

Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de *Allium sativum* "ajo" frente a dermatofitos y *Candida albicans*

In vitro effect of different concentrations of *Allium sativum* "garlic" on dermatophytes and *Candida albicans*

LORA CAHUAS, Carmen¹; LUJÁN VELÁSQUEZ, Manuela²; ROBLES CASTILLO, Heber³; SARAVIA CUEVA, Verónica⁴; CABEZA RODRIGUEZ, Julio⁵

No fueron encontrados conflictos de interés en este artículo.

RESUMEN

El presente trabajo estuvo orientado a investigar si *Allium sativum* "ajo" en su forma liofilizada posee efecto antimicótico *in vitro* sobre dermatofitos y *Candida albicans*. Para ello se trabajó con 100 g. de *A. sativum* y cultivos de dermatofitos y *C. albicans* aislados de pacientes con micosis en piel, uñas y cabellos. Se emplearon un total de 30 cultivos puros de los cuales 07 correspondieron a *Trichophyton mentagrophytes*, 04 a *T. rubrum*, 04 a *Microsporium canis* y 15 a *C. albicans*, los cuales fueron sembrados en Agar Sabouraud e incubados en el caso de dermatofitos por 2 a 3 semanas a temperatura ambiental ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) y para *C. albicans* a 37°C por 48 a 72 horas. Las pruebas biológicas *in vitro* incluyeron: la preparación del inóculo de *A. sativum* y preparación del Diflucan como control. Las pruebas de sensibilidad se realizaron usando el método de difusión en agar (MDA) y el método de dilución en tubo. Según los análisis estadísticos, los resultados indican que para el caso de dermatofitos por el MDA se logra inhibición entre 300 a 400 ug de ajo liofilizado, una concentración mínima inhibitoria (MCI) de 500 ug/mL y un efecto fungicida de 1000 ug/mL. En el caso de *C. albicans* por el MDA se obtuvo un mayor diámetro de inhibición entre 4000 a 5000 ug, una MCI de 2500 ug/mL y un efecto fungicida de 5000 ug/mL. Estos resultados podrán ser utilizados en la realización de estudios *in vivo* que corroboren las propiedades medicinales que se le atribuyen al ajo.

Palabras clave: *Allium sativum*, dermatofitos, *Candida albicans*.

ABSTRACT

The present work attempted to determine if *Allium sativum* "garlic" in its form lyophilized has *in vitro* antimycotic effect on dermatophytes and *Candida albicans*. We used 100 g. of *A. sativum*, cultures of dermatophytes and *C. albicans* isolated of patients with mycosis in skin, fingernails and hair. A total of 30 pure cultures of which 07 of *Trichophyton mentagrophytes*, 04 of *T. rubrum*, 04 of *M. canis* and 15 of *C. albicans*, which were cultured in Sabouraud Agar. Dermatophytes were incubated for 2-3 weeks under conditions of air temperature ($20 \pm 3^\circ\text{C}$), meanwhile *C. albicans* was incubated for 48 -72 hours at 37°C . The *in vitro* biological tests included: inoculum preparation of *A. sativum* lyophilized and preparation of Diflucan (control). The tests of sensibility were made using the agar diffusion method and the tube dilution test. According to variance analysis, the results indicate that inhibition determined by the agar diffusion method in dermatophytes was among 300 to 400 ug from lyophilized garlic, also found a minimum inhibitory concentration (MIC) of 500 ug/mL and a fungicidal action of 1000 ug/mL. In the case of *C. albicans*, it showed bigger inhibition diameter among 4000 to 5000 ug, a minimum inhibitory concentration of 2500 ug/mL and fungicidal action of 5000 ug/mL. These results can be used for *in vivo* studies in order to confirm the medicinal properties of garlic.

Key words: *Allium sativum*, dermatophytes, *Candida albicans*.

¹Biólogo Microbiólogo. Ms. C. Microbiología Clínica. Universidad Nacional de Trujillo. carmenlorape@yahoo.com

²Biólogo Microbiólogo. Ms. C. Microbiología Clínica. Universidad Nacional de Trujillo. manuelitaluve@yahoo.es

³Biólogo Microbiólogo. Dr. Mención en Medio Ambiente. Universidad Nacional de Trujillo. revistaucv-scientia@ucv.edu.pe

⁴Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. vpsc4e@hotmail.com

⁵Ingeniero Químico. Universidad César Vallejo. julitocabeza@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La información acerca de las propiedades curativas de ciertos vegetales ha sido transmitida de generación en generación y se ha incrementado con el tiempo como resultado del continuo contacto del hombre con las plantas¹. Su valor medicinal se debe a la presencia, en el tejido vegetal, de una sustancia química, el principio activo que produce un efecto farmacológico. Muchos de los principios activos son sumamente complejos y en algunos aún se desconoce su naturaleza; otros han sido aislados y purificados e incluso sintetizados^{2,3}.

Una de las plantas que ha suscitado especial interés es el *Allium sativum* "ajo" que es originario del Asia Central; pertenece a las familia de las Liliáceas. Esta planta crece en casi todo el mundo, sobre todo en climas templados y cálidos^{3,4}. Es frecuente atribuirle las propiedades siguientes: antiséptica, antibacteriana e hipocolesteromiente. También se cree que, disminuye la agregación plaquetaria, que es antimicótica, vermífuga y expectorante; algunas de estas acciones han sido confirmadas por la medicina moderna^{2,5}.

