



UNIVERSIDAD DEL TURABO
Escuela de Ciencias y Tecnología

PROGRAMA GRADUADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

10 de mayo de 2006
FECHA

Recomendamos que la tesis de **Dioselina Torres Carrasquillo** titulada

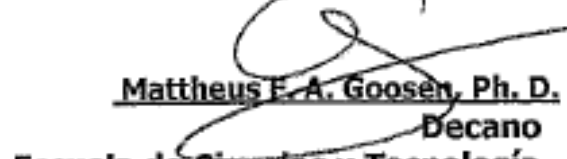
**DERIVADOS DE BENZOTIAZOLES Y OXIRANOS COMO AGENTES
ANTIFUNGICOS**

Sea aceptada como requisito parcial para el grado de

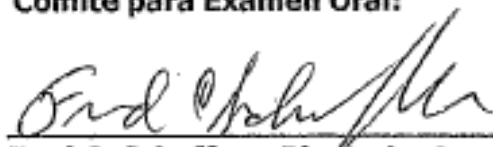
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
CONCENTRACIÓN EN MANEJO AMBIENTAL**

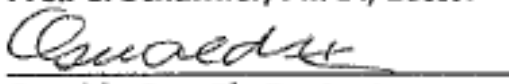

Prof. Sharon A. Cantrell, Ph. D.
Asesor de Investigación


Fred C. Schaffner, Ph. D.
Coordinador
Estudios Graduados


Mattheus E. A. Goosen, Ph. D.
Decano
Escuela de Ciencias y Tecnología

Comité para Examen Oral:


Fred C. Schaffner, Ph. D., Lector


Osvaldo Cox, Ph. D., Lector

**UNIVERSIDAD DEL TURABO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGIAS
PROGRAMA GRADUADO
MAESTRIA MANEJO AMBIENTAL**

**DERIVADOS DE BENZOTIAZOLES Y OXIRANOS COMO AGENTES
ANTIFUNGICOS**

**TESIS SOMETIDA COMO REQUISITO PARCIAL PARA EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**POR
DIOSELINA TORRES CARRASQUILLO
Mayo 2006**

APROBAMOS LA TESIS DE DIOSELINA TORRES CARRASQUILLO

TITULADA

**DERIVADOS DE BENZOTIAZOLES Y OXIRANOS COMO AGENTES
ANTIFUNGICOS**



**DRA. SHARON CANTRELL
ASESOR DE TESIS
CIENCIAS Y TECNOLOGIAS
UNIVERSIDAD DEL TURABO**

5/22/06
Fecha



**DR. OSVALDO COX
CATEDRÁTICO
CIENCIAS Y TENOLOGIAS
UMET**

5/22/06
Fecha



**DR. FRED C. SCHAEFFNER
CATEDRÁTICO
CIENCIAS Y TENOLOGIAS
UNIVERSIDAD DEL TURABO**

5/22/06
Fecha

DEDICATORIA

La vida del hombre consta de varias etapas. En cada una de estas hay un ser especial. Dando primero gracias a Dios por permitirme creer en él y darme unos padres, un esposo, dos hijos y dos nietas. Quiero dedicar este trabajo a todos aquellos seres que han hecho posible el desarrollo de mi vida. Mi madre, Guillermina Carrasquillo, quien me inicio en la vida y me ayudó a cargar mis libros cuando iba al colegio. Mi padre, Juan Torres, hoy día no está con nosotros, pero su mano fue siempre mi cayado.

El hombre con el cual durante veintiocho años comparto mi vida, mi esposo, David Hernández, sus palabras fueron y son mi faro de consuelo y su hombro es mi descanso.

A mis hijos Noel y Erik regalo de Dios para continuar viviendo y luchando.

A mis nietas Paola y Fabiola. Paola quien velaba mis descuidos para ir a meter el dedito en la computadora e irse corriendo y a Fabiola que le gustaba ver las fotos correr en la computadora mientras yo descansaba.

Con todo el amor que brota de mi corazón para ustedes y Gracias DIOS.

Dioselina Torres Carrasquillo

AGRADECIMIENTO

A DIOS

Dejamos nuestra herencia intelectual a aquellos que vienen detrás de nosotros. Nos preparamos y capacitamos en la vida para ayudar a otros. Cuan saludable es encontrarnos con esas personas. Agradezco a Dios por permitirme encontrarme con la Dra. Sharon Cantrell, directora de mi trabajo de investigación, quien impartiendo su intelecto me permitió nutrirme del mismo y me motivo a realizar esta investigación. Por permitirme realizar este trabajo y ofrecerme ayuda en su laboratorio y cada vez que le hacía una llamada siempre estaba dispuesta.

Al Dr. Agustín Ríos por su ayudarme en los procesos químicos y ayudarme a entender la importancia de los mismos para realizar mi investigación.

Al Dr. Osvaldo Cox por facilitar los compuestos químicos de la investigación.

Al Profesor Wigberto J. Hernández sin su ayuda la búsqueda de literatura en la computadora hubiera sido más difícil.

A los estudiantes del Laboratorio de Micología; Francisco, Melissa, Mayte, Zulma y Roselyn. Por preparar PDA y prestarme, y a Roselyn por inocular las especies y por medir su crecimiento en sábado y domingo cuando yo tenía compromiso.

