



Bioactividad de la solución saturada de sacarosa sobre *Sporothrix schenckii*

Martha G. Medvedeff, María Celina Vedoya, María Antonia Lloret, Alicia Espínola y León Herszage

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Posadas, Misiones, Argentina

Resumen

El propósito de este estudio fue determinar la bioactividad *in vitro* de la solución saturada de sacarosa, eugenol (Dickinson-Lab. Dr. Preston, Argentina) y polietilenglicol 400 (Merck-Merck Química, Argentina), sobre *Sporothrix schenckii*. Este hongo dimorfo es agente etiológico de la esporotricosis; infección subaguda o crónica que afecta comúnmente la piel en sus tres capas, y se caracteriza en su forma clínica más frecuente por la presencia de una lesión inicial chancríforme seguida de nódulos y trayectos linfangíticos regionales. Se realizó una suspensión de la cepa en caldo glucosa Sabouraud 2% (Merck-Merck Química Argentina), equivalente en densidad a un estándar N°5 de la escala de Mc Farland. Se tomó una alícuota de esta suspensión a la que se le agregó la solución saturada de sacarosa, eugenol y polietilenglicol 400. Para comprobar la viabilidad de la cepa, se realizaron repiques cada 15 s en placas de Petri con agar Sabouraud glucosado, (Britania-Lab. Britania. S.R.L. Argentina), después del contacto de la misma con la solución de ensayo. Se incubaron a 28°C. Se realizaron controles periódicos por espacio de 30 días. Se observó el desarrollo de *Sporothrix schenckii* hasta los 2 min, después de haber estado en contacto con la solución saturada de azúcar + eugenol + polietilenglicol 400. Pasado dicho tiempo no se detectó crecimiento del hongo. La muerte del microorganismo se produce posiblemente por deshidratación celular, como una consecuencia de la baja actividad agua de la mencionada solución saturada.

Palabras clave

Fungicida, Solución saturada de sacarosa, *Sporothrix schenckii*

Sucrose saturated solution bioactivity over *Sporothrix schenckii*

Summary

The purpose of this work was to determine the *in vitro* bioactivity of a sucrose saturated solution with eugenol (Dickinson, from Dr. Preston Lab. Argentina) and polyethylenglycol 400 (Merck, from Merck Chemistry Argentina) over *Sporothrix schenckii*. This dimorphic fungi causes sporotrichosis, a sub-acute or chronic infection that affects mainly skin, showing an ulcerous initial lesion with nodular lymphangitis. A strain suspension in Sabouraud dextrose 2% broth (Merck, from Merck Chemistry Argentina) equivalent to Mc Farland N°5 was used, to which the sucrose saturated solution with eugenol and polyethylenglycol 400 was added. Strain viability was measured by seeding aliquots of the original suspension every 15 seconds after initial contact on Sabouraud dextrose agar plates (Britania, from Britania Lab. S.R.L. Argentina). These plates were incubated at 28°C and periodically inspected during 30 days. The strain was viable until 2 min of contact with the solution, after that time no growth was detected. Fungal death may be due to cellular dehydration as a consequence of the low water activity of the referred saturated solution.

Key words

Fungicide, Sucrose saturated solution, *Sporothrix schenckii*

Dirección para correspondencia:

Dra. Martha Gladys Medvedeff
Beato Roque Gonzalez 835
Posadas (3300) Misiones
República Argentina
Tel.: +54 3752 439715
Tel./Fax: +54 3752 426128/435118
E-mail: mmedve@infovia.com.ar

Aceptado para publicación el 18 de Octubre de 2000

En años anteriores se han realizado estudios sobre la relación que existía entre la supervivencia de los microorganismos y las altas concentraciones de solutos. Los mismos concluyeron que la alta concentración de soluto produce una disminución de la actividad agua (a_w) y este es el mecanismo por el cual se produciría la inhibición del crecimiento microbiano [1-2].

