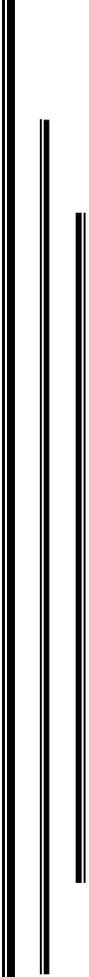




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.



ESTUDIO COMPARATIVO *In vitro* DE LA INHIBICIÓN BACTERIANA DEL  
AJO ELEFANTE (*Allium ampeloprasum complex*) Y AJO NEGRO (*Allium  
sativum*) SOBRE *Escherichia coli* ATCC® 25922”.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA

PRESENTA

**PMVZ. VANIA LIZET ALPIZAR MARTÍNEZ**

### ASESORES:

DRA. MARÍA ANTONIA MARIEZCURRENA BERASAIN

M. EN C. HÉCTOR DANIEL ARZATE SERRANO

M. EN C. LUIS FERNANDO VEGA CASTILLO



TOLUCA, MÉXICO, MARZO DE 2020

**“ESTUDIO COMPARATIVO *In vitro* DE LA INHIBICIÓN BACTERIANA DEL AJO ELEFANTE (*Allium ampeloprasum complex*) Y AJO NEGRO (*Allium sativum*) SOBRE *Escherichia coli* ATCC® 25922”**

## RESUMEN.

El ajo posee varias virtudes tanto culinarias como farmacéuticas, que despierta gran interés en la medicina natural sobre todo por su actividad antimicrobiana. El ajo es el que contiene mayor concentración de compuestos azufrados de toda la familia *Allium*, dichos compuestos le dan una potente actividad antimicrobiana, entre sus enzimas más importantes se encuentran la alinasa, peroxidasa y mirosinasa, aminoácidos como la arginina y glucósidos, que influyen en la actividad antimicrobiana, al igual que algunos minerales. Por lo que en este estudio se evaluó la inhibición antibacteriana del extracto acuoso de dos tipos de ajo: ajo negro (*Allium sativum*) y ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) sobre *Escherichia coli* ATCC® 25922. El estudio es de tipo experimental *in vitro*. Se realizó la siembra de la bacteria en cajas Petri y se colocaron discos de papel celulosa impregnada a diferentes concentraciones (500 mg/mL; 250 mg/mL; 125 mg/mL) del extracto de cada ajo para luego exponer la bacteria y a partir de ello se determinó su capacidad antibacteriana, midiendo los halos de inhibición. Los resultados evidenciaron que la concentración (500 mg/mL) de extracto acuoso de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) mostró mayores halos de inhibición ( $11.44 \pm 1.30$  mm), en comparación con las concentraciones de extracto acuoso de ajo negro que no mostraron halos de inhibición.

**Palabras clave:** Ajo, inhibición, bacteria, resistencia, *in vitro*.

|   |             |
|---|-------------|
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>iii</b>  |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>                                   | <b>vii</b>  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>                                   | <b>viii</b> |
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>                                     | <b>1</b>    |
| <b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>                          | <b>3</b>    |
| 2.1. HISTORIA Y ORIGEN DEL AJO.....                             | 3           |
| 2.1.1 Descripción de la planta de ajo.....                      | 4           |
| 2.2 PROPIEDADES MEDICINALES DEL AJO.....                        | 5           |
| 2.2.1 Composición química.....                                  | 6           |
| 2.3 DESCRIPCIÓN DE DOS VARIEDADES DE AJO.....                   | 11          |
| 2.3.1 Ajo negro ( <i>Allium sativum</i> ).....                  | 11          |
| 2.3.2. Ajo elefante ( <i>Allium ampeloprasum complex</i> )..... | 13          |
| 2.4 <i>Escherichia coli</i> .....                               | 14          |
| 2.4.1 Cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> .....          | 14          |
| 2.4.2 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922.....                  | 15          |
| 2.5   | RESISTENCIA |
| BACTERIANA.....   | 16          |
| 2.5.1 Mecanismos de acción patogénica.....                      | 16          |
| 2.5.2 El ajo como antimicrobiano natural.....                   | 17          |
| 2.6 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL AJO.....               | 18          |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>                                  | <b>18</b>   |
| <b>IV. HIPÓTESIS.....</b>                                       | <b>19</b>   |
| <b>V. OBJETIVOS.....</b>  | <b>21</b>   |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.1 General.....   | 21        |
| 5.2 Específicos.....   | 21        |
| <b>VI. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>  | <b>22</b> |
| 6.1. Material biológico.....   | 22        |
| 6.2 Material de laboratorio.....   | 22        |
| Equipo.....  | 22        |
| Equipo de protección personal.....   | 22        |
| Cristalería.....   | 22        |
| Medios de cultivo.....   | 22        |
| 6.3. Material para la preparación de sensidiscos.....  | 22        |
| 6.4 Material de oficina.....   | 23        |
| 6.5 Método.....  | 23        |
| 6.5.1 Preparación de los extractos acuosos de ajo negro ( <i>Allium sativum</i> ) y ajo elefante ( <i>Allium ampeloprasum complex</i> )..... | 23        |
| 6.5.2. Elaboración de los discos impregnados en extractos de ajo.....  | 24        |
| 6.4.3. Prueba de sensibilidad antimicrobiana.....  | 24        |
| 6.4.4 Pruebas de inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC® 25922.....  | 24        |
| <b>VII. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>VIII. LÍMITE DE ESPACIO.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>IX. LÍMITE DE TIEMPO.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>X. RESULTADOS.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>XI. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>XII. CONCLUSIÓN.....</b>  | <b>37</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>XIII. SUGERENCIAS.....</b>          | <b>38</b> |
| <b>XIV. LITERATURA CONSULTADA.....</b> | <b>39</b> |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Sensibilidad de diversas especies bacterianas a alicina. ....  | 6  |
| <b>Cuadro 2.</b> Composición química del ajo ( <i>Allium sativum</i> ) por cada 100 gramos.....   | 6  |
| <b>Cuadro 3.</b> Compuestos azufrados del ajo. ....   | 7  |
| <b>Cuadro 4.</b> Compuestos no azufrados del ajo. ....  | 8  |
| <b>Cuadro 5.</b> Metabolismo de algunos componentes del ajo.....  | 8  |
| <b>Cuadro 6.</b> Preparados de ajo más utilizados y sus características. ....   | 12 |
| <b>Cuadro 7.</b> Comparación de halos de sensibilidad en mm. ....   | 25 |
| <b>Cuadro 8.</b> Promedio de los halos de inhibición de los antibióticos y los extractos acuosos. ....  | 31 |
| <b>Cuadro 9.</b> Clasificación del halo de inhibición de los extractos acuosos sobre el crecimiento de la <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 en comparación con el Sulfametoxazol/ Trimetroprim.....     | 32 |
| <b>Cuadro 10.</b> Clasificación del halo de inhibición de los extractos acuosos sobre el crecimiento de la <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 en comparación con la Nitrofurantoina *Multibac I.D®. .... | 32 |

## ÍNDICE DE FIGURAS.

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Panta de ajo completa. ....  | 4  |
| <b>Figura 2.</b> Estructura química de aliina. ....   | 8  |
| <b>Figura 3.</b> Estructura química de aliicina. ....   | 10 |
| <b>Figura 4.</b> Concentración de extracto acuoso de ajo en los discos de papel Whatman®. ....  | 24 |
| <b>Figura 5.</b> Secuencia de la metodología usada para determinar la inhibición de crecimiento de la <i>E. coli</i> ATCC® 25922. ....  | 26 |
| <b>Figura 6.</b> Patrón de distribución de los discos impregnados de extracto acuoso de ajo negro, ajo elefante y controles (antibióticos) en el medio de cultivo. ....   | 28 |
| <b>Figura 7.</b> Cultivo de la <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>in vitro</i> con sensidiscos de extractos acuosos de ajo elefante, negro y antibióticos en donde se observa el halo de inhibición de Nitrofurantoina y Sulfametoxazol/Trimetoprim. .... | 33 |
| <b>Figura 8.</b> Cultivo de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 con sensidiscos de extractos acuosos de ajo en donde se observa inhibición del crecimiento de extracto acuoso de ajo elefante (EAAE). ....  | 34 |

## I. INTRODUCCIÓN.

Actualmente, alrededor del 80% de los habitantes del planeta cubren principalmente con medicamentos tradicionales sus necesidades de atención primaria de salud (Akerele, 1993). En América Latina, con escasas excepciones, y dando espaldas a la realidad, seguimos perdidos en un mar de riquezas verdes. Esto es debido a una falta general de información sobre los beneficios que las plantas medicinales nos brindan, no solamente para la salud, sino también para la economía (Cabieses y Rivas, 1995).

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un problema de salud mundial, las investigaciones relacionadas con este problema emergente son indispensables para reconocer y desarrollar programas para su vigilancia y control. A través del tiempo se ha ido detectando resistencia a diferentes antimicrobianos, en los años 60's fue resistencia a la penicilina y a partir de los años 70's se ha observado multiresistencia a las ampicilinas. El uso de fármacos en la producción animal ha sido una práctica regulada que carece de control y supervisión, como consecuencia favorece el uso inadecuado de medicamentos causando el desarrollo de cepas resistentes a los antimicrobianos, tanto de bacterias patógenas como no patógenas (Rodríguez *et al.*, 2014).

Los efectos generados por el uso inadecuado de antimicrobianos, son el fenómeno de multiresistencia antimicrobiana, toxicidad aguda, carcinogenicidad, efectos reproductivos y reacciones alérgicas en individuos susceptibles, esto ha creado preocupación en los organismos regulatorios, y ha obligado a tener un control más riguroso en los fármacos empleados, en las dosis y el tiempo de aplicación (Cota *et al.*, 2014).