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Tabla de contenido	v
Lista de figuras	vi
Lista de apéndices	viii
<i>Abstract/Resumen</i>	ix
Capítulo 1	
Introducción	1
Objetivos	4
Capítulo 2	
Revisión de literatura	5
Capítulo 3	
Procedimiento	10
Capítulo 4	
Resultados	12
Capítulo 5	
Discusión y conclusiones	16
Literatura Citada.....	20
Figuras	23
Apéndices	35

LISTA DE FIGURAS

Figura. No.....	Página
Figura 1. Estructuras químicas de los diferentes compuestos noveles en este estudio.....	23
Figura 2. Efecto de los diferentes disolventes sobre la especie <i>A. niger</i>	25
Figura 3. Efecto de los compuestos químicos sobre la especie <i>A. niger</i> en la concentración de 0.01 mg/mL en un periodo de cinco días	26
Figura 4. Efecto de los compuestos químicos sobre la especie <i>A. niger</i> en la concentración de 0.001 mg/mL en un periodo de cinco días	27
Figura 5. Efecto de los compuestos químicos sobre la especie <i>P. funiculosum</i> en la concentración de 0.01 mg/mL en un periodo de cinco días.....	28
Figura 6. Efecto de los compuestos químicos sobre la especie <i>P. funiculosum</i> en la concentración de 0.001 mg/mL en un periodo de cinco días.....	29
Figura 7. Efecto de los compuestos químicos sobre la especie <i>A. versicolor</i> en la concentración de 0.01 mg/mL en un periodo de cinco días.....	30
Figura 8. Efecto de los compuestos químicos sobre la especie <i>A. versicolor</i> en la concentración de 0.001 mg/mL en un periodo de cinco días.....	31
Figura 9. Efecto de la inhibición de lo diferentes compuestos químicos en las diferentes concentraciones en la especie <i>A. niger</i> a los cinco días de crecimiento (barras representan error estándar).....	32

Figura 10. Efecto de la inhibición de lo diferentes compuestos químicos en las diferentes concentraciones en la especie *P. funiculosum* a los cinco días de crecimiento (barras representan error estándar).....33

Figura 11. Efecto de la inhibición de lo diferentes compuestos químicos en las diferentes concentraciones en la especie *A. versicolor* a los cinco días de crecimiento (barras representan error estándar).....34

LISTA DE APENDICES

Apéndice No.....	Página
Apéndice 1: Análisis estadístico de la especie <i>A. niger</i> en la concentración de 0.01 mg/mL.....	36
Apéndice 2: Análisis estadístico de la especie <i>A. niger</i> en la concentración de 0.001 mg/mL.....	37
Apéndice 3: Análisis estadístico de la especie <i>Penicillium funiculosum</i> en la concentración 0.01 mg/mL.....	38
Apéndice 4: Análisis estadístico de la especie <i>Penicillium funiculosum</i> en la concentración 0.001 mg/mL.....	39
Apéndice 5: Análisis estadístico de la especie <i>Aspergillus versicolor</i> en la concentración 0.01 mg/mL.....	40
Apéndice 6: Análisis estadístico de la especie <i>Aspergillus versicolor</i> en la concentración 0.001 mg/ml.....	41

Abstract

Dioselina Torres Carrasquillo. (M.S. Environmental Science)

Derrivatives of benzotiazoles and oxiranos as antifungal agents. (May/2006)

Abstract of a master's thesis at the *Universidad del Turabo*.

Thesis supervised by Dr. Sharon Cantrell.

No. of pages in text: 41

A study was conducted with five Chemicals compounds: 2- cianomehyl- 1,3- benzotiazol (CNBT), 2-metil-1,3-benzotiazol (MBT), 2-amino-4-(benzotiazol-2-il)-5-(2-cloro-5-nitrofenil)tiazol (tiazol), 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-3-(2-cloro-5-nitrofenil)oxirano-2-carbonitrilo (epóxido), 3-(2,4-diclorofenil)-2-(fenil)oxirano-2-carbonitrilo (fenil) (benzotiazoles y oxiranos).

In order to test the degree of inhibition of these Chemicals compounds on the following species, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* y *Penicillium funiculosum*, the compounds were dissolved in 70 % ethanol. Each compound was prepared in a base solution of 1 mg/mL concentration. From this solution three concentrations were prepared (0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, y 0.001 mg/mL). Using the PDA culture method (Potato Dextrose Agar), the species were inoculated in three concentrations. Radial growth of the three species was measured during 5 days. These chemical compounds completely inhibited the growth of these species at the concentration of 0.1 mg/mL. The compounds fenil, tiazol y epóxido provided excellent inhibition during the first 48 hours at concentrations of 0.01 mg/mL y 0.001 mg/mL. At the lower concentration the chemical compound that provided the best inhibition was fenil.

RESUMEN

Se llevó a cabo una investigación con cinco compuestos químicos: *2-cianometil-1,3-benzotiazol (CNBT)*, *2-metil-1,3-benzotiazol (MBT)*, *2-amino-4-(benzotiazol-2-il)-5-(2-cloro-5-nitrofenil)tiazol (tiazol)*, *2-(1,3-benzotiazol-2-il)-3-(2-cloro-5-nitrofenil)oxirano-2-carbonitrilo (epóxido)*, *3-(2,4-diclorofenil)-2-(fenil)oxirano-2-carbonitrilo (fenil)* (benzotiazoles y oxiranos).

