

20

20

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"**



**" ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD  
ANTIMICOTICA "in vitro" DE TIOSEMICARBAZONAS,  
CON RESPECTO A CUATRO SUBSTANCIAS ANTIMI-  
COTICAS CONOCIDAS, EN 5 HONGOS PATOGENOS  
PARA EL HOMBRE "**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A N:**

**SILVIA GONZALEZ RIOS  
PABLO MARTIN HERRERA MONDRAGON**

**DIRECTOR DE TESIS PH. D. ROBERTO A. CERVANTES O.  
COASESOR ACADEMICO DE TESIS DR. JESUS VALDES M.**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. MEX.**

**1987**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

### CONTENIDO

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| ABREVIATURAS                | i  |
| INDICE DE CUADROS Y FIGURAS | ii |
| RESUMEN                     | 1  |
| INTRODUCCION                | 2  |
| OBJETIVOS                   | 12 |
| MATERIAL Y METODOS          | 13 |
| RESULTADOS                  | 19 |
| DISCUSION                   | 52 |
| CONCLUSIONES                | 56 |
| BIBLIOGRAFIA                | 57 |

## ABREVIATURAS

|  |          |
|--|----------|
| <u>Aspergillus fumigatus</u>                 | A.f      |
| <u>Candida albicans</u>                      | C.a.     |
| <u>Cryptococcus neoformans</u>               | C.n.     |
| <u>Rhizopus arrhizus</u>                     | R.a.     |
| <u>Trichophyton mentagrophytes</u>           | T.m.     |
| Anfotericina B                               | AmB      |
| 5-Bromouracilo                               | 5BrU     |
| Nistatina                                    | Nist     |
| Ketoconazole                                 | Ket      |
| Tiosemicarbazona                             | TSC      |
| Tiosemicarbazona del 5-Bromo salicilaldehido | 5BrPhSNO |
| Tiosemicarbazona del 2-hidroxi-acetofenona   | HAT      |
| 4-metil-tiosemicarbazona del salicilaldehido | MeSNO    |
| 4-fenil-tiosemicarbazona del salicilaldehido | PhSNO    |
| Tiosemicarbazona del salicilaldehido         | SNO      |
| Concentracion Minima Inhibitoria             | CMI      |
| Base de Nitrogeno Levadura                   | YNBG     |

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Síntesis de las tiosemicarbazonas utilizadas                 | 18 |
| Cuadro I, CMI, expresada en mg/l para todos los hongos levaduriformes | 20 |
| Cuadro II, CMI expresada en mg/l para todos los hongos levaduriformes | 22 |
| Cuadro III, Turbidimetría visual para A.f                             | 32 |
| Cuadro IV, Turbidimetría visual para R.a.                             | 33 |
| Cuadro V, Turbidimetría visual para T.m.                              | 34 |
| Cuadro VI, Turbidimetría visual para C.a.                             | 35 |
| Cuadro VII, Turbidimetría visual para C.n.                            | 36 |
| Cuadro VIII, Turbidimetría a 580 nm para A.f.                         | 37 |
| Cuadro IX, Turbidimetría a 580 nm para R.a                            | 38 |
| Cuadro X, Turbidimetría a 580 nm para T.m                             | 39 |
| Cuadro XI, Turbidimetría a 580 nm para C.a.                           | 40 |
| Cuadro XII, Turbidimetría a 580 nm para C.n.                          | 41 |
| Figura 2, Porcentaje de inhibición para A.f.                          | 42 |
| Figura 3, Porcentaje de inhibición para R.a.                          | 43 |
| Figura 4, Porcentaje de inhibición para T.m.                          | 44 |
| Figura 5, Porcentaje de inhibición para C.a.                          | 45 |
| Figura 6, Porcentaje de inhibición para C.n.                          | 46 |
| Figura 7, Efecto de BrPhSNO en todos los hongos                       | 47 |
| Figura 8, Efecto de PhSNO en todos los hongos                         | 48 |
| Figura 9, Efecto de SNO en todos los hongos                           | 49 |

Figura 10, Efecto de MeSNO en todos los hongos 50

Figura 11, Efecto de HAT en todos los hongos 51

## RESUMEN

Se realizó el estudio comparativo de 5 TSC (HAT, SNO, BrPhSNO, MeSNO, PhSNO) substituidas contra 4 fármacos comerciales (Ketoconazole, Nistatina, AnfotericinaB, y 5-Br Uracilo) probando en 5 hongos patógenos para el hombre--- (A. fumigatus, C. albicans, C. neoformans, R. arrhizus y I. mentagrophytes) Observando la inhibición ó crecimiento del hongo por turbidimetria a 580 nm de longitud de onda. Los resultados obtenidos nos indican que las CMI obtenidas para los diferentes hongos en algunos casos son similares y en otros son de menor concentración (R. arrhizus). Esto no quiere decir que las TSC actuan muy similares entre si, ya que la variación en cuanto a los substituyentes en la molécula principal dan la pauta para diferenciar entre la potencia de cada compuesto. Los datos de la microscopia- óptica nos indican que estos compuestos inhiben de alguna manera la maduración del hongo. En este trabajo se muestran uno de los primeros datos de comparación contra controles antimicóticos de uso común y las TSC resaltando con esto la actividad antimicótica de estas. Otro dato importante es la comparación y utilización de levaduras como microorganismos prueba para estos compuestos, ya que al parecer son de los primeros datos reportados con estos hongos.

## INTRODUCCION

Debido al poco manejo de nomenclatura y a la idea generalizada de que las técnicas micológicas eran difíciles de montar, muchos patólogos, clínicos y técnicos médicos perdían el ánimo al estudiar a los hongos. A pesar de que la invasión micótica del tejido humano fué reconocida desde principios de 1800.

Es fascinante observar con la ayuda de un microscopio de bajo poder que se puede descubrir un mundo en donde las levaduras y los mohos se asemejan a las plantas superiores y a los animales, por la complejidad anatómica de sus células. Es por eso que hoy en día, la identificación de un hongo patógeno se efectúa por la caracterización de sus estructuras observadas en tejidos o en medios de cultivos, por el uso de técnicas de tinción y el conocimiento de características físicas, las cuales en su mayoría están basadas en la clínica de la enfermedad que provocan al hombre, así mismo los estudios de histología, bioquímica, nutrición y pruebas serológicas han logrado recuperar el entusiasmo al caracterizar de una manera más adecuada a estos seres tan especiales(6,7).

Tradicionalmente las enfermedades micóticas(micosis)se dividen en cuatro categorías:

- A) Superficiales
- B) Cutáneas
- C) Subcutáneas
- D) Sistémicas

A) Micosis superficiales: Se define como una infección en la cual, el agente patógeno sólo invade la capa más superficial de la -

epidermis, los cabellos, con poca o ninguna reacción tisular.

**B) Micosis cutáneas:**

Se define como una infección en la cual, el agente patógeno puede afectar epidermis, cabellos y uñas. Los hongos responsables de estas infecciones se denominan dermatofitos y las enfermedades que causan tiñas o dermatomycosis. En ocasiones esta afección lleva al hospedero a una reacción inmunológica severa.

**C) Micosis subcutáneas:**

Las micosis subcutaneas constituyen un grupo de enfermedades heterogeneas causadas por una gran variedad de hongos, estos invaden tejidos cutáneos y subcutaneos, algunas infecciones pueden permanecer localizadas y expandirse lentamente a otros tejidos mientras que en otras invaden sistema linfático.

**D) Micosis sistemicas :**

Basicamente son enfermedades pulmonares inicialmente, forman cavidades pulmonares y en general difunden por via hematogena a organos vitales trayendo graves consecuencias al huesped. (7, 33).

Una vez que el médico y el micologo han identificado al agente causal de la micosis, el real problema es la falta de elementos químicos terapeuticos para curar a los pacientes,

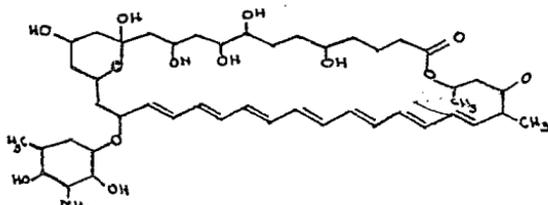
esto se ha convertido en uno de los puntos mas difíciles de atacar, debido a que las células micóticas son eucariotes - al igual que las células del huésped condicionando que en forma general los antimicóticos sean sustancias de tipo -- tóxico como los derivados poliélicos( Anfotericina B) y los derivados del imidazole (Ketoconazole), por lo que la tendencia en la investigación de fármacos antimicóticos es encontrar sustancias con una actividad casi exclusiva contra los hongos, esto no es muy fácil de lograr y se requiere de una gran cantidad de pruebas de nuevos compuestos, tales como las tiosemicarbazonas.

#### FARMACOS ANTIMICOTICOS DE USO COMUN

Generalmente los fármacos usados contra los hongos nos llevan a reconocer en diferentes terminos su modo de acción, su espectro, potencia, índice terapéutico y el desarrollo de resistencia, además de los problemas de toxicidad. Existen en la actualidad diferentes tipos de fármacos contra los hongos entre los que se encuentran a la griseofulvina, flucitocina, antibióticos poliélicos, los derivados del imidazole - etc. Cada uno de ellos interfiere con el ciclo normal de crecimiento del hongo, provocando una inhibición funcional del metabolismo celular. El efecto de estos fármacos es reflejado en el crecimiento, diferenciación y viabilidad de los hongos (3,4,15).

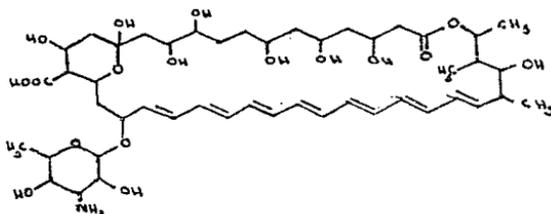
Un factor importante en la utilidad de los compuestos - es el mecanismo por el cual afectan la estructura y función - de los hongos, tal es el caso de los antimicóticos poliélicos los cuales en su mayoría tienden a provocar un daño irreversi

ble a la membrana fungica, alterando la permeabilidad de esta y como consecuencia provocando la muerte celular. Dentro de estos compuestos tenemos a la Anfotericina B cuya estructura química se muestra a continuación:



Estructura química de la Anfotericina B

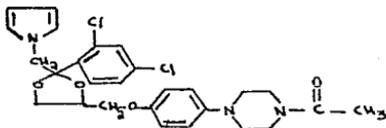
Otro ejemplo de estos compuestos es la Nistatina, la cual es incorporada por las levaduras y hongos susceptibles a nivel de la membrana celular, alterando la permeabilidad ocasionando la salida de iones potasio y otros compuestos-- importantes intracelularmente provocando la muerte (22,36). Este fármaco tiene la fórmula empírica  $C_{46}H_{77}NO_{19}$  y posee 4 grupos C-metilo una porción molecular amino-azúcar y micosa amina, para su uso clínico tiene actividad dentro de un rango de 2500 a 3500 U/mg y no tiene la capacidad de inhibir bacterias. Su estructura química es la siguiente(15):



Estructura química de la Nistatina

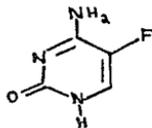
Otro tipo de fármacos usados, son los derivados del imidazole tales como el miconazole, econazole, y el ketoconazole.

zole, este último es el más empleado en la mayoría de las micosis. El mecanismo de acción de este fármaco es inhibir la biosíntesis del ergosterol, el cual es el principal esterol de la membrana celular del hongo afectando la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos esenciales para el crecimiento de la membrana celular fungica (3,8,15,32), específicamente la pared celular. Su estructura química es la siguiente:



Estructura química del Ketoconazole.