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, esta bacteria coloniza el intestino de los seres vivos pocas horas después del nacimiento, se le considera un microorganismo de microbiota nativa, pero

hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

El uso de las plantas medicinales como remedio para aliviar la enfermedad se remonta a los orígenes de la humanidad. Este conocimiento se ha ido transmitiendo de generación en generación conservando algunas de las connotaciones mágicas que eran atribuidas a las propiedades curativas de las plantas. A principios del siglo XX los remedios vegetales ocupaban un lugar predominante en todas las farmacopeas del mundo. A partir de los años 60's, la necesidad de encontrar nuevos fármacos con menos efectos secundarios renovó el interés por dotar de base científica la utilización de las plantas en terapéutica, y se dedicaron esfuerzos en estudiar los efectos de las plantas utilizadas en diferentes culturas y en aislar sus componentes (Pla, 2003).

El ajo (*Allium sativum*) por sus propiedades medicinales es el más estudiado sobre todo en el ámbito farmacéutico. Sus particularidades van desde la aplicación culinaria hasta sus estudiados efectos en la medicina natural como: su acción antioxidante, hipolipemiante, hipotensora, antitrombótica, antimicrobiana, antifúngica y antiparasitaria. Posee componentes sulfurados donde el principal de ellos es el sulfóxido de alilo alicina cuya característica antibiótica es eficaz para la inhibición del desarrollo de bacterias patógenas, sobre todo en agentes como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Chalar *et al.*, 2014).

Algunos extractos de ajo son capaces de prevenir el crecimiento de algunas bacterias, hongos e incluso de tener propiedades antivirales. Se ha identificado la alicina del ajo como el agente activo de este resultado. El mecanismo por el cual el extracto de ajo actúa es alterando el perfil lipídico de las membranas celulares (Ganado, 2001).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1. HISTORIA Y ORIGEN DEL AJO.

El género *Allium* contiene más de 300 especies de plantas; entre ellas se encuentra el *Allium sativum*, un bulbo perteneciente a la familia de las liliáceas, cuyas características olorosas permitieron su denominación con el uso del término *allium*, que significa oloroso en latín, y donde provienen tanto el vocablo español ajo, como el francés *ail*. La denominación inglesa *garlic* se origina del escandinavo antiguo, mediante la combinación de las palabras *gar* y *leac* que significan lanza y hierba, en una clara alusión a una planta con hojas en forma de lanza, en alemán es *knoblauch*, en árabe *tum*, en indio *lashunal* y en chino *da suan*. Desde épocas remotas esta planta ha coexistido como una parte fundamental de la cultura humana, siendo utilizado por diversas civilizaciones en la elaboración de alimentos, en múltiples preparaciones medicinales y en variados brebajes y ritos mágicos religiosos (Ledezma y Apitz, 2006).

A finales del siglo XV los españoles introdujeron el ajo en el continente americano. El ajo es una planta de origen asiático aclimatada en Europa desde hace unos 4 mil años y actualmente diseminada en todas las regiones climáticas del mundo; aun en países de zonas templadas. Esta planta es mencionada en el papiro de Ebers y en “De Materia Médica”, libros muy antiguos y en donde ya se menciona como un gran remedio, además se utiliza como alimento y sazónador de comidas. De la planta de ajo se utilizan: semillas, bulbo y hojas. Desde la antigüedad algunas personas han creído que poner un collar de ajo tiene un efecto de repelencia para malos espíritus (Ramos *et al.*, 2012).

La planta de ajo (*Allium sativum*) es originaria del sur de Europa, de África mediterránea o de Asia central, se utilizan los bulbos, tanto para su uso culinario como por sus propiedades terapéuticas. Fue conocida por las culturas mediterráneas y en la Edad Media la utilizaron para combatir la peste. Más tarde se conoció en el continente americano y en la actualidad se cultivan diversas variedades de ajo en numerosos países

del mundo como España, Italia, Egipto, Argentina, México, Estados Unidos, China e India (López, 2007).

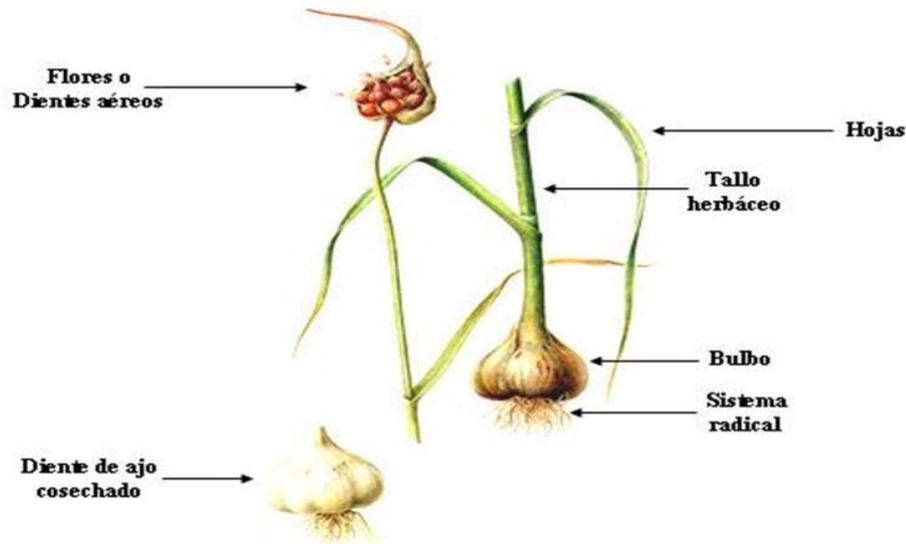
El ajo es una planta que ya se conocía 300 años a.C. su cultivo se remonta a los tiempos de Babilonia y muchas han sido las personalidades que recomiendan su uso. Independientemente de otras acciones terapéuticas, a la par que culinarias, se le atribuyen propiedades antimicrobianas. Los primeros pasos para identificar los constituyentes activos del ajo datan de la mitad del siglo pasado, cuando Cavallito y Bailey en 1944; citados por Domingo *et al.*, (2003) descubrieron la alicina (alil sulfato), una sustancia que se formaba por la acción de la enzima aliinasa, presente en la cubierta, cuando actuaba sobre la aliina que forma parte de los dientes de ajo al triturarlos.

### **2.1.1 Descripción de la planta de ajo.**

El ajo es una planta herbácea, perene, acaule con bulbos secundarios de color blanco o cremoso, hinchados, ovals de ápice agudo, llamados dientes de ajo, muy olorosos, reunidos sobre un tallo discoide, recubiertos por escamas membranosas, translúcidas, blanco amarillosas, que forman la llamada cabeza de ajo, cada una con 8 a 14 dientes, que podemos observar en la figura 1. Hojas de color verde azulado o verde rojizo, planas con un canal central, ápice agudo, hasta de 50 cm de longitud y 3 cm de ancho, tiene flores rosadas o blanquecinas agrupadas en pequeñas umbelas densas, esféricas, localizadas entre los bulbos (Escaff, 1991).

Es una planta de bulbo que requiere ciertas condiciones relacionadas con las horas luz y temperatura ambiente por lo cual sus mayores zonas de siembra están ubicadas sobre los 1.200 m.s.n.m, asegurando una temperatura fresca durante ciertas épocas del año propicias para su cultivo (Ramos G., 1991).

### **Figura 1. Planta de ajo completa.**



Fuente: (Ramos, 1991).

## 2.2 PROPIEDADES MEDICINALES DEL AJO.

A las propiedades culinarias y alimenticias del ajo se le anexan sus propiedades medicinales, estas se conocen desde la antigüedad. Los chinos y egipcios ya lo utilizaban, alimentaban con ajos a los esclavos que construían las pirámides porque creían que el ajo les aportaba energía, también se utilizaba en el proceso de momificación y como moneda. Se recomienda contra las infecciones, tumores, parásitos gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, dolores de cabeza y mordeduras (Ganado, 2001).

La planta del ajo es considerada por la población como la más extraordinaria de todas las plantas medicinales, es depurativo, desinfectante, tonificante, vermífuga, anticatarral, antirreumática, combate la congestión, antihipertensiva, en infecciones internas y externas, para diabetes, tos, antiséptico respiratorio en bronquitis y sinusitis, estreñimiento, palpitaciones del corazón, dolores de cabeza, hemorroides, escorbuto y antifúngica, fortalece el sistema inmune, es antiinflamatorio, anticoagulante, vasodilatador y antibiótico natural. Sus propiedades antimicrobianas se confrontaron

frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y otros patógenos que se enlistan en el cuadro 1 (Domingo *et al.*, 2003; Fonnegra y Jiménez, 2007; Ramos *et al.*, 2012).

**Cuadro 1.** Sensibilidad de diversas especies bacterianas a alicina.

| Cepa bacteriana                  | Concentración de alicina (*LD <sub>50</sub> µg/mL) |
|----------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i>          | 15   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>     | 12   |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>    | 3  |
| <i>Streptococcus hemolyticus</i> | >100   |
| <i>Proteus mirabilis</i>         | 15   |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i>     | 15   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>   | 15   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>     | 8  |
| <i>Enterococcus faecium</i>      | >100   |

Fuente: (Mirelman y Serge, 1999). \*LD (dosis letal 50).

### 2.2.1 Composición química.

En la composición química del ajo fresco existen más de 100 compuestos biológicamente activos (Florencio, 2011). Están presentes agua, carbohidratos, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas E, B1, B2 y C que aparecen en el cuadro 2, así como los compuestos azufrados que se mencionan en el cuadro 3 (García y Sánchez, 2000).