Para probar el grado de inhibición de estos compuestos químicos en las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* y *Penicillium funiculosum*. Estos compuestos químicos se disolvieron en etanol al 70 %. De cada compuesto químico se preparó una solución madre a 1 mg/mL. De esta solución madre se prepararon tres distintas concentraciones (0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, y 0.001 mg/mL). Usando el medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar), se inocularon las especies en las diferentes concentraciones. Se midió el crecimiento radial de las especies durante cinco días. Estos compuestos químicos inhibieron el crecimiento de las especies en su totalidad en la concentración de 0.1 mg/mL. Los compuestos químicos fenil, tiazol y epóxido en las primeras 48 horas presentaron una excelente inhibición en las concentraciones 0.01 mg/mL y 0.001 mg/mL. En la concentración menor el compuesto químico que mejor inhibió la especie fue el fenil.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Los hongos son parte de nuestro medio ambiente y los encontramos en todas partes. Estos pueden encontrarse sobre la materia orgánica en descomposición, causar enfermedades en plantas y animales, contaminar el alimento, dañar la ropa, muebles, pinturas, pero además, son utilizados en la industria. Se desarrollan en todo tipo de materia dentro del hogar y en edificios donde la temperatura es húmeda y apropiada para su crecimiento.

Los hongos se reproducen por medio de esporas sexuales y asexuales las cuales son dispersadas por corrientes de aire, agua e insectos. Las esporas son utilizadas como criterio para clasificar a los hongos en cuatro divisiones: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, y *Basidiomycota* (Carlile, 2001). La división *Chytridiomycota* es la única en donde encontramos zoosporas (esporas motiles). En algunos sistemas de clasificación éstos se clasifican entre los protistas. La división *Zygomycota* se caracteriza por formar cigosporas de origen sexual y esporangiosporas de origen asexual. Estos producen hifas sobre pan, frutas y alimentos envejecidos. La división *Ascomycota* se reproduce por medio de ascas y ascosporas con la excepción de algunas levaduras. Muchos ascomicetos son utilizados en la industria, otros causan graves enfermedades a plantas y animales. La división *Basidiomycota* comprende numerosas y variadas especies los cuales se reproducen a través de basidios y basidiosporas (Deacon, 1988). En este grupo encontramos hongos comestibles y los descomponedores de maderas y hojarascas.

Muchos hongos son de gran importancia para el hombre y la industria. Los hongos se utilizan en la producción industrial de ácido cítrico, ácido glucónico y ácido gálico el

cual todavía se emplea en la fabricación de tintes y colorantes. Las resinas se elaboran a partir de ácido fumárico formado por el hongo negro del pan. El ácido giberélico, que provoca aumento del crecimiento de las células vegetales, lo produce un hongo que causa una enfermedad en las plantas de arroz. Grasas, aceites y proteínas que se utilizan comercialmente se obtienen de especies de varios géneros y una especie es una fuente práctica de proteínas comestibles. La proteína D se forma al irradiar el ergosterol una grasa del grupo de los esteroides, sustancia obtenida a partir de los residuos de la levadura de la cerveza (Villey, 1981). Un hongo semejante a las levaduras proporciona riboflavina. La biotina se acumula durante el proceso de producción de ácido fumárico por parte de otro hongo. También se utilizan en la elaboración del queso roquefort y en la maduración del queso camembert. Muchos hongos han sido de beneficio para el hombre como el *Penicillium chrysogenum* Tom, del cual se extrae el antibiótico penicilina y el *Coprinus quadrifidus* Peck, del cual se obtiene otro antibiótico quadrifidina (Zoberi, 1972).

Muchos hongos causan enfermedades en plantas y animales. Algunas afectan directamente al hombre. Podemos señalar que aquellos hongos que viven en el medio ambiente y que están en el aire que respiramos causan serias enfermedades al hombre. Por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* Fresen, puede crecer como saprofito en el pulmón creando un aspergíoma (Murray, 2002). Este hongo también puede producir varias enfermedades tales como aspergilosis, alergias y lesiones en los pulmones. La agricultura también sufre las consecuencias de los hongos. Estos pueden atacar hojas, flores, frutos y raíces acabando con las cosechas o disminuyendo la población (Villey, 1981)

Debido a los problemas que pueden causar los hongos es necesario buscar alternativas viables para controlar el crecimiento de los mismos en el medio ambiente de forma que no se afecte la salud del hombre y otros organismos. Existen diferentes formas

para eliminar o controlar el crecimiento de los hongos. Entre éstos podemos mencionar la utilización de compuestos químicos los cuales los eliminan temporalmente. Si el medio ambiente es permisivo estos vuelven a desarrollarse. Muchos de estos agentes químicos que se usan en el hogar afectan la salud del hombre y los que se usan en los cultivos pueden afectar y contaminar los suelos, el agua y el aire.

Por eso es importante desarrollar nuevos compuestos químicos que puedan utilizarse como agentes antimicóticos y que ayuden a mejorar la calidad de vida del hombre en el hogar, los edificios y el medio ambiente. En este estudio se evaluará el efecto de cinco compuestos químicos en el control de crecimiento de tres especies comunes de hongos, *Aspergillus niger* Tiegh, *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab. y *Penicillium funiculosum* Thom.

OBJETIVOS

La meta de nuestra investigación va dirigida a probar el efecto de varios compuestos químicos inorgánicos en el crecimiento de tres especies de hongos y determinar su efectividad antifúngica.

Para llevar a cabo nuestra investigación utilizaremos hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*.

