



FIGURA 1. *Allium sativum*.

M^a Concepción Navarro

M^a Pilar González^b

Ignacio Hierro^b

M^a Pilar Pérez-Galindo^c

Adela Valero^b

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

^c Sensient Fragrances (Granada)

Actividad de un licuado de *Allium sativum* (cultivar morado) frente a larvas L₃ de *Anisakis simplex* s.l.

Abstract

The garlic bulbs (*Allium sativum*), one of the main ingredients of the Spanish cuisine, are employed since ancient times for therapeutic purposes, many of which are now scientifically validated, as it is the case of its use as biocide. In the present study we have established the *in vitro* activity against *Anisakis simplex* s.l. L₃ larvae of the supernatants of *A. sativum* (purple cultivar) liquates obtained from bulbs recently collected (T1) or after six (T2) and twelve (T3) months of the harvesting. The results show that the more active supernatant is the corresponding to T2, with a 100% of larvae mortality. The compounds involved in this activity seem to be diallyl disulphide and diallyl trisulphide along with another unidentified sulphured compound.

Key words

Anisakis, *Allium sativum*, larvicide activity, sulphured compounds.

Resumen

Los bulbos de ajo (*Allium sativum*), uno de los principales ingredientes de la cocina española, se emplean desde antiguo con fines terapéuticos, muchos de ellos validados científicamente, como es el caso de su empleo como biocida. En el presente trabajo se ha estudiado la actuación *in vitro* frente a larvas L₃ de *Anisakis simplex* s.l. de los sobrenadantes de licuados de *A. sativum* (cultivar morado), obtenidos tanto de bulbos recién recolectados (T1) como tras seis (T2) y doce meses (T3) de la recolección. Los resultados muestran que los sobrenadantes más activos son los correspondientes a T2, con una mortalidad del 100% de las larvas. Los componentes implicados en esta actividad parecen ser el disulfuro y el trisulfuro de dialilo junto con otro derivado azufrado no identificado.

Palabras clave

Anisakis, *Allium sativum*, actividad larvicida, derivados azufrados.



Introducción

El tercer estado larvario del complejo *Anisakis simplex*, es el principal responsable de una parasitosis emergente, la anisakiosis. Estos nematodos infestan una amplia variedad de peces y cefalópodos, los cuales pueden adquirir el parásito por ingestión de zooplankton o por depredación de otros peces parasitados. Se da la circunstancia de que muchas de estas especies marinas forman parte habitual de la dieta del hombre por lo cual constituyen un riesgo potencial para la salud, dado que estos anisákidos pueden causar sintomatología gastrointestinal y alérgica en el hombre.

En cuanto al tratamiento de este proceso patológico, la mayoría de los autores coinciden al elegir como remedio más eficaz para los casos diagnosticados como anisakidosis gástrica aguda, la exéresis de la larva con la ayuda del gastrofibroscopio⁽¹⁻⁷⁾. Este tratamiento no deja de ser una actuación drástica y agresiva, por lo que en gran parte de los casos no se aplica dicha intervención quirúrgica. Al no retirar las larvas, no se acaba con el problema en sí, pudiendo en ocasiones darse con posterioridad un "síndrome de larva migrans visceral" o un enquistamiento de las larvas (en pared gastrointestinal, vísceras o musculatura abdominal). El paciente queda así sensibilizado ante un futuro contacto con nuevas larvas, motivo por el que son cada vez más frecuentes los casos de reacciones anafilácticas, llamados comúnmente "alergia al pescado".

Teniendo en cuenta que no se conoce ningún fármaco de eficacia contrastada en el mercado, distintos investigadores, han ensayado la acción de algunos compuestos, muchos de ellos de origen natural, frente a las larvas de anisákidos, tanto *in vitro* como *in vivo*^(1,2). En este sentido resulta de especial interés *Allium sativum*, ya que sus bulbos, uno de los principales ingredientes culinarios en nuestro país, se emplean desde antiguo con fines terapéuticos, muchos de ellos validados científicamente, como es el caso de su empleo como biocida^(10, 11).

El objetivo de este trabajo es poner de manifiesto la posible actividad de *A. sativum* frente a las larvas *L*₃ de *A. simplex* s.l.