**Cuadro 2.** Composición química del ajo (*Allium sativum*) por cada 100 gramos.

| Componentes | Medida | Promedio | Componentes | Medida | Promedio |
|-------------|--------|----------|-------------|--------|----------|
| Agua        | g      | 6.05     | Yodo        | µg     | 440      |
| Proteínas   | g      | 0.12     | Boro        | µg     | 5.69     |

|               |    |       |                  |    |      |
|---------------|----|-------|------------------|----|------|
| Lípidos       | g  | 28.41 | Vitamina E       | µg | 100  |
| Carbohidratos | g  | 1.42  | Alfa- tocoferol  | µg | 90   |
| Calcio        | µg | 460   | Vitamina B1      | µg | 200  |
| Magnesio      | mg | 1.40  | Vitamina B2      | µg | 80   |
| Hierro        | µg | 149   | Nicotinamida     | µg | 600  |
| Cobre         | µg | 575   | Vitamina C       | mg | 14   |
| Zinc          | µg | 10    | Ácido salicílico | µg | 100  |
| Molibdeno     | µg | 1.80  | Ácido laurico    | mg | 24   |
| Aluminio      | mg | 134   | Ácido esteárico  | mg | 3    |
| Fosforo       | mg | 30    | Ácido oleico     | mg | 62   |
| Cloro         | µg | 2.70  | Ácido linoleico  | mg | 5.50 |

Fuente: (García y Sánchez, 2000).

**Cuadro 3.** Compuestos azufrados del ajo.

| Compuesto                   | Actividad biológica  |
|-----------------------------|--|
| Aliina                      | Hipotensora, hipoglucemiante   |
| Ajoeno                      | Previene la formación de coágulos, ayuda a disolverlos. Antiinflamatorio, vasodilatador, hipotensor, antibiótico.            |
| Alicina y Tiosulfatos       | Antibiótico, antifúngico, antiviral  |
| Alil mercaptano             | Hipocolesterolemia, previene la aterosclerosis, antitumoral, antidiabética, hipotensora.                                     |
| Sulfuro de dialilo y afines | Hipocolesterolemia, aumenta la producción de enzimas, desintoxicantes, anticancerígeno. Previene los daños químicos del ADN. |
| S- alil- cisteína           | Hipocolesterolemia, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer.   |

Fuente: (Souci *et al.*, 1994).

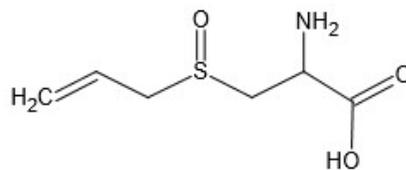
De todo el género de *Allium*, el ajo es el que contiene la mayor concentración de compuestos azufrados, lo que le da una actividad antimicrobiana muy potente, los principales compuestos son la aliina, alicina, ajoeno, trisulfuro de dialilo, salicisteina, vinilditiinas, disulfuro de alilpropilo, S-alil-mercaptano cisteína y otros. Entre las enzimas

importantes en la actividad antimicrobiana se encuentran la alinasa, peroxidasa y mirosinasa. Los glucósidos y aminoácidos, en especial la arginina, también influyen de manera importante en la actividad antimicrobiana, al igual que el selenio, germanio, telurio y trazas de otros minerales (Bhandari, 2012).

Tiene un contenido de agua alrededor del 65%, con la mayor parte del peso seco que comprende fructooligosacáridos, seguido de compuestos de azufre, proteína, fibra y aminoácidos libres (Rahman y Lowe, 2006).

Los bulbos pulverizados y secos contienen 1% de aliina como sulfóxido principal. En presencia de la enzima alinasa, la aliina que se muestra en la figura 2, se convierte en alicina. La alicina es precursor de varios productos de transformación, incluidos ajoenos, compuestos de vinilditina, mencionados en el cuadro 4, oligosulfuros y polisulfuros. El ajo también contiene compuestos no azufrados que se encuentran en el cuadro 5, como saponinas, adenosina, fractanos y quercetina, se considera que este alimento puede ser de gran ayuda para reducir los riesgos de contraer cáncer (Fonnegra y Jiménez, 2007).

**Figura 2.** Estructura química de aliina.



Fuente: (Stoll y Seebeck., 1952).

**Cuadro 4.** Metabolismo de algunos componentes del ajo.

| Compuesto | Metabolismo |
|-----------|-------------|
|-----------|-------------|

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Ajoeno                            | Reacciona con la cisteína para formar ajocisteína y S-allyl-mercaptocisteína (SAMC). Al ponerse en contacto con el aminoácido cisteína, el methyl-allyl-trisulfuro también se metaboliza en SAMC.  |
| Aliina                            | En gran medida es absorbida en el intestino, y cerca de un 60% es biodisponible. Parte se transforma en sulfuro de dialilo y luego en SAMC o sulfatos. La absorción es muy rápida. Desaparece de la circulación en 6 horas.  |
| Sustancias que contienen cisteína | Estas reaccionan con la alicina y otros tiosulfatos para formar SAMC. La alicina abandona rápidamente el torrente circulatorio, siendo convertida en sulfatos en el hígado. No se detecta alicina en sangre u orina después de ingerir ajo.  |
| Sulfuro de dialilo                | Se convierte en parte en sulfato y en parte se excreta por orina.  |
| S-alil-mercaptocisteína (SAMC)    | Se transforma en la sangre en alilmercaptano.  |
| S-alil- cisteína                  | Una vez absorbida alcanza un máximo en sangre a los 30 minutos, encontrándose en todos los órganos excepto en los riñones, después de 6 horas desaparece completamente de sangre. En el hígado se transforma parcialmente en N-acetil-S- alicilcisteína que luego es filtrada por los riñones. |
| Compuestos de vinilditina         | Lentamente absorbidos durante 2 horas. Algunos de ellos se acumulan en los adipositos, mientras que otros se excretan rápidamente, por lo que no suelen detectarse en plasma.  |

Fuente: (Ramos *et al.*, 2012).

**Cuadro 5.** Compuestos no azufrados del ajo.

| Compuestos | Actividad biológica   |
|------------|---|
| Adenosina  | Hipotensora, vasodilatadora, miorelajante. Estimula la síntesis de hormonas esteroidicas. |

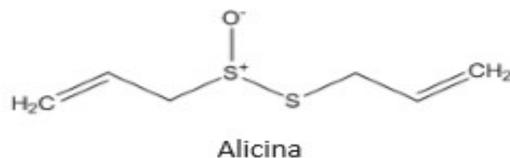
|  |   |
|--|---|
| Fractanos<br>Fracción proteica F-4                   | Efectos cardioprotectores. Estimula el sistema inmune por medio de macrófagos y células esplénicas. |
| Quercetina   | Estabiliza los mastocitos. Ejerce por tanto efectos beneficiosos en el asma y la alergia.           |
| Saponinas (Gitonina F.<br>Eurobosico B)<br>Escordina | Hipotensoras. La gitonina F es antivírica, el eurobosico B es antifúngico.                          |
| Selenio<br>Ácidos fenólicos                          | Antioxidantes, antiinflamatorios, antivíricos, antibacterianos.                                     |

Fuente: (Drago *et al.*, 2006).

La aliina o S- alilcisteina sufóxido es el compuesto sulfurado más abundante en el ajo fresco, es inodora y estable. El ajo contiene 7-14 mg de aliina por gramo de peso fresco, y de 18-42 mg/g de peso seco. Es estable en soluciones acuosas y a temperaturas elevadas (Stoll y Seebeck., 1952).

Cuando las células del ajo se rompen, la aliina reacciona, y en aproximadamente 10 segundos toda la aliina expuesta se convierte en alicina que se muestra en la figura 3, que emiten el aroma característico del ajo fresco (Lawson *et al.*, 2005).

**Figura 3.** Estructura química de alicina.



Fuente: (Ramos *et al.*, 2012).

## 2.3 DESCRIPCION DE DOS VARIEDADES DE AJO.

### 2.3.1 Ajo negro (*Allium sativum*).

Familia: *Liliaceae* (*Liliaceae*).

Género: *Allium*.

Especie: *sativum*.

El ajo negro parece tener su origen en Corea, se produce al envejecer ajo entero a alta temperatura (70°C) y alta humedad (90%) (Jang *et al.*, 2008). Durante este proceso, los compuestos inestables de ajo fresco, incluida la aliina, se convierten en compuestos estables que incluyen S-alilcisteína (SAC), el compuesto soluble en agua con potente efecto antioxidante (Corzo *et al.*, 2007).

El ajo negro se transforma tradicionalmente en los países asiáticos y en los últimos años se ha introducido en países de occidente. Se caracteriza por su mejor aroma y sabor que el ajo fresco (*Allium sativum*), además de tener mayor capacidad antioxidante, convirtiéndose en un producto estrella, debido al alto precio que alcanza en los mercados (Medina, 2017). El ajo negro es un producto elaborado a partir del ajo fresco (*Allium sativum*) mediante un proceso industrial a temperatura y humedad controlada durante un período prolongado de tiempo. Las temperaturas varían de 40 a 90 °C, la humedad relativa 80 a 95% y los tiempos oscilan entre 10 y 40 días, dependiendo de la intensidad del tratamiento (Lee *et al.*, 2011).

