

**EFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS
DE AJO (*Allium sativum*) SOBRE EL
DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus
parasiticus* Y *Aspergillus niger*.**

**EFFECT OF GARLIC EXTRACTS
(*Allium sativum*) ON THE
DEVELOPMENT *in vitro* OF *Aspergillus
parasiticus* AND *Aspergillus niger*.**

Juárez-Segovia, K.G.; E.J. Díaz-Darcía, M.D. Méndez-López, M.S. Pina-Canseco, A.D. Pérez-Santiago, y M.A. Sánchez-Medina.

EFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE AJO (*Allium sativum*) SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus parasiticus* Y *Aspergillus niger*.

EFFECT OF GARLIC EXTRACTS (*Allium sativum*) ON THE DEVELOPMENT *in vitro* OF *Aspergillus parasiticus* AND *Aspergillus niger*.

EFFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE AJO (*Allium sativum*) SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE *Aspergillus parasiticus* Y *Aspergillus niger*.

EFFECT OF GARLIC EXTRACTS (*Allium sativum*) ON THE DEVELOPMENT *in vitro* OF *Aspergillus parasiticus* AND *Aspergillus niger*.

Juárez-Segovia, K.G.;
E.J. Díaz-Darcía,
M.D. Méndez-López,
M.S. Pina-Canseco,
A.D. Pérez-Santiago,
M.A. Sánchez-Medina.

EFFECTO DE EXTRACTOS
CRUDOS DE AJO (*Allium
sativum*) SOBRE EL
DESARROLLO *in vitro* DE
Aspergillus parasiticus Y
Aspergillus niger.

EFFECT OF GARLIC
EXTRACTS (*Allium sativum*)
ON THE DEVELOPMENT *in
vitro* OF *Aspergillus parasiticus*
AND *Aspergillus niger*.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 47: 99-111. Enero 2019

DOI:
10.18387/polibotanica.47.8

K.G. Juárez-Segovia

E.J. Díaz-Darcía

M.D. Méndez-López

Laboratorio de alimentos, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica,
Instituto Tecnológico de Oaxaca, Av. Víctor Bravo Ahuja núm. 125
Esq. Calz. Tecnológico CP 68030, Oaxaca, Oaxaca, México.

M.S. Pina-Canseco

Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO,
Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca,
Ex Hacienda de Aguilera S/N, Carretera a San Felipe del Agua,
CP 68020 Oaxaca, Oaxaca, México.

A.D. Pérez-Santiago

Unidad de Bioquímica e Inmunología, División de Estudios de Posgrado e Investigación,
Instituto Tecnológico de Oaxaca, Av. Víctor Bravo Ahuja núm. 125
Esq. Calz. Tecnológico CP 68030, Oaxaca, Oaxaca, México.

M.A. Sánchez-Medina / marco.s.medina@itoaxaca.edu.mx

Laboratorio de alimentos, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica,
Instituto Tecnológico de Oaxaca, Av. Víctor Bravo Ahuja núm. 125
Esq. Calz. Tecnológico CP 68030, Oaxaca, Oaxaca, México.

RESUMEN: *Aspergillus parasiticus* y *A. niger* son dos hongos productores de micotoxinas; aflatoxinas y ocratoxinas respectivamente. Estas toxinas son causantes de enfermedades en seres humanos y animales, además de generar cuantiosas pérdidas económicas al contaminar cultivos de cereales, algodón y frutas secas entre otros. Como una alternativa para controlar el desarrollo de estos hongos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de extractos crudos de ajo sobre el desarrollo de *Aspergillus parasiticus* y *A. niger* mediante diferentes ensayos.

El extracto crudo de ajo (ECA) se preparó por maceración utilizando solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) pH 7.2 como solvente. Se evaluó su efecto sobre el desarrollo de los hongos, lo cual se cuantificó mediante halos de inhibición, punción, unidades formadoras de colonias (UFC), determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración fungicida. Adicionalmente se observó la interacción del extracto crudo de ajo con los hongos mediante microscopia de luz visible.

El extracto crudo de ajo produjo halos de inhibición de 12 mm para *A. parasiticus* y de 15.5 mm para *A. niger*, e inhibió su crecimiento en un 13 y 46.8% respectivamente. La CMI para *A. parasiticus* se encontró en la dilución 1:2 (50 µL de extracto crudo) y para *A. niger* en la dilución 1:32 (3.12 µL de extracto crudo), y las concentraciones fungicidas se observaron en la dilución 1:2 (50 µL de extracto crudo) y 1:16 (6.25 µL de extracto crudo), respectivamente. Además, inhibió la producción de micelio y esporulación de los dos hongos.

El extracto crudo de ajo presentó actividad antifúngica frente a *A. parasiticus* y *A. niger*.

Palabras clave: Efecto antifúngico, *Allium sativum* (ajo), *Aspergillus*, aflatoxina, ocratoxina.

ABSTRACT: *Aspergillus parasiticus* and *A. niger* are two mycotoxin-producing fungi species, particularly aflatoxins and ochratoxins respectively. These toxins can cause diseases in humans and animals, in addition to substantial economic losses caused by the contaminating grain crops, cotton, dried fruits among other crops. In this study, we evaluate the effect of the garlic crude extract on the *in vitro* development of *Aspergillus parasiticus* and *A. niger* as a way to control the occurrence of these fungi on crops and other foods. The garlic crude extract (ECA) was elaborated by maceration using PBS pH 7.2 as solvent. The effect of the extract on the development of the fungi was evaluated by measuring of inhibition zones, puncture, colony forming units (CFU) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC). The interaction of the garlic crude extract with the fungi was observed using visible light microscopy. The garlic crude extract induced inhibition zones of 12 mm in *A. parasiticus* and 15.5 mm for *A. niger*, it also inhibited growth in 13 and 46.8% respectively. The CMI for *A. parasiticus* was found to be the 1:2 dilution (50 µL of crude extract) and the 1:32 dilution (3.12 µL of crude extract) for *A. niger*. The treatment also inhibited the production of mycelium and sporulation of the two fungi species.

The garlic crude extract showed antifungal activity against *A. parasiticus* and *A. niger*.