Los objetivos de nuestra investigación fueron:

- ❖ Identificar el disolvente que no afecte el crecimiento de nuestros hongos.
- ❖ Identificar cuál de los compuestos químicos es más efectivo en la inhibición del crecimiento de nuestros hongos.
- ❖ Identificar la dosis mínima de inhibición antifúngica.
- ❖ Observar la relación de crecimiento entre una especie de hongo y otra

Hipótesis

Nuestro medio ambiente permite el desarrollo de un sinnúmero de microorganismos. Los hongos son microorganismos que pueden afectar diferentes sustratos y es muy importante identificar compuestos químicos que nos ayuden a controlar su crecimiento. Es nuestro interés particular identificar un compuesto químico que en dosis bajas inhiba el crecimiento de algunas especies de hongos. Por consiguiente, nuestra hipótesis señala que en una concentración menor la efectividad del compuesto químico sea mayor.

CAPITULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

Los hongos son organismos microscópicos que se encuentran ampliamente distribuidos por todo el globo terrestre y viven en cualquier sitio que presente material orgánico, agua y una temperatura apropiada, generalmente entre 4 y 60 °C. Se adaptan al ambiente creciendo sobre troncos de árboles, vegetación en descomposición, especialmente en áreas húmedas y sombreadas. Se desarrollan desde los lugares más húmedos hasta los sitios semidesérticos y aún desérticos en las épocas en que puede haber una humedad en los suelos. Debido a que los hongos carecen de clorofila, su nutrición depende de otros organismos y, de acuerdo con las clases de sustancias orgánicas que aprovechen, pueden ser saprobios, parásitos o simbioses. Según esto, los hongos son muy versátiles y su hábitat es muy amplio y diversificado (Herrera y Ulloa, 1990).

La mayoría de los hongos presentan una reproducción sexual y se les llaman hongos perfectos. Otros son considerados hongos imperfectos por no tener procesos sexuales. En la propagación de muchos hongos la reproducción asexual tiene mayor influencia que la sexual debido a la gran cantidad de esporas que se producen aunque sólo llega a germinar una mínima parte de ellas (Herrera y Ulloa, 1990). Un ejemplo lo encontramos en los géneros de *Penicillium* y *Aspergillus* que se propagan principalmente por procesos asexuales.

Los hongos se reproducen por medio de esporas (diminutas partículas de protoplasma rodeadas de pared celular) sexuales y asexuales, las cuales se dispersan por corrientes de agua dulce o salada, viento (aire) o insectos. La germinación de las esporas

depende de la temperatura, la humedad, y la estación del año. Muchos hongos aumentan su propagación durante los períodos de mayor humedad y lluvia.

La importancia del estudio de los hongos dentro de nuestro ambiente es el beneficio que se pueda obtener de éstos, o el daño que pueden causar a los diferentes materiales y los organismos. Muchos hongos han sido de beneficio para el hombre, ya que se han obtenido una serie de medicamentos y minerales. Algunos ejemplos a mencionar son la penicilina, un antibiótico, que es producido por el hongo *Penicillium chrysogenum* y la quadridina, otro antibiótico el cual se obtiene del hongo *Coprinus quadridus* (Zoberi, 1972). Otras especies de hongos son útiles para la elaboración de alimentos, tales como, quesos, pan y vino. Otro ejemplo lo es el hongo *Penicillium crustaceum*, el moho verde, el cual es utilizado en la elaboración de una variedad de quesos.

En las plantas los daños ocasionados por hongos van desde la raíz, tallo, hojas, frutos, y flores. El *Ceratocystis ulmi*, causante de la enfermedad del olmo holandés, ocasionó la muerte entre un 10% y 20% de la población de olmos (Deacon, 1988). Los insectos como *Sirex noctilio* (avispa de la madera) transmite los conidios del hongo a la madera de los árboles, el hongo se desarrolla pudriendo de ésta forma a la planta.

Muchos agricultores sufren las consecuencias de las invasiones de los hongos los cuales atacan sus cultivos causando la pérdida de sus cosechas. En el año de 1840 el hongo del tizón tardío de la papa, *Phytophthora infestans*, causó pérdidas muy graves en los cultivos de papa en Irlanda, causando la muerte de un millón de personas por inanición y la migración de un número semejante a otras partes de Europa y Estados Unidos (Deacon, 1988). Se han realizado experimentos con funguicidas para reducir el desarrollo de los hongos en las plantas tales como: Cupravit, Karathane, Azufre y Benlate que fueron

utilizados en diferentes porcentajes para combatir el mildiú polvoriento causado por *Uncinula necator*, hongo que afecta los viñedos.

Son muchos los organismos que se ven afectados por los hongos. En el área oeste de Puerto Rico se llevó a cabo un catastro de hongos en colmenas de abejas para el año 1988. Los hongos atacan las larvas, pupas y adultos de las abejas melíferas. Los daños causados a la colmena están relacionados con una ventilación pobre de la colmena. En las muestras de polen el hongo más frecuente fue el *Aspergillus niger* (Seguí-Crespo *et al.*, 1991).

Además de causar enfermedades de plantas, los hongos realizan una serie de funciones en el agroecosistema que son importantes en el mantenimiento del equilibrio ecológico. La gran mayoría de los hongos son saprofitos y ayudan en el reciclado de la materia orgánica, liberando nutrientes que enriquecen el suelo. De las 100,000 especies de hongos solamente unas 8,000 producen enfermedades en las plantas, y unas 100 causan enfermedades en los humanos y en los animales (Araúz, 1998).