El ajo contiene, sobre todo en el bulbo, una sustancia sulfurada inodora llamada aliína que por acción de un fermento contenido en los propios ajos, la aliinasa, se convierte en esencia de ajos y levulosa. La esencia de ajos contiene la alicina y sulfuros de alilo, vinilo y propilo (0,6%), que dan el olor característico a los ajos. Contiene además vitamina A, B1, B2, C, una amina del ácido nicotínico, colina, hormonas, alicetoina I y II, ácido sulfocianúrico, yodo y trazas de uranio. Esta compleja composición hace que dicho bulbo ejerza una variada acción en el organismo^{3,4,6}.

Los efectos antibióticos y antimicótico se atribuyen a la acción de la alicina que ha demostrado ser activa *in vitro*, contra *Candida albicans*, algunas especies de *Trichomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *S. paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, virus del *Herpes simplex*, de la Influenza; y hongos, principalmente dermatofitos y levaduras patógenas al hombre^{6,7,8}.

Existen estudios acerca de una sustancia derivada de *A. sativum* "ajo", el ajoeno y de su acción *in vitro* frente a dermatofitos, en la que logró inhibir el crecimiento a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 60 ug/mL y una Concentración Mínima Fungicida (CMF) de 75 ug/mL. También se comprobó el efecto *in vivo* en crema al 0.4% aplicada una vez por día por un lapso de cinco días. Se logró un bajo porcentaje de curación; sin embargo se obtuvo una excelente respuesta clínica en pacientes con pitiriasis versicolor lográndose una curación del 87,5%⁹. Hay otros trabajos que señalan la acción antimicótica sobre *C. albicans* y *Aspergillus niger*⁸ y la inhibición del crecimiento de otras levaduras como *Sacharomyces cerevisiae* a concentraciones por debajo de 20 ug/mL⁷.

Las enfermedades de la piel pueden ser causadas por hongos de tipo levadura (*Candida*), que causan las candidosis, y del tipo moho (dermatofitos) que causan dermatofitosis o tiñas^{10,11}.

Las levaduras del género *Candida* forman parte de la flora normal de las membranas mucosas de tracto respiratorio e intestinal y de los genitales femeninos; son potencialmente patógenas cuando tienen la oportunidad y pueden llegar a ser microorganismos dominantes^{5,12,13,14,15}.

C. albicans en su fase de comensal se presenta como levadura; pero en su fase patógena se divide por gemación produciendo pseudohifas y micelio verdadero^{14,16,17}. Puede causar infecciones crónicas en uñas, ser causa principal de vulvovaginitis, queilitis angular, balanitis e intertrigo.^{16,18}

Los dermatofitos son hongos filamentosos que afectan la epidermis y anexos cutáneos. Emmons, en 1934, los clasificó en tres géneros anamórficos: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Por otra parte, según la adaptación de cada una de las especies a diferentes animales o reservorios ecológicos, se dividen en especies antropofílicas, entre ellas figuran: *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. violaceum*, *Epidermophyton floccosum*; en las zoofílicas se puede citar a *Microsporum canis*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. equinum*, *M. gallinae*; y por último tenemos a las geofílicas como *M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. nanum*, *M. cookei*^{10,14}.

El tratamiento de las micosis cutáneas se ha beneficiado en las dos últimas décadas con los nuevos antifúngicos, casi todos derivados imidazólicos, de amplio espectro y de gran eficacia. Entre los principales agentes antifúngicos están los imidazoles, las alilaminas, las ciclopiroxilaminas y las amorolfinas. Dentro de los nuevos agentes antimicóticos (triazoles) se encuentran el itraconazol, el fluconazol y la terbinafina. El Fluconazol es un imidazol N- sustituido con un espectro antimicótico y su mecanismo de acción es similar a la de los imidazoles¹⁹.

En Trujillo - Perú se han realizado trabajos acerca de la acción antimicótica del *A. sativum*; Rea y col. (1998), comprobaron el efecto antimicótico en Criptococosis inducida en *Mus musculus* var. *albinus*²⁰; Amésquita (1999) determinó que el 60 y 80% del extracto de ajo afecta la viabilidad de *C. albicans*²¹; Madueño y Madujano (1999) encontraron que a concentraciones de 80 ug/mL a más, se demuestra una capacidad inhibitoria del crecimiento de los dermatofitos²².

En los últimos años los logros de la industria farmacéutica han sido notorios en la producción de antimicrobianos, aunque los costos son muy elevados⁹. Si la acción del *A. sativum* "ajo" fuera satisfactoria, habría la posibilidad de contar con un producto útil, ya que posee propiedades

terapéuticas, es cultivable a lo largo del Perú, crece en cualquier tipo de terreno y sobre todo es de muy bajo costo.

Por todo lo expuesto, se pretende demostrar el efecto antimicótico *in vitro* de *A.*

sativum "ajo" frente a dermatofitos y *C. albicans* con miras a obtener un producto competitivo con los antimicóticos que se usan en el mercado y su facilidad de adquisición para la mayoría de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Cultivos puros de *Microsporum canis* (04), *Trichophyton mentagrophytes* (07), *Trichophyton rubrum* (04) y *Candida albicans* (15) aislados de pacientes con micosis en piel, uñas y cabellos proporcionados por el Instituto de Medicina Tropical e Infectología, de la Universidad Nacional de Trujillo.
- 100 g de *Allium sativum* "ajo" donado por la planta liofilizadora de Arequipa con 2% de humedad.

2. MÉTODO

2.1. PRUEBAS BIOLÓGICAS IN VITRO

2.1.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE DERMATOFITOS

Los cultivos proporcionados por el Instituto de Medicina Tropical e Infectología de la Universidad Nacional de Trujillo, fueron sembrados en Agar Sabouraud con glucosa al 2% e incubados por 2 semanas a 27°C.