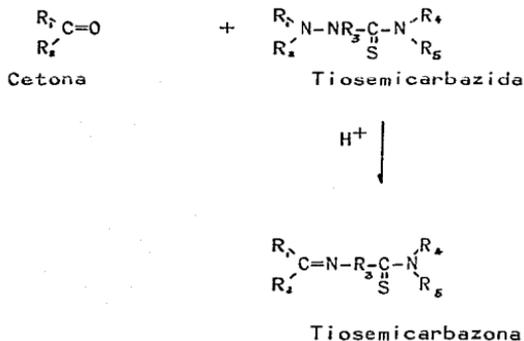
W.H. Wain en 1981 realizó estudios profundos sobre el efecto de la 5-fluorocitosina (flucitosina), sobre la germinación de Aspergillus fumigatus y su subsecuente división celular (35), informando que la flucitosina es desaminada por el hongo a 5-fluorouracilo y subsecuente desfosforilada siendo incorporada dentro del RNA afectando la síntesis de proteínas y DNA (3,35). Su estructura química es la siguiente:



Estructura química de la Flucitosina.



Su modo de preparación se basa entre la reacción de un aldehído ó cetona y una tiosemicarbazida , en un medio ligeramente ácido como se muestra a continuación :



Síntesis de tiosemicarbazonas (11).

Así mismo se ha reportado que las ( $\infty$ )-N-heterocíclicas capboxialdehído tiosemicarbazonas y sus complejos de hierro y cobre inhiben la división celular en el Síndrome de Ehrlich (Células tumorales de hidropesía de abdomen " ascitis? ) -- (13).

En 1952 Johnson, Joyner and Perry observaron la actividad antibacteriana , antiviral y antitumoral de algunas tiosemicarbazonas, esta actividad ha sido en general atribuida a su actividad quelante hacia iones metálicos y su capacidad como reductores(16,25).

En 1981 Ray informa de la estructura cristalina y molecular tridentada, 3-hidroxiamino-2-butanona tiosemicarbazona, agente antiviral y antibacteriano haciendo un análisis conformacional entre los ligantes libres y complejos metálicos para buscar una posible relación de la actividad antibacteriana con la estructura química de estos compuestos (20).

Se ha estudiado poco sobre la posible actividad de estos compuestos contra hongos, sin embargo Ashok K. Srivata en 1976, quien utilizó varios de estos fármacos, encontró por técnicas de placa de agar, a diferentes concentraciones desde una dilución 1:1 000 hasta 1:1 000 000 que el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de las colonias miceliadas de Aspergillus niger, fué la siguiente(28):

| Nombre del compuesto                               | % de inhibición después de 96 H. |          |             |
|--|----------------------------------|----------|-------------|
|  | 1:1000                           | 1:10 000 | 1:1 000 000 |
| 2-fluoro-3-metil fenil<br>4'-clorofenil K          | 100                              | 54.76    | 16.66       |
| 2-fluoro-5-metil fenil-4'-<br>fluorofenil K        | 100                              | 92.85    | 64.28       |
| 2-fluoro-5-metilfenil-k                            | 100                              | 100      | 100         |
| 2-clorofenoximetil-5'-<br>fluoro-2'-metoxifenil KT | 85.98                            | 77.12    | 52.76       |
| 4-nitrofenoximetil-5'-<br>fluoro-2'-metoxifenil    | 100                              | 100      | 71.25       |

Donde K significa derivado de cetona y KT tiosemicarbazona cetona.

Modificado de Ashok K. Srivata.

Encontrando que la comparacion de el efecto, las tiosemicarbazonas probadas era muy similar a la de los compuestos con efecto potencial mejor, así como una inhibición total del hongo probado.

También se ha utilizado la evaluacion de el efecto de las tiosemicarbazonas por medio de placas de agar observando el halo de inhibición a una determinada concentracion para el crecimiento del hongo(5,25). En los estudios realizados por Smith en --- 1975 y P. Van Auwera en 1986 han empleado el método turbidimétrico con algunas variaciones(1, 17, 18). Este es un método eficaz para comparar el crecimiento de los hongos en base al porcentaje de transmitancia, indicando el crecimiento del hongo por turbidez en el medio (17). Para probar el efecto de diferentes fármacos "in vitro", se han empleado una serie de dilucionesdobles a partir de una solucion patrón, evaluando el crecimiento a una temperatura y tiempo determinado para cada hongo; esta misma técnica se ha empleado para probar el efecto fungicida ó fungistático de las tiosemicarbazonas.

Es importante señalar que para los resultados obtenidos - de el crecimiento de el hongo deben de ser tomados en cuenta - factores tales como: tipo de medio, temperatura, tiempo de incubación, pH y cantidad de inóculo inicial, así es necesario controlar estos factores para que la susceptibilidad sólo se vea afectada por el fármaco empleado (8,9,19,21).

En consecuencia a través del uso de estos fármacos para - tratamientos de enfermedades provocadas por hongos a un nivel superficial o sistémico, surge la inquietud de buscar otro tipo de fármacos capaces de inhibir el crecimiento de algunos de

Los hongos más frecuentes en las infecciones humanas, tanto filamentosos ( A. fumigatus, R. arrhizus, I. mentagrophytes por ejemplo ), como levaduriformes ( C. albicans y C. neoformans ). Evaluando inicialmente su actividad "in vitro" - con respecto a fármacos ya conocidos para su tratamiento (18, 22, 27, 30, 34).

## OBJETIVOS

- 1) EVALUACION DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA Y/O FUNGISTATICA DE LAS TIOSEMICARBAZONAS
- 2) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) COMPUESTOS "in vitro".
- 3) OBSERVACION MICROSCOPICA DE DAÑOS A LAS DIFERENTES ES TRUCTURAS DE LOS HONGOS ESTUDIADOS.
- 4) OBSERVACION DE LA VARIACION EN EL EFECTO PRODUCIDO POR LOS DIFERENTES SUBSTITUYENTES EN LA TIOSEMICARBAZONA , SOBRE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA Y/O FUNGISTATICA.

## MATERIAL Y METODOS

CEPAS DE HONGOS. Se utilizarón 5 tipos de hongos crecidos en medio YNBG sólido obtenidos del cepario del Laboratorio de Micología Médica y Diagnóstica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán U.N.A.M.:

Hongos filamentosos: Aspergillus fumigatus  
Rhizopus arrhizus  
Trichophyton mentagrophytes

Hongos levaduriformes: Candida albicans  
Cryptococcus neoformans

INOCULO. La preparación del inóculo se realizó por separado : levaduras y hongos filamentosos. En procedimientos diferentes.

Los hongos levaduriformes fuerón cosechados de un cultivo de 7 días de crecimiento con 5 ml de solución salina fisiológica(S.S.F.). La suspensión obtenida fué llevada a un ajuste de concentración constante de 25 % de transmitancia a 580 nm de longitud de onda(aprox.  $1 \times 10^6$  cel/ml).

Los hongos filamentosos fuerón tratados de la siguiente manera: Las esporas se cosecharón de un crecimiento de 7 días en medio YNBG sólido por inundación de la superficie del crecimiento con S.S.F. sacudiendo el tubo para liberar las esporas . La suspensión de esporas fue agitada con perlas de vidrio y resuspendidas en un tubo de ensaye ó matraz erlenmeyer de 50 ml , el ajuste espectofotométrico fué igual que para las levaduras(1,17). Tanto las levaduras como las esporas sufrierón la siguiente dilución : 1 ml de la suspensión ajustada fué llevada a 50 ml de YNBG líquido estéril para obtener un inóculo de 1:50 de cada hongo a tratar.

BASE DE NITROGENO LEVADURA(YNBG). 6.7 g de base de nitrógeno levadura y 10 g de glucosa se mezclaron en 100 ml de agua destilada estéril para hacer una solución patrón. Se filtró por millipore ( $22\mu$ ) y se conservó para su uso a 4°C. De la solución anterior se realizó una dilución de 10 veces el concentrado en agua destilada estéril.

BASE DE AGAR Se suspendieron 20 g de agar bacteriológico en 900 ml de agua destilada estéril, calentando para disolver el agar, se esterilizó por  $15'/121\text{ lb/pul}^2$  de presión. Se mezcló la Base de Nitrógeno Levadura diluida con la Base de Agar en condiciones de esterilidad.

YNBG LIQUIDO. Se efectuó el mismo procedimiento, sólo que para este se utilizó Caldo Sabouraud Dextrosa en sustitución de la base de agar(29).

#### FARMACOS ANTIMICOTICOS

ANFOTERICINA B. (888mcg/mg lote 86F0059-SQUIBB\*)

Fue disuelta en Dimetil Sulfoxido (DMSO) a una concentración de 1280 mg/l. La dilución de este compuesto patrón fue hecha a un 100 % de DMSO grado Q.P.

KETOCONAZOL (99.64% de Pureza-FORMEX\*\*). Fue disuelto en DMSO a una concentración final de 1280 mg/l. La dilución de este compuesto fue hecha en 100% de DMSO grado Q.P.

\*Donación de Lab. SQUIBB de MEXICO S.A.

NISTATINA. (63S0 U/mg-FORMEX). Fué disuelto a una concentración final de 1280 mg/l. La dilución fué hecha en 100% de DMSO Q.P.

5-Br Uracilo (F.E.S.C.). Fué disuelto en agua destilada estéril a una concentración de 1280 mg/l.

TIOSEMICARBAZONAS. Sintetizadas en el Instituto de Química de la U.N.A.M. a partir de salicilaldehído y 5-Br salicilaldehído (BrPhSNO) y la tiosemicarbazida correspondiente usando ácido acético como catalizador ( 11 ) ver fig. 1.

Todas fueron disueltas en acetona Q.P. a una concentración final de 1280mg/l. Todas las soluciones fueron concentradas hasta su uso a 4°C.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI). Método de dilución en caldo.

Las sustancias control y TSC fueron corridas en paralelo, para lo cual se prepararon una serie de diez diluciones dobles partiendo de las soluciones patrón de 1280 mg/l hasta obtener una solución de 80 mg/l. Estas se consideraron las diluciones de trabajo.

METODO DE LA PRUEBA ( 5,21,29 ). Se colocaron tubos estériles (11X16 mm) en una gradilla numerada del 1 al 11. Se adiciono 7.2 ml. de YNBG líquido en el tubo 1 más 0.8 ml de solución de trabajo. A los 10 tubos restantes de cada serie se se les adicionaron 4 ml de YNBG líquido estéril realizándose diluciones dobles sucesivas desde el tubo 1 hasta el 10.

