los que realizaban trabajos pesados, Paracelso consideraba el "Ajo" una planta sagrada. El Dr. Paavo Airola, autor del libro "El Milagro del Ajo" que desde hace años realizaba experiencias con el Ajo, señala otras utilidades: "He usado el "Ajo" con éxito en el tratamiento de pacientes con disentería, dispepsia, bronquitis, fermentación intestinal ,presión alta y parásitos intestinales". Al "Ajo" se le atribuye efectos benéficos contra la anemia, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del Aparato respiratorio, presión alta y como eliminador de toxinas (CIRCULMAR 1997).

Tópicamente se usa en compresas y cataplasmas para tratar afecciones de la piel (escrúfulas, piodermia, úlcera, tiña, leucorrea, reumatismo, vaginitis, induraciones, verrugas y tumores), se aplica como ungüento para eliminar callosidades (CACERES, A., 1996).

3.- COMPOSICIÓN QUÍMICA , PROPIEDADES Y TOXICIDAD.

El bulbo contiene aceite volátil sulfurado (33 compuestos como di. tri y tetrasulfuro), mucílago, esteroides, (aliína, alicina), glucósidos (fructosanas), fosfolípidos, vitaminas (A,B,C), nicotilamida, 17 aminoácidos (derivados de cisteína y cisteinglicina) y antocianinas (glucósidos 3 de cianídina) (CACERES,A., 1996).

La Aliína es el compuesto que proporciona el sabor del Ajo crudo y sus propiedades antibióticas que lo hacen altamente preciado. El aroma característico

de la planta del "Ajo" se debe a un aceite esencial (0.10-0.20 % de esencia en peso) en que su composición incluye el disulfuro de alilo, el trisulfuro de alilo y el disulfuro de propilo (GARCIA, A., 1990).

El principio con actividad antimicrobiana es la aliína que por la acción de la aliínasa se convierte en alicina, disulfuro de alilo y Ajoene que es un producto de auto condensación de alicina con actividad virucida, el orden que se presenta dicha actividad es ajoene > alicina > alilmetil tiosulfonato, además puede usarse como modelo de quimioterapia antifúngica.

También se atribuye la actividad antimicrobiana a la alixina y la garlicina que se obtienen por tratamientos severos del bulbo, aunque existen dudas de su existencia en forma natural (CACERES, A., 1996).

El jugo y el aceite pueden ser irritantes de las mucosas y conjuntiva . El extracto etanólico no tiene actividad mutagénica en S. Typhimurium TA98 Y TA102. La administración oral no produce efecto genotóxico medido por la prueba del micronúcleo en la médula ósea y por inducción de cambios en las cromátidas hermanas en la espermatogénia del ratón, por el uso tradicional prolongado en alimentación y medicina, podría decirse que el consumo de cantidades moderadas no representa ningún riesgo para la salud (CACERES, A.,1996).

4.- CLASIFICACION TAXONOMICA DEL Cryptococcus neoformans.
ORDOÑES, Y CASTAÑEDA, (1995) Menciona La clasificación actual basándose en las características observadas en el estado amorfo y telemorfo del hongo.

Reino	: Hongos
División	: Amastigomycota
Sub- división	: Deuteromycotina
Clase	: Deuteromycetes
Sub- clase	: Blastomyceditae
Orden	: Cryptococcales
Género	: <u>Cryptococcus</u>
Especie	: <u>Cryptococcus neoformans</u>

5.- MORFOLOGIA

El Cryptococcus neoformans es un hongo esférico que se reproduce por brotación. Los brotes a veces son múltiples y de diferentes tamaños y están adheridos a la célula madre por una delgada pared que fácilmente se rompe dejándolos libres. (ZAPATER, R., 1981).

La morfología no es constante y cambia, según la edad de la levadura, mide de 3 a 5 um de ancho por 5 a 10 um de largo, tamaño que dependen según el medio ambiente donde se desarrolla (WILLIAMS, W., 1980).

La pared celular es rígida y está formada por glucanas o mananas muy ramificadas, asociadas con proteínas también contienen quitina, no presentan celulosa. algunas levaduras tienen cápsulas pegajosas formadas de heteropolisacáridos (ORDOÑES, Y CASTAÑEDA, 1995).

El glucurono-xilo-manosan capsular de Cryptococcus neoformans tiene una estructura ramificada en la cual una cadena lineal de polimánosa con ligaduras alfa-1,3 es sustituida en las posiciones C-2 por ácido glucorónico o xilosa de

uniones beta - glucosídicas, con predominio de la xilosa (ABRAHAM, Y BRAUDE, 1984).

El estudio antigénico del polisacárido capsular de Cryptococcus neoformans permitió su agrupación en 4 serotipos: A, B, C, Y D. La var serotípica AD se corresponde con variedad neoformans y el BC se corresponde con la variedad gatii (JAWETZ, E., 1992).

Cryptococcus neoformans, es parecido a las levaduras y tiene forma ovalada, apareciendo en los excrementos de las aves. Si se inhala puede provocar varias formas de enfermedad, incluyendo una infección de la meninges que afecta al cerebro (COLLE, J. 1978).

Existen diferencias entre las dos variedades, tanto desde el punto de vista patogénico como de distribución geográfica, de tal forma que Cryptococcus neoformans var. neoformans se ha relacionado con la infección en los pacientes inmunodeprimidos, siendo de distribución mundial, mientras que el Cryptococcus neoformans var. gatii se ha descrito en infecciones de paciente inmunocompetentes y su distribución está más restringida a países tropicales y sub tropicales (ESTRELLA, Y ANASTASIO, 2001).

6.-HABITAT

En 1995, Emmons demostró una estrecha relación entre Cryptococcus neoformans y las excretas de palomas. En su trabajo este investigador comprobó que los suelos de los cuales había aislado el hongo estaban en sitios próximos a nidos de palomas y que el guano de las aves era un adecuado medio de cultivo para el hongo (ORDOÑEZ, Y CASTAÑEDA, 1995).

7.-TIPOS CLINICOS DE INFECCION EN EL HOMBRE.

Los pacientes que se presentan con signos y síntomas crónicos e intermitentes de meningitis en general insidiosos al comienzo, deben hacerse sospechar criptococosis. En la actualidad el Cryptococcus neoformans ocupa el cuarto lugar entre las causas más comunes de infecciones con riesgo para la vida en pacientes con SIDA (GUERSI, A., 1985).

Las lesiones de la piel se presentan como pápulas pústulas acneiformes o abscesos que se ulceran. La criptococosis pulmonar puede comenzar de una manera brusca, con fiebre de 39 °C y tos aparentando una "influenza", o bien hacerse crónica como una bronquitis la diseminación de la enfermedad es a través de la vida respiratoria y radiológicamente pueden aparecer imágenes de infiltración en la parte inferior del pulmón. En ocasiones los infiltrados son peribronquiales y semejan una tuberculosis (ZAPATER, R., 1981).

Este hongo posee características únicas entre las micosis generales del hombre por que está muy encapsulado en el tejido, cuyo cápsula polisacárida libera en el huésped el antígeno soluble que proporciona un medio de diagnóstico serológico (CECIL, L., 1977).

La infección por Cryptococcus neoformans se adquiere por inhalación de las levaduras desecadas (menor de 3 ug existentes en la naturaleza, cuyo patogenicidad viene determinada por la cápsula que impide la fagocitosis y la actuación del complemento y por la enzima fenil- oxidasa que contribuye al especial neotropismo del hongo. Cuando el criptococo llega a los alvéolos pulmonares se desencadena una respuesta de la inmunidad celular y humoral del

huésped, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección (ESTRELLA, ANASTASIO, Y FERRERO, 2001).

Los síntomas de Criptococosis en el hombre comienza por cefalea insidiosa y después hay náuseas, vómitos, visión borrosa o disminución de las capacidades mentales, que gradualmente el paciente se hace letárgico y prefiere que no se le moleste (CECIL, L., 1977).

8.-TIPOS CLINICOS DE INFECCION EN EL ANIMAL

Cryptococcus neoformans ha sido diagnosticado en muy diversas razas de perros, pero el grán Danes y el Dóberman Pinscher son razas caninas en la que la Criptococosis se ha diagnosticado con mayor frecuencia, cuyo contagio se realiza habitualmente por la vía respiratoria, habiéndose incluso aislado de fosas nasales de perros asintomáticos (ACOSTA, Y ALVAREZ, 1999).