Estudios recientes describen los cambios producidos en la composición química del ajo fresco al transformarse en ajo negro (Choi *et al.* 2014). En el calentamiento se producen varios cambios en el sabor, olor y contenidos en nutrientes. Así, el tratamiento térmico permite las reacciones del pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard, la caramelización y oxidación química de los fenoles. Así, en el ajo negro aparecen un elevado número de compuestos bioactivos, como son los fenoles, flavonoides, piruvato, tiosulfato, SAC, y S-alil-mercaptano-cisteina (SAMC) (Shin *et al.*, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, el compuesto precursor del olor y sabor del ajo fresco es la S- Alil-cisteina-sulfóxido (Aliina); cuando el ajo es cortado o macerado, indicado en el cuadro 6 la enzima alinasa actúa sobre este compuesto generando alicina, ácido pirúvico y amoniaco. Sin embargo, en el ajo negro la alicina se transforma en otros compuestos por lo que desaparece el olor y sabor pungente. Este hecho se debe a cambios en la alicina compuesta, que es responsable del olor acre, en compuestos antioxidantes solubles en agua, tales como SAC, tetrahidro-β carbolinas, alcaloides biológicamente activos y compuestos similares a flavonoides (Rahman, 2007). Los derivados tetrahidro-β-carbolina se forman por condensación entre triptófano y aldehído, similar a la producción de ácido pirúvico por la vía allinallin o el proceso de reacción de Maillard (Banerjee *et al.*, 2003).

**Cuadro 4.** Preparados de ajo más utilizados y sus características.

|  |  |
|--|--|
| Ajo deshidratado, pulverizado y encapsulado. | Su manipulación origina perdidas casi totales de aliina.   |
| Aceite esencial de ajo.                      | Se obtiene por destilación y carece de alicina y de compuestos hidrosolubles en medio oleoso (disulfuro de dialilo y Trisulfuro de dialilo).   |
| Macerado de ajo.                             | Es el producto obtenido por maceración de ajo.<br>Contiene aliina y alicina<br>La alicina se descompone instantáneamente en numerosos compuestos organosulfurados (sulfuros, ajoenos y ditiinas).  |
| Extracto envejecido de ajo.                  | Es el extracto obtenido por maceración de láminas de bulbo de ajo en solución hidroalcohólica (15 a 20%) durante 20 meses o más, a temperatura ambiente (posteriormente se filtra y concentra a baja temperatura y presión reducida).<br>Este extracto es rico en derivados azufrados solubles en agua, especialmente S-alil-mercaptano-cisteína.<br>También contiene alil-sulfuros liposolubles estables, flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas y otros nutrientes esenciales<br>Carece de compuestos liposolubles inestables (alicina). |

Fuente: (López, 2007).

### **2.3.2. Ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*).**

Familia: *Alliaceae*.

Género: *Allium*.

Especie: *ampeloprasum*.

El ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*), llamado también ajo gigante, ajo ruso, bladino o ajo chilote. Se trata de una hortaliza comercializada por la vía gourmet, consumida en fresco y apreciada por su sabor suave y el gran tamaño de sus dientes. Esta hortaliza forma un bulbo compuesto por no más de 6 dientes. Los dientes pequeños y las plantaciones tardías producen por lo general bulbos simples llamados unibulbos, o vulgarmente llamados ajos machos o cebollones (Lanzavechia, 2007).

Esa especie y sus variedades botánicas son originarias de la zona comprendida entre el oeste de Portugal y el este de Irán. El *Allium ampeloprasum* se utiliza generalmente en huertos caseros, ocasionalmente en cultivos de poca extensión. Las características quizás más reconocidas del género *Allium* son su olor y sabor típicos, dados por compuestos azufrados que son liberados al dañarse o destruirse sus células. Tales compuestos han generado un renovado interés por los investigadores, ya que presentan beneficios cada vez más reconocidos para la salud humana (Celis, 1999).

Las características botánicas de ajo chilote son muy parecidas a las de ajo común, excepto por ser un hexaploide (48 cromosomas), la planta presenta una apariencia general mucho más robusta, forma un tallo floral grueso de 1 a 2 metros de longitud, hojas anchas y gruesas, un bulbo muy grande, con aproximadamente 6 bulbillos de gran tamaño y otros pequeños con flores blancas y purpuras, estos bulbos tienen sabor y olor menos intenso que el ajo verdadero (CORFO, 1987).

Entre los compuestos azufrados encontrados en los distintos tipos de *Allium*, el más importante y que se encuentra en mayor proporción es la aliina. Es un aminoácido azufrado, insaturado, de fórmula empírica  $C_6H_{11}NO_3S$  y precursor de la alicina, la cual

es una molécula dienoica con un grupo sulfóxido, de fórmula empírica C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>S<sub>2</sub>O. Se forma al romperse la estructura del bulbo del ajo, cuando la aliinasa liberada produce la reorganización de dos moléculas de aliina; posee sólo un débil olor a ajo y tiene propiedades antienzimáticas, antitumorales y bactericidas (Adrián y Frangne, 1990).

## **2.4 *Escherichia coli*.**

Es una bacteria, bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, género *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino de los mamíferos pocas horas después del nacimiento, se le considera un microorganismo de microbiota nativa, algunas cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, pero otras pueden causar graves intoxicaciones alimentarias. Algunas de estas bacterias son productoras de la toxina Shiga, puede causar graves enfermedades a través de los alimentos. El origen principal de los brotes de *E. coli* productora de toxina Shiga son los productos de carne cruda o poco cocinada, la leche fresca no procesada y los vegetales contaminados por materia fecal, *E. coli* O157: H7 es el serotipo de *E. coli* productora de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos, *E. coli* productora de toxina Shiga por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*, puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta pH de 4.4 y en alimentos con una actividad de agua mínima de 0.95 (OMS, 2018 a).

### **2.4.1 Cepas patógenas de *Escherichia coli*.**

*Escherichia coli* está presente en grandes concentraciones en la microbiota intestinal normal de las personas y los animales donde, por lo general, es inocua. Sin embargo, en

otras partes del cuerpo *E. coli* puede causar enfermedades graves, como infecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis. Un número reducido de cepas enteropatógenas pueden causar diarrea aguda. Se han determinado varios tipos de *E. coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD), (Nataro y Kaper, 1998).

Theodore Escherich, bacteriólogo alemán, descubridor de *Escherichia coli*, no imaginaría que este microorganismo se convertiría en la primera causa de infección nosocomial y la segunda comunitaria, pero mucho menos de pensar que con el pasar del tiempo, un patógeno tan sensible frente a múltiples antimicrobianos tendría una relevancia importante por sus niveles de multirresistencia antimicrobiana. El uso inadecuado de antimicrobianos en los diferentes cuadros clínicos ha provocado, que *E. coli* haya desarrollado una serie de mecanismos de resistencia antimicrobiana que hoy preocupan al médico de asistencia, tanto en las unidades cerradas, como en la comunidad. En un momento en que las enterobacterias se están robando el protagonismo de la multirresistencia hospitalaria, la *E. coli* junto con la *Klebsiella pneumoniae* son sus principales representantes (Morejón, 2013; OMS. 2018 b).

#### **2.4.2 *Escherichia coli* ATCC® 25922.**

*Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa bacilo corto, es mejor conocida por su capacidad de causar brotes transmitidos por los alimentos. La cepa ATCC® 25922 es de control de calidad utilizada particularmente en ensayos de sensibilidad a antígenos, se aisló originalmente a partir de una muestra clínica humana recogida en Seattle, WA (1946). Es del serotipo O6 y biotipo 1. Un ensamblaje previo del genoma está a disposición del público (Minogue *et al.*, 2014).

## **2.5 RESISTENCIA BACTERIANA.**

En el mes de marzo del 2006 la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosa (IDSA) publicó una lista de impacto para enfatizar sobre la importancia de seis bacterias de alto riesgo no sólo por su patogenicidad sino por ser resistentes a la mayoría de antimicrobianos que disponemos. Estos microorganismos multirresistentes son el *Staphylococcus áureus* resistente a oxacilina, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium* y *Pseudomonas aeruginosa*. Igualmente, en enero del 2008, esta sociedad llamó la atención a la comunidad médica sobre la epidemia de infecciones resistentes a antimicrobianos en numerosos patógenos como los señalados y la gravedad de los mismos (Paz *et al.*, 2008).

### **2.5.1 Mecanismos de acción patogénica.**

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antimicrobianos. El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). Por último, algunos antimicrobianos ejercen su acción uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de las bacterias. La resistencia bacteriana se produce cuando ésta modifica la proteína diana y cambia su función o produce enzimas diferentes (Fernández *et al.*, 2003).

Los investigadores hallaron que los transposones contienen una proteína llamada transposasa que permite a estos elementos genéticos unirse al ADN en un estado inactivo, lo que evita la división y, por lo tanto, la destrucción del transposon. Esta proteína también obliga al ADN del transposon a desenrollarse y abrirse, lo que le permite insertar

su carga de resistencia a los antimicrobianos en muchos lugares en una gama diversa de bacterias (Infobae, 2018).

### **2.5.2 El ajo como antimicrobiano natural.**

En el siglo XIX, Louis Pasteur finalmente demostró científicamente que el ajo contiene propiedades antibióticas. Su descubrimiento condujo a la iniciación de cientos de estudios que han fundamentado sus hallazgos. A finales del siglo XIX, el ajo era utilizado rutinariamente por los médicos como un tratamiento eficaz para el tifus, el cólera y la tosferina. Fue altamente recomendado por los médicos y considerado como tratamiento básico para la infección. A principios del siglo XX, la tuberculosis fue tratada con ajo y también se usó como un antibiótico/antiséptico para las heridas durante la Segunda Guerra Mundial (Torija *et al.*, 2013).

El mecanismo de la actividad antimicrobiana del ajo, se basa en la inhibición de la actividad de enzimas como: fosfatasa alcalina, invertasa, ureasa y papaína, así como de enzimas sulfhídricas. La alicina inhibe la actividad de enzimas sulfhídricas debido a la presencia de los grupos químicos S-O-S (Davidson y Parish, 1989).