Materiales y métodos

Los bulbos de ajo [cultivar morado; procedencia:

Munera (Albacete)] fueron licuados y sometidos posteriormente a centrifugación (3.000 rpm, durante quince minutos). El sobrenadante de *Allium sativum* (SAS) obtenido fue conservado a -4°C, hasta el momento del ensayo de la actividad larvicida y análisis de su composición, realizada mediante CG/EM. Las larvas de los parásitos (FIGURA 1), aisladas de bacaladilla (*Micromesistius potassou*), una vez axenizadas en solución anti-biótica, se introducen pocillos individuales de placas de poliestireno, que contenían 2 ml de solución salina y 0,30 ml de SAS (concentración final: 0,15 mL / mL medio). La incubación se efectúa a 37°C y 5% de CO₂. Las lecturas se llevaron a cabo a las 4, 8, 24 y 48 h del inicio de las experiencias. Dichos ensayos fueron realizados sobre SAS correspondientes a bulbos de ajo recién recolectados (T1), transcurridos seis meses de la recolección (T2) y al año de la recolección (T3).

De forma paralela se realizan dos controles con solución de NaCl al 0,9 % (control nº 1) (2 mL por pocillo), en las mismas condiciones que los productos, con el fin de comprobar si las larvas se encuentran en estado óptimo.

Con el fin de que los resultados sean lo más fidedignos posibles, cada uno de los SAS se ensaya tres veces de acuerdo con el protocolo descrito y en días diferentes. Se determinan los siguientes parámetros: Supervivencia Media (SM = % de *L*₃ vivas) a las 4, 8, 24 y 48 h del inicio del ensayo y Supervivencia Máxima (Smáx= número de *L*₃ vivas a las 48 horas).

Resultados y discusión

Si bien la supervivencia máxima es igual a cero para los SAS de los tres tiempos estudiados (T1, T2 y T3), los resultados obtenidos muestran que el SAS de T2 (seis meses de la recolección) posee la mayor actividad larvicida de todas las muestras ensayadas, puesto que dicho sobrenadante ocasiona, desde la primera lectura, una mortalidad del 100% (FIGURA 2). Estos datos se encuentran en consonancia con los descritos por otros autores en relación con la actividad biocida frente a distintos microorganismos de preparados de ajo y, en particular, de ajo envejecido^(11, 12). En relación con la actuación de *A. sativum* frente a larvas *L*₃ de *Anisakis*, los resultados obtenidos refrendan los publicados por Kasuya *et al.* (1988),

según los cuales las larvas del nematodo pierden totalmente la movilidad *in vitro* a las 24 horas de ponerlas en contacto con un extracto salino al 5% de *A. sativum*.

En cuanto a la composición de los distintos SAS, los análisis cuali y cuantitativos llevados a cabo mediante CG-EM, ponen de manifiesto la presencia en dichos sobrenadantes de numerosos derivados azufrados (FIGURA 3), entre los que destacan por su especial abundancia el disulfuro y el trisulfuro de dialilo, descritos por otros autores como

componentes implicados en la muerte celular (13, 14). Si bien no es posible establecer una relación estricta entre la composición de los SAS y su actividad larvicida, los resultados parecen apuntar hacia el hecho de que tanto el disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo como un derivado azufrado no identificado (NI-1) podrían estar implicados en la actuación frente a las larvas del SAS del T2.

Dirección de contacto

M^º Concepción Navarro
cnavarro@ugr.es

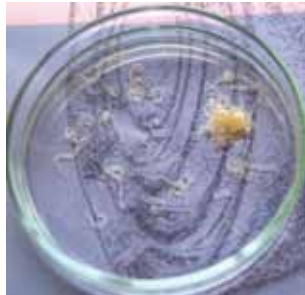


FIGURA 1. Tercer estadio larvariode *Anisakis simplex* s.l. obtenido del hospedador *Micromesistius poutassou*.

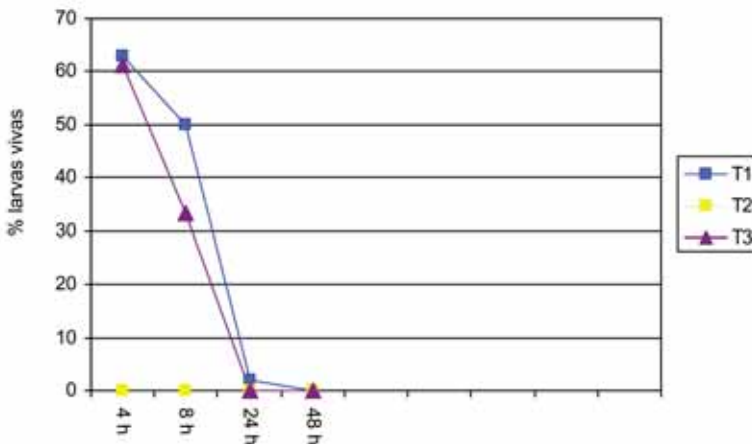


FIGURA 2. Actividad *in vitro* del sobrenadante del bulbo de *Allium sativum* frente a larvas L₃ de *A. simplex* s.l.