Muchas enfermedades en el hombre son causadas por hongos que viven en el medio ambiente y están en el aire que respiramos. La Aspergilosis incluye una gama de enfermedades ocasionadas por varias especies del género *Aspergillus* como *A. fumigatus* Fresen *A. niger* y *A. flavus* Link (Herrera y Ulloa, 1990). La enfermedad puede manifestarse como reacción alérgica en personas que sufren de asma (aspergilosis pulmonar) o como un absceso pulmonar donde se produce una bola del hongo denominada aspergiloma. A pesar de la enfermedad causada por *A. fumigatus*, cabe señalar que la fumagilina es un antibiótico extraído de este hongo. La neumonía se extiende a través del torrente sanguíneo en el organismo. La invasión de este hongo puede causar ceguera y puede afectar otras partes del cuerpo como el corazón, pulmones, cerebro y riñones. Otros

hongos como *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link y *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) G.A. de Uries, puede causar la “rinitis”. (Deacon, 1988).

Es necesario buscar alternativas viables para controlar el crecimiento de aquellos hongos que crecen dentro de nuestro medio ambiente y que afectan la salud del hombre, de las plantas y de los animales sin que se afecte nuestro entorno. Muchos funguicidas que se usan en el hogar afectan la salud del hombre. Los que se usan para los cultivos y los animales afectan los suelos y contaminan los cuerpos de aguas.

Un funguicida es un compuesto químico que destruye los hongos o inhibe su crecimiento. Existe una gama de compuestos químicos, pero no todos son adecuados para utilizarse debido a factores tales como toxicidad en mamíferos, fototoxicidad, olor desagradable y color. Existen diferentes tipos de funguicidas los cuales son utilizados para controlar enfermedades tanto en plantas como en animales y en procesos industriales.

Los funguicidas inorgánicos fueron los primeros en ser descubiertos tales como el azufre en 1846, el cobre en el 1882, y el mercurio en 1920. El azufre es de uso limitado debido a su insolubilidad, y en la actualidad se usa como suspensión coloidal. Los funguicidas basados en cobre por lo general se basan en fórmulas de sulfato de cobre y cal que ofrecen protección contra varias enfermedades en las hojas y en los frutos. El mercurio ha tenido uso muy limitado debido a su aguda toxicidad a los mamíferos (Deacon, 1988). Los funguicidas orgánicos fueron descubiertos en 1930 y podemos mencionar el ***Tiram, Captan, Dinocap, Zineb, Maneb, Mancozed, y Quintozen***. Se introdujo un nuevo grupo de funguicidas, los sistémicos, (Marsh, 1977). Entre los primeros grupos sistémicos están los benzimidazoles, descubiertos por casualidad.

La mayoría de las micosis se tratan con antibióticos. Estos se pueden considerar como un grupo especial de funguicidas, pero su alto costo y falta de persistencia tienden a

restringir su aplicación a unas cuantas funciones en específico. Existe una variedad de antibióticos como los cicloheximidias, los poloénicos, los griscofulvinas, los polioxinas, y las estreptomycinas. Existe un buen número de funguicidas cuya actividad se limita a hongos ascomicetos y deuteromicetos y que pertenecen a diversos grupos químicos (Benzimidazoles) (Araúz, 1998).

Según Carrillo-Muñoz (2001), en pacientes con alteraciones inmunológicas ha habido un aumento en la frecuencia y gravedad de las micosis que sufren. Por lo tanto, ha habido un incremento en el empleo de los antifúngicos. Muchas infecciones están limitadas al uso de *amphotericin B* un antifúngico recomendado en los tratamientos de larga duración de micosis graves al igual que sus distintas formulaciones.

Los azoles son una de las familias de antifúngicos con mayor número de derivados. Uno de ellos, el voriconazol ha demostrado ser efectivo un 80 – 100% en pacientes con candidiosis orofaríngea y un 53% en aspergilosis (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001). La Terbinafina (Lamisil) es otro antifúngico usado en el tratamiento de infecciones en las uñas de los pies y las manos. Otros compuestos químicos como el Amphotericin B, Itraconazole el Voriconazole son usados como antifúngicos en la inhibición del crecimiento de conidias (Manavathu *et al.*, 1999). De igual forma derivados de nuevos derivados de azoles en el tratamiento de candidiasis (Pitzurra, 1999).

CAPITULO 3

PROCEDIMIENTO

Se tomaron varias muestras de aire de diferentes áreas en el Edificio de Ciencias y Tecnología de la Universidad del Turabo. Usando el medio de cultivo rojo de bengala se aislaron varias especies de hongos. Durante el periodo de crecimiento se prepararon laminillas en cámara húmeda para luego a través del microscopio identificar, estudiar, y caracterizar. También se prepararon laminillas con los diferentes tipos de hongos y se comenzó a identificar usando el libro de referencia *Penicillium* (Raper y Thom, 1968) y *Aspergillus* (Raper y Fennell, 1965).

Pudimos identificar dos especies de *Aspergillus* y una de *Penicillium*. Se identificó *A. niger*, *A. versicolor*, y *P. funiculosum*. Después de identificar el género y la especie del hongo se procedió a inocular los hongos nuevamente en diferentes medios de cultivo en agar de Malta, “Czapek, Corn” Meal, y papa para observar y medir el crecimiento radial e identificar el medio de cultivo a utilizarse con los compuestos químicos en nuestra investigación. Se determinó utilizar el medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar).