El tubo 11 fué el tubo control, el cual contenía compuesto a probar (29). Posteriormente se adiciono 1 ml a todos los tu bos de inóculo así las concentraciones finales fueron:

| TUBO | mg/l  | TUBO | mg/l         |
|------|-------|------|--------------|
| 1    | 56.88 | 7    | 0.88         |
| 2    | 28.44 | 8    | 0.44         |
| 3    | 14.22 | 9    | 0.22         |
| 4    | 7.11  | 10   | 0.11         |
| 5    | 3.55  | 11   | tubo control |
| 6    | 1.77  |      |              |

Para el caso de nistatina que fué preparada a una solu ción patrón de 1280 mg/l y considerando que la concentración de esta se encuentra en 6380 U/mg, la solución patrón corres ponde a una concentración de  $8.16 \times 10^6$  U/l, así la solución de trabajo fué de  $5.104 \times 10^5$  U/l donde las equivalencias pa ra las diluciones anteriores en U/l para cada dilución se re sume de la siguiente manera:

| DILUCION | EQUIVALENCIA | DILUCION | EQUIVALENCIA |
|----------|--------------|----------|--------------|
| 1        | 51040        | 6        | 1595         |
| 2        | 25520        | 7        | 797,5        |
| 3        | 12720        | 8        | 398          |
| 4        | 6380         | 9        | 199.3        |
| 5        | 3190         | 10       | 99.68        |

El control de acetona y DMSO se corrió de la misma ma nera que las diluciones dobles para cada hongo.

Todos los tubos se agitaron para homogenizar y posteriormente se incubaron a 37°C durante 48 a 72 horas dependiendo del hongo ( 5 ). Transcurrido el tiempo de incubación se efectuó la lectura visual y espectrofotométrica de cada tubo para medir el grado de turbidez ( crecimiento del hongo ) a una longitud de onda de 580 nm.

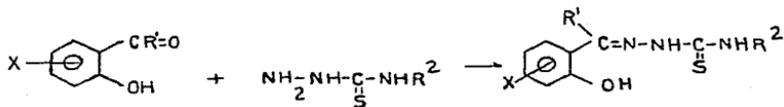
#### MICROSCOPIA.

Se realizó por medio de tinción de Gram para las levaduras, y para los hongos filamentosos se realizó el mismo procedimiento, sólo que se empleo la técnica de azul de algodón y lactofenol ( 6,19 ).

En el caso de C. neoformans se realizó adicionalmente - observación de la capsula con tinta china ( 7,21 ).

El análisis estadístico solo consistio en el cálculo - de la media y desviación estándar para cada valor obtenido.

Fig 1.

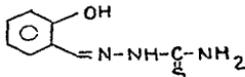


Salicilaldehído

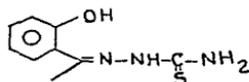
Tiosemicarbazida

Tiosemicarbazona

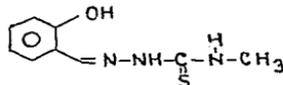
X = H, R' = H, R<sup>2</sup> = H SNO. Tiosemicarbazona del salicilaldehído



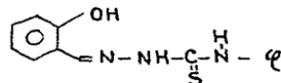
X = H, R' = H, R<sup>2</sup> = Me. MeSNO. 4-Metil-tiosemicarbazona del salicilaldehído.



X = H, R' = H, R<sup>2</sup> = φ PhSNO. 4-Fenil-tiosemicarbazona del salicilaldehído.



X = H, R' = Me, R<sup>2</sup> = H. HAT. Tiosemicarbazona del 2-hidroxiacetofenona.



X = Br, R' = H, R<sup>2</sup> = φ 5BrPhSNO. Tiosemicarbazona del 5-Br salicilaldehído.

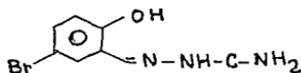


Fig. 1. Síntesis de tiosemicarbazonas utilizadas.

## RESULTADOS

La comparación del efecto que presentan las diferentes TSC utilizadas contra los 5 tipos de hongos, se muestra en los cuadros y figuras de este trabajo, los valores mostrados son los - promedios de un total de 5 lecturas para cada compuesto, así co- mo su desviación estándar.

### CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA ( CMI ).

Los cuadros III, IV y V muestran las lecturas visuales de todos los compuestos probados en el caso de los hongos filamentosos, los cuadros VI y VII la de los hongos levaduriformes. De estos datos se partió para la obtención de la CMI de una manera cualitativa y dió la pauta para la elección de las concentraciones a probar por turbidimetría.

Los cuadros VIII, IX, X, XI y XII muestran las lecturas de turbidimetría a 580 nm de longitud de onda para la obtención de la CMI, indicando la inhibición del crecimiento tanto de los - hongos filamentosos como el de los levaduriformes.

Las figuras 2, 3, 4, 5 y 6 son los resultados de los valores anteriores, en esta también se muestran los valores de inhi- bición del crecimiento tanto de los hongos filamentosos como el de los levaduriformes, y nos da una comparación de la efectividad de las TSC y los controles.

Las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 nos muestran la comparación - de cada compuesto individualmente con todos los hongos empleados en el experimento.

Resumiendo los valores encontrados para los tres hongos filamentosos:

Cuadro I CMI expresada en mg/l para los diferentes hongos filamentosos a las 48 y 72 horas de crecimiento.

| Compuestos.  | <u>A. fumigatus</u> | <u>R. arrhizus</u> | <u>I. mentagrophytes</u> |
|--------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| SNO          | 7.11                | 1.77               | 3.55                     |
| HAT          | 7.11                | 1.77               | 7.11                     |
| MeSNO        | 7.11                | 1.77               | 3.55                     |
| PhSNO        | 7.11                | 1.77               | 1.77                     |
| 5BrPhSNO     | 7.11                | 1.77               | 3.55                     |
| Controles:   |                     |                    |                          |
| Ketoconazole | 7.11                | 3.55               | 1.77                     |
| AmB          | 14.22               | 3.55               | 3.55                     |
| 5-Br-Uracilo | -                   | -                  | -                        |
| Nistatina    | 14.22               | -                  | -                        |

Las características coloniales de los tres hongos filamentosos se observó afectada en las diluciones de menor concentración de antimicótico, este efecto se expreso en un retraso en la maduración de la colonia.

En el caso de A. fumigatus la maduración hacia una colonia verde parduzca no se observó durante las primeras 48 H de incubación y si la producción de exudado sobre las colonias de color blanco de cada dilución. El control sin embargo, si presentó su coloración típica, pero no presento exudado sobre la colonia.

Para el caso de R. arrhizus la maduración hacia una colonia de tipo algodonosa salpicada de puntos negros tampoco fué observada en estas últimas diluciones, sólo en el tubo de la dilución final y el control.

Para T. mentagrophytes sólo se observó un crecimiento poco uniforme de la colonia en la superficie del tubo de cada dilución, el control cubrió la superficie del medio de cultivo empleado.

Estas características fueron observadas en las TSC y los controles empleados.

El cuadro XI muestra los valores obtenidos de las lecturas de transmitancia encontradas para cada uno de los compuestos probados contra C. albicans. Las concentraciones encontradas para cada TSC son: 3.55 mg/l para PhSNO y 5 Br-PhSNO en este caso el valor encontrado para HAT fué de 7.11 mg/l y 14.22 mg/l para SNO y PhSNO los dos controles empleados presentaron una CMI de 7.11 mg/l.

El cuadro XII muestra los valores encontrados para C. neoformans. Las CMI para cada TSC son: HAT, MeSNO y 5 Br-PhSNO 3.55 mg/l, SNO y PhSNO 7.11 mg/l. En este caso la CMI de las 3 primeras corresponde al valor obtenido para Ketoconazole y 5 Br-Uracilo y el de las dos últimas a Nistatina y AmB.

Es importante señalar que el crecimiento de los hongos filamentosos y levaduriformes en acetona y DMSO se presentó de igual manera que el control para cada uno y sólo sirvió para eliminar un posible efecto de estos compuestos sobre el crecimiento de alguno de ellos.

Cuadro 11 , CMI expresadas en mg/l para los dos diferentes hongos levaduriformes a las 48 y 72 horas de -- crecimiento:

| Compuesto    | <u>C. albicans</u> | <u>C. neoformans</u> |
|--------------|--------------------|----------------------|
| SNO          | 14.22              | 7.11                 |
| HAT          | 7.11               | 3.55                 |
| MeSNO        | 14.22              | 3.55                 |
| PhSNO        | 3.55               | 7.11                 |
| 5 BrPhSNO    | 3.55               | 3.55                 |
| Controles:   |                    |                      |
| Ketoconazole | 7.11               | 3.55                 |
| Nistatina    | 7.11               | 7.11                 |
| AmB          | -                  | 7.11                 |
| 5Br Uracilo  | -                  | 3.55                 |

El crecimiento de A. fumigatus se esquematiza en la figura 2 donde el eje de las ordenadas corresponde al % de transmitancia y el eje de las abscisas a la concentración en mg/l de -- las sustancias utilizadas. En esta se determino el grado de inhibición para el crecimiento del hongo así como el efecto que tiene cada una de las sustancias en comparación con los controles:

| % de transmitancia<br>(Rango) | Concentración mg/l<br>(Rango) | Substancia    |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------|
| 90-100                        | 7.0-15.0                      | BrPhSNO y HAT |
| 80-100                        | 7.0-15.0                      | SNO           |
| 70-100                        | 7.0-15.0                      | PhSNO         |
| 60-100                        | 7.0-15.0                      | MeSNO         |
| 80-100                        | 3.0-15.0                      | Ket           |
| 70-100                        | 7.0-15.0                      | AmB           |

En base a lo anterior se evaluó de mayor a menor la eficacia de cada compuesto contra el hongo encontrando:

BrPhSNO > y HAT > SNO > PhSNO > MeSNO

La comparación con los controles nos establece que los compuestos probados contra este hongo tienen efecto sobre el crecimiento ya que el presente estudio no determina la potencia para cada sustancia.