II.-MATERIALES Y METODO

1.-RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

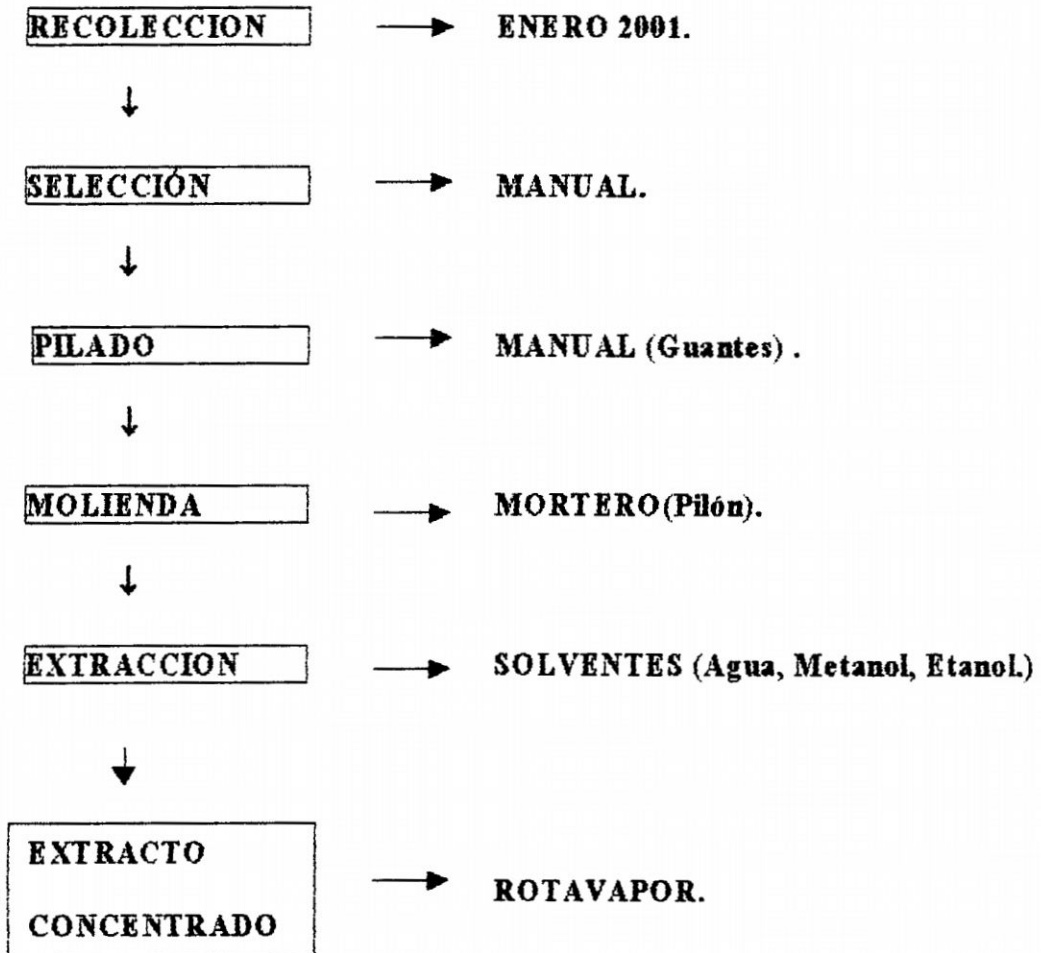
El bulbo de Allium sativum "Ajo", fue recolectada en el Instituto Nacional de Investigación Agraria -Ayacucho a 2720 m.s.n.m. en bolsas de polietileno durante el mes de enero de año 2001 aproximadamente medio kilo y seleccionado por cada variedad **Chuschi, Napuri, y Arequipeña.**

Estas variedades fueron llevadas para procesar al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

El bulbo del "Ajo" previamente peladas, se colocaron en un mortero de porcelana debidamente lavada y desinfectada y se procedió a su molienda utilizándose un pilón de porcelana, obteniéndose partículas diminutas, aceitosas y/o untuosa.

En el siguiente Esquema N° 01 muestra el proceso de recolección y preparación del Allium sativum "Ajo".

**ESQUEMA N° 01: RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA
ANTIFUNGICA.**



2. -OBTENCION DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS .

La concentración del extracto se realizó con los siguientes solventes; Agua, Etanol, Metanol.

2.1.-OBTENCION DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO.- Se pesó 150 g. de "Ajo" molido, variedad **Chuschi** y se añadió 600 ml. de etanol al 60%, se dejó macerar por dos semanas para luego filtrar con la ayuda del papel filtro, luego se llevó al rotavapor a una temperatura de 30°C, haciendo girar el balón suavemente con un vacío constante con 50 rpm. Hasta obtener 20 ml. de extracto concentrado, guardándose en refrigeración para los ensayos correspondientes.

Esta misma medida y procedimiento se llevó acabo con la variedad **Arequipeña y Napuri**.

2.2.-OBTENCION DEL EXTRACTO ACUOSO.- Se pesó 150 g. De "Ajo" molido, variedad **Chuschi** para luego añadir 600 ml de agua destilada se, dejó macerar por una semana para luego filtrar con la ayuda del papel de filtro hacia un recipiente, luego se llevó al rotavapor a una temperatura de 40°C, haciendo girar el balón suavemente con un vacío constante con 70 rpm hasta obtener 15 ml del extracto concentrado, este mismo medida y procedimiento se llevó a cabo con la variedad **Napuri y Arequipeña** .

2.3.-OBTENCION DEL EXTRACTO METANÓLICO.- Se pesó 150 g. de "Ajo" molido, variedad **Chuschi**, para luego añadir 600 ml de agua destilada, se dejó macerar por una semana para luego filtrar con la ayuda del papel de filtro hacia un recipiente, luego se llevó al rotavapor a una temperatura de 20 °C, haciendo girar el balón suavemente con un vacío constante con rpm., hasta obtener 20 ml del extracto concentrado. Esta misma medida y procedimiento se

llevó acabo con la variedad **Napuri y Arequipeña.**

3.-METODOLOGIA PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIFUN- GICA.

3.1.-PREPARACION DE LA CONCENTRACION DEL EXTRACTO.

Se trabajó con extracto concentrado sin diluir (100% puro), inoculando solamente 0.1 ml a cada excavación. Luego una cantidad de alicuotas de muestra del extracto de ajo (10 ml), se vertió a un frasco que contenía 100 ml. de agua destilada, luego se procedió a realizar concentraciones a 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, respectivamente, que sirvió para determinar la actividad antifúngica.

3.2.-DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL KETOCONAZOL.- Se obtuvo de la farmacia tabletas de 200 mg de ketoconazol luego se disolvió en 250 ml de agua destilada para luego realizar las diversas diluciones de acuerdo a la recomendación por el National Committee For Clinical Laboratory Standars (NCCLS), (BAVA, Y NEGRONI, 1995).

3.3.-PREPARACION DE Cryptococcus neoformans .- Para rejuvenecer la cepa se repicó a Agar Saboraud contenido en un vial, se incubó a una temperatura de 30°C por 72 h. después de este tiempo se observó las características de las colonias lisas mucoides, blanco, pasado las 48 h. se procedió a seleccionar 4 a 5 colonias para luego inocular a un tubo de prueba que contiene 5ml de Caldo Saboraud a 28°C por 24 h. que al final hay una turbidez de 0.5 según la escala de Macfarland.

3.4.- OBTENCION DE HALOS DE INHIBICION POR METODO DE

DILUCION EN PLACA.-Una vez licuado 100 ml de Agar Saboraud a una temperatura de 45 °C, se vertió a cada una de las placas 20 ml. de Agar mas 1ml. de solución homogeneizada del hongo, se dejó reposar hasta que tome la consistencia adecuada, seguidamente se hizo los agujeros de 10mm con la ayuda de un sacabocados de acero, teniendo ya las excavaciones en el Agar se procedió a añadir 0.1ml de los diferentes extractos a diferentes concentraciones en las excavaciones realizadas. Dejándose difundir por una hora, para luego incubar las placas a 30 °C. por 24-48 h., para de esta manera observar los halos de inhibición y ser medidos con una regla Vernier.

3.5.-DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE INHIBICION

$$\% \text{ DE INHIBICION} = \frac{\text{Halo de Inhibición del Extracto}}{\text{Halo de Inhibición Control}} \times 100$$

4.-DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA Y LA CONCENTRACION FUNGICIDA MÍNIMA.

Se realizó mediante el método de: dilución en Agar, utilizándose extractos de concentración al 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% y 40%.

4.1.-DILUCION EN AGAR.- Consistió en preparar diluciones decrecientes de los extractos del Allium sativum "Ajo", para luego agregar 1ml. de las diluciones a cada recipiente con medio Agar Saboraud, que finalmente se plaqueó y se inoculó una gota homogeneizada de suspensión de Cryptococcus neoformans. con una placa mas de control sin extracto.

