

# Efectos del ajoeno sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*

María Ibelise de González<sup>1</sup>, Mireya Mendoza<sup>1</sup>, María Bastardo de Albornoz<sup>1</sup> y Rafael Apitz-Castro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Micología, Instituto de Biomedicina, Caracas y <sup>2</sup>Laboratorio de Trombosis Experimental, IVIC, Caracas, Venezuela

## Resumen

Se evaluó la sensibilidad *in vitro* de un aislamiento de *Trichophyton rubrum* y un aislamiento de *Trichophyton mentagrophytes* frente al ajoeno, encontrándose que este compuesto logró inhibir el crecimiento de ambos aislados mostrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 60 µg/ml y una concentración mínima fungicida (CMF) de 75 µg/ml. En cuanto a su efecto *in vivo*, el ajoeno en crema al 0,4% aplicado una vez al día, por un lapso de 5 días en 38 pacientes (treinta dermatofitosis y ocho intertrigo candidiásico) logró un bajo porcentaje de curación (23,3% y 12,5%, respectivamente). Sin embargo, se obtuvo una excelente respuesta clínica en ocho pacientes con pitiriasis versicolor lográndose una curación en el 87,5 % de los casos.

## Palabras clave

Ajoeno, Tinea, Intertrigo candidiásico, Pitiriasis versicolor

## Activity of ajoene on dermatophytes, *Candida albicans* and *Malassezia furfur*

## Summary

The sensitivity *in vitro* of an isolate of *Trichophyton rubrum* and another of *Trichophyton mentagrophytes* to ajoene. This compound inhibited the growth of both isolates, showing an minimal inhibitory concentration (MIC) of 60 µg/ml and a minimal fungicidal concentration (MFC) of 75 µg/ml. *In vivo*, the ajoene cream at 0.4% used once a day and every five days in 38 patients (thirty dermatophytosis and eight *Candida* intertrigo cases) achieved a low percentage of cures (23.3% and 12.5%, respectively). However, an excellent clinic response was obtained in eight patients with pityriasis versicolor, with a cure in 87.5% of the cases.

## Key words

Ajoene, Tinea, Cutaneous candidiasis, Pitiriasis versicolor

En los últimos 20 años los avances en la industria farmacéutica han sido notorios en la obtención de productos antimicrobianos. Sin embargo, se continúa tratando de optimizar el espectro de acción de los medicamentos y de minimizar los efectos secundarios. En la actualidad, los costes de un tratamiento antimicótico son muy elevados, por lo que cualquier investigación encaminada a obtener sustancias menos costosas, pero igualmente efectivas que las ya existentes constituiría un gran aporte en éste campo. En tal sentido, en años recientes se ha logrado obtener una sustancia derivada del *Allium sativum* (ajo) a

la que se ha denominado ajoeno ([E,Z]-4,5,9-tritriadodeca-1,6,11-trieno-9-óxido), compuesto antiplaquetario [1]. Sin embargo, su acción parece abarcar un amplio espectro, ya que ha sido demostrado su efecto antiviral [2], antimicrobiano [3], antiprotozoario [4], antimutagénico [5] y modulador de las funciones dependientes de membrana en las células del sistema inmune [6].

La acción antimicótica del ajoeno ha sido estudiada *in vitro* sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger* [7], y puede inhibir el crecimiento de otras levaduras como *Sacharomyces cerevisiae* a concentraciones por debajo de 20 µg/ml [8]. Su efecto *in vitro* sobre otros hongos patógenos ha sido descrito [9,10].

La eficacia del ajoeno en los estudios *in vivo* ha sido reportada en el tratamiento de *Tinea pedis* con un corto período de aplicación [11].

En miras de ampliar los estudios en esta área, nos propusimos evaluar el efecto *in vitro* e *in vivo* sobre los dermatofitos de mayor frecuencia en nuestro medio, así como también evaluar su efecto *in vivo* sobre *C. albicans* y *Malassezia furfur*.