La figura 3 nos resume los siguientes resultados para R.a.:

| % de transmitancia<br>(Rango) | Concentración mg/l<br>(Rango) | Substancia |
|-------------------------------|-------------------------------|------------|
| 30-100                        | 2.0-8.0                       | BrPhSNO    |

|        |         |       |
|--------|---------|-------|
| 90-100 | 2.0-8.0 | MeSNO |
| 80-100 | 2.0-8.0 | SNO   |
| 80-100 | 1.5-8.0 | PhSNO |
| 60-100 | 2.0-8.0 | HAT   |
| 90-100 | 1.5-8.0 | Ket   |
| 40-100 | 1.8-8.0 | AmB   |

En base a lo anterior la evaluación de mayor a menor de la eficacia de cada compuesto sobre R. arrhizus :

MeSNO > PhSNO , SNO > HAT > BrPhSNO

La figura 4 nos resume los siguientes resultados para I.m. :

| % de transmitancia | Concentración mg/l | Substancia |
|--------------------|--------------------|------------|
| 80-100             | 1.0-15             | PhSNO      |
| 40-100             | 1.0-15             | SNO        |
| 30-100             | 1.0-15             | HAT        |
| 30-100             | 2.0-15             | BrPhSNO    |
| 30-100             | 2.0-15             | MeSNO      |
| 70-100             | 2.0-15             | Ket        |
| 40-100             | 2.0-15             | AmB        |

En base a lo anterior la evaluación de mayor a menor eficacia de cada compuesto contra I. mentagrophytes :

PhSNO > SNO > HAT, MeSNO, BrPhSNO

La figura 5 nos resume los siguientes resultados para C.a. :

| % de transmitancia | Concentración | Substancia |
|--------------------|---------------|------------|
| 90-100             | 30.0-60       | MeSNO      |
| 90-100             | 10.0-60       | SNO        |
| 70-100             | 3.0-8.0       | PhSNO      |
| 80-100             | 3.0-8.0       | BrPhSNO    |
| 85-100             | 3.0-8.0       | HAT        |
| 30-100             | 3.0-8.0       | Nist       |
| 30-100             | 3.0-8.0       | Ket        |

En base a lo anterior la evaluación de mayor a menor ,  
la eficacia de cada compuesto contra C. albicans:

HAT > PhSNO > BrPhSNO > SNO > MeSNO

La figura 6 nos resume los resultados encontrados para--  
C. neoformans :

| % de transmitancia | Concentración mg/l | Substancia |
|--------------------|--------------------|------------|
| 90-100             | 3.0-8.0            | 5 BrPhSNO  |
| 90-100             | 3.0-8.0            | MeSNO      |
| 30-100             | 3.0-8.0            | PhSNO      |
| 90-100             | 3.0-8.0            | HAT        |
| 30-100             | 3.0-8.0            | SNO        |
| 50-100             | 3.0-8.0            | Ket        |
| 90-100             | 3.0-8.0            | 5BrU       |
| 60-100             | 3.0-8.0            | Nist       |

En base a lo anterior la evaluación de la eficacia para los  
compuestos probados es la siguiente:

BrPhSNO, MeSNO > HAT > SNO > PhSNO

En este caso el comportamiento de 5 BrU es muy similar al-  
que provocan las 3 TSC con mayor eficacia para este hongo.

Efecto individual de las sustancias probadas, para todos los hongos.

En la figura 7, el efecto de BrPHSNO se determinó en base al % de transmitancia en el eje ( y ) y concentración ( mg/l ) en el eje ( x ), contra todos los hongos tratados de mayor a menor siendo:

R. arrhizus > I. mentagrophytes > A. fumigatus > C. neoformans >  
- C. albicans.

En la figura 8, el efecto de PhSNO se determinó contra todos los hongos tratados de mayor a menor siendo:

R. arrhizus, I. mentagrophytes > C. albicans > A. fumigatus >  
> C. neoformans

En la figura 9, el efecto de SNO se determinó contra todos los hongos tratados de mayor a menor siendo:

R. arrhizus > I. mentagrophytes > C. neoformans > A. fumigatus -  
> C. albicans

En la figura 10, el efecto de MeSNO se determinó contra todos los hongos tratados de mayor a menor siendo:

R. arrhizus > C. neoformans > I. mentagrophytes > A. fumigatus  
> C. albicans

En la figura 11, el efecto de HAT se determinó contra todos los hongos tratados de mayor a menor siendo:

R. arrhizus } C. neoformans } I. mentagrophytes } A. fumigatus  
    » C. albicans

## MICROSCOPIA

La observación directa del crecimiento de los hongos filamentosos en cada tubo de las diluciones menores a la CMI, reveló de una manera general una evolución retrasada del crecimiento del hongo, dependiente de la concentración existente de antimicótico probado. Esta evolución se refiere principalmente a las estructuras que dan las características de madurez al hongo.

A. fumigatus. La observación directa de cada dilución por medio de la técnica de azul de algodón y lactofenol reveló por medio de la comparación con el control, una disminución en la cantidad de esporas presentes en la cabeza conidial ó vesícula. El aumento en la cantidad de estas fué observado conforme disminuía la cantidad de antimicótico presente en el medio. Este efecto fué más fuerte en el caso de PhSNO y los dos controles Ket y AmB. La revisión de la mayoría de las estructuras, tales como el conidióforo y las hifas no revelaron cambio aparente.

R. arrhizus. La observación directa de cada dilución para este hongo, la cual fué hecha de la misma manera que la del hongo anterior, reveló por medio de la comparación con el control una disminución en la concentración de esporas dentro de los esporangios, esto fué observado por medio de la comparación de esporas presentes al rededor de las cabezas, ya que este tipo de estructuras resulta ser muy frágil al manejo ó manipulación para la preparación de un frotis. En este caso, también la evolución del crecimiento del hongo se incrementaba de acuerdo a la disminu

ción de concentración de antimicótico, pero esta nunca llego a un crecimiento similar al observado en el control. Es importante mencionar que este hongo fué el que mayor inhibición -- presentó por parte de las TSC.

I. mentagrophytes. La observación del crecimiento de este hongo en las diluciones de TSC menores a la CMI mostró só lo la inhibición en el crecimiento de la colonia del hongo - en el medio de cultivo, ya que la observación directa con - azul de algodón y lactofenol no revelo un daño en las estruc turas presentes en el mismo, la concentración de macroconidi as no presento mucha variación en relación a las observadas - en el control.

C. albicans. En este caso la microscopia no fué muy u-- til ya que la observación por medio de la tinción de gram só lo mostro diferencias en cuanto al número de levaduras pre-- sentes en cada dilución y no un cambio en la estructura de - la misma siendo en este caso la comparación con el control- semejante en cuanto a características físicas de esta.

C. neoformans. La microscopia por medio de tinción de - gram ,al igual que para candida no mostro ningun cambio im- portante en la estructura de la levadura. En este caso la - observación con tinta china mostró una disminución en el ta maño de la capsula en todas las diluciones de TSC y contro- les empleados como antimicóticos, en comparación con la cap- sula presente en las levaduras del tubo control. Esta dismi- nución se evaluó en un 80 % comparada con la capsula de las levaduras sin antimicóticos.

Es importante señalar que en las diluciones de las TSC probadas en todos los hongos no se observó contaminación bacteriana, estando por ejemplo, en algunas diluciones de - Ket presente esta contaminación.

CUADRO III  
 TURBIDIMETRIA VISUAL. Resultados obtenidos para Aspergillus fumigatus.  
 Lectura de 48 horas a 37°C.

| Concentración<br>mg/l | BrPhSNO | MeSNO | HAT  | PhSNO | SNO  | Ket  | AmB  | Nist |
|-----------------------|---------|-------|------|-------|------|------|------|------|
| 56.88                 | -       | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -    |
| 28.44                 | -       | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -    |
| 14.22                 | -       | -     | -    | -     | -    | -    | -    | +    |
| 7.11                  | lig.    | -     | -    | -     | lig. | -    | -    | ++   |
| 3.55                  | ++      | +     | +    | +     | +    | +    | +    | +++  |
| 1.77                  | +++     | +++   | ++   | ++    | ++   | +    | +    | ++++ |
| 0.88                  | ++++    | +++   | ++   | ++    | +++  | ++   | ++   | ++++ |
| 0.44                  | ++++    | ++++  | ++++ | ++    | ++++ | ++   | +++  | ++++ |
| 0.22                  | ++++    | ++++  | ++++ | +++   | ++++ | +++  | ++++ | ++++ |
| 0.11                  | ++++    | ++++  | ++++ | ++++  | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |

CRECIMIENTO CONTROL: +++. Lig.=Crecimiento ligero.

CUADRO IV  
TURBIDIMETRIA VISUAL

Resultados obtenidos para Rhizopus arrhizus. Lectura de 48 horas a 37°C

| Concentración<br>(mg/l) | BrPhSNO | MeSNO | HAT  | PhSNO | SNO | Ket. | AmB. | Nist. |
|-------------------------|---------|-------|------|-------|-----|------|------|-------|
| 56.88                   | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -    | -     |
| 28.44                   | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -    | -     |
| 14.22                   | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -    | -     |
| 7.11                    | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -    | -     |
| 3.55                    | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -    | -     |
| 1.77                    | -       | -     | lig. | -     | -   | +    | +    | +     |
| 0.88                    | +       | ++    | +    | +     | +   | ++   | ++   | ++    |
| 0.44                    | ++      | +++   | +++  | +++   | +++ | +++  | +++  | +++   |
| 0.22                    | +++     | +++   | +++  | +++   | +++ | +++  | +++  | +++   |
| 0.11                    | +++     | +++   | +++  | +++   | +++ | +++  | +++  | +++   |

CRECIMIENTO CONTROL: +++ lig. Crecimiento ligero.

CUADRO V  
TURBIDIMETRIA VISUAL

Resultados obtenidos para Trichophyton mentagrophytes. Lectura de 72 horas a 37°C.

| Concentración<br>(mg/l) | BrPhSNO | MeSNO | HAT  | PhSNO | SNO | Ket. | AmB | Nist. |
|-------------------------|---------|-------|------|-------|-----|------|-----|-------|
| 56.88                   | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -   | -     |
| 28.44                   | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -   | -     |
| 14.22                   | -       | -     | -    | -     | -   | -    | -   | -     |
| 7.11                    | -       | lig.  | -    | -     | -   | -    | -   | -     |
| 3.55                    | -       | lig.  | lig. | -     | -   | lig. | -   | lig.  |
| 1.77                    | +       | +     | +    | -     | +   | -    | +   | -     |
| 0.88                    | ++      | ++    | ++   | +     | ++  | +    | +   | -     |
| 0.44                    | ++      | ++    | ++   | ++    | +++ | +    | +   | -     |
| 0.22                    | +++     | +++   | +++  | +++   | +++ | ++   | ++  | -     |
| 0.11                    | +++     | +++   | +++  | +++   | +++ | +++  | +++ | -     |

CRECIMIENTO CONTROL: +++ lig. crecimiento ligero

CUADRO VI  
TURBIDIMETRIA VISUAL

Resultados obtenidos para Candida albicans 7A. Lectura de 48 --  
horas a 37°C

| Concentración<br>(mg/l) | BrPhSNO | MeSNO | HAT  | PhSNO | SNO  | Ket. | AmB. | Nist. |
|-------------------------|---------|-------|------|-------|------|------|------|-------|
| 56.88                   | -       | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -     |
| 28.44                   | -       | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -     |
| 14.22                   | -       | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -     |
| 7.11                    | -       | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -     |
| 3.55                    | lig.    | -     | -    | +     | -    | +++  | -    | +++   |
| 1.77                    | ++      | +++   | ++   | +++   | +++  | ++++ | ++   | ++++  |
| 0.88                    | +++     | ++++  | +++  | ++++  | ++++ | ++++ | +++  | ++++  |
| 0.44                    | ++++    | ++++  | ++++ | ++++  | ++++ | ++++ | ++++ | ++++  |
| 0.22                    | ++++    | ++++  | ++++ | ++++  | ++++ | ++++ | ++++ | ++++  |
| 0.11                    | ++++    | ++++  | ++++ | ++++  | ++++ | ++++ | ++++ | ++++  |

CRECIMIENTO CONTROL: ++++ lig. Crecimiento ligero.