El requerimiento de agua de los microorganismos es mejor expresado en término de $a_w = p/p_0$ donde p es la presión de vapor del agua en la solución y p_0 es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Se ha establecido también que la a_w del medio no es solamente el factor regulador determinante de la respuesta biológica del microorganismo, sino también la naturaleza del soluto usado para reducir la misma.

La utilización de la sacarosa como soluto en altas concentraciones con la consecuente disminución de la a_w fue ampliamente estudiada en microbiología de alimentos [3], extendiéndose su aplicación a la curación de heridas infectadas. [4-6]. A la solución de sacarosa se le suma la acción antiséptica del eugenol [7-10] y del polietilenglicol 400 [11-14], que producen una disminución adicional de la actividad agua.

La solución así planteada se enfrentó *in vitro* a *Sporothrix schenckii*, agente etiológico de la esporotricosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Azúcar granulada común comercial: químicamente es la sacarosa, es un α -D-glucopiranosido- β -D-fructofuranósido.

Eugenol (Dickinson-Lab. Dr. Preston S.R.L., Argentina): 4 alil-2 metoxi fenol- $C_{10}H_{12}O_2$

Polietilenglicol 400 (PEG 400) (Merck-Merck Química Argentina S.A.I.C.): polímero de condensación de óxido de etileno y agua, que responde a la fórmula general $HOCH_2(CH_2-O-CH_2)_n-CH_2OH$, n varía entre 3 y 225 en relación con el peso molecular.

Solución de ensayo y actividad agua (a_w): Solución saturada de azúcar + eugenol + PEG 400. Se preparó con 250 gr. de azúcar común a la que se agregó 100 ml de agua destilada. Luego se incorporaron 0,4 ml de eugenol y 0,4 ml de PEG 400. $a_w = 0,65 \pm 2$.

Cepa ensayada: *Sporothrix schenckii* 982919 (fase filamentosa); cepa cedida por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos Malbrán. (Bs.As.-Argentina).

Medios de cultivo: Agar Sabouraud glucosado 20 (Britania-Laboratorios Britania S.A., Buenos Aires, Argentina). Caldo glucosa Sabouraud 2% (Merck-Merck Química Argentina S.A.I.C.)

La metodología empleada fue la siguiente:

- Se repicó la cepa en agar Sabouraud glucosado 20. Se incubó a temperatura ambiente durante 12 - 15 días.
- Se realizó una suspensión de la cepa en caldo glucosa Sabouraud 2%, equivalente en densidad a un estándar N°5 de la escala de Mc Farland.
- Se colocaron 50 μ l de la suspensión anterior, previamente homogeneizada en un tubo de ensayo a la cual se añadieron 2 ml de la solución en ensayo.
- Se agitó y se controló con cronómetro el tiempo que transcurrió desde que la suspensión de la cepa se puso en contacto con la solución de ensayo.

e) Para comprobar su viabilidad se realizaron repiques, cada 15 s en placas de Petri de agar Sabouraud glucosado 20.

f) Las placas se incubaron a temperatura ambiente y se observaron durante treinta días con el objeto de verificar presencia o ausencia de desarrollo fúngico durante este período.

RESULTADOS

Sobre un total de 50 experiencias, se observó desarrollo de *Sporothrix schenckii* hasta 2 min al enfrentarlo con solución saturada de sacarosa + eugenol + PEG 400.

Con los valores obtenidos se realizó un análisis estadístico obteniéndose un valor promedio de 71 s y una desviación standard de 50,6 s. Los límites de confianza del 99% dieron valores de 0 y 189 s. Aplicando el test de chi-cuadrado, los datos se ajustaron a una distribución normal ($\chi^2 = 4,43$).

La distribución de los datos en clases y el ajuste de la curva se puede observar en la figura 1.