Key words: Antifungal effect, *Allium sativum* (ajo), *Aspergillus*, aflatoxin, ochratoxin.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son los principales microorganismos causantes de la pérdida en la calidad de los cereales almacenados, además de ocasionar una disminución en la viabilidad o poder de germinación de la semilla, decoloración en el grano, pudrición, modificación del valor nutricional y características organolépticas, así como la producción de micotoxinas (Hernández, 2005; Pascual, Calderón, & Calderón, 2000). Las micotoxinas son consideradas la principal causa de riesgo para la salud, ya que el consumo de granos contaminados, así como de sus productos puede ser fatal si estas se encuentran en altas concentraciones (Christensen & López, 1962; Dohlman, 2004; Ocampo, 2006). Pueden ser producidas por algunos hongos del género *Aspergillus* y son de gran importancia debido a su alto potencial para producir enfermedades en humanos y animales, además de causar grandes pérdidas económicas. Como ejemplo de estas micotoxinas están las aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* y las ocratoxinas producidas por *A. niger* (Juárez, 2002; Luna, Lozada, & Trigos, 2010; Robledo, Marín, & Ramos, 2001; Vega, 2012). Estos microorganismos son controlados con fungicidas tradicionales, lo cual podría causar graves consecuencias sobre la salud humana y el medio ambiente, además que algunos hongos han generado resistencia a ellos (Hernández, 2005). Una de las alternativas ha sido el uso de compuestos de origen vegetal, que tienen la habilidad de inhibir su crecimiento y/o la producción de sus micotoxinas (Gamboa, Hernández, Guerrero, Sánchez, & Lira, 2003; Sánchez, 2002).

El ajo (*Allium sativum*) es un bulbo perteneciente a la familia Amaryllidaceae que se caracteriza por tener un sistema radicular constituido por una raíz bulbosa compuesta de 6 a 12 bulbillos, reunidos en su base por medio de una película delgada para formar la “cabeza del ajo” (Bender & Bárcenas, 2013; Córdova, 2010), ha sido utilizado por diversas civilizaciones en la elaboración de alimentos y en múltiples preparaciones medicinales y se considera que su origen se pudo haber dado en Asia Central y de ahí migrado a Arabia, Egipto, India, China y al Mediterráneo (Ledezma & Apitz, 2006; Torija, Matallana, & Chalup, 2013). El interés de la ciencia por la capacidad antifúngica del ajo se remonta al siglo pasado, Timonin y Thexton (1951) y Tansey (1975) observaron que extractos acuosos del ajo pueden inhibir el crecimiento de diversas especies de hongos. En la actualidad se conocen más de 100 compuestos biológicamente activos derivados de *Allium sativum* contenidos sobre todo en el bulbo. Destaca una sustancia sulfurada inodora llamada aliina que por acción de aliinasa se convierte en esencia de ajo y levulosa. La esencia de ajo contiene la alicina, a la cual se le atribuyen efectos antimicrobianos y antimicóticos *in vitro*, contra *Candida albicans* y algunos hongos, principalmente dermatofitos y levaduras patógenas para el hombre. Alkahil (2005) probó extractos acuosos, por arrastre de vapor y etanólicos de ajo (*Allium sativum*) contra *Fusarium oxysporum*, pero fue el extracto

acuoso el mejor con casi 95% de actividad fungicida (Corrales & Reyes, 2016; Kyung, 2012; Ledezma & Apitz, 2006; Moctezuma, Pedraza, Cárdenas, Martínez, & Acosta, 2016; Villa *et al.*, 2014). Este efecto está asociado a que los extractos de ajo disminuyen la absorción de oxígeno, reducen el crecimiento, dañan las membranas e inhiben la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ankri & Mirelman, 1999; Bender & Bárcenas, 2013; Pundir & Jain, 2010). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de extractos crudos de ajo sobre el desarrollo *in vitro* de *A. parasiticus* y *A. niger* mediante diferentes ensayos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron ajos (*Allium sativum*) obtenidos directamente del productor y cultivados entre enero y junio del 2017 en el municipio de San Jerónimo Tlacoahuaya, perteneciente al estado de Oaxaca, México.

Preparación de extracto

El extracto de ajo se preparó al momento de realizar los ensayos y se mantuvo en refrigeración entre 4 y 10°C hasta su uso. Los dientes de ajo fueron pelados y macerados a temperatura ambiente en un mortero de porcelana con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) pH 7.2 en relación 1:1 (p/v), esta solución se consideró la concentración al 100%. Posteriormente el extracto se centrifugó por 10 min a 3000 rpm para quitar los sólidos disueltos.

Cepas fúngicas

Los hongos utilizados fueron: *A. parasiticus* cepa ATCC 16992 donada por la doctora Dora Linda Guzmán Ortiz, Jefa del Laboratorio de Micotoxinas del CINVESTAV Unidad Irapuato y una cepa silvestre de *A. niger*, ambas conservadas en agua con tritón al 0.01%.

Preparación de las cepas

Se inocularon 100 µL de una suspensión de esporas en placas de PDA y se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. Posteriormente, se recuperaron las esporas en agua con tritón al 0.01%, se determinó su concentración con cámara de Neubauer y se ajustó a 1.5×10^6 esporas/mL.