Luego de observar un buen desarrollo, se agregó 4 ml de agua destilada estéril, y se levantó cuidadosamente con una varilla de vidrio todo el desarrollo del hongo, trasvasándolo a un tubo estéril.

Posteriormente, se agitó vigorosamente por 5-10 minutos y se hizo el recuento en cámara de Neubauer obteniéndose una concentración de 1000 esporas/ml. Este material fue colocado en viales estériles a 4°C hasta el momento de su uso.

2.1.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE *C. albicans*

Los 15 cultivos de *C. albicans* se colocaron en Agar Sabouraud, se verificó su pureza y luego se incubó 24 hrs a 37°C. Cada cultivo se diluyó en agua destilada estéril hasta alcanzar una turbidez similar al tubo N° 2 de MacFarland cuya concentración es equivalente a 6×10^8 cél/ml.

2.1.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE *A. sativum* "AJO"

El ajo liofilizado se diluyó al 10% en agua destilada estéril alcanzando

una concentración equivalente a 100000 ug/mL (solución stock).

a) Para dermatofitos

A partir de la solución stock se hizo una dilución al décimo obteniéndose 10000 ug/ml. Luego a partir de esta, se tomó 0,01; 0,02; 0,03 y 0,04 mL, alcanzando concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ug/mL respectivamente.

b) Para *C. albicans*

A partir de la solución stock se tomó 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 mL alcanzando concentraciones de 2000, 3000, 4000 y 5000 ug/mL respectivamente.

2.1.4. PREPARACIÓN DEL DIFLUCAN (FLUCONAZOL)

El antimicótico diflucan (fluconazol) fue utilizado como control positivo de inhibición, por su actividad *in vitro* e *in vivo* contra Dermatofitos y *C. albicans*. Las concentraciones empleadas fueron las mismas que para *A. sativum*.

a) Para Dermatofitos¹⁰

A la cápsula de diflucan de 150 mg, se le agregó 10 mL de agua destilada, obteniéndose una concentración de 15000 ug/mL (solución stock). Esta se diluyó al 2/3, luego se tomó 0,01; 0,02; 0,03 y 0,04 mL, obteniéndose concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ug/mL respectivamente.

b) Para *C. albicans*

A la cápsula de diflucan de 150 mg/mL se agregó 3 mL de agua destilada y se obtuvo 50000 ug/mL (solución stock). Se tomó 0,1; 0,08; 0,06 y 0,04 mL obteniéndose las concentraciones de 5000, 4000, 3000 y 2000 ug/mL respectivamente.

2.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

2.2.1. EN PLACA

Se realizó mediante el método de difusión en agar^{8,23}.

a) Para Dermatofitos

Se empleó placas petri con Agar

Sabouraud + Cloranfenicol al 0,05g% para observar la acción de *A. sativum* "Ajo" sobre el crecimiento de los dermatofitos.

Se depositó 0,1 mL de inóculo que equivale a 1000 esporas/mL en las placas, luego con una asa de vidrio (Asa Drigralsky) se dispersó el inóculo y se llevó a la estufa para secar.

Posteriormente, se hicieron 04 excavaciones en el medio con una campanilla de Durham de 6 mm de diámetro. En estas excavaciones se depositaron las diferentes concentraciones de ajo y en otra placa el Diflucan como control, luego se incubaron a 28°C por 15 días.

La lectura se realizó a los 15 -18 días y se hizo en base al crecimiento del hongo cerca de la excavación, midiendo su diámetro de inhibición en mm (la distancia que existe entre el hoyo y el micelio del hongo), luego se hizo las comparaciones con respecto a la placa control.

b) Para *C. albicans*

Se empleó el método de placa vertida^{24,25}. Para ello se agregó en la placa petri 1 mL de inóculo que equivale aproximadamente a 6×10^7 esporas/mL, luego se colocó el Agar Sabouraud que se encontraba a 45°C, se mezcló y se colocó a la estufa para que seque.

Después, se hicieron las excavaciones para colocar las diferentes concentraciones de ajo y diflucan (control).

La lectura se realizó a las 48 hrs de incubación midiéndose el halo de inhibición en mm y se comparó con su placa control.

2.2.2. EN TUBO

En relación a los resultados observados se procedió a determinar su concentración mínima inhibitoria y su efecto fungicida.

a) Para *C. albicans*

Se realizó mediante el método de dilución en tubo^{10,12,23,24}.

Se empleó 04 tubos de 16x150 mm y caldo Sabouraud. A partir de la solución stock del ajo equivalente a 100000 ug/mL se hizo una dilución al 1/10 (10000 ug/mL) y de esta última se realizaron 4 diluciones al 1/2 en caldo Sabouraud, obteniéndose

concentraciones de 5000, 2500, 1250 y 625 ug/mL.

En el caso de los tubos control, se trabajó con la solución stock de diflucan a una concentración de 15000 ug/mL, la cual fue diluida a los 2/3 (10000 ug/mL). Luego a partir de ésta se realizaron diluciones al 1/2 en caldo Sabouraud obteniéndose concentraciones de 5000, 2500, 1250 y 625 ug/mL.

Posteriormente, se agregó 0,1 mL de inóculo de *C. albicans* a una concentración de 6×10^7 esporas/mL a cada uno de los tubos y se incubaron a 37°C durante 48 horas.

Los parámetros de evaluación que se emplearon fueron el crecimiento visible (turbidez) y el crecimiento en Agar Sabouraud de los cultivos evaluados.