## Dirección para correspondencia:

Dra. Mireya Mendoza  
Laboratorio de Micología, Instituto de Biomedicina,  
San Nicolás a Providencia, San José, Caracas,  
Venezuela  
Tel.: +582 - 817095; Fax: +582 - 8611258;  
E-mail: mmendoz@telcel.net.ve

Aceptado para publicación el 13 de julio de 1998

## PACIENTES Y MÉTODOS

*Estudio de sensibilidad in vitro.* Se estudió la sensibilidad *in vitro* de un aislamiento de *Trichophyton rubrum* y de *Trichophyton mentagrophytes* frente al ajoeno, el cual fue suministrado en forma pura por el Dr. Rafael Apitz-Castro (IVIC). Se procedió a preparar inóculos de cada hongo en medio de Sabouraud líquido, estandarizados por espectrofotometría (absorbancia entre 0,6 y 0,7 a una longitud de onda de 450 nm).

Los aislamientos fueron sometidos a concentraciones ascendentes de ajoeno, desde 25 µg/ml hasta 200 µg/ml. El ketoconazol, compuesto azólico de actividad comprobada frente a dermatofitos tanto *in vitro* como *in vivo* fue sometido a iguales condiciones utilizándose como diluyente de ambos fármacos al dimetil sulfóxido (DMSO). Para los ensayos se prepararon muestras controles, tubos con inóculos del hongo en caldo glucosado de Sabouraud y con el diluyente (DMSO). Para la sensibilidad se ensayaron tubos con el inóculo del hongo, a los cuales se les adicionó los fármacos a las diferentes concentraciones ensayadas. Los tubos fueron mantenidos a temperatura ambiente a 100 rpm.

Cada 48 h se procedió a realizar una lectura visual y medición de la densidad óptica de cada tubo. A los 11 días se procedió a sembrar 0,1 ml de las preparaciones en agar glucosado de Sabouraud. Los parámetros de evaluación utilizados fueron el crecimiento visible del hongo, la modificación de los niveles de absorbancia y el crecimiento del hongo en subcultivos en agar glucosado de Sabouraud. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la menor concentración del ajoeno capaz de inhibir totalmente el crecimiento del hongo. Ésto expresa la actividad fungistática del ajoeno. La concentración mínima fungicida (CMF) se definió como la menor concentración del ajoeno capaz de matar al hongo e impedir su crecimiento en subcultivos. Esto expresa la actividad fungicida del ajoeno [12,13].

*Estudio de sensibilidad in vivo.* Se estudiaron 30 pacientes con dermatofitosis (*Tinea corporis*, *Tinea cruris* y *Tinea pedis*), ocho pacientes con intertrigo candidiásico y ocho pacientes con pitiriasis versicolor, que acudieron a la consulta de Micología del Instituto de Biomedicina, en Caracas. Los criterios de inclusión y de exclusión se describen en la tabla 1. Se les realizó una historia clínica y se tomó una muestra de la lesión para examen micológico directo con clorazol Black-E [14] y cultivo en agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol; en los casos de pitiriasis versicolor sólo se practicó examen directo mediante el método de la cinta adhesiva e investigación de fluorescencia mediante lámpara de Wood. Los pacientes se dividieron en dos grupos al azar mediante el método de

**Tabla 1.** Criterios de inclusión y de exclusión considerados en la selección de los pacientes para el tratamiento con ajoeno.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Mayores de 10 años <i>Tinea corporis</i> poco extensa <i>Tinea cruris</i> o <i>Tinea pedis</i> de cualquier tipo clínico.	Embarazo o lactancia Enfermedades inmunosupresoras
Pitiriasis versicolor con menos del 10% de la superficie corporal afectada.	Tineas de otras localizaciones.
Candidiasis en zona de pliegues	Uso de antimicótico sistémico en los últimos 14 días y/o tópico en los últimos 7 días.
Examen directo y cultivo micológico positivo.	Imposibilidad de acudir a controles
Aceptación del paciente	Pacientes poco confiables

alternación y siguiendo un procedimiento simple ciego, se les administró a la mitad de ellos el compuesto activo en forma de crema al 0,4% por cuatro semanas (grupo 1). La otra mitad recibió el vehículo de la preparación sin el compuesto activo durante dos semanas, si al cabo de ese tiempo no se producía negativización del examen micológico, los individuos de este grupo pasaban a ser tratados con ajoeno por cuatro semanas (grupo 2). Las preparaciones eran aplicadas al paciente una vez al día, realizándose controles clínicos y micológicos semanales y a los 15 días post-tratamiento. Los parámetros de evaluación clínica y micológica se registran en la tabla 2. Todos los pacientes fueron informados sobre la naturaleza del estudio e incluidos en el protocolo bajo su consentimiento absoluto.