La actividad antibacteriana del ajo es ampliamente atribuida a la alicina (Bayan *et al.*, 2014). Cuando Wills en 1956; citado por Cacao y Mora (2019), se sabe que la alicina tiene propiedades antibacteriales y antifúngicas debido a la interferencia con las enzimas sulfhidrilo. La cisteína y el glutatión contrarrestan la actividad de tiolación de la alicina. Se ha demostrado que el extracto de ajo y la alicina ejercen efectos bacteriostáticos sobre algunos enterococos resistentes a la vancomicina. Se observó un sinergismo inhibitor cuando se usó en combinación con vancomicina (Jonkers *et al.*, 1999). Se ha informado que inhibe *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Vibrio* (Sivam, 2001).

Se considera que la alicina tiene actividad antimicrobiana por que modifica la biosíntesis de los lípidos y síntesis del RNA de los microorganismos y disminuye el perfil de lípidos de los mismos. Este compuesto activo reacciona rápidamente con grupos tiol libres, por ello se cree que el principal mecanismo antimicrobiano se produce a través de la interacción de alicina con enzimas que contienen grupos tiol, como proteasas y alcohol dehidrogenasas (Rahman, 2007).

La alicina inhibe a más de 300 bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megateriom*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus polymyxya*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Kumar y Jain, 2010) *Salmonella typhy*, *Salmonella paratyphy* (Abraham, 2010) y *Helicobacter pylori* (O'Gara *et al.*, 2000).

## 2.6 CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA DEL AJO

La concentración mínima inhibitoria (CMI), es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de  $10^5$  bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18 a 24 horas de incubación (Paredes y Roca, 2004). Debido a que el ajo mostró resultados positivos de inhibición, se calculan las cantidades necesarias para obtener un efecto inhibitorio sobre las bacterias. En un estudio realizado por Arroyo *et al.*, en 2015, reportaron que la cantidad de ajo necesaria para inhibir el crecimiento de *E. coli* fue de 12.5 mg/mL. Yaguana en 2015, realizó un estudio donde la concentración mínima inhibitoria de *Allium sativum* sobre *E. coli* es de 62.5 mg/mL es decir que, mientras sea mayor la concentración del extracto de ajo, se obtendrán halos de inhibición mucho mayores.

## III. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de fármacos sintéticos ha generado resistencia a muchos antimicrobianos por parte de ciertos microorganismos. Es necesario desarrollar drogas antibacterianas alternas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. La medicina herbolaria representa una rica fuente para obtener nuevos agentes quimioterapéuticos, antibacteriales y fungicidas. Debemos tomar en cuenta que existen alternativas naturales que funcionan como antimicrobianos, como es el caso del ajo, que es considerado como un antibiótico natural que inhibe el crecimiento de algunos microorganismos.

Se ha comprobado que el ajo tiene muchas propiedades, tanto culinarias como medicinales y que contiene componentes sulfurados como la alicina que es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, entre ellas *Escherichia coli*, la cual hoy en día ha logrado obtener una mayor resistencia a los antimicrobianos siendo la principal causante de las enfermedades gastrointestinales, que son uno de los principales problemas de salud pública en México.

Por lo tanto, el presente trabajo pretende evaluar si los extractos acuosos de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) y negro (*Allium sativum*) a diferentes concentraciones inhiben el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 con el propósito de abrir nuevas investigaciones en la búsqueda de antimicrobianos de tipo natural que causen menos efectos nocivos.

#### IV. HIPÓTESIS

El extracto acuoso de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) tiene mayor inhibición al crecimiento bacteriano *in vitro* sobre la bacteria *Escherichia coli* ATCC® 25922 que el extracto acuoso de ajo negro (*Allium sativum*).

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

Evaluar la inhibición *in vitro* del extracto acuoso de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) y ajo negro (*Allium sativum*) sobre el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* ATCC® 25922.

### 5.2 Específicos

- Determinar la inhibición bacteriana del extracto acuoso de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) sobre la bacteria *Escherichia coli*. ATCC® 25922 *in vitro*.
- Determinar la inhibición bacteriana del extracto acuoso de ajo negro (*Allium sativum*) sobre la bacteria *Escherichia coli*. ATCC® 25922 *in vitro*.
- Identificar la concentración de extracto acuoso de ajo que presente mayor inhibición bacteriana *in vitro*.

## VI. MATERIAL Y MÉTODO.

### 6.1. Material biológico.

- Ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*)
- Ajo negro (*Allium sativum*)
- Bacteria *Escherichia coli* ATCC® 25922™

#### 6.1.1 Material de laboratorio.

##### Equipo.

- Asa bacteriológica
- Autoclave AESA® modelo: CV300, serie: 999.
- Balanza analítica BOECO® modelo: BPS 51 Refrigerador
- Espectrofotómetro Thermo Scientific™ Genesys™ 10 UV-Vis.
- Hisopos estériles
- Incubadora Riossa® modelo:BD, serie:BDME
- Mechero Bunsen
- Mortero con pistilo
- Regla de vernier Mitutoyo®

##### Equipo de protección personal.

- Bata
- Guantes de Asbesto para autoclave
- Guantes de látex

##### Cristalería.

- Cajas Petri
- Matraz Erlenmeyer 500 mL
- Tubos de ensayo de vidrio

##### Medios de cultivo.

- Agar Mueller Hinton BD BIOXON®
- Agua destilada
- Peptona de carne BD BIOXON®

#### 6.1.2 Material para la preparación de sensidiscos.

- Jeringa 10 mL y 3 mL
- Papel de celulosa Membrane filter 100 pack 25mm 0.2 µm Pall Corporation Suppor®-200
- Papel Whatman® 1filter papers 110mm cat no. 1001 110

- Sensidiscos para bacterias Gram-negativas Multibac I. D®
- Tubos cónicos de plástico Coning® 15 mL

### 6.1.3 Material de oficina.

- Bolígrafo
- Hoja milimétrica
- Libreta
- Marcador indeleble
- Perforadora

## 6.2 Método.

La metodología para este trabajo, consistió en elaborar los extractos acuosos de ajo negro (*Allium sativum*) y ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*), con la finalidad de realizar pruebas de inhibición del crecimiento de la *Escherichia coli* cepa ATCC® 29922, que se describen continuación.

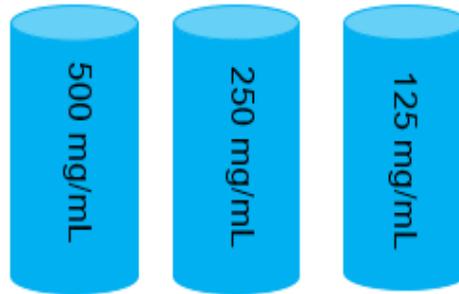
### 6.2.1 Preparación de los extractos acuosos de ajo negro (*Allium sativum*) y ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*).

Para preparar los extractos acuosos y determinar las concentraciones se siguió la metodología de Yaguana, (2015). Los ajos se pelaron y se lavaron con agua destilada, para la primera concentración (P/V) se pesaron 200 g de ajo en una balanza analítica BOECO® modelo: BPS 51 y se agregaron 400 mL de agua (500 mg/mL), para la segunda concentración 100 g de ajo por 400 mL de agua (250 mg/mL) y para la tercera concentración 50 g de ajo por 400 mL de agua (125 mg/mL). Se realizó el macerado de los ajos durante 15 minutos en un mortero con pistilo y se utilizó agua destilada como diluyente. El extracto se filtró con papel Whatman 1, el resultante se almacenó en refrigeración (4°C) por 12 horas.

### 6.2.2. Elaboración de los discos impregnados en extractos de ajo.

Se utilizó papel Whatman® 1 filter papers 110 mm cat no. 1001 110, con una perforadora se realizaron 120 discos de 6 mm de diámetro. Se adicionaron 20 discos en cada tubo cónico de plástico Coning® de 15 mL, se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 15 minutos para después colocarles las diferentes concentraciones de los extractos acuosos de ajo (EAA) durante 12 horas como se muestra en la figura 4.

**Figura 4.** Concentración de extracto acuoso de ajo en los discos de papel Whatman®.



### 6.2.3. Prueba de sensibilidad antimicrobiana.

Para la preparación del agar Mueller Hinton se utilizaron 9 g de medio, diluido en 200 mL de agua destilada mezclando mediante agitación frecuente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos se dejó enfriar a 45 °C. Posteriormente con una probeta estéril de 50 mL se midieron 20 cm<sup>3</sup> para vaciarlos en una caja Petri estéril hasta obtener un grosor uniforme de 4 mm.

### 6.2.4 Pruebas de inhibición de crecimiento de *E. coli* ATCC® 25922.

Para determinar los controles de inhibición de crecimiento bacteriano, se realizó una prueba en la que se desafió a la bacteria *Escherichia coli* (ATCC® 25922) utilizando una de las cajas Petri estériles con Mueller Hinton en la cual se colocó un multidisco para Gram negativos (productos biológicos Multibac I. D®), eligiendo al antibiótico que esté en la categoría de sensible (Sulfametoxazol/Trimetroprim 25 mcg) para ser utilizados como

control de inhibición de crecimiento de la *E. coli* y el antibiótico que no presente inhibición de crecimiento bacteriano (Nitrofuranoína 300 mcg), se eligió como control de no inhibición del crecimiento bacteriano (categoría de resistente) que podemos observar en el cuadro 7.