En nuestra investigación usamos cinco compuestos químicos nuevos (Figura 1) los cuales son:

- a. 2- cianometil- 1, 3 benzotiazol (CNBT)
- b. 2- metil 1-3 benzotiazol (MBT).
- c. 2-amino-4-(benzotiazol-2-il)-5-(2-cloro-5-nitrofenil)tiazol (tiazol)
- d. 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-3-(2-chloro-5-nitrofenil)oxirano-
2-carbonitrilo (epóxido)
- e. 3-(2,4-diclorofenil)-2-(fenil)oxirano -2- carbonotrilo (fenil)

A base de la literatura encontramos que los disolventes más utilizados en trabajos de investigación con hongos son etanol, metanol, acetona, dimetilsulfóxido, tolueno y agua (Vázquez, 2000). Descartamos el agua como disolvente, ya que algunos compuestos químicos son insolubles en la misma. Trabajamos con DMSO (100%), etanol (70%), metanol (100%) y acetona (100%). Se preparó PDA, se dividió en cuatro matraces que contenían una cantidad de 100 mL, y una vez identificados se añadió 10 mL del disolvente identificado. Se prepararon la placas petri con los diferentes disolventes se identificaron y luego se procedió a inocular la especie *A. niger* debido a su crecimiento rápido. De esta forma identificamos el disolvente a utilizar en nuestra investigación.

Utilizando el mejor disolvente se prepararon cinco soluciones madres, de 1 mg/mL de cada compuesto químico. Utilizando el PDA se prepararon tres diferentes concentraciones la cuales fueron de 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, y 0.001 mg/mL. De cada matraz se prepararon diez placas petri (dos por tratamiento) y se inocularon con *A. niger*, *A. versicolor*, y *P. funiculosum* de acuerdo a las concentraciones antes mencionadas y en duplicados. Las placas se incubaron a 27 °C. Durante cinco días se midió y observó el crecimiento de los hongos. Estas pruebas se llevaron a cabo tres veces para verificar la reproducibilidad de nuestros experimentos.

CAPITULO 4

RESULTADOS

El propósito de nuestra investigación fue estudiar el efecto de cinco compuestos químicos;

- a. 2- cianometil- 1, 3 benzotiazol (CNBT)
- b. 2- metil 1-3 benzotiazol (MBT).
- c. 2-amino-4-(benzotiazol-2-il)-5-(2-cloro-5-nitrofenil)tiazol (tiazol)
- d. 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-3-(2-chloro-5-nitrofenil)oxirano-
2-carbonitrilo (epóxido)
- e. 3-(2,4-diclorofenil)-2-(fenil)oxirano -2- carbonitrilo (fenil)

en el crecimiento de tres especies de hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* y *Penicillium funiculosum* .

Efecto de los disolventes

En este estudio probamos cuatro disolventes en el crecimiento radial de *Aspergillus niger*. Observamos que los disolventes afectan de manera diferente el crecimiento de la especie. El DMSO inhibió el crecimiento total de la especie, el metanol presenta un grado de inhibición mayor que el observado con la acetona. El crecimiento de la especie en etanol es mayor al de la acetona y casi similar al PDA. Este crecimiento de la especie nos permitió identificar al etanol como el mejor disolvente para la disolución de los compuestos químicos y poder realizar nuestra investigación (Figura 2)

Efecto de los compuestos químicos en las especies

Los cinco compuestos químicos fueron probados con las tres especies de hongos, *A. niger*, *A. versicolor* y *P. funiculosum* en la concentración mayor (0.1mg/mL) y la inhibición en el crecimiento de las especies fue total. Es por esta razón que presentamos los resultados sólo para las concentraciones de 0.01 mg/mL y 0.001 mg/mL.

1. Efecto de los compuestos químicos en la especie *A. niger*

El compuesto químico tiazol inhibió mejor la especie *A. niger* en la concentración 0.01 mg/mL. Durante cinco días se midió el crecimiento radial de la especie y se observó un crecimiento similar y casi paralelo en los últimos tres días en los compuestos químicos fenil epóxido y tiazol. Luego del tercer día tanto el fenil como el tiazol inhibieron muy bien la especie *A. niger*. Los compuestos químicos CNBT y MBT no presentaron inhibición en la especie ya que su crecimiento fue mayor al del PDA. Existe una diferencia significativa entre los compuestos químicos tiazol, fenil y epóxido ($P=0.01$) (Figura 3) (Apéndice 1).

En la concentración de 0.001 mg/mL el compuesto químico epóxido inhibió mejor el crecimiento durante los primeros cuatro días, que el fenil y el tiazol. Al quinto día el fenil fue el que presentó una mejor inhibición. El MBT y el CNBT nuevamente mostraron un crecimiento mayor al del PDA.

El efecto del tiazol al igual que el epóxido en la especie *A. niger* después del cuarto día aparentemente fueron perdiendo el grado de efectividad. Hay diferencia significativa entre los diferentes compuestos químicos en el crecimiento de *A. niger* a una concentración de 0.001 mg/mL ($P=0.01$) (Figura 4) (Apéndice 2)

2. Efecto de los compuestos químicos en la especie *P. funiculosum*

El compuesto químico tiazol a una concentración de 0.01 mg/mL provocó una mejor inhibición en *P. funiculosum*. El epóxido y el fenil se mantuvieron una inhibición muy buena hasta 72 horas. El compuesto químico MBT presentó mayor inhibición que el CNBT comparándolo con el PDA. Existe diferencia significativa entre los cinco compuestos químicos el ($P= 0.01$) (Figura 5) (Apéndice 3).