La acción fungistática se determinó con la menor concentración de *A. sativum* "ajo" que inhibe el desarrollo de *C. albicans* (ausencia de turbidez). También se midió su absorbancia a 540 nm usando un Spectronic.

El efecto fungicida se determinó por los subcultivos en Agar Sabouraud de los tubos que no presentaron turbidez²³.

b) Para Dermatofitos

Se efectuó de forma similar que para *C. albicans*. A partir de la solución stock de ajo equivalente a 10000 ug, se hicieron diluciones al 1/2 en caldo Sabouraud obteniéndose concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 ug/mL.

En el caso de los tubos control, se trabajó con la solución stock de diflucan a una concentración de 15000 ug/mL, la cual fue diluida a los 2/3 (10000 ug/mL). Luego a partir de ésta se realizaron diluciones al 1/10 y 1/2 en caldo Sabouraud obteniéndose concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 ug/mL respectivamente.

Posteriormente se agregó 0,1 mL de esporas a una concentración de 1000 esporas/mL a cada uno de los tubos y se incubaron a temperatura ambiente por 7 a 14 días.

Los parámetros de evaluación que se emplearon fueron el

crecimiento micelial y turbidez de los tubos.

2.3. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

El análisis fue realizado empleando las pruebas de ANOVA, HDS de Tukey, Duncan. Se evaluaron los resultados tanto para Dermatofitos como para *C. albicans*. También se determinó el grado de

significancia entre las diferentes concentraciones de *A. sativum* "ajo", para poder determinar si puede ser utilizado como un antimicótico natural alternativo de bajo costo según la inhibición del crecimiento de los hongos usados (efecto fungistático y efecto fungicida).

RESULTADOS

Existen diferencias significativas entre las concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ug/mL de *Allium sativum* "ajo", de acuerdo a las pruebas post hoc, determinándose que con una concentración de 400 ug/mL se obtiene un mejor resultado en la disminución del desarrollo de *Trichophyton mentagrophytes* (Figura 1a y 2).

Las diferentes concentraciones de *A. sativum* "ajo" difieren significativamente en el crecimiento de *T. rubrum* (con $F_{exp} = 50$ y $F_{tab} = 3,49$) y *Microsporium canis* (con $F_{exp} = 14.6$ y $F_{tab} = 3.49$), así a mayor concentración de *A. sativum* la tasa promedio de crecimiento de estos dermatofitos disminuye (Figura 1b y 1c).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria en *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *M. canis*, frente a diferentes concentraciones (1000, 500, 250 y 625 ug/mL) de *A. sativum*, encontrándose una concentración mínima inhibitoria de 500 ug/mL (Tabla 1).

En relación al efecto fungicida de *A. sativum* en *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *M. canis*, se encontró que a una concentración de 1000 ug/mL, dichos dermatofitos son incapaces de sobrevivir (Anexo 1).

Para *C. albicans* se emplearon 15 cultivos puros, encontrándose que las diferentes concentraciones de *A. sativum* difieren significativamente ($F_{exp} = 34.9$ y $F_{tab} = 2.78$) y de acuerdo a las pruebas post hoc, se obtiene un mayor diámetro de inhibición del crecimiento a la concentración de 5000 ug/mL. (Figura 1d y Anexo 2).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria correspondiente a 2500 ug/mL (Tabla 3), así mismo se encontró que las diferentes concentraciones de *A. sativum* difieren significativamente ($F_{exp} = 30.1$ y $F_{tab} = 2.78$) con respecto al promedio de crecimiento. Así, a mayor concentración de *A. sativum* menor es su absorbancia, pudiéndose apreciar que a medida que la concentración del ajo disminuye aumenta su absorbancia debido al crecimiento del hongo (turbidez) (Tabla 4).

El efecto fungicida también se determinó mediante subcultivos en Agar Sabouraud a partir de los tubos que no presentaron turbidez encontrándose que a 5000 ug/mL no desarrolló la levadura (Tabla 5 y Anexo 3b).

Gráfico 1. Promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) en dermatofitos y *Candida albicans* a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo"
a) *Trichophyton mentagrophytes*, b) *Trichophyton rubrum*, c) *Microsporium canis* y d) *Candida albicans*.

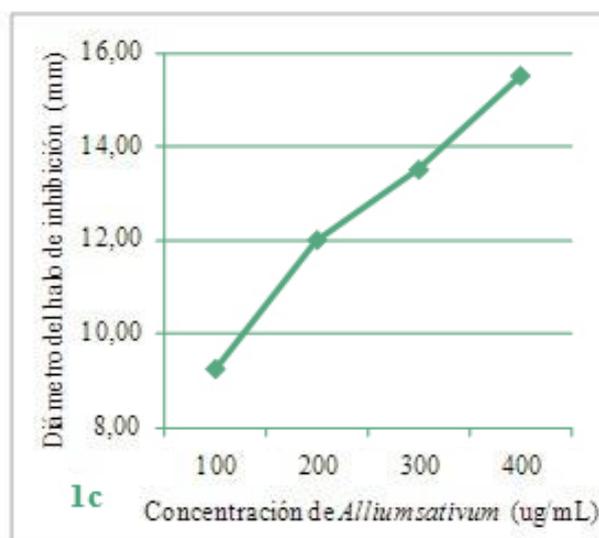
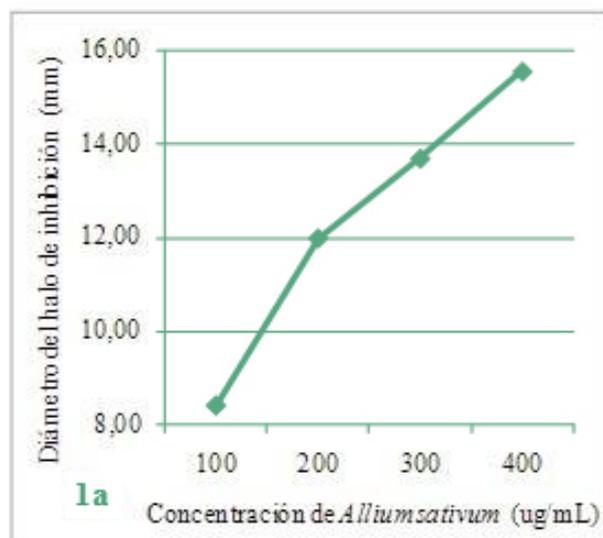