III.- RESULTADOS

**CUADRO N° 01: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS
DEL Allium sativum SOBRE Cryptococcus neoformans.**

EXTRACTO AL 100%	VARIEDAD	ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SOBRE <u>Cryptococcus neoformans</u>
ACUOSO	Chuschi	+
	Napuri	-
	Arequipaña	-
ETANOLICO	Chuschi	+
	Napuri	+
	Arequipaña	+
METANOLICO	Chuschi	+
	Napuri	+
	Arequipaña	+

Leyenda:

(+) presenta actividad antifúngica

(-) no presenta actividad antifúngica

CUADRO N° 02: CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACION FUNGICIDA MINIMA DEL KETOCONAZOL FRENTE A Cryptococcus neoformans (Metodo dilución en Agar).

PLACA	KETOKONAZOL ug/ml	TIEMPO (72 h.)
1	100	-
2	80	-
3	10(CFM)	-
4	8 (CMI)	-
5	1	+
6	0.8	+
7	0.1	+
8	0.01	+

Leyenda:

(CMI) Concentración Mínima Inhibitoria.

(CFM) Concentración Fungicida Mínima.

**CUADRO N° 03: CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA Y LA
CONCENTRACION FUNGICIDA MINIMA DE LOS EXTRACTOS DEL
Allium sativum FRENTE A Cryptococcus neoformans**

(Método de Dilución en Agar)

EXTRACTO	VARIEDAD	CRECIMIENTO (72 hrs.)						
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
		100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%
ACUOSO	Chuschi	-	-	+	+	+	+	+
	Napuri	+	+	+	+	+	+	+
	Arequipeña	+	+	+	+	+	+	+
ETANOLICO	Chuschi	-	-	-	-	-	-	+
	Napuri	-	-	-	-	+	+	+
	Arequipeña	-	-	+	+	+	+	+
METANÓLICO	Chuschi	-	-	-	-	+	+	+
	Napuri	-	-	+	+	+	+	+
	Arequipeña	-	-	+	+	+	+	+

Leyenda:

No tiene crecimiento a esa concentración : (-)

Tiene crecimiento a esa concentración : (+)

Concentración fungicida mínima (Chuschi) : (-) 60%

Concentración mínima inhibitoria (Chuschi): (-) 50%

CUADRO N° 04: HALOS DE INHIBICION AL SER ENFRENTADO AL HONGO Cryptococcus neoformans CON EL EXTRACTO ACUOSO AL 100% DEL Allium sativum "Ajo".

HONGO	ESTANDAR	EXTRACTO ACUOSO		
	Ketoconazol 8ug/ml	Chuschi	Napuri	Arequipeña
<u>Cryptococcus</u>	2.6	1.1	1.1	1.2
<u>neoformans</u>	2.4	1.4	1.2	1.1
	2.5	1.2	1.2	1.1
PROMEDIO	2.5	1.23	1.17	1.13

Suma de rangos: 12.0 7.0 6.0 5.0

Diferencias entre grupos mediante el test de Friedman.

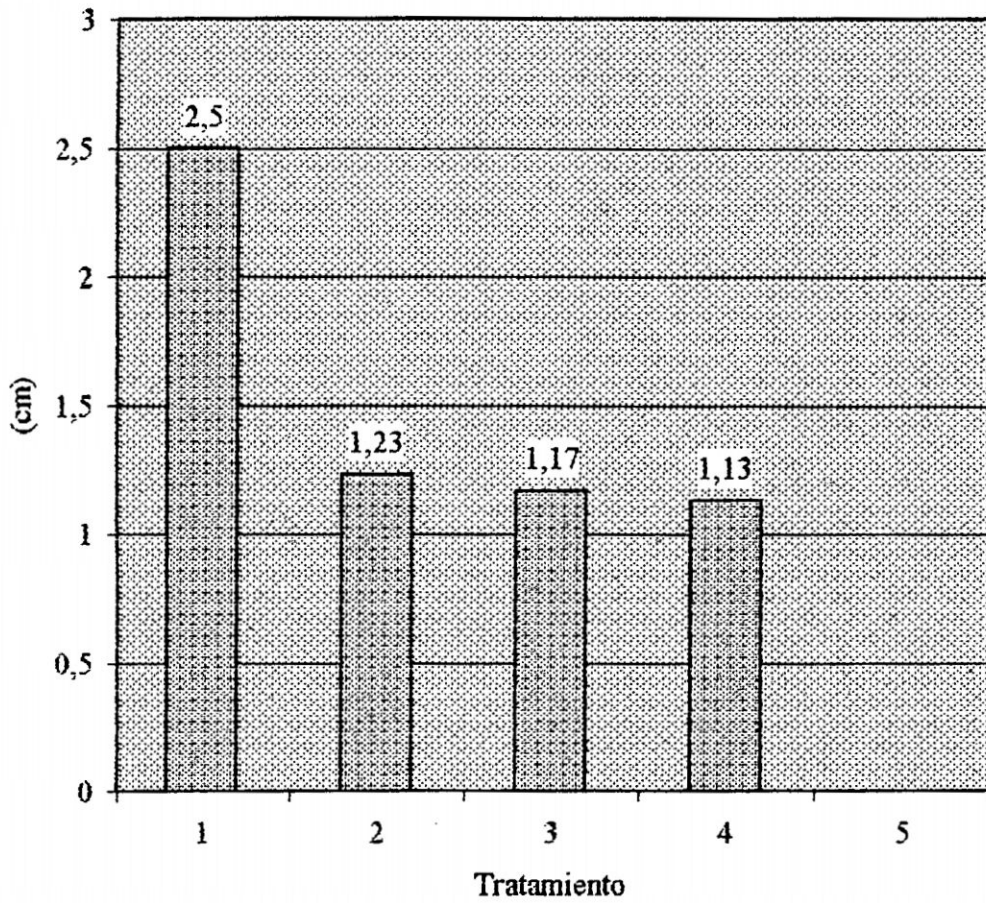
S = 5.80

p = 0.122

S = 6.21

p = 0.102 (Adjusted for ties).

GRAFICA N° 01: PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICION EN (cm) DEL EXTRACTO ACUOSO



Leyenda:

- 1.-Ketoconazol.
- 2.-Variedad **Chuschi**.
- 3.-Variedad **Napuri**.
- 4.-Variedad **Arequipeña**.

CUADRO N° 05: HALOS DE INHIBICION AL SER ENFRENTADO AL HONGO *Cryptococcus neoformans* CON EL EXTRACTO METANOLICO AL 100% DEL *Allium sativum*

HONGO	ESTANDAR	EXTRACTO METANOLICO		
	Ketoconazol 8ug/ml	Chuschi	Napuri	Arequipena
<u>Cryptococcus</u>	2.6	1.8	1.2	1.4
<u>neoformans</u>	2.4	1.9	1.5	1.3
	2.5	2.0	1.1	1.3
PROMEDIO	2.5	1.9	1.23	1.3