**Tabla 2.** Parámetros considerados para la evaluación clínica y micológica de los pacientes tratados con ajoeno.

Parámetros de evaluación clínica	Parámetros de evaluación micológica
<b>Mejoría</b> Desaparición de 2 ó más signos/síntomas presentes al inicio del estudio.	<b>Eradicación</b> Ausencia del patógeno en el examen directo y/o cultivo.
<b>Curación</b> Desaparición de todos los signos y síntomas presentes al inicio del estudio.	<b>Persistencia</b> Presencia del patógeno en el examen directo y/o cultivo.
<b>Empeoramiento</b> Aparición o exacerbación de 2 ó más signos y síntomas.	<b>Recaída</b> Ausencia del patógeno basal al final del tratamiento, con reaparición del mismo patógeno en la siguiente visita en el examen directo y/o cultivo.
<b>Sin modificación</b> Hallazgos clínicos invariables	

## RESULTADOS

*Estudio in vitro.* De acuerdo a los valores diferenciales de DO obtenidos y la evaluación visual del crecimiento de los hongos estudiados pudimos apreciar que el ajoeno fue capaz de inhibir el crecimiento de ambos aislamientos de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

La CMI encontrada para ambos fue de 60 µg/ml; se observó también inhibición del crecimiento de los hongos en estudio en subcultivos, siendo la CMF para ambos aislamientos de 75 µg/ml. Al comparar el ajoeno con el ketoconazol en igualdad de condiciones y a iguales concentraciones, se encontró que el ketoconazol mostró CMI y CMF inferiores a la mínima concentración probada en este estudio (25 µg/ml).

*Estudio in vivo.* Se estudiaron 46 pacientes, 24 conformaron el grupo 1 (ajoeno) y 22 pacientes el grupo 2 (vehículo del fármaco). La relación entre sexo femenino y sexo masculino fue de 1,4 para el grupo 1 y 0,6 para el grupo 2, con edades promedio de 35,3 y 33,5 años respectivamente (rango = 11 a 60 años y 16 a 60 años, respectivamente), siendo la *Tinea cruris* la que ocupó el mayor porcentaje de los casos (Figura 1).

El intertrigo candidiásico se localizó principalmente en espacios de pies siendo otras localizaciones la región crural y el surco submamario (Figura 2). El tiempo de evolución de la enfermedad en la mayoría de los casos osciló entre uno y seis meses. Sólo se presentaron patologías asociadas en siete pacientes (hipertensión arterial, obesidad, epilepsia). Todos los pacientes estudiados pre-

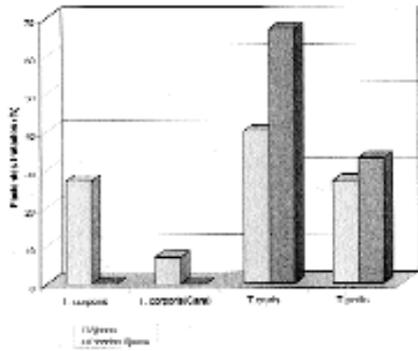


Figura 1. Localización del intertrigo candidiásico en pacientes tratados con ajoeno y placebo.

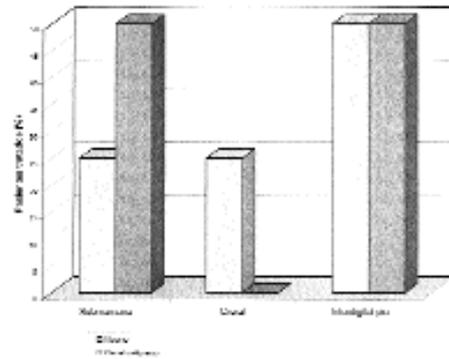


Figura 2. Clasificación clínica de dermatomycosis tratadas con ajoeno y placebo.