Gráfico 1. Promedio del diámetro de los halos de inhibición (mm) en dermatofitos y *Candida albicans* a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo"
 a) *Trichophyton mentagrophytes*, b) *Trichophyton rubrum*, c) *Microsporum canis* y d) *Candida albicans*.

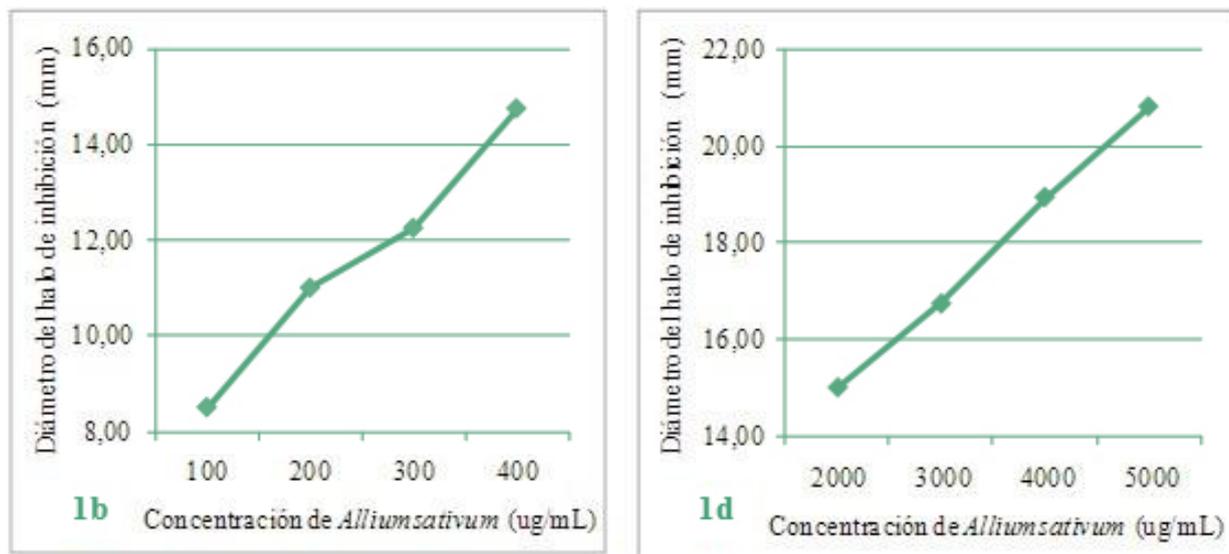


Gráfico 2. Inhibición de dermatofitos a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo" a los 15 días de incubación a temperatura ambiente ($23 \pm 3^\circ\text{C}$)
 a) *Trichophyton mentagrophytes*, b) *Microsporum canis*.

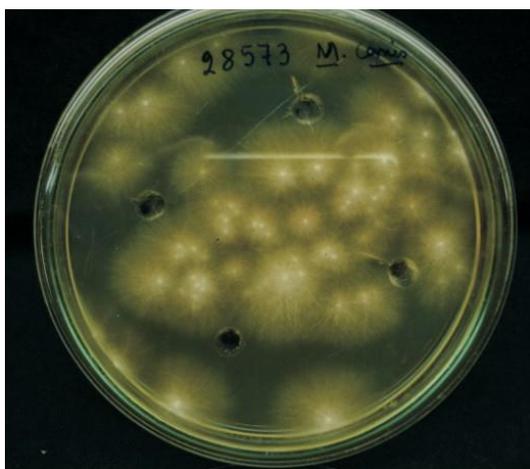


Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria de dermatofitos a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo".

Cultivos	Concentración de de <i>Allium sativum</i> (ug/mL)			
	1000	500	250	125
M1	-	-	+	+
R3	-	-	+	+
C1	-	-	+	+
C2	-	-	+	+
Diflucan (control)	-	-	-	+

Cultivos M1: *Trichophyton mentagrophytes*, R3: *Trichophyton rubrum*, C1 y C2: *Microsporum canis*.

+ : Crecimiento con presencia de micelio y turbidez, - : No presenta crecimiento, es transparente.