CUADRO VII  
TURBIDIMETRIA VISUAL

Resultados obtenidos para Cryptococcus neoformans. Lectura de 72 horas a 37°C.

---

Concentración BrPhSNO MeSNO HAT PhSNO SNO Ket. Amb Nist. 5BrU.  
(mg/l)

|       |     |     |     |      |     |      |     |      |     |     |
|-------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|
| 56.88 | -   | -   | -   | -    | -   | -    | -   | -    | -   | -   |
| 28.44 | -   | -   | -   | -    | -   | -    | -   | -    | -   | -   |
| 14.22 | -   | -   | -   | -    | -   | -    | -   | -    | -   | -   |
| 7.11  | -   | -   | -   | -    | -   | lig. | -   | lig. | -   | -   |
| 3.55  | -   | -   | -   | +    | +   | +    | ++  | +    | -   | -   |
| 1.77  | ++  | +++ | +++ | ++   | +++ | +++  | ++  | ++   | +++ | +++ |
| 0.88  | +++ | +++ | +++ | +++  | +++ | +++  | ++  | +++  | +++ | +++ |
| 0.44  | +++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | +++  | +++ | +++  | +++ | +++ |
| 0.22  | +++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | +++  | +++ | +++  | +++ | +++ |
| 0.11  | +++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | +++  | +++ | +++  | +++ | +++ |

---

CRECIMIENTO CONTROL: +++, lig. Crecimiento ligero.

CUADRO VIII. Aspergillus fumigatus

Resultados de promedios y desviación estandar, de las lecturas turbidimétricas para el hongo filmentoso.

---

| Concentración<br>(mg/l) | Br-PhSNO      | MeSNO         | HAT           |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 14.22                   | 0.968 ± 0.013 | 0.916 ± 0.068 | 0.914 ± 0.047 |
| 7.11                    | 0.913         | 0.645         | 0.864         |
| 3.55                    | 0.530         | 0.335         | 0.289         |
| 1.77                    | 0.302         | 0.323         | 0.286         |
| 0.88                    | 0.283         | 0.312         | 0.282         |
| 0.44                    | 0.259         | 0.305         | 0.270         |

| Concentración<br>(mg/l) | PhSNO         | SNO           | Ketoconazol   |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 14.22                   | 0.948 ± 0.009 | 0.930 ± 0.042 | 0.923 ± 0.057 |
| 7.11                    | 0.720         | 0.854         | 0.904         |
| 3.55                    | 0.507         | 0.272         | 0.863         |
| 1.77                    | 0.382         | 0.287         | 0.336         |
| 0.88                    | 0.372         | 0.269         | 0.315         |
| 0.44                    | 0.365         | 0.259         | 0.311         |

| Concentración<br>(mg/l) | Anfotericina B | Nistatina     |
|-------------------------|----------------|---------------|
| 14.22                   | 0.828 ± 0.05   | 0.848 ± 0.060 |
| 7.11                    | 0.696          | 0.551         |
| 3.55                    | 0.417          | 0.380         |
| 1.77                    | 0.377          | 0.332         |
| 0.88                    | 0.374          | 0.321         |
| 0.44                    | 0.373          | 0.313         |

---

CONTROL: 0.246 ± 0.044.

CUADRO IX Rhizopus arrhizus

Resultados de promedio y desviación estándar, de las lecturas turbidimétricas para el hongo filamentoso.

---

| Concentración<br>(mg/l) | BrPhSNO       | MeSNO         | PhSNO         |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 7.11                    | 0.968 ± 0.019 | 0.964 ± 0.006 | 0.942 ± 0.026 |
| 3.55                    | 0.948 0.061   | 0.938 0.060   | 0.929 0.023   |
| 1.77                    | 0.895 0.049   | 0.901 0.046   | 0.843 0.019   |
| 0.88                    | 0.345 0.125   | 0.255 0.048   | 0.497 0.069   |
| 0.44                    | 0.263 0.048   | 0.253 0.036   | 0.355 0.010   |

| Concentración<br>(mg/l) | SNO           | HAT           | Ketoconazol   |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 7.11                    | 0.939 ± 0.027 | 0.961 ± 0.046 | 0.971 ± 0.023 |
| 3.55                    | 0.929 0.027   | 0.935 0.039   | 0.934 0.043   |
| 1.77                    | 0.802 0.315   | 0.670 0.136   | 0.423 0.080   |
| 0.88                    | 0.502 0.077   | 0.342 0.052   | 0.275 0.027   |
| 0.44                    | 0.424 0.082   | 0.283 0.027   | 0.265 0.047   |

| Concentración<br>(mg/l) | Anfotericina B |
|-------------------------|----------------|
| 7.11                    | 0.914 ± 0.064  |
| 3.55                    | 0.089 0.059    |
| 1.77                    | 0.419 0.074    |
| 0.88                    | 0.274 0.088    |
| 0.44                    | 0.265 0.070    |

---

CONTROL: 0.295 ± 0.064

CUADRO X Trichophyton mentagrophytes

Resultados de promedios y desviación estándar, de las lecturas turbidimétricas para el hongo filamentoso

---

| Concentración<br>(mg/l) | BrPhSNO       | MeSNO         | PhSNO         |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 14.22                   | 0.890 ± 0.033 | 0.890 ± 0.065 | 0.888 ± 0.048 |
| 7.11                    | 0.862         | 0.827         | 0.878         |
| 3.55                    | 0.858         | 0.816         | 0.862         |
| 1.77                    | 0.426         | 0.356         | 0.858         |
| 0.88                    | 0.245         | 0.294         | 0.478         |
| 0.44                    | 0.240         | 0.265         | 0.262         |

| Concentración<br>(mg/l) | SNO           | HAT           | Ketoconazol   |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 14.22                   | 0.949 ± 0.048 | 0.854 ± 0.080 | 0.912 ± 0.030 |
| 7.11                    | 0.922         | 0.814         | 0.894         |
| 3.55                    | 0.845         | 0.569         | 0.905         |
| 1.77                    | 0.450         | 0.313         | 0.753         |
| 0.88                    | 0.374         | 0.294         | 0.512         |
| 0.44                    | 0.275         | 0.290         | 0.454         |

| Concentración<br>(mg/l) | Anfotericina B |
|-------------------------|----------------|
| 14.22                   | 0.912 ± 0.063  |
| 7.11                    | 0.889          |
| 3.55                    | 0.854          |
| 1.77                    | 0.422          |
| 0.88                    | 0.373          |
| 0.44                    | 0.364          |

---

CONTROL: 0.202 ± 0.058.

CUADRO XI Candida albicans

Resultados de promedios y desviación estándar, de las lecturas turbidimétricas para el hongo levaduriforme

---

| Concentración<br>(mg/l) | BrPhSNO       | HAT     |       | PhSNO   |       |       |
|-------------------------|---------------|---------|-------|---------|-------|-------|
| 7.11                    | 0.975 ± 0.012 | 0.979 ± | 0.021 | 0.934 ± | 0.053 |       |
| 3.55                    | 0.739         | 0.126   | 0.348 | 0.207   | 0.792 | 0.143 |
| 1.77                    | 0.352         | 0.177   | 0.313 | 0.069   | 0.246 | 0.088 |
| 0.88                    | 0.253         | 0.099   | 0.254 | 0.062   | 0.233 | 0.059 |
| 0.44                    | 0.214         | 0.095   | 0.238 | 0.095   | 0.233 | 0.083 |

| Concentración<br>(mg/l) | Ketoconazol |       | Nistatina |       |
|-------------------------|-------------|-------|-----------|-------|
| 7.11                    | 0.900 ±     | 0.054 | 0.947 ±   | 0.023 |
| 3.55                    | 0.333       | 0.231 | 0.352     | 0.149 |
| 1.77                    | 0.313       | 0.180 | 0.269     | 0.133 |
| 0.88                    | 0.296       | 0.142 | 0.245     | 0.131 |
| 0.44                    | 0.298       | 0.166 | 0.255     | 0.142 |

| Concentración<br>(mg/l) | SNO     |       | Concentración<br>(mg/l) | MeSNO   |       |
|-------------------------|---------|-------|-------------------------|---------|-------|
| 28.44                   | 0.976 ± | 0.020 | 56.88                   | 0.948 ± | 0.038 |
| 14.22                   | 0.954   | 0.027 | 28.44                   | 0.903   | 0.008 |
| 7.11                    | 0.327   | 0.057 | 14.22                   | 0.414   | 0.119 |
| 3.55                    | 0.315   | 0.056 | 7.11                    | 0.294   | 0.090 |
| 1.77                    | 0.264   | 0.076 | 3.55                    | 0.226   | 0.033 |

---

CONTROL: 0.245 ± 0.027.

CUADRO XII Cryptococcus neoformans Crecimiento de 72 horas a 37°C

Resultados de promedios y desviación estándar, de las lecturas turbidimétricas.

| Concentración (mg/l) | BrPhSNO |         | MeSNO |         | PhSNO |         |
|----------------------|---------|---------|-------|---------|-------|---------|
| 7.11                 | 0.948   | ± 0.044 | 0.975 | ± 0.028 | 0.981 | ± 0.021 |
| 3.55                 | 0.938   | 0.044   | 0.954 | 0.024   | 0.337 | 0.278   |
| 1.77                 | 0.225   | 0.065   | 0.237 | 0.060   | 0.180 | 0.049   |
| 0.88                 | 0.195   | 0.033   | 0.226 | 0.064   | 0.167 | 0.058   |
| 0.44                 | 0.203   | 0.037   | 0.205 | 0.068   | 0.167 | 0.048   |

| Concentración (mg/l) | SNO   |         | HAT   |         | 5 BrU |         |
|----------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| 7.11                 | 0.983 | ± 0.009 | 0.967 | ± 0.025 | 0.979 | ± 0.046 |
| 3.55                 | 0.337 | 0.169   | 0.942 | 0.045   | 0.928 | 0.063   |
| 1.77                 | 0.254 | 0.092   | 0.231 | 0.062   | 0.228 | 0.014   |
| 0.88                 | 0.192 | 0.013   | 0.200 | 0.035   | 0.193 | 0.041   |
| 0.44                 | 0.192 | 0.013   | 0.193 | 0.032   | 0.185 | 0.046   |

| Concentración (mg/l) | Anfotericina B |         | Ketoconazol |         | Nistatina |         |
|----------------------|----------------|---------|-------------|---------|-----------|---------|
| 7.11                 | 0.945          | ± 0.052 | 0.991       | ± 0.006 | 0.929     | ± 0.059 |
| 3.55                 | 0.248          | 0.054   | 0.556       | 0.131   | 0.678     | 0.083   |
| 1.77                 | 0.221          | 0.058   | 0.197       | 0.044   | 0.190     | 0.047   |
| 0.88                 | 0.175          | 0.032   | 0.184       | 0.038   | 0.212     | 0.077   |
| 0.44                 | 0.154          | 0.033   | 0.174       | 0.039   | 0.243     | 0.120   |