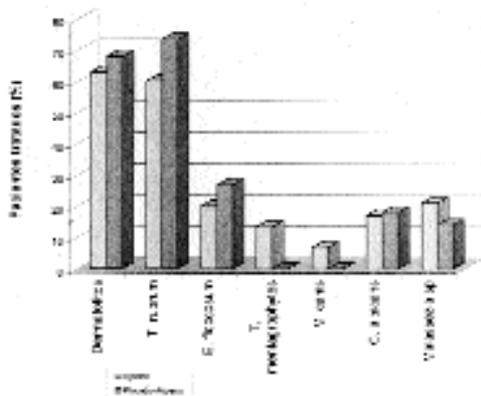


Figura 3. Agentes patógenos aislados en pacientes tratados con ajoeno y placebo.

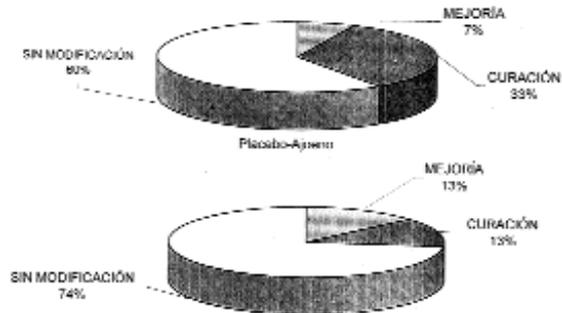


Figura 4. Evolución clínica de los pacientes con dermatomycosis tratados con ajoeno y placebo, al concluir el tratamiento.

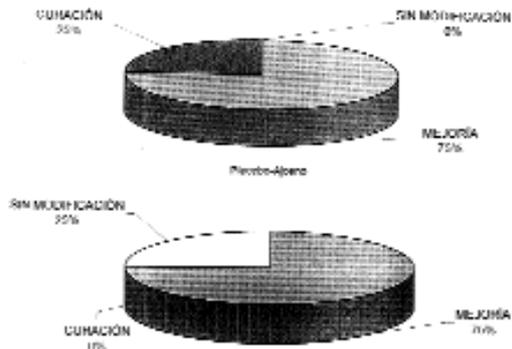


Figura 5. Evolución clínica de los pacientes con candidiasis tratados con ajoeno y placebo, al concluir el tratamiento.

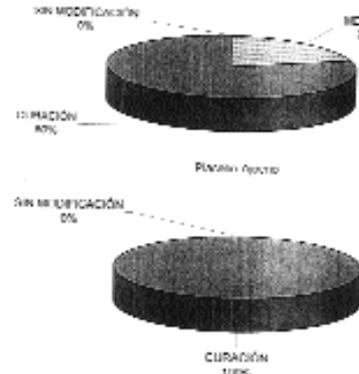


Figura 6. Evolución clínica de los pacientes con pityriasis versicolor tratados con ajoeno y placebo, al concluir el tratamiento.

sentaron elementos micóticos evidenciados en el examen micológico directo al inicio del estudio, en todos los casos se identificó el hongo productor de la patología mediante cultivo micológico, excepto en los casos de pityriasis versicolor donde solo se practicó examen directo.

*T. rubrum* fue el dermatofito más frecuentemente aislado en ambos grupos (60% y 73%, grupos 1 y 2, respectivamente) y *C. albicans* el agente encontrado en todos los casos de intertrigo estudiados (Figura 3).

Todos los pacientes tratados inicialmente con placebo permanecieron invariables desde el punto de vista clínico y micológico luego de dos semanas de tratamiento, por lo que pasaron a recibir ajoeno por cuatro semanas.

Al final del tratamiento en lo que a dermatomycosis se refiere, se obtuvo una pobre respuesta clínica en ambos grupos: el 60% de los casos del grupo 1 y el 73,3% de los pacientes del grupo 2 permanecieron invariables desde el punto de vista clínico a las cuatro semanas de tratamiento con un examen micológico directo positivo en el 33,3% y

86,7% de los casos (grupos 1 y 2) y un cultivo micológico positivo en el 6,7% y 13% de los casos, respectivamente. En la evaluación post-tratamiento se mantuvo la misma respuesta clínica, aumentando la positividad en el cultivo micológico: 60% (grupo 1) y 40% (grupo 2) (Figura 4).