Evaluación *in vitro* de las propiedades antifúngicas del extracto de ajo

Para evaluar las propiedades antifúngicas del extracto de *Allium sativum* se realizó mediante las Técnicas del pozo en agar y dilución de extracto en agar reportadas por Moreno, González, Salcedo, Cárdenas, & Perales (2011) realizando modificaciones

a) Técnica del pozo en agar

Con espátula Drigalski se inocularon 100 µL de la suspensión de esporas en placas de PDA, con un sacabocados se hicieron pozos de 5 mm de diámetro a los que se agregaron 10 µL de extracto en diferentes concentraciones (50, 66, 75, 80 y 100%). Utilizando un control al cual se le agregaron 10 µL de PBS en lugar del ECA. Las placas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h, y los halos de inhibición se midieron cada 24 h.

b) Técnica de dilución del extracto en agar

Debido a que en ensayos con concentraciones mayores a 1% de extracto crudo de ajo era imposible medir el efecto, se envenenó el medio PDA adicionando concentraciones de ECA por debajo de ese valor (0.25, 0.35, 0.38 y 0.4%). Se inoculó por punción en el centro de las placas con una colonia de *A. parasiticus* de 144 h de desarrollo, utilizando un control sin extracto. Las placas se incubaron durante 6 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, y se midió el crecimiento radial de las colonias cada 24 horas.

c) Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Para evaluar UFC se empleó la técnica reportada por Diaz (2015), en tubos Eppendorf se agregaron 200 µL de extracto en diferentes concentraciones (50, 66, 75, 80 y 100%) y 100 µL de una suspensión de esporas (1.5×10^3 esporas/mL), utilizando un control sin extracto. Los tubos se incubaron durante 48 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, el contenido de los tubos se inoculó por vertido en placas con PDA, se incubaron por 48 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y cada 24 h se realizó el conteo de colonias.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se utilizó la técnica reportada por Moreno *et al.*, (2011), realizando modificaciones, a partir de 100 µL de extracto crudo, en tubos Eppendorf, se realizaron diluciones seriadas con PBS (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), posteriormente se agregaron 100 µL de una suspensión de esporas (1.5×10^6 esporas/mL) y 100 µL de Caldo Papa Dextrosa (CPD); los tubos se incubaron 48 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Se realizó microscopía de luz visible para confirmar la ausencia de crecimiento micelial. Para evaluar el efecto fungicida del extracto de ajo sobre los hongos, los tubos que no presentaron crecimiento micelial visible en la prueba de CMI, se lavaron con agua destilada estéril por centrifugación y las esporas se resuspendieron en 100 µL de agua destilada estéril, se inocularon en placas de PDA y se incubaron por seis días a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Interacción del extracto crudo de ajo con los hongos

Se realizó la misma técnica descrita para determinar la CMI y después de 48 h de incubación se realizó la observación por microscopía de luz visible para identificar los cambios morfológicos de esporas y micelio, el ensayo se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental complementado al azar y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor. Además, se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$), utilizando el programa estadístico MINITAB (versión 16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Evaluación *in vitro* de las propiedades antifúngicas del extracto de ajo****a) Técnica del pozo en agar**

Los extractos crudos de ajo mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. parasiticus* y *A. niger*, presentando halos de inhibición durante las 72 horas de incubación. El análisis de Tukey ($p < 0.05$) indicó que al cabo de 72 de incubación existe diferencia significativa entre las medias de los resultados del extracto al 100% y las concentraciones al 50, 66 y 75%. Por otro lado, todas las concentraciones muestran diferencia significativa con respecto al control. El mayor efecto a las 72 horas de incubación lo presentó el extracto al 100%, con halos de inhibición de 12 mm para *A. parasiticus* y 15.5 mm para *A. niger* (tabla 1), estos resultados son similares a los obtenidos con el extracto etanólico de propóleo y los extractos acuosos de canela y clavo al 100%, los cuales presentaron halos de inhibición de 16, 11.3 y 15.4 mm respectivamente sobre *A. niger* (Bucio, Navarro, Martínez, & Torres, 2016; Cubillo, 2007). En otro trabajo, el extracto acuoso de ajo en una concentración de 10 g/mL presentó halos de inhibición de 0.5 cm sobre *A. niger* (Magro, Carolino, Bastos, & Mexia, 2006). En ensayos realizados con *A. flavus*, hongo con características fisiológicas similares a *A. parasiticus*, el extracto de hoja de zimmu, un híbrido interespecífico de *A. sativum* y *A. cepa*, inhibió un 73% el crecimiento del hongo con respecto al control, presentando un halo de 2.4 cm (Sandoskumar *et al.*, 2007). Con el mismo hongo, el extracto de *Melissa officinalis* en una concentración de 58.25 mg/mL presentó halos de inhibición de 22 mm (Abarca, Bragulat, Castellá, Accensi, & Cabañes, 2000; Sara Centeno & Carrera, 2013), mientras que los extractos etanólicos de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* (S. Centeno, Calvo, Adelantado, & Figueroa, 2010) produjeron halos de inhibición de 11.4 mm y 14.6 mm respectivamente, estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo con *A. parasiticus*. Algunos estudios han evaluado el efecto antifúngico de *Allium sativum* sobre otras especies de hongos. Un liofilizado de *Allium sativum* en una

concentración de 400 µg/mL mostró halos de inhibición entre 1500-2000 mm para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Candida albicans* (Lora, Lujan, Robles, Saravia, & Cabeza, 2010). El extracto acuoso de *Allium sativum* a concentración de 9 y 10 g/ml inhibió el desarrollo de *Fusarium culmorum*, *Penicillium* sp. y *Aspergillus candidus*, produciendo halos de inhibición de 0.5-0.7 cm (Magro *et al.*, 2006). En otro estudio el extracto de ajo (200 mg/ml) mostró halos de 20 mm sobre *Trichophyton rubrum* (Samuel, Andrews, & Jebashree, 2000).

Tabla 1. Valores promedio (mm) de los halos de inhibición de *A. parasiticus* y *A. niger* en respuesta a diferentes porcentajes de extracto crudo de ajo.

Porcentaje de extracto crudo	Halo de inhibición (mm *)		
	Tiempo de incubación (h)		
	24	48	72
	<i>A. parasiticus</i>		
50	14.3 ^c	9.5 ^c	5.3 ^d
66	17.5 ^{b,c}	14.2 ^b	6 ^{c,d}
75	20 ^{a,b}	17.7 ^{a,b}	8.6 ^{b,c}
80	20.5 ^{a,b}	17.9 ^a	9.8 ^{a,b}
100	22.4 ^a	19.5 ^a	12 ^a
Control	0 ^d	0 ^d	0 ^e
	<i>A. niger</i>		
50	30.1 ^a	19.1 ^a	11 ^a
66	30.8 ^a	19.8 ^a	12.3 ^{a,b}
75	31.5 ^a	20.3 ^a	13.6 ^{a,b}
80	31.7 ^a	20.8 ^a	13.8 ^{b,c}
100	31.9 ^a	25.5 ^b	15.5 ^c
Control	0 ^b	0 ^c	0 ^d

*El halo de inhibición incluye el diámetro del pozo (5 mm); Los resultados son la media de seis repeticiones.

**Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$)

b) Técnica de dilución del extracto en agar.

En los ensayos de dilución del extracto en agar, El análisis de Tukey ($p < 0.05$) indicó que al cabo de 144 de incubación existe diferencia significativa entre las medias de los resultados del extracto al 0.38 y 0.4% con respecto al control de *A. parasiticus* (tabla 2), el crecimiento disminuyó en 10 y 13% con colonias de 69.6 y 66.8 mm respectivamente, después de 144 horas de incubación. Con *A. niger*, el extracto de ajo mostró una diferencia significativa en todas las concentraciones con respecto al control. La concentración que inhibió en mayor porcentaje el crecimiento del hongo fue la de 0.4% con un 46.8% con una colonia de 40.1 mm (tabla 2).

Por otro lado, algunos estudios reportan que los extractos de canela y orégano en concentración de 250 ppm y los extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, en una concentración de 100 mg/mL inhibieron en un 100% el crecimiento de *A. flavus* (Moreno *et al.*, 2011), los extractos etanólicos de *Allium sativum* y *Allium cepa* a una concentración de 1 g/mL después de siete días de incubación inhibieron el desarrollo de *A. flavus* en 56.25 y 37.5% respectivamente (Tagoe, Nyarko, & Akpaka, 2011). Los extractos de *Juniperus sabina* y *J. virginiana* en concentraciones de 1000 ppm inhibieron el crecimiento de *A. parasiticus* en un 100% (Dambolena *et al.*, 2011; García *et al.*, 2006). Los extractos metanólicos de *Karwinskia humboldtiana* y *Ambrosia ambrosioides* al 6% inhibieron el crecimiento de *A. niger* en un 52 y 50% respectivamente, mientras que los extractos etanólicos de *L. tridentata*

inhibieron el crecimiento de la misma especie en un 77.3% (Tequida, Cortez, Rosas, López, & Corrales, 2002); estos resultados son similares a los observados en este trabajo con el extracto crudo de ajo. Por otra parte, extractos metanólicos de *Myrocaroues frondosus* inhibieron en un 17% el crecimiento micelial de *A. niger*, los extractos etanólicos de *Allium sativum* y *Allium cepa* a una concentración de 1 g/mL después de siete días de incubación inhibieron en un 46.2 y 30.8% el desarrollo de *A. niger* (Jerke *et al.*, 2008; Tagoe *et al.*, 2011; Torija *et al.*, 2013), porcentaje menor al observado con el extracto crudo de ajo. Por otro lado, el extracto acuoso de *Allium sativum* a una concentración de 100 mg/ml inhibió en un 100% el desarrollo de *Trichophyton rubrum* (Samuel *et al.*, 2000).

Tabla 2. Valores promedio (mm) del crecimiento radial de *A. parasiticus* y *A. niger* en respuesta a diferentes porcentajes de extracto crudo de ajo.

Concentración (ppm)	Crecimiento radial (mm*)					
	Tiempo de incubación (h)					
	24	48	72	96	120	144
	<i>A. parasiticus</i>					
0.25	4 ^a	16.8 ^a	30 ^{a,b}	42.1 ^a	55 ^a	76.1 ^a
0.35	3 ^a	15.8 ^a	29.6 ^{a,b}	41.8 ^a	50.6 ^b	74 ^a
0.38	1.5 ^b	13 ^{b,c}	26.6 ^{b,c}	38.2 ^{a,b}	50 ^{b,c}	69.6 ^b
0.4	1.1 ^b	12 ^c	26.1 ^c	37.1 ^b	48.8 ^c	66.8 ^b
Control	6.6 ^c	18.6 ^a	32.6 ^a	47.1 ^c	59.5 ^d	77.5 ^a
	<i>A. niger</i>					
0.25	2.3 ^b	6.3 ^b	21.5 ^b	35.2 ^b	47.6 ^b	56.8 ^b
0.35	0 ^c	5.5 ^b	16.2 ^{b,c}	26.2 ^c	40.2 ^b	51.8 ^c
0.38	0 ^c	3.2 ^c	10.8 ^c	21.5 ^d	39.8 ^c	51.7 ^c
0.4	0 ^c	2.3 ^c	9.1 ^c	21.5 ^d	35.8 ^d	40.1 ^d
Control	10.2 ^a	27.6 ^a	42 ^a	62.7 ^a	68.3 ^a	75.3 ^a

*Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$)

**En el cuadro se muestra la media de seis repeticiones.

c) Unidades formadoras de colonias (UFC)

Para evaluar la viabilidad de las esporas se realizó la prueba de UFC. Para *A. parasiticus* y *A. niger*, todas las concentraciones mostraron una inhibición del 100% con respecto al control sin extracto (figs. 1 y 2). En un estudio similar, Díaz (2013), reportó que el extracto de lectina de coleoptilo de *Zea mays*, incrementaba el número de colonias de *A. parasiticus* con respecto al control sin lectina, y que el extracto crudo de *Sorghum bicolor* a mayor concentración disminuía el desarrollo de sus colonias.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

En la prueba para determinar la CMI, la dilución 1:2, que corresponde a 50 µL de extracto crudo, inhibió en 100% el crecimiento de *A. parasiticus*. En un trabajo similar, la CMI para *A. flavus* del extracto de *Melissa officinalis* se observó en la dilución 1:2.5 (23.30 mg/mL) y en el extracto etanólico de ajo en 20 mg/mL (Sara Centeno & Carrera, 2013; Pundir & Jain, 2010). Para *A. niger*, la CMI se observó en la dilución 1:32 (3.12 µL de extracto). Al respecto, Huamani & Ruiz (2005), reportaron una CMI de 4 mg/mL con los extractos de *Annona* para este hongo. En trabajos realizados con extractos de ajo se encontró que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto concentrado fresco del ajo (ECFA) estaba entre 40 y 50 µL del ECFA (0.8-1.0 mg/mL de proteína) sobre los hongos *Histoplasma capsulatum*, *Cladophialophora carrionii* y *Exophiala dermatitidis* (Moctezuma Zárate *et al.*, 2016).