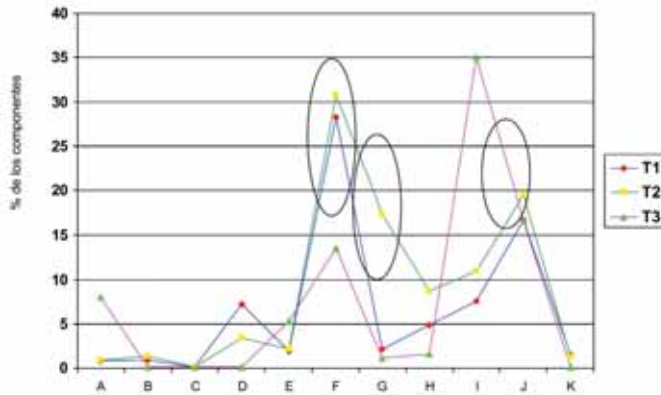


FIGURA 3. Perfiles cromatográficos (CG-EM) de los SAS (sobrenadantes de *Allium sativum*).

A: alcohol alílico; B: sulfuro de metilo; C: disulfuro de metilo; D: sulfuro de dialilo; E: disulfuro de metilo; F: disulfuro de dialilo; G: no identificado-1; H: no identificado-2; I: trisulfuro de metilo; J: trisulfuro de dialilo; K: tetrasulfuro de dialilo.

T1 = Momento de la recolección; T2= seis meses tras recolección; T3= 12 meses tras recolección

Referencias bibliográficas

- Oshima T, Nakazawa M, Sugiyama Y. Effect of mebendazole on *Anisakis simplex* larvae in vivo. Proceedings of the 7th International Congress of Parasitology, Bull Soc Franc Parasitol. 1990; 8:1058.
- Smith JW, Wootton R. *Anisakis* and Anisakiasis. Adv Parasitol. 1978;16: 93-163.
- Carvajal J. Anisakiasis. Parasitología Clínica. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago de Chile. 1984;23: 183-186.
- Deardorff TL, Fukumura T, Raybourne RB. Invasive anisakiasis. A case report from Hawaii. Gastroenterol. 1986; 90: 1047-1950.
- Pethitory JC, Marty B. L'anisakiase en France. La lettre del'Infectiologue 1988; 3: 96-99.
- Kasuya S, Hamamo H, Izumi S. Gastric anisakiasis with anaphylactoid reactions. ACI News. 1989; 1: 13-14.
- Cocheton JJ, Cabou I, Lecomte I. Anisakiase et infections par les anisakidés. Ann Med Interne. 1991; 142: 121-130.
- Kasuya S, Goto C, Koga K, Ohtomo H, Kagei N, Honda G. Lethal efficacy of leaf extract from *Perilla frutescens* (traditional Chinese medicine) or perillaldehyde on *Anisakis* larvae in vitro. Jpn J Parasitol. 1990; 39: 220-225.
- Hierro I, Valero A, Pérez P, González P, Cabo MM, Montilla MP, Navarro MC. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. 2004; Phyto-med. 11: 77-82.
- Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ. Antimicrobial properties of garlic against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 475-480.
- Lemar KM, Passa O, Aon MA, Cortassa S, Müller CT, Plummer S, O'Rourke B, Lloyd D. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. Microbiol. 2005;151: 3257-3265.
- Sato T, Miyata G. The nutraceutical benefit. Part IV. Garlic. Nutrition. 2000; 16: 787-788.
- Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. Med Res Rev. 1996;16: 111-124.
- Xiao D, Singh SV. Diallyl trisulfide, a constituent of processed garlic, inactivates Akt to trigger mitochondrial translocation of BAD and caspase-mediated apoptosis in human prostate cancer cells. Carcinogen. 2005. (En prensa. Acceso on line).