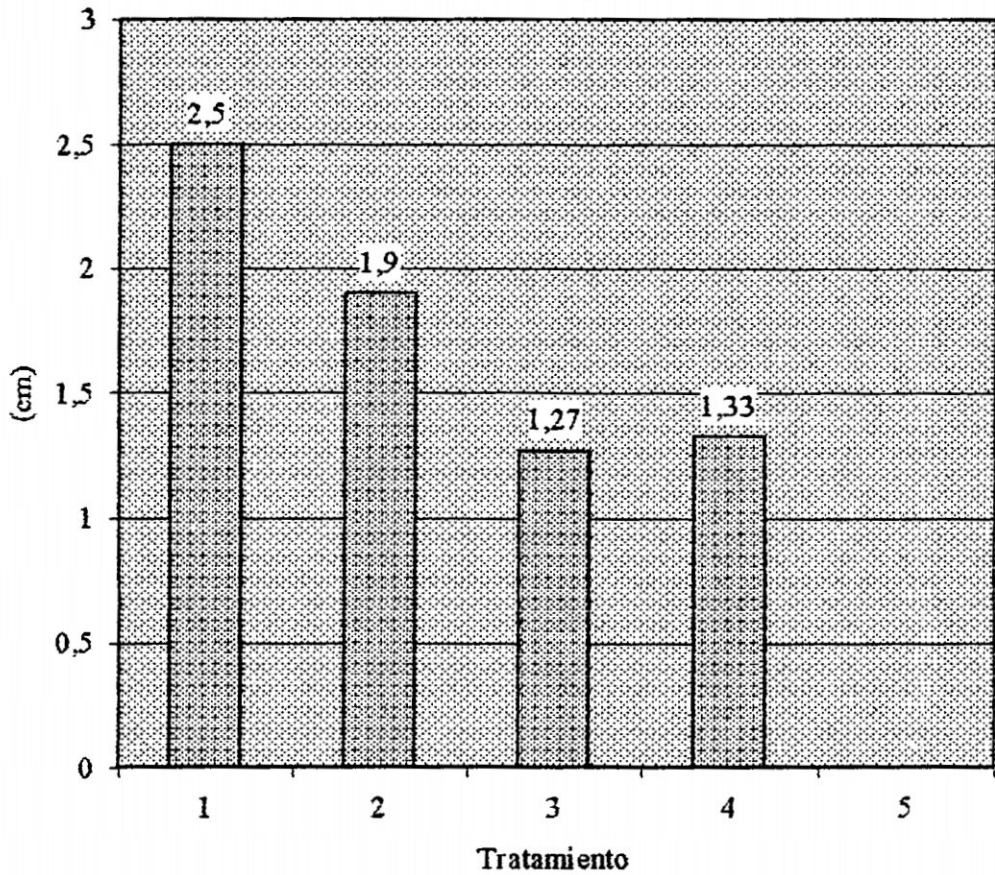
Suma de rangos: 12 9.0 4.0 5.0

Diferencias entre grupos mediante el test de Friedman.

S = 7.40

P = 0.042

GRAFICA N° 02: PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICION EN (cm) DEL EXTRACTO METANOLICO.



Leyenda:

- 1.- Ketoconazol
- 2.- Variedad **Chuschi**
- 3.- Variedad **Napuri.**
- 4.- Variedad **Arequipaña.**

CUADRO N° 06: HALOS DE INHIBICION AL SER ENFRENTADO AL HONGO Cryptococcus neoformans CON EL EXTRACTO ETANOLICO AL 100% DEL Allium sativum.

HONGO	ESTANDAR	EXTRACTO ETANOLICO		
	Ketoconazol 8ug/ml	Chuschi	Napuri	Arequipena
<u>Cryptococcus neoformans</u>	2.6	2.5	1.5	1.4
	2.4	2.9	1.3	1.2
	2.5	2.5	1.3	1.4
PROMEDIO	2.5	2.5	1.4	1.3

Suma de rangos: 11.0 10.0 5.0 4.0

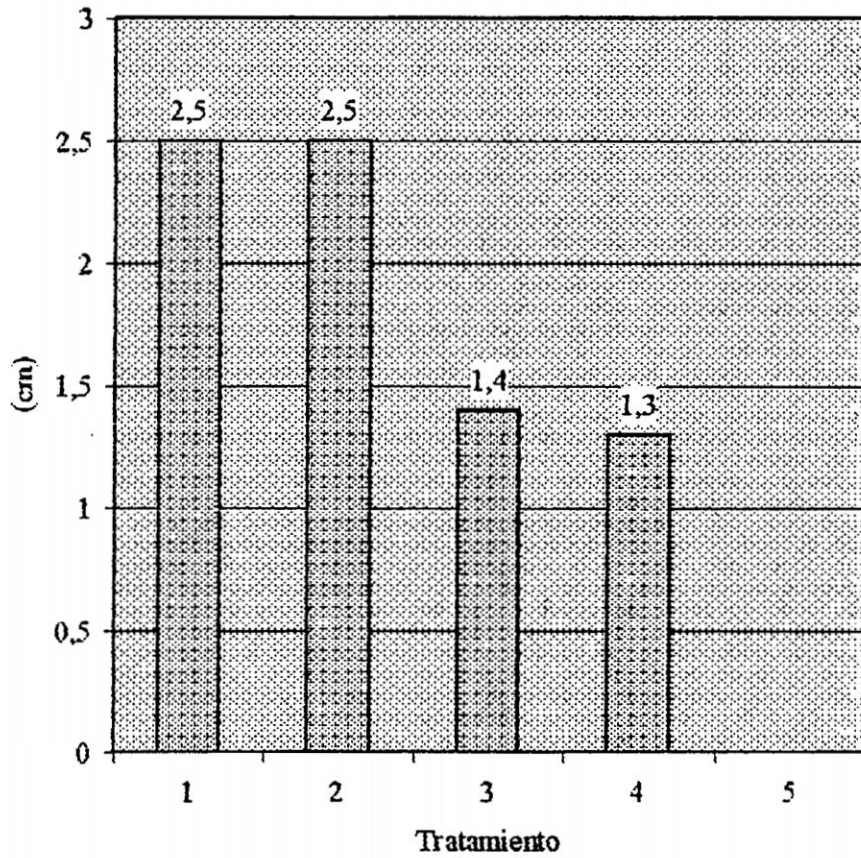
S = 7.40

P = 0.060

S = 7.93

P = 0.048 (Adjusted forties).

GRAFICA N° 03: PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICION EN (cm) DEL EXTRACTO ETANOLICO.



Leyenda:

1.- Ketoconazol.

2.- Chuschi.

3.- Napuri.

4.- Arequipeña

CUADRO N° 07: HALOS DE INHIBICION AL SER ENFRENTADO AL HONGO Cryptococcus neoformans CON LOS EXTRACTOS AL 80% DEL Allium sativum "Ajo".

a)

HONGO	ESTANDAR	EXTRACTO ACUOSO		
	Ketoconazol 8ug/ml	Chuschi	Napuri	Arequipena
<u>Cryptococcus</u>	2.6	1.1	1.0	1.1
<u>neoformans</u>	2.4	1.0	1.0	1.0
	2.5	1.0	1.1	1.0
PROMEDIO	2.5	1.03	1.03	1.03

S= 5.70

P=0.127

S= 8.14

P= 0.043 (adjusted for ties)

Tratamiento	Estimación Media	Suma de Rangos
1	2.500	12.0
2	1.000	6.5
3	1.000	5.
4	1.000	6.5
Grand Median =	1.375	

b)

HONGO	ESTANDAR	EXTRACTO METANOLICO		
	Ketoconazol 8ug/ml	Chuschi	Napuri	Arequipena
<u>Cryptococcus</u>	2.6	1.6	1.1	1.2
<u>neoformans</u>	2.4	1.5	1.0	1.2
	2.5	1.4	1.1	1.1
PROMEDIO	2.5	1.5	1.03	1.17

S = 8.50

P=0.037

S= 8.79

p= 0.032 (adjusted for ties).

Tratamiento	Estimación Media	Suma de Rango
1	2.4750	12.0
2	1.4750	12.0
3	1.0250	3.5
4	1.1250	5.5
Grand median =	1.5250	

c)

HONGO	ESTANDAR	EXTRACTO ETANOLICO		
	Ketoconazol 8ug/ml	Chuschi	Napuri	Arequipaña
<u>Cryptococcus</u>	2.6	2.2	1.3	1.3
<u>neoformans</u>	2.4	2.0	1.3	1.2
	2.5	2.0	1.3	1.3
PROMEDIO	2.5	2.06	1.3	1.26

S= 8.20

P=0.042

S= 8.79

P=0.032 (adjusted for ties).

Tratamiento	Estimación Media	Suma de Rangos
1	2.5500	12.0
2	2.0250	9.0
3	1.2750	5.0
4	1.2500	4.0
Gran median	= 1.7750	

**TEST DE FRIEDMAN, FORMA GENERAL DEL EXTRACTO
CONCENTRADO AL 100%.**

S= 19.8

P= 0.00072

Tratamiento	Estimación Media	Suma de Rangos
1	2.50	35
2	1.86	26
3	1.26	15
4	1.26	14

CUADRO N° 08: HALO DE INHIBICION AL SER ENFRENTADO AL HONGO Cryptococcus neoformans CON EL ESTANDAR DE KETOCONAZOL.

CONCENTRACION	PROMEDIO DE 5 HALOS DE INHIBICION (cm)
10 ug/ml	2.5

CUADRO N° 09: PORCENTAJE DE INHIBICION DE LOS EXTRACTOS AL 100% DEL Allium sativum FRENTE AL HONGO Cryptococcus neoformans.

EXTRACTO	VARIEDAD		
	Chuschi	Napuri	Arequipena
Acuoso	48%	48%	44%
Metanólico	76%	52%	52%
Etanólico	98%	56%	52%
PROMEDIO	74%	52%	49.3%

El **Porcentaje de Inhibición** es mayor que 25% por lo que todas son activas (+).