Tabla 2. Efecto fungicida en dermatofitos a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo"

Cultivos	Concentración de de <i>Allium sativum</i> (ug/mL)			
	1000	500	250	125
M1	-	+	+	+
R3	-	+	+	+
C1	-	+	+	+
C2	-	+	+	+
Diflucan (control)	-	-	-	+

Cultivos M1: *Trichophyton mentagrophytes*, R3: *Trichophyton rubrum*, C1 y C2: *Microsporum canis*.
+ : Crecimiento, - : No hubo crecimiento

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria de 15 cultivos de *Candida albicans* a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo"

Cultivos	Concentración de <i>A l l i u m</i> <i>s a t i v u m</i> (u g / m L)			
	5000	2500	1250	625
01	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
02	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
03	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
04	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
05	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
06	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
07	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
08	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
09	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
10	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
11	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
12	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
13	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
14	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
15	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Diflucan(control)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

Positivo: Presencia de turbidez a los 7 días de incubación a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Negativo: No hubo crecimiento a los 7 días de incubación a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria de 15 cultivos de *Candida albicans* a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo" medidos a una absorbancia de 540 nm.

Cultivos	Concentración de <i>A l l i u m</i> <i>s a t i v u m</i> (u g / m L)			
	5000	2500	1250	625
01	0.06	0.05	0.14	0.40
02	0.05	0.03	0.15	0.32
03	0.09	0.08	0.15	0.29
04	0.04	0.06	0.10	0.15
05	0.09	0.10	0.15	0.20
06	0.09	0.08	0.15	0.30
07	0.09	0.14	0.15	0.30
08	0.04	0.06	0.10	0.15
09	0.09	0.06	0.10	0.30
10	0.09	0.06	0.08	0.14
11	0.02	0.04	0.05	0.15
12	0.03	0.05	0.09	0.10
13	0.09	0.07	0.17	0.22
14	0.05	0.05	0.10	0.12
15	0.09	0.10	0.12	0.22
Diflucan (control)	0.07	0.07	0.07	0.12

Tabla 5. Efecto fungicida de 15 cultivos de *Candida albicans* a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo"

Cultivos	Concentración de <i>A l l i u m</i> <i>s a t i v u m</i> (u g / m L)			
	5000	2500	1250	625
01	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
02	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
03	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
04	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
05	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
06	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
07	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
08	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
09	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
10	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
11	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
12	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
13	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
14	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
15	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Diflucan (control)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Positivo: Crecimiento

Negativo: No hubo crecimiento

DISCUSIÓN

Los dermatofitos son hongos que infectan tejidos queratinizados como piel, pelo y uñas. Incluyen tres géneros (*Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*) los cuales pueden tener como hábitat natural el suelo (geófilicos), los animales (zoófilicos) o el hombre (antropofílicos). Como la capacidad infectante, la morfología y la patogenicidad de estos hongos es muy semejante, es habitual que se categoricen de acuerdo con el síndrome y el sitio anatómico con los cuales se relacionan como la tiña de la cabeza, tiña del pie, etc.

Candida albicans es una levadura que forma parte de la microflora normal de las mucosas oral, vaginal y de la piel. Sin embargo ocasiona enfermedades cuando existen factores predisponentes como la disminución de mecanismos celulares de defensa (función de los neutrófilos), alteraciones de barreras favoreciendo la invasión micótica etc.^{14,23,26}.

Al no existir vacunas contra las infecciones micóticas y al presentarse un elevado costo de los agentes antimicóticos, el presente trabajo permite establecer una posibilidad de tratamiento en las infecciones de piel, pelos y uñas causadas tanto por dermatofitos como por *C. albicans*, mediante el uso de *Allium sativum* "ajo" en base a los resultados obtenidos *in vitro*.

Esta investigación se orientó a determinar si *A. sativum* "ajo" en su forma liofilizada tiene efecto sobre el desarrollo de los hongos mencionados. Existen trabajos en los que se utilizan los extractos producidos por destilación y condensación en los que se demuestra inhibición^{9,20}. Estadísticamente se observa que el crecimiento de los dermatofitos y *C. albicans* es dependiente de las diferentes concentraciones de *A. sativum* "ajo"; es decir que a mayor concentración el diámetro de crecimiento del hongo es fungistático y posteriormente fungicida (Figura 1a, 1b, 1c y 1d).

La inhibición del crecimiento utilizando el método de difusión^{23,24} indicó que a medida que aumenta la concentración de *A. sativum* "ajo" el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* es afectado como se confirma en los resultados obtenidos. Lo mismo ocurre para *T. rubrum* y

Microsporum canis (Anexo 1). También se observó que en el control con Diflucan el efecto inhibitorio es mucho mayor, ya que este fue usado como control positivo de inhibición.

La concentración mínima inhibitoria que muestran los dermatofitos a diferentes concentraciones de *A. sativum* fue de 500 ug/mL (Tabla 1). El efecto fungicida se obtuvo a 1000 ug/mL (Tabla 2), la acción que tiene el *A. sativum* con su componente la alicina es que altera la síntesis lipídica de la membrana del hongo dificultando la entrada de oxígeno.

Otros estudios *in vitro* e *in vivo* determinaron actividad inhibitoria de los extractos de ajo sobre *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus parasiticus*. También se demostró inhibición *in vitro* en un caso de esporotricosis y sobre hongos de los géneros *Epidermophyton sp*, *Trichosporum sp*, *Trichophyton sp*, *Rhodotorula sp* y *Torulopsis sp*²⁷.

Para el caso de *C. albicans*, la concentración ensayada fue mucho más alta que la utilizada para dermatofitos. Su resistencia fue notoria, se observó inhibición del crecimiento (mayor halo) cuando la concentración aumentó, demostrando relación directa (Figura 1d). Así mismo, se obtuvo un mayor efecto de inhibición de crecimiento en placa a 5000 ug/mL (Anexo 2). En cuanto a los 15 cultivos puros de *C. albicans* se obtuvo concentración mínima inhibitoria de 2500ug/mL, en forma cualitativa se observó la turbidez y en forma cuantitativa usando el Spectronic (Tabla 3, Anexo 3a).