En cuanto a las candidiasis, se obtuvo mejoría clínica en el 75% de los casos en ambos grupos a las cuatro semanas de tratamiento, con erradicación del patógeno en el 100% de los casos (Figura 5). A los quince días post-tratamiento, el 75% de los pacientes de ambos grupos, volvieron a las condiciones de los inicios de estudio, con un examen micológico directo y un cultivo positivo (grupo 1 = 75%, grupo 2 = 100%).

En los pacientes con pityriasis versicolor, se obtuvo una excelente respuesta clínica, con 80% de curación clínica en el grupo 1 y 100% en el grupo 2, erradicación del patógeno en el 80% de los casos de ambos grupos, tanto al final del tratamiento como a los quince días post-tratamiento (Figura 6).

Correlacionando los parámetros clínicos y micológicos se logró éxito terapéutico en el 23,3% de todos los casos de dermatofitosis, en el 12,5% de todos los casos de candidiasis y el 87,5% de todos los casos de pitiriasis versicolor. Los únicos efectos secundarios observados fueron ardor y eritema local de pocos minutos de duración que cedían espontáneamente (60% de los casos en el grupo 1 y 40% de los casos en el grupo 2) y olor desagradable en el 100% de los casos. Las diferencias entre porcentajes se analizaron mediante el método de Chi cuadrado y la probabilidad exacta de Fisher. Se usó el 5% como criterio de significancia estadística.

## DISCUSION

El *A. sativum* (ajo) ha sido utilizado por el ser humano desde tiempos inmemorables, atribuyéndosele propiedades medicinales. Basado en esto, diversos investigadores han estudiado el efecto *in vitro* de extractos de ajo sobre diferentes hongos patógenos (*Histoplasma capsulatum*, *C. albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* sp, *Torulopsis* sp, *Trichosporon* sp), encontrando efecto inhibitorio total o parcial en su crecimiento [15-17]. Se han realizado además estudios en animales con criptococcosis experimental, obteniéndose una reducción de la población micótica cerebral [18].

De los ensayos realizados *in vitro* para la medición de la actividad antimicótica se ha observado el efecto inhibitorio del crecimiento en *C. albicans* (CMI=20 µg/ml), *Aspergillus niger*, *Paracoccidioides brasiliensis*, (CMI=11,7 µg/ml), *Coccidioides immitis*, (CMI= 6,25 µg/ml), *Fonsecae pedrosoi* (CMI= 3,12 µg/ml) y *Cladosporium carrionii* (CMI= 6,25 µg/ml) [7,9,10]. Estudios con microscopía electrónica en *P. brasiliensis* han evidenciado su acción a nivel de la membrana celular del hongo [3]. En relación a esto su efecto induce una alteración de los fosfolípidos ácidos grasos de la membrana celular con una disminución de la fosfatidilcolina y un incremento de fosfatidiletanolamina, esta alteración de la membrana celular al parecer produce el deterioro de la estructura fúngica [19]. En cuanto al compuesto en sí, se ha descrito que los puentes disulfuro del ajoeno son necesarios para su actividad antimicrobial, ya que la cisteína reduce su efecto *in vitro* [8].

Con relación a nuestros resultados *in vitro*, se evidenció actividad fungistática y fungicida del ajoeno frente a los aislamientos de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* con una CMI de 60 µg/ml y una CMF de 75 µg/ml. En el

estudio *in vivo* se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con ajoeno y el grupo tratado con el vehículo del ajoeno durante los primeros quince días de tratamiento: no se produjo modificación clínica, ni micológica en ninguno de los pacientes tratados con el vehículo, expresando esto ausencia de efecto antifúngico del vehículo utilizado, por lo que los resultados finales no dependen de su acción (p= 0,0003 en dermatofitosis, p= 0,01 en candidiasis, p= 0,02 en pitiriasis versicolor). Al recibir ajoeno ambos grupos se comportaron de manera similar, resultando no significativas las diferencias encontradas (p= 0,19 en dermatofitosis, p= 0,5 en candidiasis, p= 0,02 en pitiriasis versicolor). Los resultados del estudio no dependieron de la localización y/o extensión del área comprometida, tiempo de evolución, agente aislado, ni tratamientos previos.