CUADRO N° 10: PORCENTAJE DE INHIBICION DE LOS EXTRACTOS AL 80% DEL Allium sativum FRENTE AL HONGO Cryptococcus neoformans

EXTRACTO	VARIEDAD		
	Chuschi	Napuri	Arequipeña
Acuoso	4.1%	4%	4.1%
Metanólico	58.4%	42.4%	46.4%
Etanólico	84%	56%	54%
PROMEDIO	48.7%	34.2%	34.7%

El **Porcentaje de Inhibición** mayor que 25% es activo (+), menores a este porcentaje son inactivas.

IV.- DISCUSION

No existen trabajos específicos referentes a la actividad antifúngica de las variedades **Napuri**, **Chuschi** y **Arequipeña** del Allium sativum "Ajo" sobre Cryptococcus neoformans por lo que en la presente investigación nos limitamos solamente al análisis y comentarios de los resultados.

El nivel de popularidad que alcanzó el Allium sativum "Ajo" de unos años hasta hoy en el mundo es muy alto. Sin embargo en nuestro país, particularmente en nuestra provincia y en los pueblos más alejados, la mayor parte de la población a un no saben valorar las propiedades medicinales del Allium sativum, "Ajo" por lo que es un deber nuestro investigar y empezar a revalorizar sus propiedades terapéuticas.

En el cuadro N° 01: se presentan los resultados de la actividad antifúngica de los diversos extractos de las tres variedades de Allium sativum "Ajo" frente al hongo Cryptococcus neoformans en el cual se observa que los extractos acuoso, metanólico y etanólico presentan actividad antifúngica, excepto el extracto acuoso de la variedad **Napuri** y **Arequipeña**.

Al observar estos resultados con efectos significativos del extracto de la variedad **Chuschi**, se puede presumir que contiene un mayor porcentaje de aliína y sus productos de transformación respecto a los demás variedades, por lo que hace mención también sobre el "Ajo" (CACERES,A, 1996).

AMAGASE, PETESCH, Y MATSUURA, 2001) mencionan, que la droga pulverizada secada cuidadosamente, contiene alrededor de 1 % de aliína [(+) -S- alil - L- cisteína sulfóxido], como el compuesto Sulfurado principal, otros constituyentes característicos son (+) - S - metil - L - cisteína sulfóxido, gamma - L - glutamil péptidos, S - alil - cisteína, aminoácidos, esteroides y adenosina. En presencia de la enzima aliinasa, la aliína se convierte en alicina (1mg de aliína se considera equivalente a 0.45 mg de alicina), la alicina es precursor de varios productos de transformación incluidos ajoene vinilditiinos, oligosulfuros y polisulfuros, dependientes de las condiciones aplicadas.

(GARCIA, R., 1987) Que la la alicina como el componente antimicótico principal del "Ajo" frente a varias cepas de *Aspergillos*, *Candida albicans* y diversos dermatofitos comparando su actividad antimicótica con diversos fármacos.

El ajoeno y el dialil- trisulfuro también tienen actividad antibacteriana y antifúngica (WHO 1999).

En el Cuadro N°02 : se Presentan los resultados del estudio de la concentración fungicida y fungistática del ketoconazol frente al hongo *Cryptococcus neoformans* realizado mediante el método de dilución en Agar. *Cryptococcus neoformans* es sensible frente al antimicótico ketoconazol a una concentración de 8ug/ml, siendo esta la concentración mínima inhibitoria(CMI)

y a una concentración de 10ug/ml se determinó la placa concentración mínima fungicida (CMF).

BAVA Y NEGRONI (1995), realizaron un trabajo de investigación, en la cual prueban cinco drogas antimicóticos a cepas de Cryptococcus neoformans Var. *Neoformans* aislados del medio ambiente, encontrando los siguientes resultados; los valores máximo y mínimo de concentración mínima inhibitoria para ketoconazol (3.12- 12.5ug/ml), y para itroconazol (0.78-3.12ug/ml), siendo los valores máximos y mínimos de (CM1).

La sensibilidad frente al antimicótico se hizo cuando el hongo en estudio se encontraba en su fase exponencial de crecimiento debido a que en esta fase hay una mayor sensibilidad a los efectos adversos del ambiente, facilitando a los antifúngicos paso a través de la barrera celular a los demás. Estos resultados son esperados pues el ketoconazol es un producto químicamente puro con cualidades antifúngicas definidas y con el cual se comparan extractos de las diferentes variedades de Allium sativum "Ajo". Este es un producto natural donde el compuesto activo con actividad antifúngica se encuentra diluido, mezclado con gran cantidad de otras sustancias que componen el producto en estudio, por lo que su acción debe ser menor que el ketoconazol.

El ketoconazol actúa por la alteración de la permeabilidad de la membrana celular del hongo, por que interfiere la biosíntesis de los esteroides, es posible que actúe también por inhibición de la demetilación del lanosterol en ergosterol. (BERGOGLIO,B., 1993).

En el tratamiento etiológico de criptococosis pueden resultar efectivos,

distintos antifúngicos, entre estos el ketoconazol ocupa un lugar a tener en cuenta bien solo o asociado con otros agentes antifúngicos, además de ser tolerado en tratamientos prolongados. Este tratamiento debe ser continuado hasta que se llegue a un diagnóstico negativo. (ACOSTA, Y ALVAREZ, 1999).

En el cuadro N° 03: se Presentan los resultados del estudio de la concentración mínima inhibitoria y la concentración fungicida mínima de las tres variedades de Allium sativum "Ajo" frente al hongo Cryptococcus neoformans realizado mediante el método dilución en Agar, observándose un mayor rendimiento con el extracto etanólico, seguidas de las realizadas con el extracto metanólico, mientras que las realizadas con el extracto acuoso presentaron menor efecto inhibitorio, como se observa en los resultados de la actividad antifúngica, el mejor disolvente para el "Ajo" es el etanol, ya que el 60% de concentración del extracto, tiene la concentración fungicida mínima (CFM) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) es de 50% del extracto, mientras los demás extractos son activos al 100% esto solamente con la variedad **Chuschi**. Todo esto sugiere que la mayor parte de los componentes y posiblemente los principios activos del extracto etanólico variedad **Chuschi**, se encuentra en esta fracción polar.

Con relación a la propiedad inhibitoria de la variedad **Napuri** y **Arequipeña** se obtuvieron resultados negativos; con el extracto Acuoso no tuvo actividad contra Cryptococcus neoformans, lo que comprueba que los principios activos no se encuentran en esta fracción polar.

Estos resultados son interesantes y alentadores, sin embargo son insuficientes para validar el uso de estos extractos vegetales en el tratamiento de los Cryptococosis para sugerir ensayos terapéuticos con la planta es necesario

conocer exactamente la molécula responsable de la actividad, así como sus propiedades fármaco dinámicas tomando en cuenta el escaso recurso disponible en la Facultad de Ciencias Biológicas para la elucidación estructural de productos naturales, se hace una tarea difícil en las condiciones actuales .

No todos los principios activos se conservan después de una extracción ya sea mediante la utilización de solventes orgánicos o una simple extracción por decocción pues los principios activos se transforman en sustancias que no cuentan con acción terapéutica (MARCANO, E.,1992).

En un estudio in vitro realizado por el Instituto de Medicina Tropical (1998) , Cryptococcus neoformans fue mas sensible que Candida albicans frente a la anfotericina B, sólo fue encontrada una cepa resistente perteneciente a la especie Candida krusci.

El tamizaje fitoquímico sirve para orientar sobre la relación bioactividad, estructura, aunque no se encontró ningún patrón especial. Se concluye que las plantas medicinales estudiadas y que tienen actividad interesante, se recomienda ampliar las investigaciones tendientes a validarlas científicamente (AGENCIA DE COOPERACION INTERNACIONAL DE JAPON 1996).

(MEDINA, M., 1993). determinó el efecto antimicrobiano del Allium sativum "Ajo" sobre bacterias patógenas, mostrando mayor potencia antibiótica en comparación a los patrones utilizadas tales como la tetraciclina, ampicilina, y cloranfenicol

En el Cuadro N° 04 .- se estudiaron las diferencias entre grupos de los tres tratamientos Chuschi, Napuri, Arequipeña.

Al aplicar el test de Friedman para estudiar el comportamiento de los cuatro tratamientos frente a Cryptococcus neoformans en particular, notamos la presencia de una diferencia significativa con el extracto metanólico (60%), en las variedades **Chuschi, Napuri y Arequipeña** y el control ketoconazol, no hay diferencias significativas con el extracto etanólico (60%), al aplicar las variedades **Chuschi, Napuri, Arequipeña**.