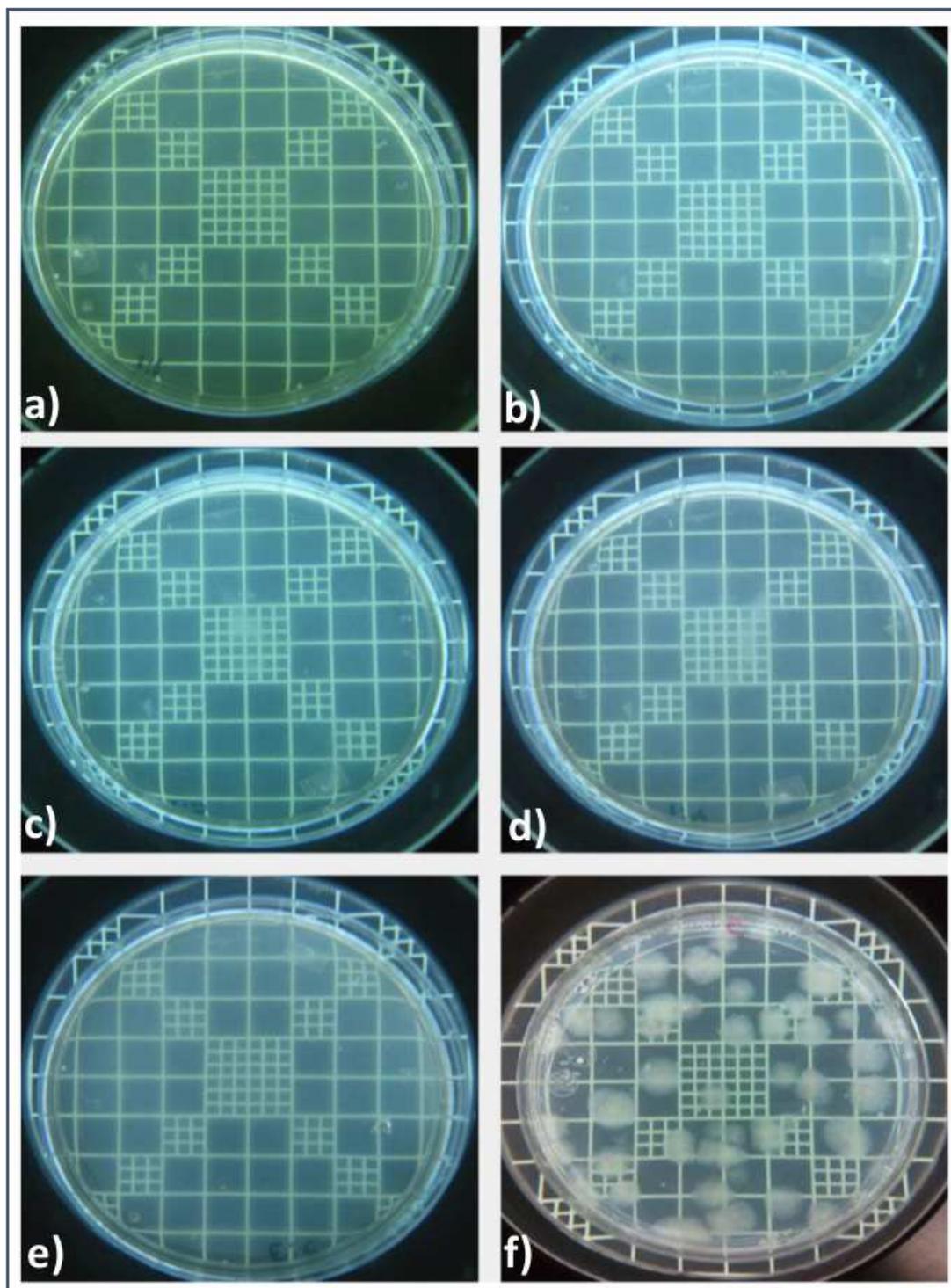


Fig. 1. Unidades Formadoras de Colonias de *A. parasiticus* después de 48 horas de incubación con extractos de ajo al a) 50%, b) 66%, c) 75%, d) 80%, e) 100% y f) control sin extracto.