El éxito terapéutico obtenido en dermatofitosis e intertrigo candidiásico fue bajo (23,3 % y 12,5 % casos, respectivamente), concluyéndose en nuestro caso, que esta preparación no cubre las expectativas de un tratamiento antimicótico efectivo.

Nuestros resultados entran en controversia con los reportados por Ledezma y cols. [11] quienes encuentran una buena eficacia del ajoeno a la misma concentración empleada en este estudio (0,4%) en *Tinea pedis*, en un corto periodo de tratamiento. La disparidad de estos resultados parece estar fundamentada en la doble aplicación diaria del compuesto que fue aplicado en el estudio realizado por los autores antes mencionados, resultando en nuestro caso una sola aplicación poco eficiente en dermatofitosis e intertrigo candidiásico.

Con respecto a los pacientes con pitiriasis versicolor, el porcentaje de curación fue de 87,5 % por lo que se puede concluir que esta preparación es efectiva en el tratamiento de esta patología, aunque el número de pacientes estudiados fue muy reducido. Este fármaco abre nuevas posibilidades en el campo de la investigación clínica y farmacológica, ya que si se logra la concentración eficaz se podrá evaluar su acción combinada con los antimicóticos tradicionales en virtud de estudiar una posible acción sinérgica. Este compuesto puede ser un modelo para una línea farmacológica novedosa, constituyendo así una nueva alternativa eficiente y de bajo costo para el tratamiento de las micosis.

**Bibliografía**

1. Apitz-Castro R. Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thromb Res* 1983; 32:155-169.
2. Tatarintsev AV, Vrizheshch PV, Schegolev AA, *et al.* Ajoene antagonizes integrin-dependent processes in HIV-infected T-lymphoblasts. *AIDS* 1992; 6: 1215-1217.
3. San Blas G, Mariño L, San Blas F, Apitz-Castro R. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 133-134.
4. Urbina JA, Marchan E, Lazardi K, *et al.* Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2381-2387.
5. Ishikawa K, Naganawa R, Yoshida H, *et al.* Antimutagenic effects of ajoene, an organosulfur compound derived from garlic. *Biosci Biotech Biochem* 1996; 60: 2086-2088.
6. Romano EL, Montaña RF, Brito B, *et al.* Effects of ajoene on lymphocyte and macrophage membrane-dependent functions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997; 19: 15-36.
7. Yoshida S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 615-617.
8. Villar R, Alvario MT, Flores R. Inhibition by ajoene of protein tyrosine phosphatase activity in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1337: 233-240.
9. San Blas G. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1641-1644.
10. Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Actividad *in vitro* e *in vivo* del ajoeno sobre *Coccidioides immitis*. *Rev Iberoam Micol* 1994; 11: 99-104.
11. Ledezma E, De Sousa L, Jorquera A, *et al.* Efficacy of ajoene an organosulphur derived from garlic, in the short-term therapy of tinea pedis. *Mycoses* 1996; 39: 393-395
12. Odds FC. A survey of old and new antifungal test *In vitro*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Proceedings of the International Symposium on *in vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Tokio, 1986.
13. Aria T. Standarization of *in vitro* evaluation of antifungal agents. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Proceedings of the International Symposium on *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Tokio, 1986.
14. Pérez AR, Weiss E, Villanueva E. Método rápido y sencillo para visualización de hifas en el diagnóstico de las dermatomycosis. *Dermatol Venezol* 1986; 24: 27-34.
15. Appleton J, Tansey M. Inhibition of growth of zoopathogenic fungi by garlic extract. *Mycologia* 1975; 67: 882-885.
16. Tansey M, Appleton J. Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia* 1975; 67: 409-413.
17. Amer M. The effect of aqueous garlic extract on the growth of dermatophytes. *Int J Dermatol* 1980; 19: 285-287.
18. Louria D. Garlic (*Allium sativum*) in the treatment of experimental cryptococcosis. *J Med Vet Mycol* 1989; 27: 253-256.
19. San Blas G, Urbina JA, Marchan E, Contreras LM, Sorais F, San Blas F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology* 1997; 143: 1583-1586.



“Murallas al mar”  
Ana E. García  
Saint Malo, 1998