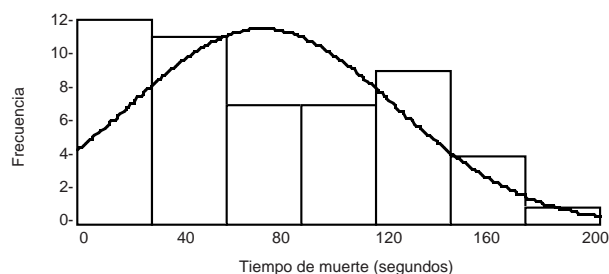


Figura 1. Tiempo de muerte de *Sporothrix schenckii*.

CONCLUSIÓN

El corto tiempo de supervivencia del *Sporothrix schenckii* en la solución estudiada se atribuye a: 1°) la solución saturada de azúcar en altas concentraciones produce una disminución de a_w ; 2°) a la solución anterior, se le suma la acción antiséptica del eugenol y la acción estabilizante del PEG 400. La incorporación de estos compuestos químicos a la formulación producen una disminución adicional de la a_w .

La muerte del microorganismo se produce, posible-mente, por deshidratación celular y posterior plasmólisis.

Dado que el cuadro clínico más frecuente de la esporotricosis produce lesiones cutáneas y subcutáneas que se ulceran y fistulizan, cabría la posibilidad de la utilización de la solución saturada de sacarosa + eugenol + PEG 400, como alternativa terapéutica; teniendo en cuenta su bajo costo y el mayor número de especies fúngicas resistentes a los antimicóticos de uso habitual.

Bibliografía

1. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn E. *In vitro* study of bacterial, growth inhibition in concentrated sugar solutions: Microbiological basis for the use of sugar in treatment infected wounds. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 733-766.
2. Herszage L, Montenegro J, Joseph A. Traitement des plaies suppurées par la application de saccharose. *La Nouvelle Presse Médicale*, 1982; 12: 940.
3. Fennema OR. *Food Chemistry*. Third Ed., New York, Marcel Dekker Inc. 1996: 52-54.
4. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn E. Sugar and bacterial growth in infected wounds. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 766-773.
5. Herszage L, Montenegro J, Joseph A. Treatment of suppurating wound with comercial granulated sugar. *Forum Dr. Med.* 1982; 82: 22-30.
6. Joseph A, Montenegro J, Herszage L. Tratamiento de las heridas supuradas con azúcar comercial. *Boletín y Trabajos de la Sociedad Argentina de Cirujanos* 1980; 21: 315-350.
7. Briozzo J, Nuñez L, Chirife J, Herszage L, D'Aquino M. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J Appl Bacteriol* 1988; 66: 69-70.
8. Chirife J, Nuñez L, Ballesteros A, Benzini J, Herszage L, D'Aquino M. Estudios sobre la acción bactericida del aceite de clavo de olor dispersado en una solución concentrada de azúcar. *Rev Argent Microbiol* 1992; 24:32-39.
9. Fauli i Trillo C y cols. *Tratado de Farmacia Galénica*. 1° Ed. Madrid. Luzan 5, S.A.d Ediciones. 1993: 143-162.
10. Medvedeff M, Lloret MA, Vedoya MC, Reza M, Herszage L. Estudio *in vitro* de la acción fungicida del eugenol en solución sobresaturada de azúcar. *Rev Argent Micol* 1997; 20: 46-52.
11. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Bozzini J, Leardini N, Kohn E. *In vitro* antibacterial activity of concentrated polyetyleneglycol 400 solutions. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 3: 409-412.
12. Bozzini J, Kohn E, Joseph A, Herszage L, Chirife J. Submicroscopical changes in *Klebsiella pneumoniae* cells treated with concentrated sucrose and polyethylene glycol 400 solutions. *J Appl Bacteriol* 1986; 60: 375-379.
13. Le-Hir A. *Polyetyleneglycoles*. Manual de Farmacia Galénica. 6° Ed. Barcelona, Masson, 1995: 62-65.
14. Medvedeff M, Lloret MA, Vedoya MC, Zaneck M, Herszage L. Efecto fungicida de la solución saturada de azúcar, eugenol y polietilenglicol 400 sobre *Candida albicans*. *Rev Argent de Micol* 1998; 21: 14-17.