En el Cuadro N° 05: hay diferencia significativa entre los tratamientos

En el cuadro N° 06: no hay diferencias significativas entre los tratamientos de las tres variedades y el ketoconazol.

En el Cuadro N° 07: al aplicar la prueba de Friedman Ajustada existen diferencias significativas de los cuatro tratamientos. El test de Friedman, de forma general, muestra que existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos ketoconazol, variedad **Chuschi, Napuri, Arequipeña**, por lo que cada uno se comporta de manera diferente.

En el cuadro N° 09: se muestran los resultados de los porcentajes de inhibición obtenidas al ser comparadas los halos de inhibición de los extractos del Allium sativum "Ajo" con el ketoconazol. No obstante al analizar la tabla N°09 del extracto al 100% se obtuvo porcentajes de inhibición del 98.6% de la variedad **Chuschi** (etanólico), mientras el extracto variedad **Napuri, Arequipeña**, (etanólico), mostraron porcentajes de inhibición de 76% y con la variedad **Napuri, Arequipeña** se obtuvo 52%, lo cual indica una considerable actividad antifúngica, el extracto acuoso variedad **Chuschi, Napuri, Arequipeña** mostró el porcentaje de inhibición de 48% y 44% respectivamente y que muestra una actividad poco eficiente.

Cuando se trabajó con extracto concentrado al 80% tabla N°10 solamente fue activo y antifúngico, el extracto etanólico de las variedades **Chuschi**, **Napuri**, **Arequipaña** con un porcentaje de inhibición de 84%, 52%, 54%, respectivamente los demás se comportaron con menor o ninguna de actividad inhibitoria.

V.- CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1.- Las variedades estudiadas de Allium sativum "Ajo" mostraron actividad antifúngica.
- 2.- Los extractos etanólico y metanólico de las variedades **Chuschi**, **Napuri** y **Arequipeña**, demostraron actividad antifúngica; mientras que sólo el extracto acuoso de la variedad **Chuschi** mostró actividad antifúngica.
- 3.- La concentración mínima inhibitoria(CMI) de la variedad **Chuschi** fue al 50%,**Napuri** al 70% y **Arequipeña** al 90% todo esto con el extracto etanólico.
- 4.- La concentración fungicida mínima(CFM) de la variedad **Chuschi** fue al 60%,**Napuri** al 80% y **Arequipeña** al 100% con el extracto etanólico.
- 5.- Al comparar la actividad antifúngica del extracto del "Ajo" con la capacidad de inhibición de la ketoconazol, el mayor porcentaje de inhibición fue de 98.6% de la variedad **Chuschi** (etanólico), mientras el extracto variedad **Napuri** y **Arequipeña** (etanólico) mostraron porcentajes de inhibición de 56% y 52%

respectivamente. El extracto metanólico variedad **Chuschi** tubo un porcentaje de inhibición del 76% y con la variedad **Napuri** y **Arequipeña** se obtuvo el 52%. El extracto acuoso variedad **Chuschi**, **Napuri**, **Arequipeña** mostró el porcentaje de inhibición de 48% y 44%.

Cuando se trabajó con extracto concentrado al 80%, solamente fue activo el extracto (etanólico), **Chuschi**, **Napuri** y **Arequipeña** con un porcentaje de inhibición de 84%, 52%, 54%, los demás se comportaron sin actividad.

Los resultados de la actividad antifúngica in vitro del extracto Allium sativum son insuficientes para llegar a una conclusión que permita orientar sobre la relación entre composición química y bioactividad. Sin embargo por revisión de la literatura podría inferirse cuál es la molécula responsable de la actividad del extracto investigado.

VL- RECOMENDACIONES

- 1.- Probar el espectro de la inhibición a otros microorganismos con los extractos que fueron activos en esta investigación.
- 2.- Fraccionar y elucidar las moléculas responsables de la actividad antifúngica en el extracto.
- 3.-Determinar el gen responsable de la síntesis de las moléculas antimicrobianas de Allium sativum variedad **Chuschi**.
- 4.- Realizar estudios preclínicos con el extracto de Allium sativum variedad **Chuschi**, para conocer sus posibles implicaciones fisiológicas, acciones farmacológicas y potencialidad tóxica.
- 5.- Difundir el uso de Allium sativum “ajo” para aliviar parte de los problemas de salud de la población, principalmente de los grupos de escasos recursos económicos.
- 6.- Promover proyectos de estudios antimicrobianos o de elucidación estructural de los principios activos, de las plantas nativas, con la participación de las instituciones interesadas en este tema.

VII.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

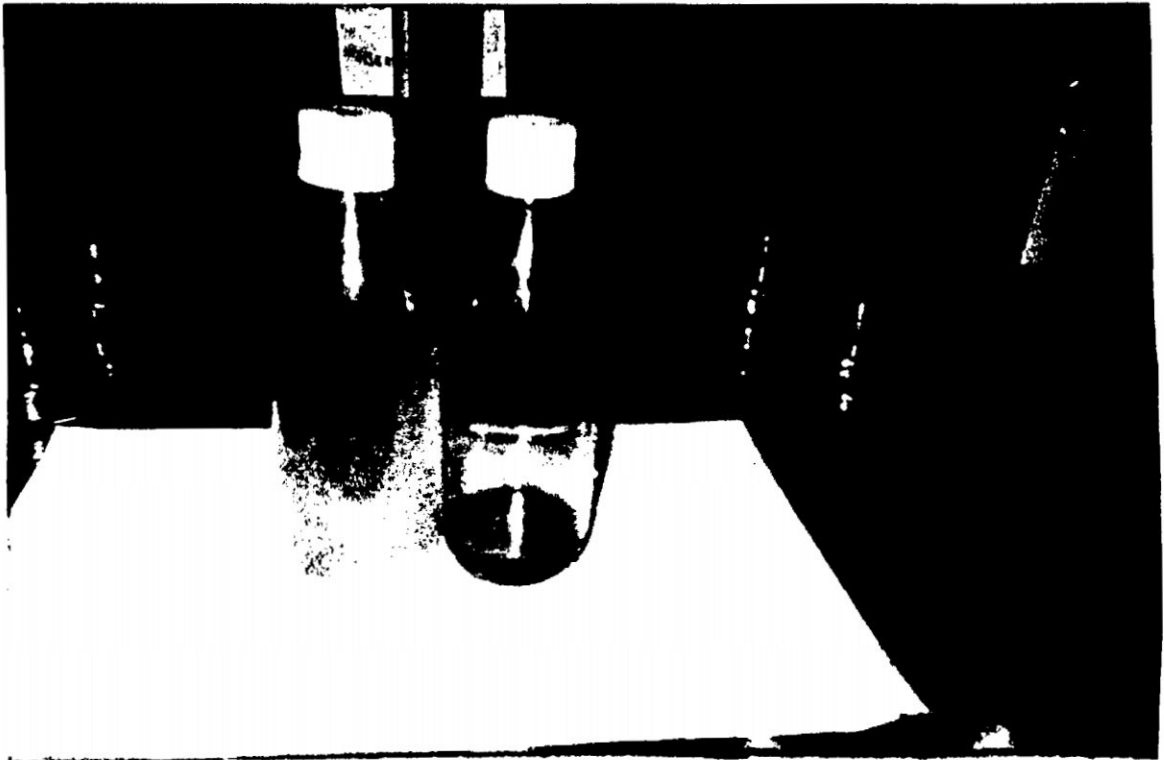
1. ACOSTA,B. ; ALVARES, P. ; DENIZ,S. ; (1999). "Lenfadenites Canina por Cryptococcus neoformans". Revista Iberoamericana Micología. Volumen 1 Las Palmas - España.
2. AMAGASE, H.; PETESCH, B.; MATSVURA, H., (MAR. 2001), et al Intake of Garlic and its Bioactive Components. J Nutr (united states).
3. AGENCIA DE COOPERACION INTERNACIONAL DEL JAPON (JICA) (1996) "Enfermedades Tropicales en Guatemala", Editor: Dr. Yuichiro Tabaru. Editado en Wings. S.A- Guatemala.
4. BRAUDE,A., (1984) "Microbiología Clínica" .Primera Edición. Editorial Médica Panamericana . Buenos Aires - Argentina.
5. BAVA, A; R, NEGRONI (1995) " Susceptibilidad in vitro de cepas de Cryptococcus a drogas antifungicas". Rev. Inst- med. Trop. Sao Paulo. Brasil.
6. BERGOGLIO, R., (1993) "Antibióticos". Editorial Médica Panamericana. Quinta Edición . Impreso en Buenos Aires - Argentina.