El crecimiento de la especie *P. funiculosum* fue mayor en la concentración 0.001 mg/mL. Los dos compuestos químicos el epóxido, y fenil presentaron una mayor inhibición sobre la especie. Después del cuarto día observamos el compuesto químico tiazol aparentemente perdiendo su efectividad. Hay una diferencia significativa entre los cinco compuestos químicos ($P=0.01$) (Figura 6)-(Apéndice 4).

3. Efecto de los compuestos químicos en la especie *A. versicolor*

Nuestra tercera especie lo fue *A. versicolor* el cual posee un crecimiento radial muy lento. El compuesto químico tiazol a una concentraron de 0.01 mg/mL causó una inhibición total durante las primeras 24 horas, aparentemente perdiendo efectividad luego de este periodo. El epóxido después de 24 horas presentó una mejor inhibición sobre la especie *A. versicolor*. En el fenil la especie mantuvo un crecimiento similar y casi paralelo al tiazol, pero luego del cuarto día el tiazol y el fenil presentaron un crecimiento similar. El epóxido mantuvo una mejor inhibición sobre la especie. El MBT y CNBT presentaron menor inhibición sobre la especie comparándolos con el PDA. El análisis nos indicó que hay diferencia significativa entre los compuestos químicos ($P= 0.01$) (Figura 7) (Apéndice 5).

La concentración 0.001 mg/mL presentó un patrón de crecimiento similar a la concentración 0.01 mg/mL. A partir de 72 horas el epóxido presentó una mayor inhibición la cual mantuvo hasta el quinto día. El fenil y el tiazol .ambos compuestos químicos presentaron un crecimiento similar en ambas concentraciones. Nuevamente el CNBT y el MBT mostraron un crecimiento similar al control PDA en la especie *A. versicolor*. El análisis estadístico nos indicó que hay diferencia significativa en los compuestos químicos (P= 0.01). (Figura 8)(Apéndice 6).

Debido a que la especie *A. versicolor* es de lento crecimiento el efecto de los compuestos químicos se reflejó mejor entre el cuarto y quinto día. El compuesto químico que mejor inhibió la especie *A. versicolor* fue el epóxido seguido muy de cerca del fenil.

CAPITULO 5

Discusión y Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo respaldan la hipótesis formulada de poder identificar una concentración de un compuesto químico que inhiba el crecimiento de la especie en una dosis menor sin que se vea afectado el medio ambiente. Los estudios que se han realizado a través de los tiempos fueron dirigidos a encontrar soluciones a los diferentes problemas de control que se presentan con los organismos que afectan nuestro medio ambiente. La preparación de compuestos químicos y sus derivados buscan controlar los diferentes agentes patógenos en nuestro entorno.

La investigación llevada a cabo pretendió identificar entre cinco compuesto químicos uno que actuara como agente antifúngico ante tres especies de hongos. El comportamiento en el crecimiento de cada una de estas especies fue totalmente diferente. La especie *A. niger* produce abundantes esporas y presenta un crecimiento rápido, *A. versicolor* es todo lo contrario, presenta un crecimiento lento y *P. funiculosum* presenta un crecimiento promedio con abundantes esporas y un crecimiento irregular muchas veces que dificulta el medir su radio de crecimiento.

Nuestros compuestos químicos llamados benzotiazoles poseen en su estructura química un anillo de benceno unido a un tiazol y los oxiranos poseen un grupo epóxido. Muchos de los fármacos que han surgido recientemente con las nuevas investigaciones son derivados de los benzotiazoles tales como amphotericin B, fluconazol, posaconazol, caspofungina y otros (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001).

Muchos de estos compuestos químicos y sus derivados muestran una actividad antifúngica muy buena sobre algunos tipos de especies de hongos o condiciones de salud y otros muestran una actividad antifúngica pobre (Pitzurra, 1999).

En los compuestos químicos identificados en nuestra investigación podemos señalar que los mismos presentaron un grado de inhibición en las diferentes especies. Todos los compuestos químicos inhibieron en su totalidad el crecimiento de *A. niger*, *A. versicolor* y *P. funiculosum* en la concentración mayor de 0.1 mg/mL. En un estudio donde se evaluó la germinación de conidias de la especie *A. fumigatus* en presencia de varios agentes antifúngicos (**amphotericin B**, **itraconazole**, **voriconazole**) se encontró que los mismos inhibían la germinación de la conidia al cabo de 24 horas (Manavathu *et al.*, 1999).

En las concentraciones menores de 0.01 mg/mL y 0.001 mg/mL el grado de inhibición fue menor, pero es diferente en cada compuesto químico. Algunos compuestos químicos no presentaron inhibición en comparación con el control PDA y en nuestro caso los compuestos químicos CNBT y MBT. Los compuestos químicos Epóxido, tiazol y fenil estudiados en esta investigación causaron un alto grado de inhibición en las primeras 24 horas en las especies *A. versicolor*, *P. funiculosum* y *A. niger*.

La asimilación de los agentes antifúngicos es diferente en los diferentes organismos. Muchas veces se asocian buscando mejores alternativas para inhibir el crecimiento de bacterias, virus y hongos. Un estudio realizado con histoplasmosis en ratas la actividad antifúngica disminuyó cuando el **fluconazole** se asocio con **ibuprofan** y **piroxican**. (Finkelievich *et al.*, 2002).