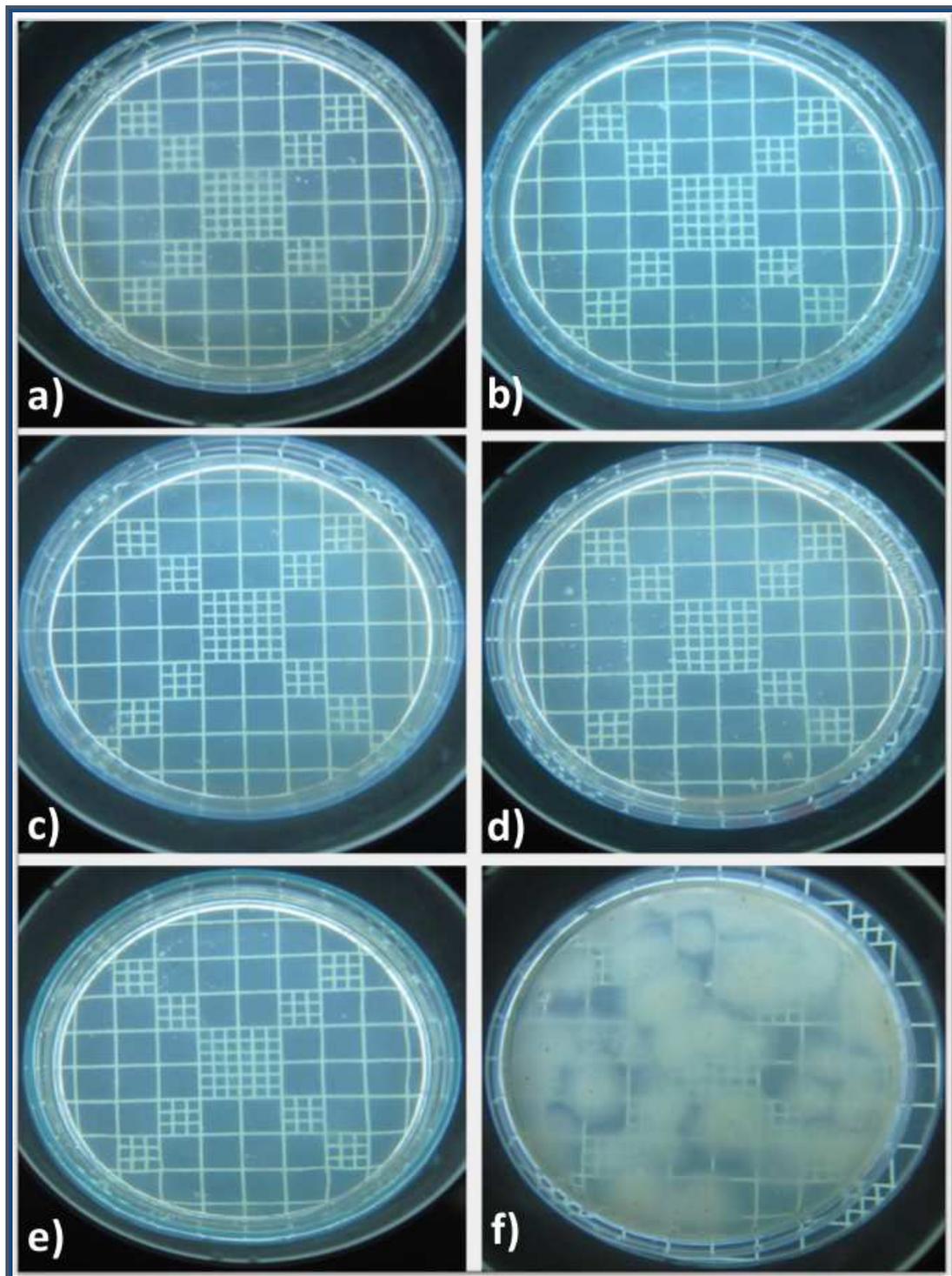


Fig. 2. Unidades Formadoras de Colonias de *A. niger* después de 48 horas de incubación con extractos de ajo al a) 50%,
a) 66%, c) 75%, d) 80%, e) 100% y f) control sin extracto.

Allium sativum presentó una CMI a una concentración de 500 µg/mL sobre *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, y de 2500 µg/mL sobre *Candida albican* (Lora *et al.*, 2010). El compuesto activo del ajo, ajoeno presento una CMI en medio CSD de 2.5 y 5 en medio RPMI-1640, de 1,25 a 5 µg/ml sobre *Histoplasma capsulatum* (Torres & Romero, 2012).

Para *A. parasiticus* la concentración fungicida se encontró en la dilución 1:2, correspondiente a 50 µL de extracto de ajo, y para *A. niger* la concentración fungicida se observó en la dilución 1:16, (6.25 µL de extracto). García *et al.* (2006), reportaron concentraciones fungicidas de 1000 y 2000 ppm, sobre *A. flavus* con los extractos de orégano y canela respectivamente. *Allium sativum* liofilizado presentó una concentración fungicida de 1000 µg/mL sobre *Histoplasma capsulatum*, *Cladophialophora carrionii* y *Exophiala dermatitidis*, y de 5000 µg/mL para *Candida albicans*, por otro lado el ajoeno tiene una concentración fungicida de 5 y 10 µg/ml sobre *Histoplasma capsulatum* (Lora *et al.*, 2010; Torres & Romero, 2012).

Interacción del extracto crudo de ajo con los hongos

En los estudios microscópicos se observó que el extracto crudo de ajo inhibió el crecimiento micelial de los dos hongos en la dilución 1:32, y redujo significativamente la cantidad de esporas, en comparación con el control sin extracto, en el cual se observó elongación de hifas y esporulación de cabezas conidiales, por lo que se puede concluir que el extracto crudo de ajo inhibe la germinación de las esporas de *A. parasiticus* y *A. niger* (fig. 3). Lo cual es diferente a lo reportado para las lectinas Concavalina A y *Dolichos biflorus* sobre *A. parasiticus*, las cuales indujeron la elongación de hifas y modificaron la morfología de las mismas (Díaz, 2015).