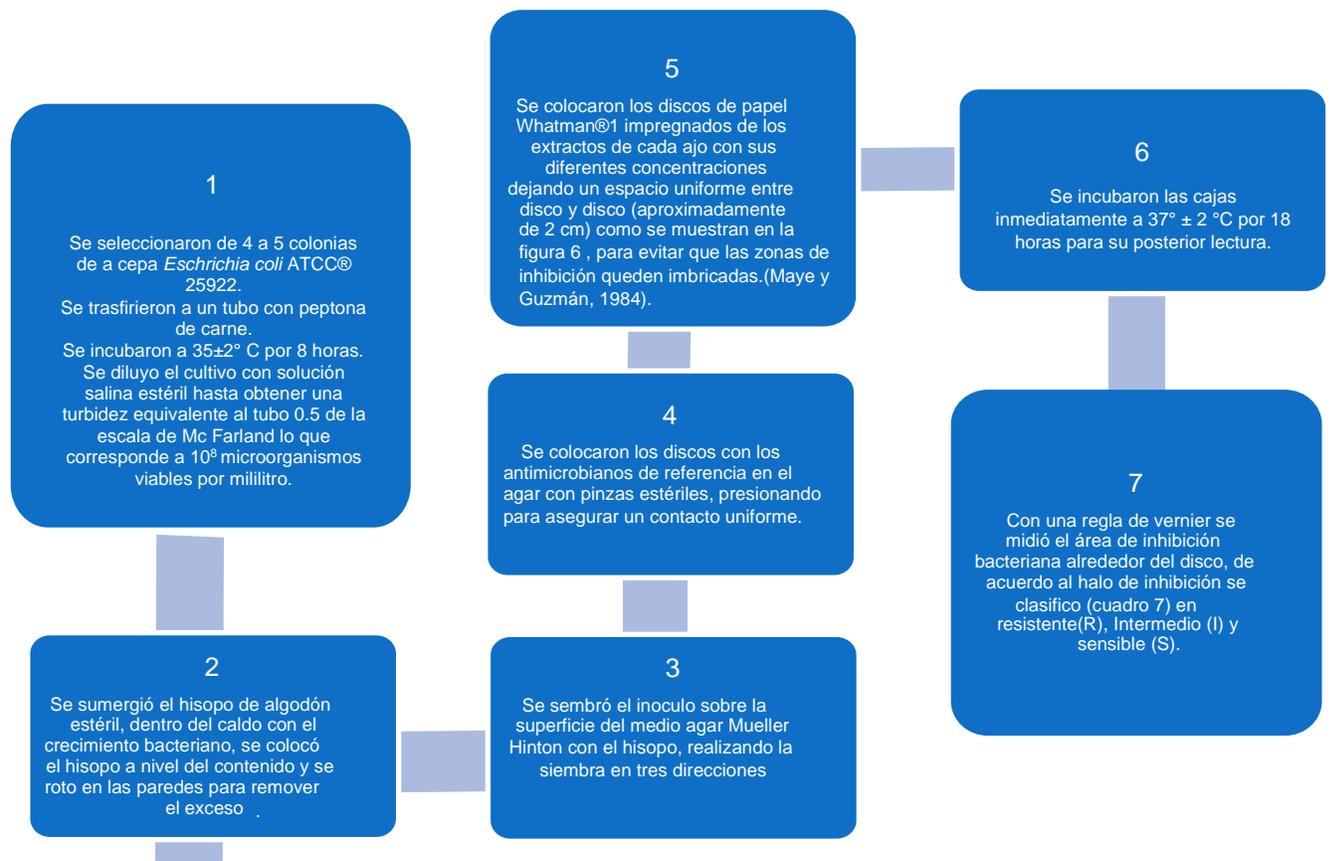
**Cuadro 5.** Comparación de halos de sensibilidad en mm.

| Antimicrobianos                   | Resistente ( $\leq$ ) | Intermedio | Sensible ( $\geq$ ) |
|-----------------------------------|-----------------------|------------|---------------------|
| Amikacina 30 mcg                  | 14                    | 15-16      | 17                  |
| Ampicilina 10 mcg                 |                       |            |                     |
| Cefalotina 30 mcg                 | 14                    | 15-17      | 18                  |
| Cefotaxima 30 mcg                 | 14                    |            | 23                  |
| Dicloxacilina 1 mcg               |                       |            |                     |
| Ceftriaxona 30 mcg                | 13                    |            | 21                  |
| Cloranfenicol 30 mcg              | 12                    | 13-17      | 18                  |
| Gentamicina 10 mcg                | 12                    | 13-14      | 15                  |
| Netilmicina 30 mcg                | 12                    | 13-14      | 15                  |
| Nitrofurantoina 300 mcg           | 14                    | 15-16      | 17                  |
| Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 mcg | 10                    | 11-15      | 16                  |

Fuente: (Gutiérrez, 2014) Multibac I.D®.

Se realizó el cultivo bacteriano de *Escherichia coli* (ATCC® 25922) para llevar a cabo el método de Kirby-Bauer que se muestra en la figura 5 (Bauer *et al.*, 1966).

**Figura 5.** Secuencia de la metodología usada para determinar la inhibición de crecimiento de la *E. coli* ATCC® 25922.



Fuente: Datos Originales

\*Modificación debido a que en el medio de cultivo peptona de carne la cepa mostró mejor crecimiento.

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2x3, donde las variables de estudio fueron los 2 extractos acuosos de ajo elefante (EAAE) y negro (EAAN) y las 3 concentraciones (500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL).

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza a un nivel de confianza del 95% para evaluar el efecto de los extractos acuosos de ajo sobre la inhibición bacteriana.

Cada tratamiento tuvo siete repeticiones (Mujica y Mogollón, 2004), distribuidas de la siguiente manera:

Disco 1: (EAAE) a la concentración 500 mg/mL.

Disco 2: (EAAE) a la concentración 250 mg/mL.

Disco 3: (EAAE) a la concentración 125 mg/mL.

Disco 4: (EAAN) a la concentración 500 mg/mL.

Disco 5: (EAAN) a la concentración 250 mg/mL.

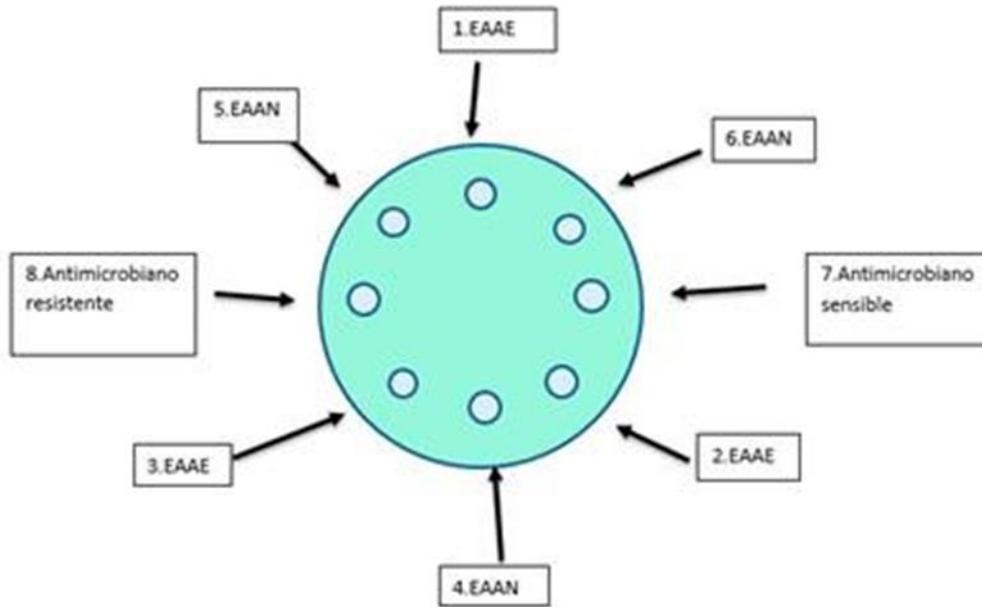
Disco 6: (EAAN) a la concentración 125 mg/mL.

Disco 7: control positivo de inhibición de crecimiento bacteriano (antimicrobiano sensible) (Sulfametoxazol/Trimetroprim 25 mcg).

Disco 8: control negativo de inhibición de crecimiento bacteriano (antimicrobiano resistente) (Nitrofuranoína 300 mcg) se observa en la figura 6.

La variable respuesta es la medida del halo de inhibición en milímetros del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

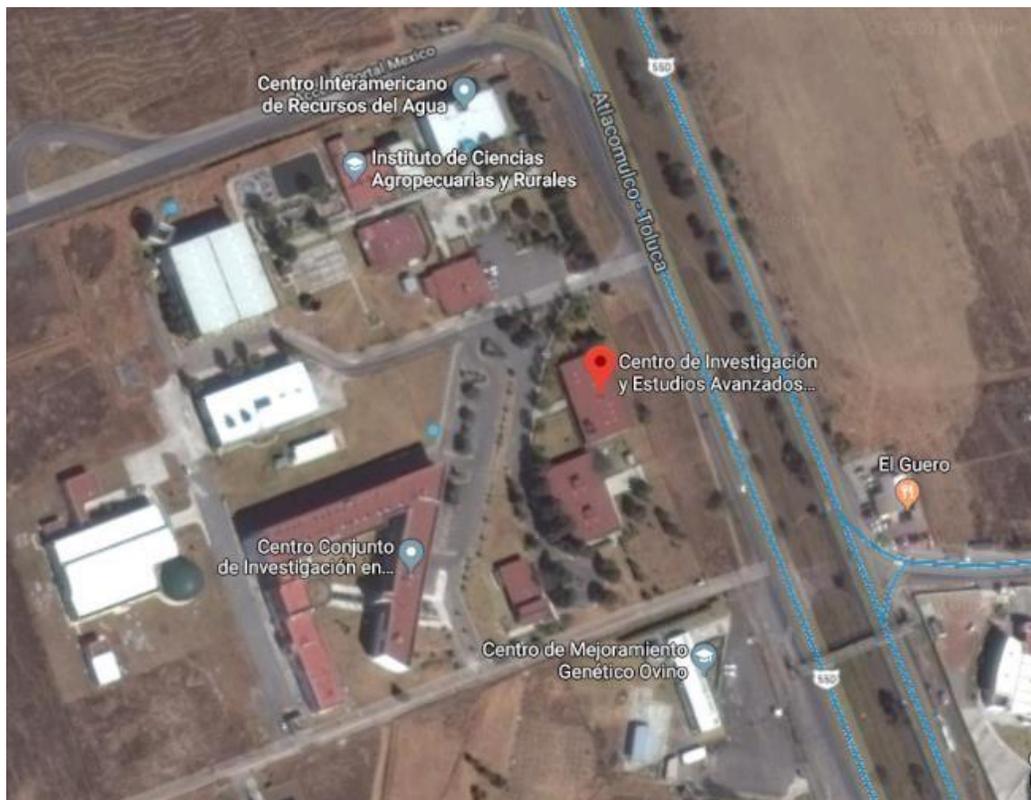
**Figura 6.** Patrón de distribución de los discos impregnados de extracto acuoso de ajo negro, ajo elefante y controles (antibióticos) en el medio de cultivo.