El efecto fungicida se encontró a la concentración de 5000 ug/mL en la cual no hubo desarrollo de ninguna colonia de la levadura (Anexo 3b). El cuanto al control Diflucan tanto la concentración mínima inhibitoria como el efecto fungicida se obtuvo a 625 ug/mL.

Los resultados obtenidos permitirán establecer pautas para la realización de estudios *in vivo* que corroboren las propiedades medicinales que se le atribuyen al ajo, y así la medicina tradicional cobrará más auge en nuestro país que goza de una diversidad de flora orientada a utilizar productos biológicos naturales como fitofármacos que sean de bajo costo y que sean inocuos para la población^{28,29}.

CONCLUSIONES

Las diferentes concentraciones ensayadas de *Allium sativum* "ajo" poseen actividad antimicótica sobre Dermatofitos y *Candida albicans* lo que se demuestra mediante el método de difusión en agar y el método de dilución en tubo.

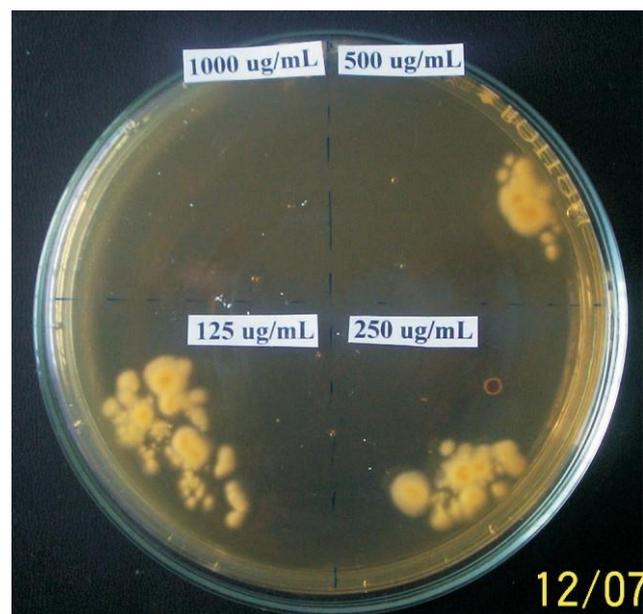
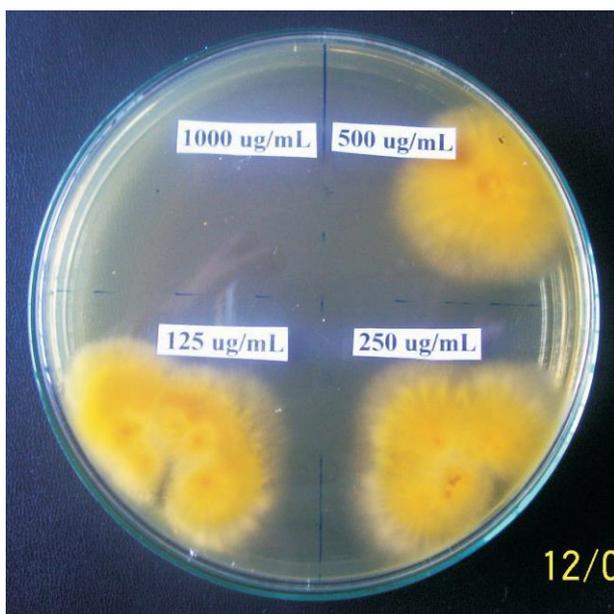
Tanto *Trichophyton mentagrophytes* como *T. rubrum* y *Microsporum canis*, presentaron por el método de difusión en agar mayor inhibición del crecimiento a las concentraciones de 300 y 400

ug/mL. En los dermatofitos, la concentración mínima inhibitoria corresponde a 500 ug/mL y el efecto fungicida de 1000 ug/mL.

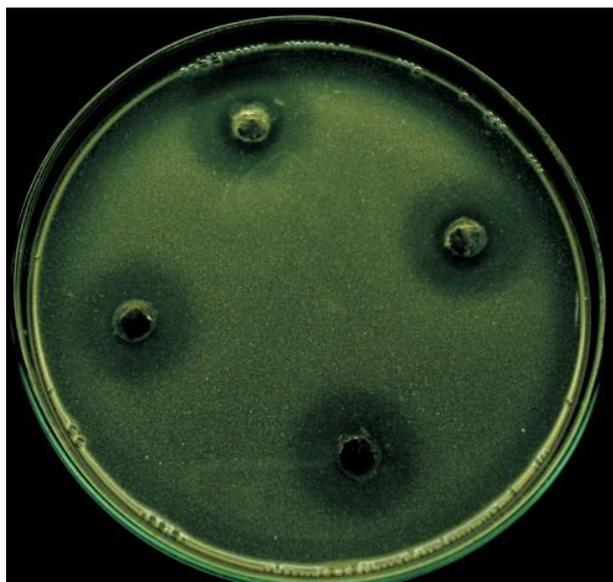
Por el método de difusión en agar, *C. albicans* obtuvo mayor inhibición entre 4000 y 5000 ug/mL y por el método de dilución en tubo una concentración mínima inhibitoria de 2500 ug/mL y un efecto fungicida de 5000 ug/mL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