CONTROL: 0.191 ± 0.017

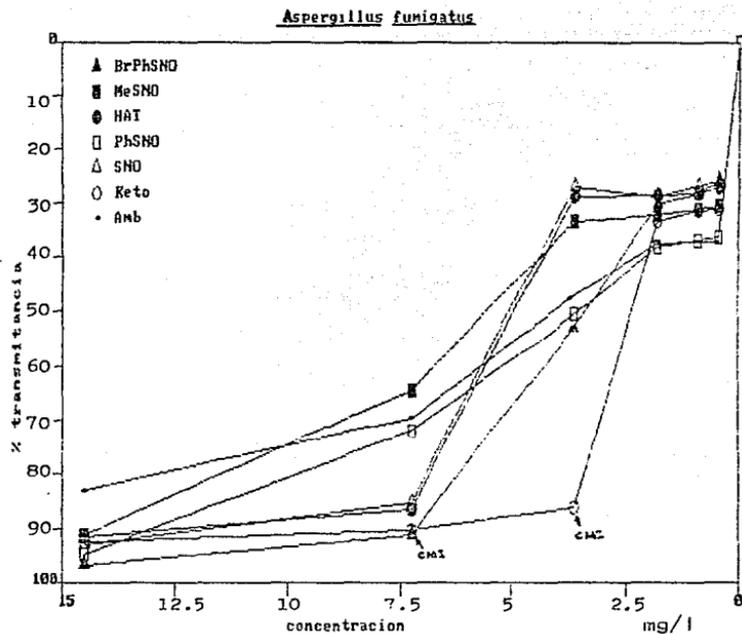


Fig.2. % de inhibición ejercido por las diferentes tiosemicarbazonas (▲ BrPhSNO, ■ MeSNO, ● HAT, □ PhSNO, △ SNO, y los controles ○ Ket, y • Amb) para Aspergillus fumigatus.

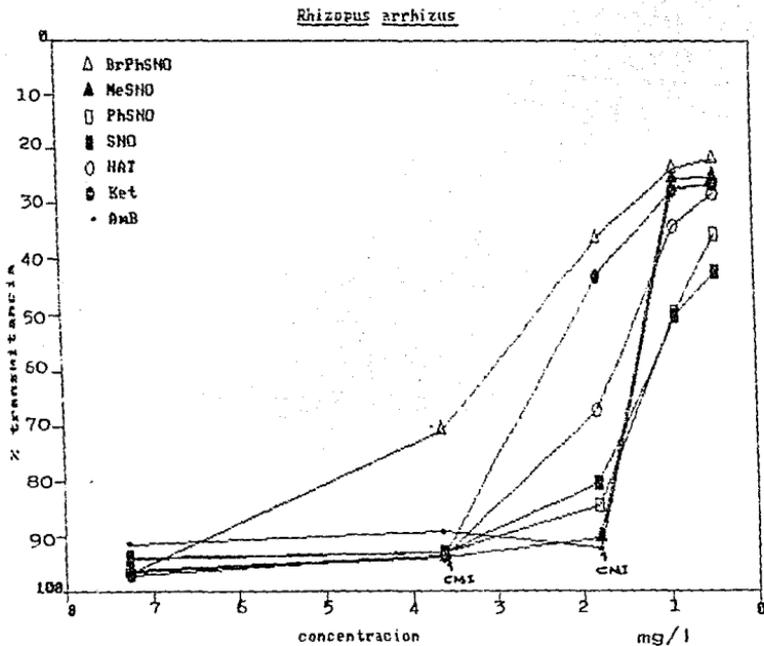


Fig.3 % de inhibición ejercido por las diferentes tiosemicarbazonas ( $\Delta$  BrPhSNO,  $\blacktriangle$  MeSNO,  $\square$  PhSNO,  $\blacksquare$  SNO,  $\circ$  HAT, y los controles para este hongo,  $\circ$  Ket y Amb) para Rhizopus arrhizus.

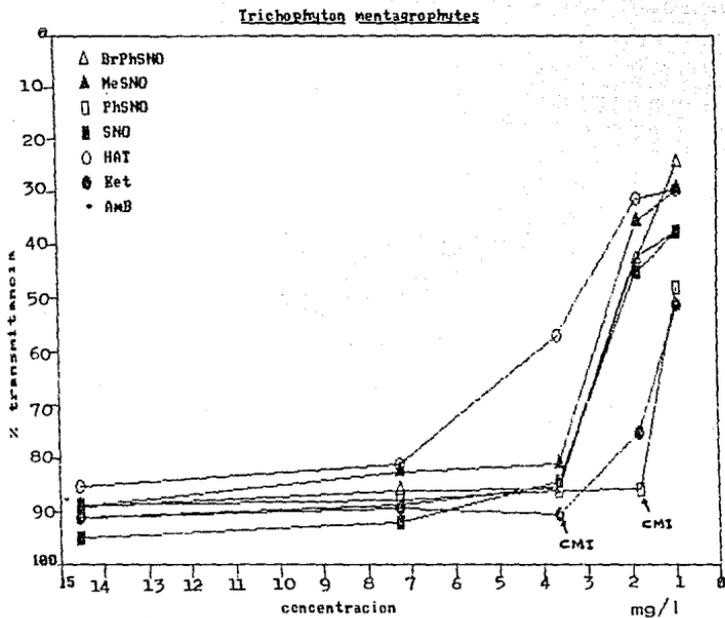


Fig.4 % de inhibición ejercido por las diferentes TSC (  $\Delta$  BrPhSNO,  $\blacktriangle$  MeSNO,  $\square$  PhSNO,  $\blacksquare$  SNO,  $\circ$  HAT, y los controles KetO, y  $\bullet$  AmB ) para Trichophyton mentagrophytes.

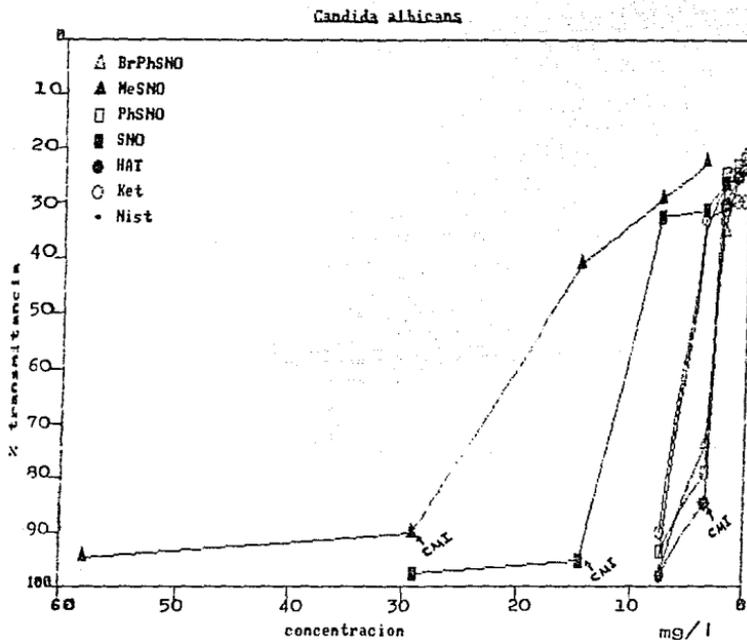


Fig 5. % de inhibición ejercido por las diferentes TSC ( $\Delta$  BrPhSNO,  $\blacktriangle$  MeSNO,  $\square$  PhSNO,  $\blacksquare$  SNO,  $\bullet$  HAT y los - controles  $\circ$  Ket, y  $\cdot$  Nist ) para Candida albicans.

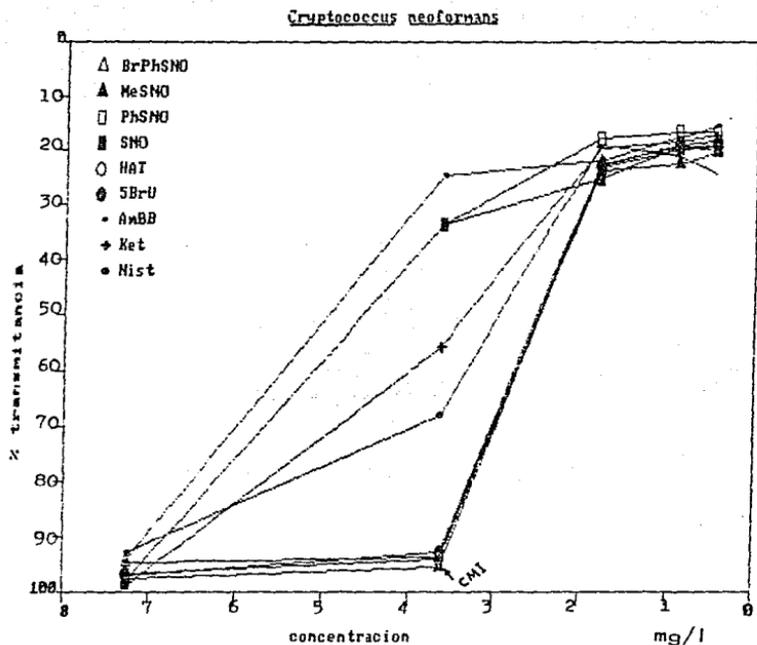


Fig.6 % de inhibición ejercido por las diferentes TSC ( $\Delta$  BrPhSNO,  $\blacktriangle$  MeSNO,  $\square$  PhSNO,  $\blacksquare$  SNO,  $\circ$  HAT,  $\odot$  5BrU y los controles  $\bullet$  AmBB,  $+$  Ket, y Nist  $\circ$ ) para Cryptococcus neoformans.

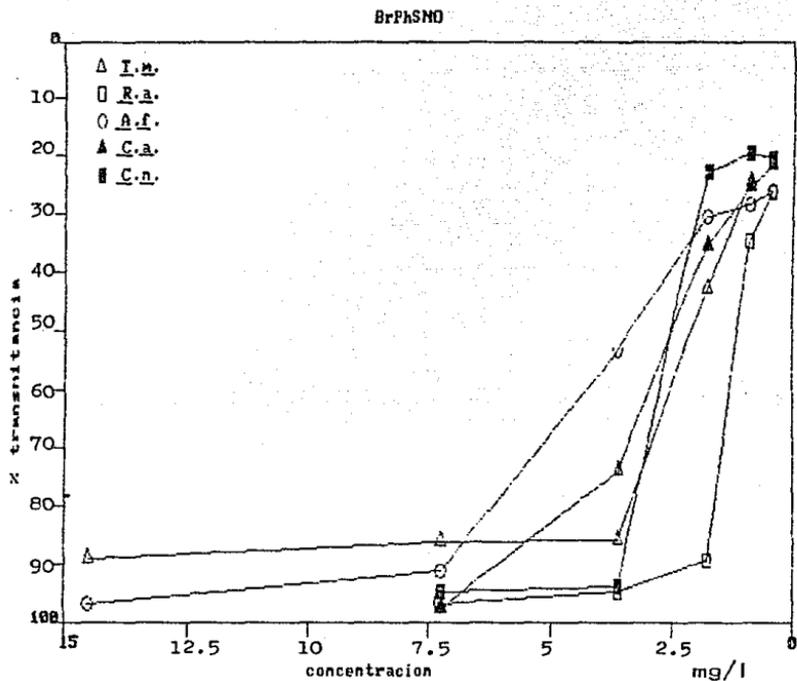


Fig.7 Efecto producido por BrPhSNO para todos los hongos probados ( $\Delta$ T.m.,  $\square$ R.a.,  $\circ$ A.f.,  $\blacktriangle$ C.a., y  $\blacksquare$ C.n.)