### VIII. LÍMITE DE ESPACIO.

La preparación de material, la siembra, incubación de la bacteria y las pruebas de laboratorio, se llevarán a cabo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), ubicado en el Kilómetro 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México.

Localización:



Fuente: Google maps.

<https://www.google.com.mx/maps/place/Centro+de+Investigaci%C3%B3n+y+Estudios+Avanzados+en+Salud+Animal/@18.2632832,-100.5863011,8z/data=!4m8!1m2!2m1!1sCIESA!3m4!1s0x85d277526dd83a37:0x4af5c946af25868a!8m2!3d19.3992479!4d-99.7130349>

## IX. LÍMITE DE TIEMPO

El presente trabajo se realizó conforme a lo descrito en el siguiente cuadro:

| <b>ACTIVIDAD</b>                                   | <b>FECHA</b>             |
|--|--------------------------|
| Elaboración del protocolo y revisión bibliográfica | Abril 2018               |
| Aprobación del protocolo                           | Julio 2019               |
| Inicio de estudio                                  | Agosto 2019              |
| Investigación bibliográfica                        | Agosto a Septiembre 2019 |
| Desarrollo del estudio                             | Octubre 2019             |
| Aprobación del trabajo concluido                   | Marzo 2020               |
| Presentación de examen                             | Abril 2020               |

## X. RESULTADOS

Durante el presente trabajo se evaluaron a seis concentraciones de extracto acuoso de ajo elefante (*Allium ampeloprasma complex*) y ajo negro (*Allium sativum*), como inhibidores del crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

El extracto acuoso de ajo elefante en la concentración 500 mg/mL mostró un halo de inhibición de  $11.44 \pm 1.30$  mm y la concentración 250 mg/mL mostró un halo de inhibición de  $7.14 \pm 1.53$  mm. sobre el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* ATCC® 25922, mientras que la concentración 125 mg/mL no mostró inhibición en el crecimiento *in vitro* de la bacteria. Las concentraciones de extracto acuoso de ajo negro no mostraron inhibición en el crecimiento bacteriano. En cuanto a los antibióticos utilizados como referencia de inhibición del crecimiento microbiano, la Sulfametoxazol-Trimetoprim tuvo un promedio de inhibición de  $28.24 \pm 0.07$  mm. y la Nitrofurantoina presentó un promedio de inhibición de  $28.77 \pm 0.79$  mm. (Cuadro 8).

Los halos de inhibición del extracto acuoso de ajo elefante (EAAE), extracto acuoso de ajo negro (EAAN) y los antibióticos sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC® 25922, se clasificaron según Multibac I.D.

**Cuadro 6.** Promedio de los halos de inhibición de los antibióticos y los extractos acuosos.

| Aislamiento                        | Antibiótico          |                      | EAAE                 |                     |           | EAAN      |           |           |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                    | SXT                  | NF                   | 500 mg/mL            | 250 mg/mL           | 120 mg/mL | 500 mg/mL | 250 mg/mL | 120 mg/mL |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | $28.24 \pm 0.07$ mm. | $28.77 \pm 0.79$ mm. | $11.44 \pm 1.30$ mm. | $7.14 \pm 1.53$ mm. | 0         | 0         | 0         | 0         |

SXT: Sulfametoxazol/ Trimetoprim 25mcg (antibiótico sensible).

NF: Nitrofurantoina 300mcg (antibiótico resistente).

De acuerdo a la medición del halo de inhibición se observó que el extracto acuoso de ajo elefante en la concentración 500 mg/mL se encuentra en la categoría de intermedio (I), la concentración 250 mg/mL se encuentra en la categoría resistente (R), esto en comparación con los antibióticos utilizados (Gutiérrez, 2014 \*Multibac I.D®) como se muestra en los cuadros 9 y 10.

**Cuadro 7.** Clasificación del halo de inhibición de los extractos acuosos sobre el crecimiento de la *Escherichia coli* ATCC® 25922 en comparación con el Sulfametoxazol/ Trimetoprim

| Aislamiento                         | Antibiótico    | EAAE           |               |           | EAAN      |           |           |
|-------------------------------------|----------------|----------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                     | SXT            | 500 mg/mL      | 250 mg/mL     | 120 mg/mL | 500 mg/mL | 250 mg/mL | 120 mg/mL |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 | 28.24±0.07 mm. | 11.44±1.30 mm. | 7.14±1.53 mm. | 0         | 0         | 0         | 0         |
| CLSI                                | S              | I              | R             | R         | R         | R         | R         |

SXT: Sulfametoxazol/ Trimetoprim 25mcg; R≤10 mm, I 11-15 mm y S≥16mm.  
Referencia: \*Multibac I.D®, (CLSI, 2012)

**Cuadro 8.** Clasificación del halo de inhibición de los extractos acuosos sobre el crecimiento de la *Escherichia coli* ATCC® 25922 en comparación con la Nitrofurantoina \*Multibac I.D®.

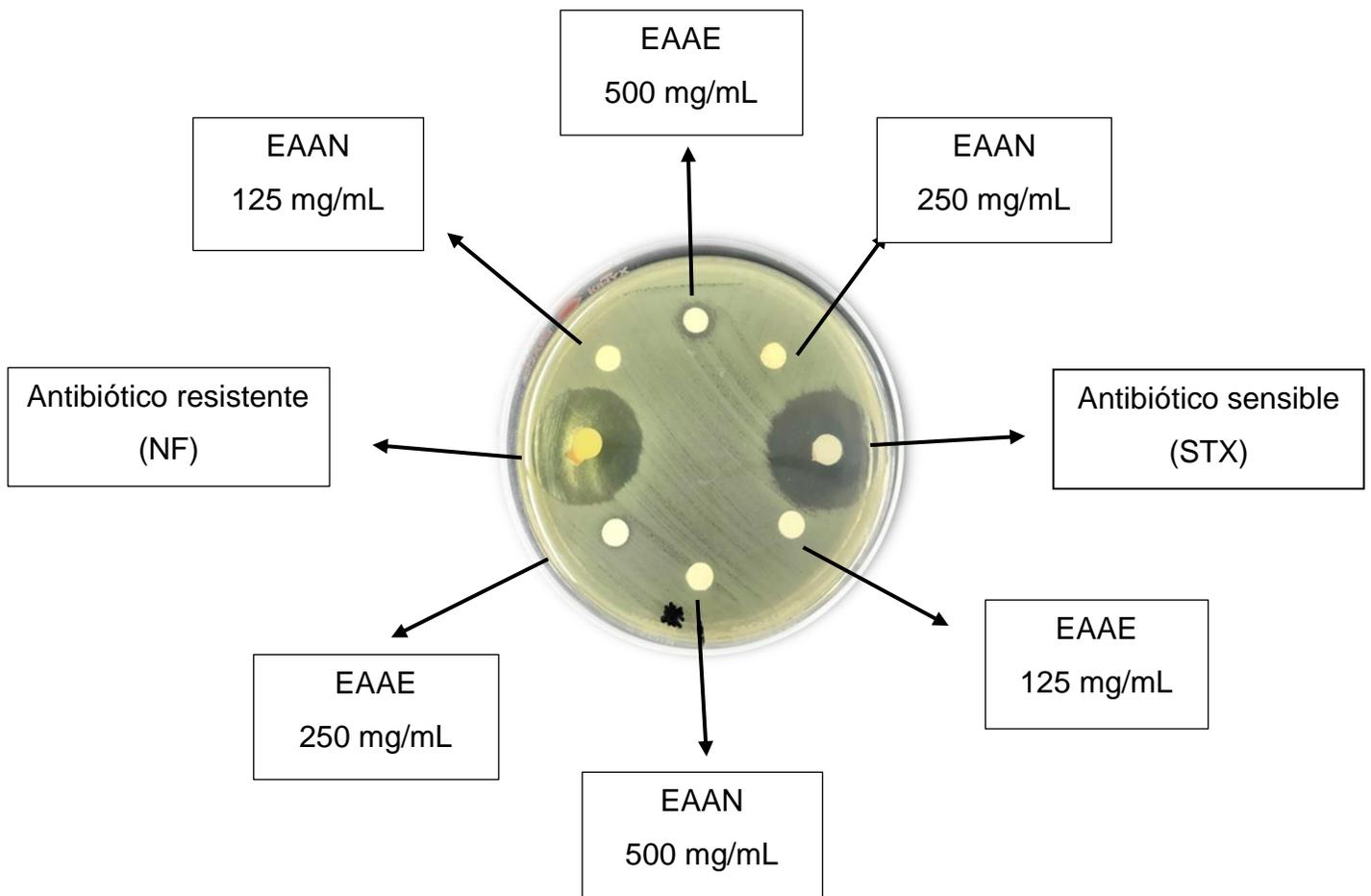
| Aislamiento                         | Antibiótico    | EAAE           |               |           | EAAN      |           |           |
|-------------------------------------|----------------|----------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                     | NF             | 500 mg/mL      | 250 mg/mL     | 120 mg/mL | 500 mg/mL | 250 mg/mL | 120 mg/mL |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 | 28.77±0.79 mm. | 11.44±1.30 mm. | 7.14±1.53 mm. | 0         | 0         | 0         | 0         |
| CLSI                                | S              | R              | R             | R         | R         | R         | R         |

NF: Nitrofurantoina 300 mcg; R≤14mm, I 15-16 mm y S≥17mm.