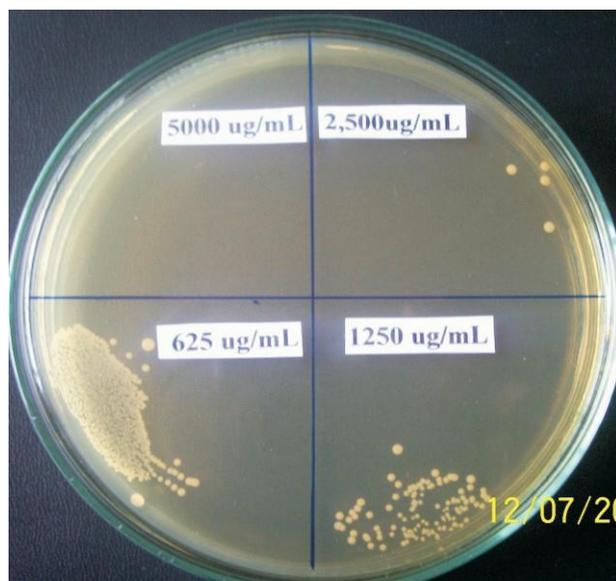
1. Saldaña L. Guía Moderna de Medicina Natural. Lima: ASDIMOR; 1992.
2. Sagrera F. Enciclopedia de medicina natural: Plantas medicinales. Programa educativo visual. Bogotá: Lerner Ltda; p.7-8.
3. William A, Thompson D. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Barcelona: Blume; 1981.
4. Bruneton J. Elementos de fotoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Acribia; 1991.
5. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Microbiología Médica. 15^{ava} ed. México: El manual moderno; 1993.
6. Troncoso L. Consumir ajos tiene efectos benéficos. Bibliomed; 2002. URL Disponible en: <http://salud.terra.com.ar/canales/salud/54/54164.html>.
7. Villar R, Alvaríño M, Flores R. Inhibition by ajoene of protein tyrosine phosphatase activity in human platelets. Biochim Biophys Acta 1997; 1337(2):233-40.
8. Yoshida S, Kasuga S, Hayashi N, Ushiroguchi T, Matsuura H, Nakagawa S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. Appl Environ Microbiol 1987; 53(3):615-7.
9. De Gonzales M, Mendoza M, Bastardo M, Apits-Castro R. Efectos del ajoene sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. Rev Iberoam Micol 1998; 15(4):227-81.
10. Arenas R. Atlas de dermatología, diagnóstico y tratamiento. 2^{da} ed. México: Interamericana; 1996.
11. Fitzpatrick T. Dermatología en medicina general. 4^a ed. México: Interamericana, 1997.
12. Lennete E, Balows A, Hausler W, Shadomy S. Manual de Microbiología Clínica. 4^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1987.
13. Pelczar M, Michael C, Chain C. Elementos de Microbiología. McGraw Hill; 1984.
14. Rippon J. Tratado de Micología. 3^{ra} edic. México: McGraw Hill Interamericana; 1990.
15. Sanitas. Hongos de la piel. 2000. URL Disponible en: <http://www.tuotromedico.com/temas/hongos.htm>
16. Du Vivier A. Atlas de dermatología clínica. 2^{da} ed. España: Mosby/Doyma/Libro; 1995.
17. Lynch M, Rafael S, Mellor L, Spare P, Inwood M. Métodos de laboratorio. 2^{da} ed. México: Interamericana; 1987.
18. Carpenter P. Microbiología. 4^a ed. México: Interamericana; 1989.
19. Gonzáles S, Saltigeral S. Guía Antimicrobianos, Antivirales, Antiparasitarios, Antimicóticos e Inmunomoduladores. 5^a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2001.
20. Rea V, Luyo P, Boncún L. Grupos funcionales del aceite de *Allium sativum* "ajo" y su efecto en la criptococosis inducida en *Mus musculus* var. *albinus*. Sciendo 1998;1(1):81-9.
21. Amésquita C. Efecto de cuatro concentraciones del extracto seco de *Allium sativum* sobre la viabilidad de *Candida albicans* en lesiones cutáneas en *Rattus rattus* var. *albinus* infectadas experimentalmente. [Tesis magistral]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 1999.
22. Madueño C, Madujano I. Acción in vitro de una solución de ajos *Allium sativum* contra los dermatofitos. 1999. URL Disponible en: www.concytec.gob.pe/biologos/microbiologia.htm.
23. Rotger R. Microbiología Sanitaria y Clínica. España: Síntesis; 1997.
24. Koneman E, Aleen S, Janda W, Scheneckenberger P, Winn y W. Diagnóstico microbiológico, texto y Atlas color. 5^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999.
25. Ratto M, Vega C, Garrido T. Control microbiológico de leche y productos lácteos. Métodos recomendados. Lima: Tipografía SESATOR; 1983.
26. Wilson W. Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades infecciosas. México: El Manual Moderno; 2002.
27. Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. España: Corpus; 2004.
28. Mostacero J, Mejía F, Araujo E. Botánica II. 2^{da} ed. Trujillo: UNT; 1995.



Anexo 1. Efecto fungicida de diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo" frente a dermatofitos: a) *Microsporum canis* y b) *Trichophyton mentagrophytes*.



Anexo 2. Inhibición del crecimiento de *Candida albicans* frente a diferentes concentraciones (ug/mL) de *Allium sativum* "ajo" a 2 días de incubación a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.



Anexo 3. a) Concentración Mínima Inhibitoria de *Allium sativum* "ajo" frente a *Candida albicans* en 7 días de incubación a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (Método de dilución en tubo), b) Efecto fungicida de diferentes concentraciones (ug/mL) de *A. sativum* "ajo" frente a *C. albicans*.

Recibido: 20 julio 2010 | **Aceptado:** 03 septiembre 2010