7. BENAVIDES, A; RAMIREZ, J; SANDOVAL, A. (1999). Los Fitonutrientes del ajo (*Allium sativum*). Una especie Medicinal y Alimenticia. Buenavista Saltillo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Agronomía. México.
8. CÁCERES, A. (1996) "Plantas de uso Medicinal – en Guatemala" Editorial Universitaria (universidad de San Carlos de Guatemala, Primera Edición, Guatemala Centro - América).
9. CECIL, L. (1977) "Tratado de Medicina Interna". Nueva Editorial Interamericana. Tomo I. Novena Edición. México.
10. CIRCULAR, (1997). "Aceite de Ajo Macerado Marnis en perlas Naturalis" Producción. www.olhoalho.html.
11. COLLE, J. G. (1978) "Microbiología Médica Aplicada". Ediciones H. Blume Primera Edición. Impreso en España.
12. CARLOS, M.; FERNANDEZ A.; GERARDO, M.; MARIA T. (1998) Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés Médico. "Instituto de Medicina Tropical" Pedro Kouri. Cuba.
13. DELGADO D, F ; TOLEDO, J ; CASAS A; UGAS, R. ; SIURA S. (1998). "Cultivos Hortícolas Datos básicos CONCYTEC UNALM. Lima – Perú.
14. DE FEOVICENZO, S. (1992). "Contributo Allo studio de la flora Medicinale Peruviana". I Congreso Halo - Peruano de Medicina Tradicional Andina "Antonio Raymundi" – Salerno. Italia, Villa, Guarigliaraito.
15. ESTRELLA M. M. ; ANASTASIO V. C. , (FEBRERO 2001) "Criptococosis: Diagnostico Microbiológico y Estudio de la Sensibilidad in

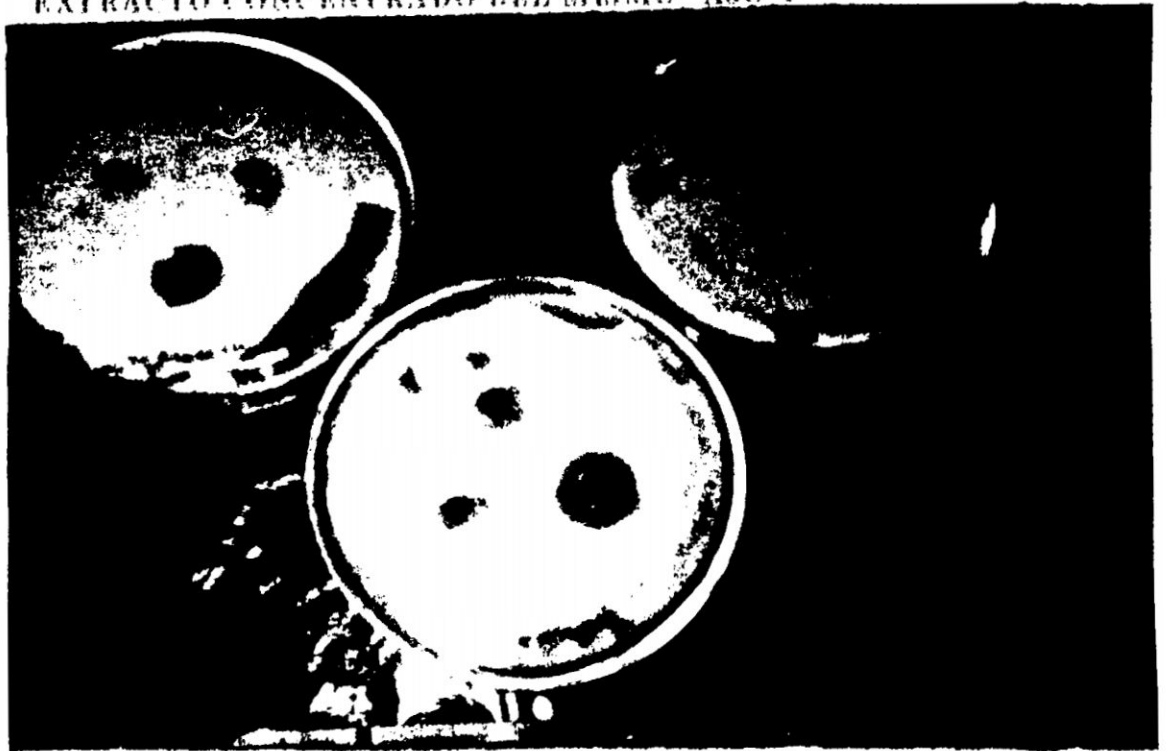
- vitro". Hospital Universitario de Valme. Sevilla - España.
16. ENRIQUE, A. (1958). "Horticultura". Editorial Diana. Tercera Edición
ACME. Buenos Aires - Argentina.
 17. FROSI Y YOKOYAMA. (1983). "Origen y Botánica del Ajo". Informe
Agropecuário. Belo Horizonte - Brasil.
 18. GUERSI A. (1985) "Laboratorio; Métodos de Análisis Clínico y su
Interpretación. Editorial el Ateneo. Tercera Edición- Buenos Aires.
 19. GARCIA, R.; ERAZO, S.; LEMUS, J.; DOWOSO, R.; PIVET H.; LAZO
Y FERRADA L. (1987), Acción Antimicótica de Extractos de Allium sativum
Boletín Micológico.
 20. GARCIA, A.; C. R. (1990). "El Ajo : Cultivo y Aprovechamiento".
Primera Edición , Editorial Mundi - Prensa. Madrid. España.
 21. JAWETZ, E.; MELNICK J.; ADELBERG, E.; BROOKS, J.; BUTEL, J.;
ORNSTON, N.(1992). "Microbiología Medica" 14 Edición. Editorial el
Manual Moderno. S.A. México.
 22. LENNETTE, E. (1994). "Manual de Microbiología Clínica". Tercera Edición.
La Habana; Edit. Científico - Técnica. Cuba.
 23. MARCANO, E. (1992). "Las Plantas Venenosas en la Medicina Popular
" Conferencia realizada en Santo Domingo 30 de septiembre".
 24. MEDINA, M.(1993). "Efecto Antimicrobiano del Allium sativum " Ajo "
Sobre Vibrio cholerae, Salmonella typhi, Shigella dysenteriae,
Aeromonas hydrophyla y Escherichia coli Enteropatógena 0111:B4. Tesis
UNSCH-Ayacucho.

25. MAROTO, B.(1983) "Horticultura Especial". Ediciones Mundi Prensa
Madrid España.
26. MORIN, CH. Y HOLLE, M. (1962). "Cultivo Práctico de Hortalizas".
UNALM. Lima - Perú.
27. ORDÓÑEZ, N; CASTAÑEDA E. (1995) "La Criptococosis y su Agente
Etiológico". Rev. Médicas VIS.
28. PALACIOS, R. (1998) "Producción de Ajo". Tesis para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo. Cuzco - Perú.
29. VANDER, A. 1987 " Las plantas Medicinales", impreso en España, Editorial
Ronda Universidad Barcelona - España.
30. WHO. (1999) " Monographs on select plants ". Vol. 1.
31. WILLIAMS W. (1998). " Introducción a la Microbiología" Edit. Continental
Ira. Edición. México.
32. ZAPATER, R. (1981) "Microbiología Médica" Primera Edición Impreso
en Argentina . Edit. Inmobiliaria.