De cinco compuestos químicos se observó que el CNBT y MBT no presentaron inhibición en las especies *P. funiculosum* y *A. niger* al compararlos con el control PDA. El epóxido, tiazol y fenil mostraron un grado mayor de inhibición ante las tres especies de hongos. A base de estas observaciones hicimos unas gráficas de barras que muestran el efecto de los tres compuestos químicos con mayor grado de efectividad sobre las especies de hongos. (Figuras 9-11). Las mismas muestran que a mayor concentración del

compuesto químico mayor el grado de efectividad sobre la especie de hongo. En las concentraciones 0.01 mg/mL y 0.001 mg/mL los compuestos químicos que mejor inhibieron las especies fueron el fenil y el epóxido. Pero en la menor concentración el compuesto químico que mejor inhibió las especies fue el fenil.

El compuesto químico tiazol aparenta perder efectividad después de varios días por posible asimilación por las especies *A. versicolor* y *A. niger* en las concentraciones menores. A una mayor concentración de 0.01 mg/mL el tiazol presenta una mayor inhibición en la especie *P. funiculosum*. Los compuestos químicos fenil y epóxido presentaron una mejor inhibición a menor concentración. La concentración menor de nuestra investigación fue de 0.001 mg/mL para especies de hongos, pero en la literatura encontramos estudios llevados a cabo con benzotiazoles y azoles (voriconazol) usados en pacientes afectados con el hongo *Pseudallescheria boydii* en donde la concentración ha sido de 0.5 mg/mL (García, *et al.*, 2003). Otros estudios nos mencionan sobre concentraciones mayores con otros antifúngicos como el **amphotericin B** (Rodríguez, 1998). Los compuestos químicos usados en nuestra investigación en la concentración de 0.1 mg/mL presentaron una inhibición total. Esta concentración es menor en comparación con otros reportes de otros estudios lo que significa que nuestros compuestos químicos tienen un alto grado de efectividad sobre las especies tratadas.

Para estudios futuros que guarden relación con el tema sugerimos una concentración mayor en aquellas especies que presentan un grado de tolerancia al compuesto químico. Además de tomar en consideración la degradación de estos compuestos químicos, ya que se pretende hallar un control sobre aquellas especies de bacterias, virus y hongos que nos afectan y afectan nuestro entorno sin afectar nuestro medio ambiente. También recomendamos utilizar estos compuestos químicos de mayor

efectividad con otros microorganismos (bacterias y levaduras) y establecer una concentración entre 0.1 mg/mL y 0.01 mg/mL. Además de que se trabaje con estos compuestos químicos que presentan un grado mayor de inhibición. y formar sinergismo entre aquellos de menor efectividad y modificar la estructura molecular añadiendo el grupo oxirano.

Literatura Citada

1. Araúz, L.F. (1998). Fitología: Un enfoque agroecológico, Editorial de la Universidad de Costa Rica, pág. 442.
2. Chew, G. L., Douwes, J., Doekes, G., Higgins, K. M., Strien, R. V., Spithoven, J. and Brunekreef, B., (2001), Fungal extracellular polysaccharides, (13)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air*, 11 (3) Page 171.
3. Carrillo-Muñoz, A.J., Brío, S., Quindós, G. (2001). Una nueva generación de fármacos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18: 2-5.
4. Christense, C. (1964). *Los Hongos y el hombre*. Pág.209.
5. Deacon, J.W., (1988). *Introducción a la Micología Moderna*. Editorial Limusa, S.A de C.V. Departamento de Microbiología, Univ. De Edimburgo. Pág. 350.
6. Gams.W, Domsch, K.H, Anderson, H. (1993). *Compendium of Soil Fungi and Supplement*. Institute of Soil Biology, Federal Agricultural Research Center, Braunschweig, Federal Republic of Germany, Vol. I, page 859.
7. Herrera, T. Y Ulloa, M. (1990). *Microbiología Básica y Aplicada*, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, pág. 481.
8. Manavathu, E., Cutright, J., Chandrasekhae, P., (1999). Comparative Study of Susceptibilities of Germinated and Ungerminated Conidia of *Aspergillus fumigatus* to Various Antifungal Agents. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (3):858-861.
9. Moore-Landecker, E., (1996). *Fundamentals of the fungi* Prentice-Hall, Inc, Simon & Schuster/A Viacom, Com. Upper Saddle River, N.J. page 549.

10. Pitzurra, L., Fringuelli, R., Perito, S., Schiaffella, F., Barluzzi, R., Bistoni, F., Vecchiarelli, A., (1999). A New Azole Derivate of 1, 4 Benzothiazine Increases the Anthifungal Mechanisms of Natural Effectors Cells. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*, Sept., p. 2170-2175.
11. Raper, K.B, Thom, C. (1968). *A Manual of the Penicillia*. Hafner Publishing Co. N.Y. Page 875
12. Raper, K.B., Fennell, D.I., (1973). *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger, Publishing Co. page 687.
13. Rodriguez, M, Cury, A (1998). Amphotericin B-metronidazole combination against *Candida spp.* *Rev.Iberoam.Micol.* 15: 78-80.
14. Roilides, E., Sigler, L. Bibashi, E. Katsifa, H., Flaris, N., Panteliadis, C., (1999) Disseminated Infection Due to *Chrysosporium zonatum* in a Patient with Chronic Granulomatus Disease and Review of Non *Aspergillus* fungal Infections in Patients with This Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. Pág. 18-25 vol.37, No 1
15. Segui-Crespo, D. Pérez-Laguillo, C., Betancourt López, D., Pesante, Y. Berríos, A. (1991) Catastro de Hongos Presentes en Colmenas de las Abejas Melífera (*Apis mellifera*) en el Area Oeste de Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, 27(1-2): 75-79.