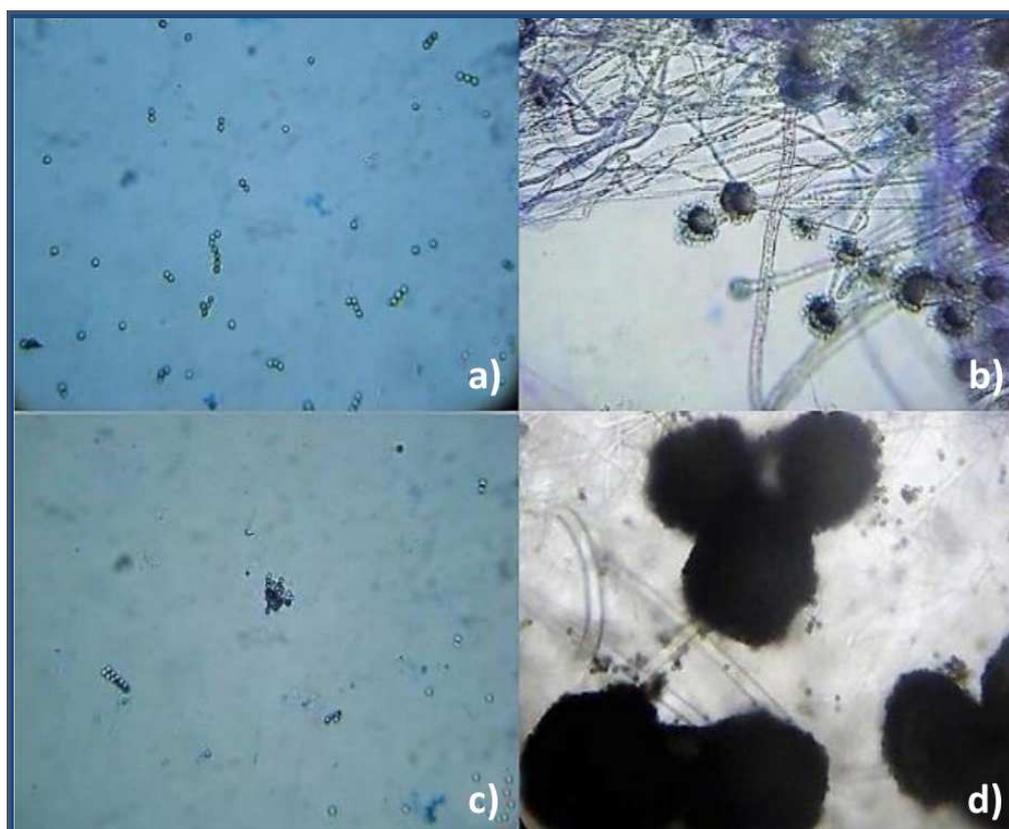


Fig. 3. Microscopia de la interacción del extracto crudo de ajo con los hongos, Vista 40x: a) ECA-*A. parasiticus*, b) Control de *A. parasiticus*, c) ECA-*A. niger*, d) Control de *A. niger*.

Se ha reportado que algunos extractos vegetales contienen sustancias que muestran un efecto directo en la reducción o total inhibición del crecimiento de *Aspergillus*, mediante la degradación de componentes estructurales de pared celular, membrana celular, y organelos (Bhatnagar, Cary, Ehrlich, Yu, & Cleveland, 2006; Cupull, Andreu, Pérez, Delgado, & Cuppull, 2003). Y con respecto al extracto concentrado de ajo, la inhibición del crecimiento bacteriano se atribuye principalmente a la alicina (Jiménez & Zambrano, 2017; Moctezuma Zárate *et al.*, 2016). Su efecto radica en el bloqueo de la síntesis de fosfatidilcolina, con una acumulación del compuesto precursor fosfatidiletanolamina, lo cual se traduce en una alteración en la estructura de la membrana celular y consecuente muerte celular (San Blas *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

Allium sativum inhibe el crecimiento de *A. flavus* y *A. niger* *in vitro*. Debido a que se trabajó con un extracto acuoso, se puede atribuir el efecto antifúngico a la presencia de alicina; se presentó un mayor efecto sobre *A. niger* en algunos de los ensayos. La concentración mínima inhibitoria para *A. parasiticus* se encontró en la dilución 1:2 y para *A. niger* en 1:32, y las concentraciones fungicidas se observaron en las concentraciones 1:2 y 1:16 respectivamente. Se demostró mediante microscopía que a mayor concentración de extracto crudo de ajo mayor inhibición de la producción de micelio y esporulación en comparación con el control. En general, el efecto de los extractos de ajo dependerá de su concentración, volumen, tipo de extracción y la especie de hongo a estudiar.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de doctorado. Parte este trabajo se realizó con financiamiento del Tecnológico Nacional de México a través del proyecto 5814.16-P.

LITERATURA CITADA

- Abarca, L., Bragulat, R., Castellá, G., Accensi, F., & Cabañes, J. (2000). Hongos Productores de Micotoxinas Emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 63–68.
- Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic. *Microbes and Infection*, 2, 125–129.
- Bender, D., & Bárcenas, M. E. (2013). El ajo y sus Aplicaciones en la Conservación de Alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7, 25–36.
- Bhatnagar, D., Cary, J., Ehrlich, K., Yu, J., & Cleveland, T. (2006). Understanding the Genetics of Regulation of Aflatoxin Production and *Aspergillus flavus* Development. *Mycopathologia*, 162, 155–166.
- Bucio, C. M., Navarro, F. A., Martínez, O. A., & Torres, J. J. (2016). Efecto sobre Hongos Fitopatógenos de un Extracto Acuoso de Propóleo Obtenido de las Abejas Domésticas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 107–110.
- Centeno, S., Calvo, M. A., Adelantado, C., & Figueroa, S. (2010). Antifungal Activity of Extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(9), 452–455.
- Centeno, S., & Carrera, Y. (2013). Actividad Antifúngica y Antiaflatoxigénica de Extractos de *Melissa officinalis* (Lamiaceae) sobre *Aspergillus flavus*. *Saber*, 25(2), 185–191.
- Christensen, C., & López, L. (1962). Daños Que Causan en México los Hongos de Granos Almacenados. (Vol. 44). Ciudad de México.
- Còrdova, M. de los Á. (2010). Extracción y Purificación de Alicina a partir de Ajo (*Allium sativum* L): Implicaciones Analíticas. Instituto Politécnico Nacional.