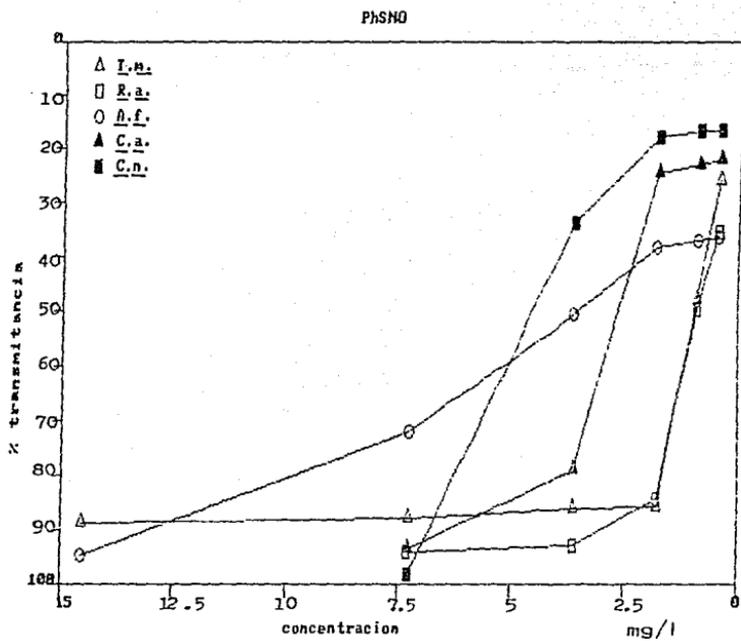


Fig 8. Efecto producido por PhSNO para todos los hongos probados (T.m., R.a., A.f., C.a., C.n.).

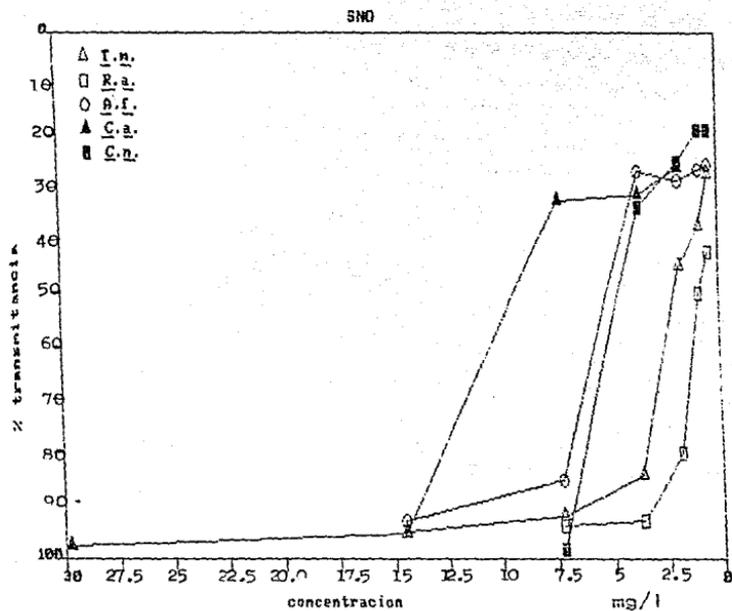


Fig.9. Efecto producido por SNO para todos los hongos probados ( T.m., R.a., A.f., C.a., C.n.)

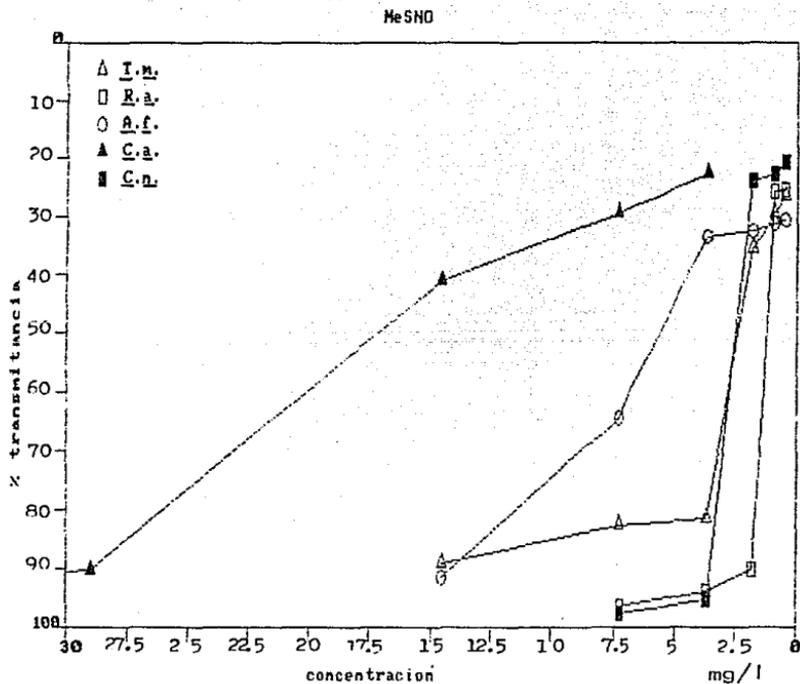


Fig.10. Efecto producido por MeSNO para todos los hongos probados ( T.m., R.a., A.f., C.a. y C.n.)

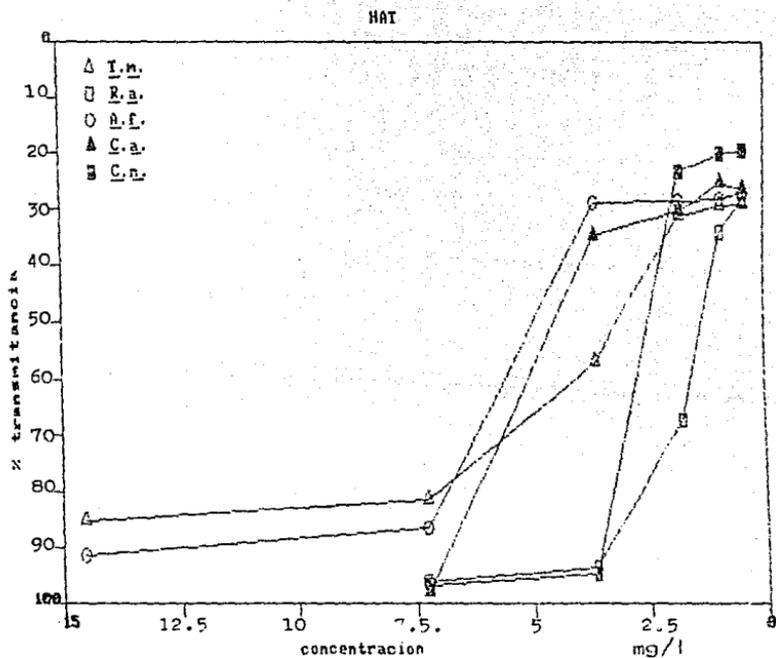


Fig. 11 Efecto producido por HAT para los diferentes hongos probados ( T.m., R.a., A.f., C.a., y C.n. )

## DISCUSION

El presente trabajo demuestra la actividad "in vitro" de las tiosemicarbazonas (TSC) contra hongos patógenos, - tanto filamentosos (A. fumigatus, R. arrhizus y I. mentagrophytes ) como levaduriformes ( C. albicans y C. neoformans ), por medio de estudios de turbidimetría (visual y -espectrofotométrica ). Así mismo se comparó la eficacia de las diferentes TSC contra los hongos utilizados teniendo - como controles drogas antimicóticas ya evaluadas ( Nistatina, Anfotericina B, Ketoconazol y 5-Br Uracilo ) por otros autores ( 17,18,19,20,21,22,26 )

En el presente trabajo se utilizó la técnica de turbidimetría a 580 nm de longitud de onda para evaluar la actividad de las drogas y al mismo tiempo obtener la concentración mínima inhibitoria ( CMI ), este tipo de técnicas fueron empleadas anteriormente por otros autores ( 1, 18, 19, 26 ) quienes indican que este método tiene mayor ventaja sobre los de placas de agar ya que se tiene un mejor control sobre las fases de crecimiento del hongo.

En nuestro estudio observamos lo reportado por R. Srivastava en 1975 y Bhat en 1972 quienes reportan que la efectividad de las TSC varía de acuerdo a los substituyentes, - ya que como puede observarse en los resultados, los diferentes tipos de TSC afectaron en forma distinta a los hongos - en estudio, por ejemplo en el caso de C. albicans la MeSNO fué menos eficaz que la PhSNO, aunque en algunos casos (R. arrhizus ) la diferencia no fué apreciada. Al parecer este

es uno de los primeros estudios donde se lleva a cabo la evaluación de las diferentes TSC utilizando tanto hongos filamentosos como levaduriformes.

Algunas TSC han sido estudiadas en su actividad anti tumor (12,16,23,25) encontrando que presentan actividad en algunos de los procesos en el Síndrome de Ehrlich y - Sarcoma 180 de tumor ascítico, estos autores proponen que la acción de estos compuestos es la capacidad que tienen de formar complejos con metales, principalmente con el - hierro y el cobre inhibiendo la enzima ribonucleótido re ductasa deteniendo así la división celular. En nuestro es tudio no se propone ningún mecanismo de acción pero proba blemente este sea el mismo ya que los hongos tamb i én son células eucarióticas.

Al comparar las TSC contra drogas antimicóticas ya - conocidas se encontró que presentan actividad de amplio- espectro, ya que tienen la capacidad de afectar tanto a hongos filamentosos ( A. fumigatus, R. arrhizus y I. menta grophytes ) como a levaduriformes ( C. albicans y C. neo-- formans ) coincidiendo nuestros hallazgos con los reporta dos por otros autores en el caso de los primeros. En las levaduras nuestros resultados no pueden ser comparados - ya que hasta nuestro conocimiento no han sido informados- con anterioridad estudios de estos compuestos empleando a las levaduras como microorganismos prueba.

Para la obtención de las CMI de cada TSC, así como - la de los compuestos antimicóticos empleados como controles se decidió utilizar la metodología recomendada por la So- ciedad de Micopatología Británica, en donde los valores -

para la búsqueda de la CMI de un compuesto cae dentro de un rango válido a las ya establecidas por algunos autores (17,27), debido a que estos no mencionan concentraciones iguales para cada uno de los compuestos empleados. Dadas las diferentes técnicas, medios y cepas empleadas en la búsqueda de estos valores.