ANEXO

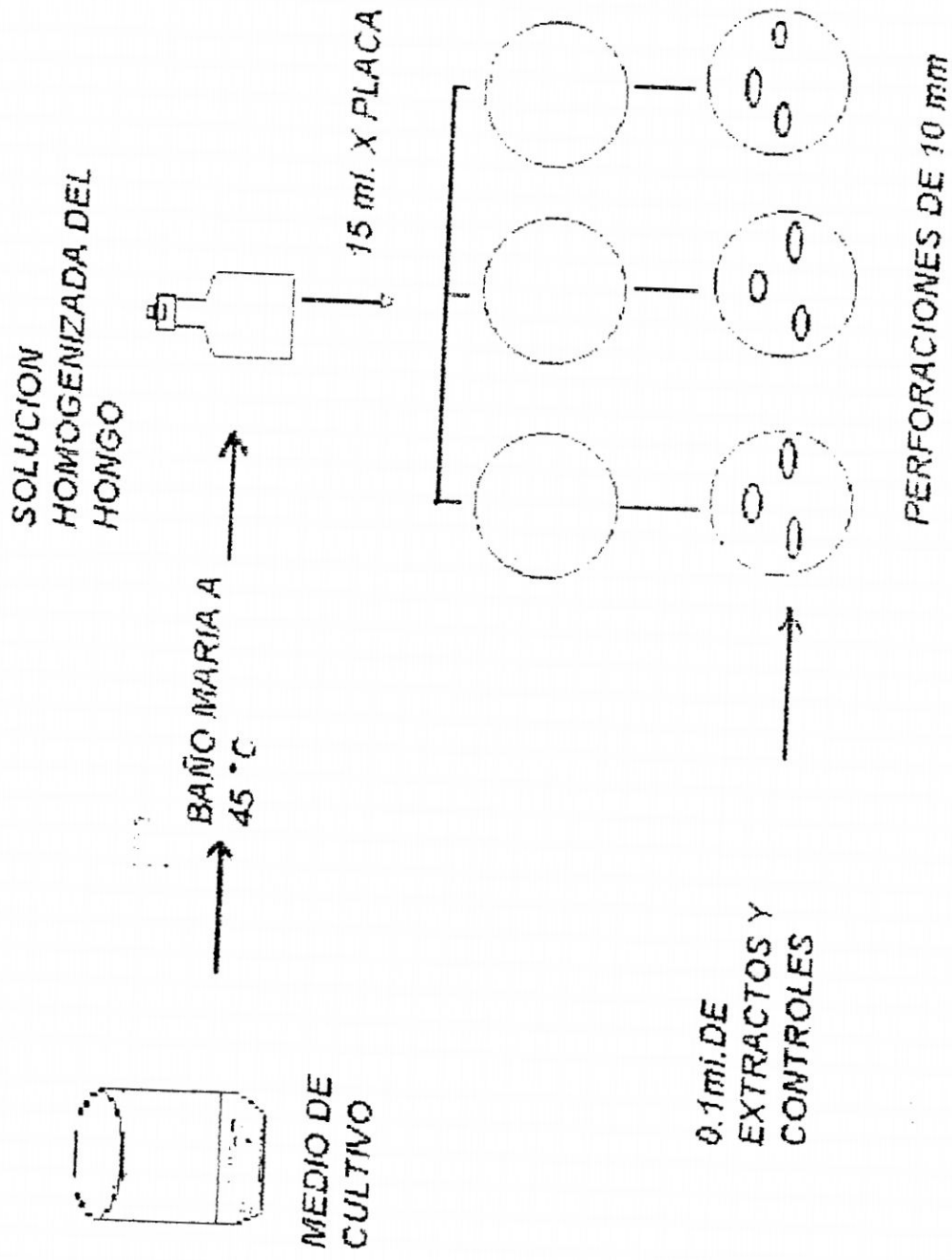


A IZQUIERDA "AJO" MACERADO FILTRADA, A LA DERECHA)
EXTRACTO CONCENTRADO DEL MISMO "AJO".

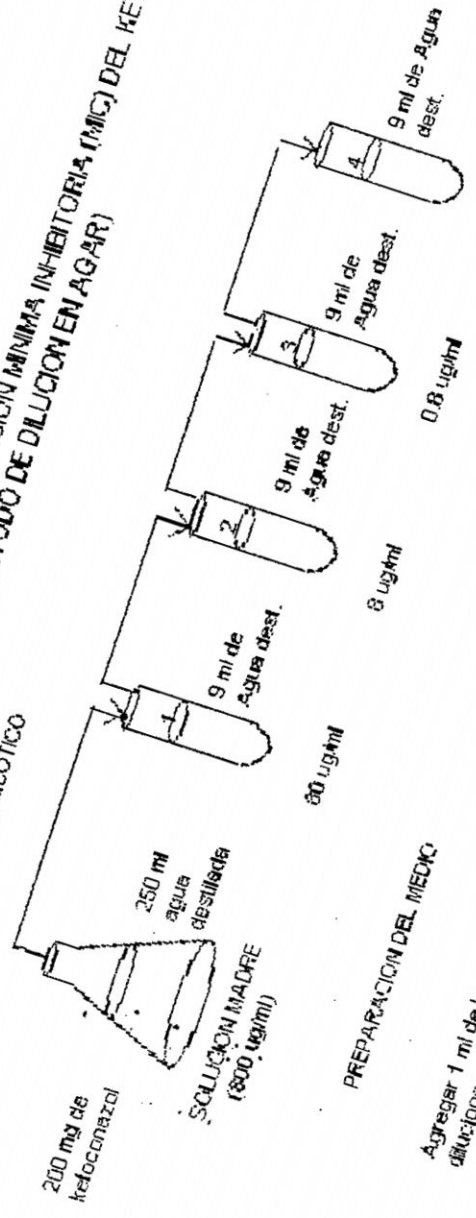


UNA DE LAS PLACAS MUESTRA EL CRECIMIENTO DEL HALO
MAYOR, QUE CORRESPONDE A LA VARIEDAD CHUSCHI Allium
sativum "ajo".

ESQUEMA NRO 2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA



MINI-VINYL
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (MIC) DEL KETOCONAZOL
 (METODO DE DILUCION EN AGAR)

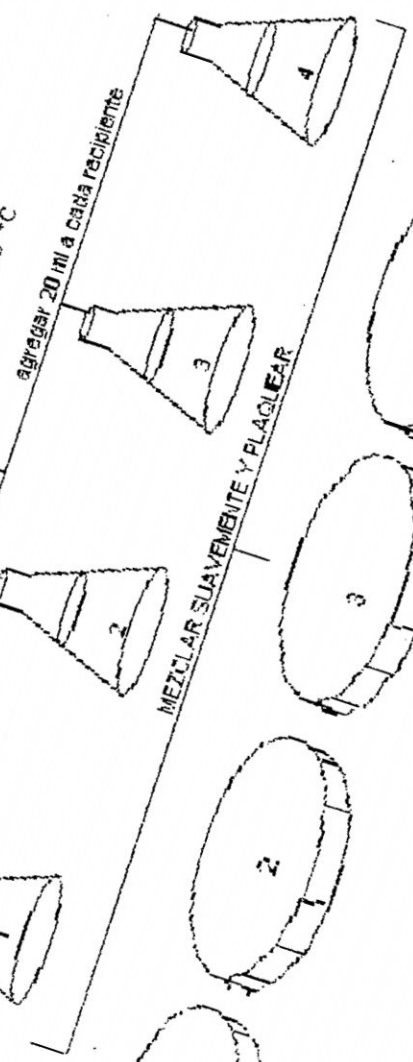


PREPARACION DEL MEDIO

Agregar 1 ml de las diluciones del antimicótico a cada recipiente

AGAR SABCRA 41/D

500 ml 45-50 °C



S.A.
 Sin antimicótico

PREPARACION DEL INOCULO



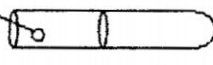
Cryptococcus neoformans

Sembrar en una
placa con agar
Sabouraud



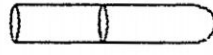
Cultivo joven

Seleccionar 4 - 5
colonias e inocular



5 ml de caldo
Sabouraud

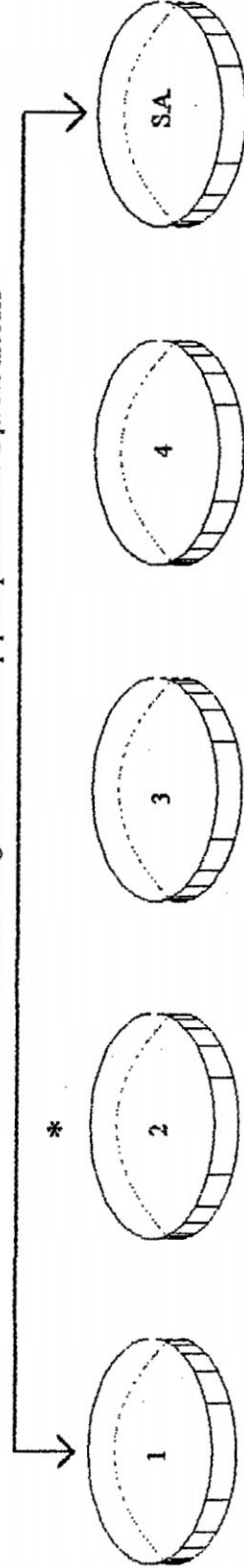
28 °C x 2 - 5 Hrs.



Turbidez N° 0.5
Mc. Farland

INOCULACION

Inocular una gota con una micropipeta que contiene 2 µl del inóculo



Reposar sin tocar hasta que las gotas esten totalmente absorbidas

Incubar a 28 °C x 3 - 5 días



LECTURA
Inhibicion del crecimiento