- Corrales, I., & Reyes, J. (2016). Actividad Antimicrobiana y Antifúngica de *Allium sativum* en Estomatología. *16 de Abril*, (254), 59–68. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/308201470>
- Cubillo, M. A. (2007). Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Algunas Especies Naturales sobre Microorganismos Asociados a Alimentos. Universidad de Costa Rica.
- Cupull, R., Andreu, C., Pérez, C., Delgado, Y., & Cuppull, M. (2003). Efecto de *Trichoderma viride* como Estimulante de la Germinación, en el Desarrollo de Posturas de Cafetos y el Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Centro Agrícola*, (1), 21–25.
- Dambolena, J. S., Meriles, J. M., López, A. G., Gallucci, M. N., González, S. B., Guerra, A., & Zunino, M. (2011). Actividad Antifúngica del Aceite Esencial de Cinco Especies de *Juniperus* de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(2), 104–115.
- Díaz, E. (2013). Interacción de las Lectinas de *Zea mays* y *Sorghum bicolor* con el Hongo *Aspergillus parasiticus*. Instituto Tecnológico de Oaxaca.
- Díaz, E. (2015). Evaluación del Efecto de la Interacción de las Lectinas Concavalina A y *Dolichos biflorus* con *Aspergillus parasiticus*. Instituto Tecnológico de Oaxaca.
- Dohlman, E. (2004). Mycotoxin Regulations Implications for International Agricultural Trade. *Agriculture Information Bulletin*.
- Gamboa, R., Hernández, F., Guerrero, E., Sánchez, A., & Lira, R. (2003). Inhibición del Crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con Extractos Vegetales Metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca) Schlech]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1), 13–18.
- García, A. E., Quezada, Y. M., Moreno, J., Sánchez, G., Moreno, E., & Pérez, M. C. (2006). Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangerh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 8–12.
- Hernández, M. (2005). Efectividad Antibacterial y Antifúngica de Quitosán y *Larrea tridentata* contra Microorganismos que Afectan a Humanos y Productos Agrícolas. Universidad de Guadalajara.
- Huamani, M. ., & Ruiz, J. (2005). Determinación de la Actividad Antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas Medicinales de 3 Departamentos del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Jerke, G., Horianski, M., Bargarbi, S., Salvatierra, K., Kramer, F., Jorda, G., ... Guida, A. (2008). Actividad Antifúngica de Extractos de *Myrocarpus frondosus* Fr. Allem sobre Hongos Aislados de Yerba mate y Té Comerciales. *Ciencia y Tecnología*, 10a, 24–29.
- Jiménez, A., & Zambrano, M. (2017). Efecto Antibacteriano del Extracto de *Allium sativum* (Ajo) Blanco, Púrpura y Clorhexidina al 0.12% sobre Cepas de *Streptococcus mutans*. *Dominio de las Ciencias*, 3(1), 234–247.
- Juárez, S. R. (2002). Extractos de *Larrea tridentata* con Actividad Antifúngica e Inhibición de la Síntesis de Aflatoxinas de Especies del Género *Aspergillus*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Kyung, K. H. (2012). Antimicrobial Properties of *Allium* Species. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.004>
- Ledezma, E., & Apitz, R. (2006). Ajoene, el Principal Compuesto Activo Derivado del Ajo (*Allium sativum*), un Nuevo Agente Antifúngico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, 75–80.
- Lora, C., Lujan, M., Robles, H., Saravia, V., & Cabeza, J. (2010). Efecto in vitro de Diferentes Concentraciones de *Allium sativum* (Ajo) Frente a Dermatofitos y *Candida albicans*. *UCV-Scientia*, 2(2), 23–33.
- Luna, M., Lozada, Y., & Trigos, Á. (2010). Aislamiento de Cepas de *Aspergillus niger*, Productoras de Ocratoxina A, en Café Verde (*Coffea arabica*) Almacenado. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 64–68.

Recibido:
19/mayo/2018

Aceptado:
10/diciembre/2018

- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., & Mexia, A. (2006). Efficacy of Plant Extracts Against Stored Products Fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, 176–178.
- Moctezuma Zárate, M., Pedraza Ramos, M., Cárdenas Gonzáles, J., Martínez Juárez, V., & Acosta Rodríguez, J. (2016). Efecto del ajo (*Allium sativum*) sobre el crecimiento de algunas especies de hongos. *Tlatemoani, Revista Académica de Investigación*.
- Moreno, S., González, L. M., Salcedo, S. M., Cárdenas, M. L., & Perales, A. (2011). Efecto Antifúngico de Extractos de Gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la Inhibición *In vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium SP*. *Polibotánica*, (32), 193–205.
- Ocampo, I. (2006). Estudio de la Micoflora y Contenido de Aflatoxinas de Cebada Cultivada en Tlanalapa, *Hidalgo*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Pascual, M. R., Calderón, V., & Calderón, P. (2000). *Microbiología Alimentaria : Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/339713504/Microbiologia-alimentaria-metodologia-analitica-para-alimento-pdf>
- Pundir, R. K., & Jain, P. (2010). Antimicrobial Activity of *Allium sativum* Ethanolic Extract against Food Associated Bacteria and Fungi. *Drug Invention Today*, 2(4), 229–232.
- Robledo, M. de L., Marín, S., & Ramos, A. J. (2001). Contaminación Natural con Micotoxinas en Maíz Forrajero y Granos de Café Verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*, 18, 141–144.
- Samuel, J. K., Andrews, B., & Jebashree, H. S. (2000). *In vitro* Evaluation of the Antifungal Activity of *Allium sativum* Bulb Extract against *Trichophyton rubrum*, a Human Skin Pathogen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 617–620. <https://doi.org/10.1023/A:1008972016316>
- San Blas, G., Urbina, J. A., Marchán, E., Contreras, L. M., Sorais, F., & San Blas, F. (1997). Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by Ajoene is Associated with Blockade of Phosphatidylcholine Biosynthesis. *Microbiology*, 143, 1583–1586.
- Sánchez, E. (2002). Inhibición del Crecimiento y la Producción de Toxinas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* por Extractos de Plantas del Género *Agave*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sandosskumar, R., Karthikeyan, M., Mathiyazhagan, S., Mohankumar, M., Chandrasekar, G., & Velazhahan, R. (2007). Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth and Detoxification of Aflatoxin B1 by the Medicinal Plant Zimmu (*Allium sativum* L. x *Allium cepa* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1007–1014. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9327-x>
- Tagoe, D. N. ., Nyarko, H. D., & Akpaka, R. (2011). A Comparison of the Antifungal Properties of Onion (*Allium cepa*), Ginger (*Zingiber officinale*) and Garlic (*Allium sativum*) against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *Medicinal Plant*, 5(3), 281–287. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.281.287>
- Tequida, M., Cortez, M., Rosas, E. C., López, S., & Corrales, C. (2002). Efecto de Extractos Alcohólicos de Plantas Silvestres Sobre la Inhibición de Crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1(6), 84–88.
- Torija, E., Matallana, C., & Chalup, N. (2013). El Ajo y la Cebolla : de las Medicinas Antiguas al Interés Actual. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural Sección Biología*, 107, 29–37.
- Torres, J., & Romero, H. (2012). Actividad Antifúngica *In vitro* del Ajoeno en Cinco Aislamientos Clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(1), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.04.001>
- Vega, V. (2012). Hongos Micotoxigénicos y Aflatoxinas en Granos de Maíz de Diferentes Orígenes Geográficos de la República Mexicana. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H., Basurto, M., Soto, J., & Martínez, E. (2014). Situación Actual en el Control de *Fusarium spp.* y Evaluación de la Actividad Antifúngica de Extractos Vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>