Al comparar nuestro sistema de evaluación "in vitro" los diferentes compuestos antimicóticos se puede observar que en especial las TSC actuaron en forma más adecuada que alguno de los controles empleados, así podemos observar las diferentes figuras (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11) que en el caso de A. fumigatus las TSC BrPhSNO, SNO, y HAT mostraron 90 a 100 % de inhibición en un rango de concentración de 7 a 15 mg/l, mientras que Ket en el mismo rango de concentración sólo mostró un 80 % de inhibición, al compararlo con AmB en el mismo rango mostró un 70 % de efectividad. En el caso de I. mentagrophytes la TSC PhSNO fue la que mostró mayor eficacia en el rango de 2 a 15 mg/l con un 80 % mientras que AmB con el mismo rango -- mostró un 40 % de inhibición y Ket un 70 %.

En el caso de las levaduras, para C. albicans BrPhSNO mostró una efectividad del 80 % en un rango de concentración de 3 a 8 mg/l, mientras que Nist en el mismo rango mostró una efectividad del 30 % en tanto que Ket fue efectivo en un 30 %, para C. neoformans BrPhSNO y MeSNO mostraron una efectividad del 90 % a un rango de concentración de 3 a 8 mg/l, siendo muy similar a 5BrU mientras que Ket sólo mostró un 50 % de efectividad así mismo - Nist sólo fue efectivo en un 60 %.

Una observacion interesante sobre las TSC en este trabajo es la posible capacidad bactericida de las mismas, ya que en el desarrollo de la parte experimental, se trabajo con un número grande de tubos de dilución el cual resultaba un ambiente favorable para contaminación bacteriana, a pesar de ello no se observaron bacterias, aún en diluciones más bajas de TSC empleadas, mientras que si se observó contaminación en el caso de Ket. Esto puede apoyar algunos estudios realizados en estos compuestos con la determinacion de su actividad bactericida y antiviral ( 20 ).

Con el presente trabajo hacemos notar que los valores obtenidos para las TSC en cuanto a CMI con respecto a los controles, es una de las primeras comparaciones hechas de estos compuestos con los de uso comun contra hongos, este hecho es basado en que la mayoría de los estudios realizados para TSC, se hacen en base a propiedades que puedan presentar estas estructuras con otras de la misma familia.

El presente estudio es el inicio de una serie sobre el posible uso de las TSC como alternativas de tratamiento en micología, aun falta una gran cantidad de trabajos complementarios, pero es de importancia resaltar que estos resultados son muy halagadores por lo menos en su actividad antimicótica "in vitro".

## CONCLUSIONES

- 1) Las TSC presentan un efecto fungicida "in vitro" evaluado en base a la CMI de cada compuesto y el hongo utilizado.
- 2) La variación de los substituyentes en las diferentes TSC influyen en el efecto fungicida y fungistático variando así su CMI para cada compuesto.
- 3) El efecto fungicida depende del hongo en forma general todas las TSC afectan a R. arrhizus y varía su acción sobre los otros hongos.
- 4) A concentraciones menores de la CMI se determina que las TSC, presentan un efecto fungistático, al no permitir la maduración de ciertas estructuras de los hongos filamentosos y detener el crecimiento de levaduras.
- 5) Este es el primer estudio (hasta la fecha) en donde se utilizan tanto controles comerciales, como levaduras para la valoración de TSC como compuestos antimicóticos.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1) Auwera P.V., Ceuppens A.M., Heymans C., and Meunier F.:  
" In vitro evaluation of various antifungal agents alone and in combination by using an automatic turbidimetric system combined with viable count determinations". Anti microbial Agents and Chemotherapy; (1986); 29 (6):997-1004
- 2) Bhat A.K.B., Patel R.P., Bellere M.R. "Chemotherapy of fungus infections. III Alkyl or Aryl thiosemicarbazones, acid hydrazones, and styryl sryl ketones of 5-bromo and 5-nitrosalicylaldehydes"; Indian J. Chem.; (1972); 10(7);-694-698.
- 3) Borgers, M; "Mechanism of action of antifungal drug with special reference to the imidazole derivatives"; Reviews of infectious diseases; (1980); 2(4); 520-534.
- 4) Borders, M.; Bossche H. Van den, De Brabander M.; "The - mechanism of action of the new antimycotic ketoconazole"; The American Journal of Medicine; (1983) 24; 2-8
- 5) Boyer, M. J.; "Impregnated disk method for antifungal antibiotic testing"; Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1976); 9(6); 1070-1071
- 6) Campbell, C.M. and Stewart J.; The medical mycology Handbook; A Willey medical publication; New York; pag. 3.
- 7) Chandler, F.W., Kaplan A.; A colour atlas and texbook - of the histopatology of micotic diseases; Wolf Medical Publications Ltd. London 1980; pags. 9-17

- 8) Cope, E.J.; "Mode of action of miconazole on Candida albicans: Effect on growth, viability and  $K^+$  release; Journal of General Microbiology; (1980); 119; 245-251.
- 9) Cosgrove, R. F., Beezer E.A. and Miles R.J.; "In vitro -- studies of amphotericin B in combination with the imidazole antifungal compounds clotrimazole and miconazole"; The Journal of infectious diseases; (1978); 139 (5); 681-684.
- 10) Craven, C.P., Graybill R.J., Jorgensen H. J., Dismukes - E.W. and Levine E. B.; "High-dose ketoconazole for treatment of fungal infections of the central nervous system"; Annals of Internal Medicine; (1983); 98; 160-167.
- 11) Dvus, F.; "Comprehensive organic chemistry" Vol. 111; - Barton D., Omis W. Davis Ed.; Cap. 11.22 "Thiocarbonyl - compounds"; pags. 453-455.
- 12) French, A.F. and Blanz J.E.; "The carcinostatic activity of thiosemicarbazones of formyl heteroaromatic compounds. III. Primary correlation"; Cancer Chemotherapy; (1966) 9; 585-589.
- 13) French, A.F., and Blanz J.E.; " $\infty$ -(N)-Formyl heteroaromatic thiosemicarbazones inhibition of tumor derived ribonucleoside diphosphate reductase and correlation with in vivo antitumor activity "; Journal of Medicine; (1974) 17(2); 172-181.
- 14) Graybill, R. J.; "Summary: Potential and problems with - ketoconazole"; The American Journal of Medicine; (1983); 24; 86-90.

- 15) Goodman, S.L., Gilman A.; Bases farmacológicas de la terapéutica; Interamericana S.A.; 5a Ed. 1978; Mexico D.F. pags. 1036-1041.
- 16) Kauffman, B. G.; "Transition metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones"; Coord. Chem. Rev.; -- (1985); 63; 127-133.
- 17) Kitahara, M., Seth K.V., Medoff G., and Kobayashi; "Anti microbial susceptibility testing of six clinical isolates of Aspergillus."; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; (1976); 9(6); 908-914.
- 18) Kitahara, M., Seth K.V., Medoff G. and Kobayashi S.G. - "Activity of amphotericin B, 5-fluorocytosine, and rifampin against six clinical isolates of Aspergillus"; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; (1976); 9(6); 915-919.
- 19) Minzawa, H., Kitaura K, and Nobuhiro N.; "Effects of pH on the activity of ketoconazole against Candida albicans Antimicrobial Agents and Chemotherapy; (1983); 23(1); - 105-107.
- 20) Nandi, K.A., Caudhuri S. and Mazumdar K.S., "Structure - of 3-hydroxyimino-2-butanone thiosemicarbazones, a tridentate N-S Ligand, C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>"; Acta Cris. (1984) 40; 1193-1196.
- 21) Odds, C.F. and Abbott B.A.; "Relative inhibition factors a novel approach to the assessment of antifungal antibiotics in vitro"; Journal of Antimicrobial Chemotherapy - (1984); 13-43.

- 22) Odds, C.F., Abbott B.A., Pye G and Troke F.P.; "Improved method for estimation of azole antifungal inhibitory concentrations against Candida species based on azole/antibiotic interactions"; Journal of Medical and Veterinary Mycology (1986); 24; 305-311.
- 23) Petering, H.D.; "Carcinostatic copper complexes"; (H. Sigel, ed), Marcel Dekker, New York 1980; 11; 197-229.
- 24) Petering, H.D., Antholine E.W. and Saryan A.L.; "Metal - complexes as antitumor agents"; (Drugs and the pharmaceutical Sciens), Marcel Dekker, New York 1982; 200-243.
- 25) Saryan, A.L., Ankel E., Krishnamurti C., Petering H.D. - "Comparative cytotoxic and biochemical effects of ligands and metal complexes of -N-Heterocyclic carbozaldehyde - thiosemicarbazones"; Journal of Medicine Chemistry (1979) 22(10); 1218-1221.
- 26) Smith S., Ingroff E., and Davis A.B.; "In vitro studies - with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B Antimicrobial Agents and Chemotherapy; (1975), 8(2); 117 121.
- 27) Scott, E.M., Gorman P.S., Millership S.J. and Wright R.L. "Effect of miconazole and clotrimazole of  $K^+$  release and and inhibitor of ergosterol biosynthesis in Trichophyton - mentagrophytes and relate ultrastructural observations"; Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1986); 17; 432-423.
- 28) Erivastava, K.A., and Bahel C.S.; "Synthesis of fluorio-

nated diaryl Ketones, substituted phenoxyethyl-5'-fluoro-2'-methoxyphenylketones and their thiosemicarbazones as potential fungicides"; Agr. Biol Chem. (1976); 40(4) 801-803.

- 29) Speller E.C.D., Royal B. ; "Laboratory methods for flu<sup>u</sup>cytosine (5-fluorocytosine)"; Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1984); 14; 1-8.
- 30) Stevens, A.D., Stiller L.R., Williams L.P. and Sugar M. A. "Experience with ketoconazole in three major manifes<sup>u</sup>tations of progressive coccidioidomycosis"; The American Journal of Medicine; (1983); 24; 58-63.
- 31) Sud, J., Feingolk S.D.; "Effect of Ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in Candida albicans Antimicrobial Agents and Chemotherapy; (1983); 23(1); - 185-187.
- 32) Symoens J., Moens M., Jom J., Sheijgrond H., Dony J.; - and Finestine N.; "An evaluation of two years of clinical experience with ketoconazole"; Reviews of infectious diseases (1980); 2(4), 674-691.
- 33) Todd, S.D., Nernard H. J., Diagnostico clinico por el - laboratorio", Salvat S.A., 6a Ed. (1979); Barcelona España; Cap. 20. pag. 1153, 1155, 1180.
- 34) Utz, J.P.; "The current status of chemotherapeutic agents for the systemic mycoses"; Contr. Microbiol. Immunol - (1977); 4; 124-135.

- 35) Wain, H.W., Polak A. and Florio A.R.; "The effect of - 5-fluorocytosine on the germination of Aspergillus fu-  
migatus and on subsequent nuclear division"; Sabouran  
dia (1981); 19; 147-153.
- 36) Youmans G, Philips F., Sommers M.H.; "Infectologia -  
clínica; Interamericana S.A., 2a. Ed. España (1984) -  
Cap. 52 "Zoonosis"; pag. 867.