Se muestra que la inhibición *in vitro* del EAAE en una concentración 500 mg/mL es de 10.23 mm (diámetro), en la concentración 250 mg/mL es de 7.89 mm y en la concentración 125 mg/mL no mostró inhibición, de la misma manera que el EAAN en

ninguna de sus concentraciones se mostraron resultados a diferencia de los antibióticos, Nitrofurantoina (NF) con 29.34 mm y Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT) con 28.19 mm que se exponen en la figura 7.

**Figura 7.** Cultivo de la *Escherichia coli* ATCC® 25922 *in vitro* con sensidiscos de extractos acuosos de ajo elefante, negro y antibióticos en donde se observa el halo de inhibición de Nitrofurantoina y Sulfametoxazol/Trimetoprim.

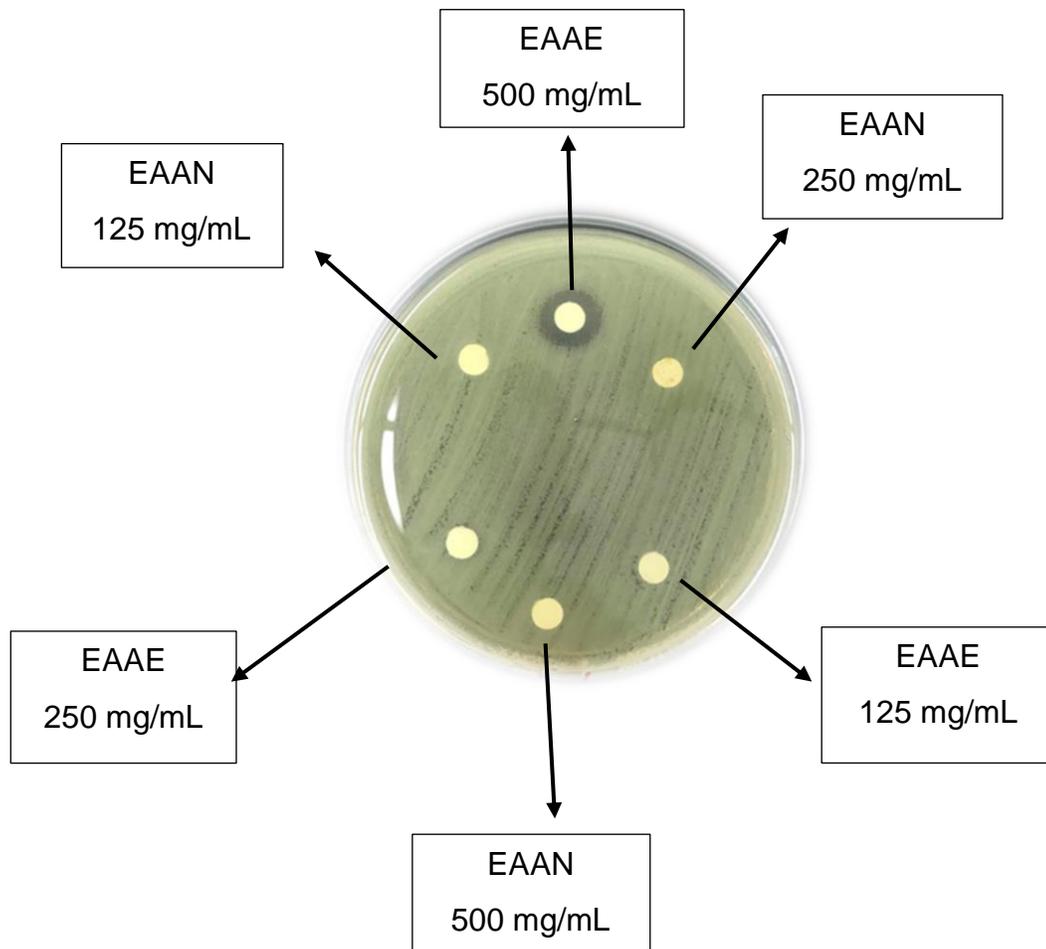


(STX): Sulfametoxazol/Trimetoprim

(NF): Nitrofurantoina

La inhibición del crecimiento *in vitro* EAAE sobre *E. coli* ATCC® 25922 en una concentración de 500 mg/mL fue de 10.45 mm, en la concentración 250 mg/mL fue de 7.53 mm y la concentración 125 mg/mL no mostró inhibición, al igual que el EAAN no se mostró inhibición del crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC® 25922 (Figura 8).

**Figura 8.** Cultivo de la cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 con sensidiscos de extractos acuosos de ajo en donde se observa inhibición del crecimiento de extracto acuoso de ajo elefante (EAAE).



(EAAE): Extracto Acuoso de Ajo Elefante.

(EAAN): Extracto Acuoso de Ajo Negro.

## XI. DISCUSIÓN.

De manera natural los seres vivos conviven en simbiosis con billones de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras y mohos, principalmente concentrados en el tracto gastrointestinal y la piel. Estos microorganismos juegan un papel trascendental para la salud, pero también constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades. Existe la necesidad de crear una variedad de compuestos antimicrobianos que sean más efectivos y menos tóxicos. En diversas investigaciones sobre el ajo, demostraron la presencia de alicina la cual posee un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Micobacterium tuberculosis* (Ramírez, 2016).

Uno de los principales riesgos de la transmisión de microorganismos patógenos, es a través del consumo de alimento contaminado. Entre microorganismos patógenos se encuentran las bacterias como: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, siendo, por esto, reconocidos como microorganismos de vital importancia para la salud pública (Riveros y Ochoa, 2015).

Christensen *et al.*, (2001) mencionan que los patógenos Gram positivos y patógenos Gram negativos se vuelven cada vez más resistentes a uno o más antibióticos usados, por lo que establecen la necesidad de nuevas alternativas en los tratamientos antimicrobianos.

Por su parte, Lucero (1999) señala que el "ajo elefante" es considerado una planta hipotensora, el cual produce una disminución significativa de la presión arterial sistólica y diastólica. Lo mismo señaló Hoffmann en 1992 para el *Allium sativum*. La planta no es igual, pero contienen en su mayoría componentes similares. En el transcurso de ese año

Ankri y Milerman comprobaron que los extractos de ajo tienen actividad antibacteriana sobre algunas enterobacterias de interés clínico como *Escherichia coli*.

En el 2014, Salazar demostró el efecto antibacteriano del ajo sobre *Escherichia coli* ATCC® 25922, con una concentración de extracto acuoso a 125 mg/mL, en ese estudio el promedio de diámetro en los halos de inhibición es de 14.3 mm, en contraste en el presente estudio el halo de inhibición que manifestó el extracto acuoso de ajo a una concentración de 500 mg/mL fue de 11.44 mm, sin embargo en comparación con el antibiótico que se utilizó como referencia esta inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC® 25922 lo ubica en la categoría de resistente. García y Herrera, en (2007) también realizaron un estudio en el cual se evaluó la actividad antibacteriana del extracto acuoso de tres especies de la familia *Allium* (*Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*) sobre cinco cepas bacterianas, en su estudio encontraron que el extracto acuoso de *Allium cepa* fue el que mostró mayor acción efectiva contra *Escherichia coli* al generar halos de inhibición de 15 mm de diámetro en promedio, en comparación con el presente estudio solo el extracto acuoso de ajo elefante mostró inhibición del crecimiento de la *Escherichia coli* ATCC® 25922.

En micro bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) Mujica y Mogollón en (2004), adicionaron citocininas *in vitro* que son hormonas vegetales responsables de la división celular para lo cual se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial regular 3 x 3 (tres dosis de la citocinina combinadas con tres de sacarosa) con ocho réplicas, este diseño es similar al establecido para este trabajo.

El principal efecto antimicrobiano de alicina se debe a su reacción química con los grupos tiol de las diferentes enzimas, además, se ha demostrado que el ajo ejerce una inhibición diferencial entre la micro flora intestinal y las enterobacterias y que esto se produce en un grado mucho menor si el extracto se almacena entre 0 y 4 °C, lo que indica la existencia de inestabilidad térmica en los componentes activos (Ramírez *et al.*, 2016).

El presente estudio puede ser utilizado como referencia de que el ajo elefante pone en manifiesto cierta utilidad *in vitro* como antimicrobiano a una concentración de 500 mg/mL contra *Escherichia coli* ATCC® 25922 y el ajo negro no expreso actividad antimicrobiana en ninguna de las tres concentraciones utilizadas para este trabajo. Por lo que abre nuevas puertas para realizar más estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para reforzar la inhibición del crecimiento bacteriano en diferentes bacterias patógenas probando otros métodos de extracción o aislando únicamente los principios activos.

## **XII. CONCLUSIONES.**

La concentración de 250 mg/mL y 500 mg/mL de extracto acuoso de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) fueron capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria

*Escherichia coli* ATCC® 25922. Mientras que la concentración de 125 mg/mL) no fue suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano.

Ninguna de las concentraciones de extracto acuoso (500 mg/mL; 250 mg/mL; 125 mg/mL) de ajo negro (*Allium sativum*) fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

### **XIII. SUGERENCIAS.**

Realizar estudios en relación con los diferentes métodos de extracción de los principios activos del ajo que provocan inhibición antimicrobiana.

Favorecer el cultivo de ajo en uso de suelos orgánicos libres de pesticidas para así garantizar un ajo de alta calidad y a su vez obtener un extracto eficaz.

De igual manera se sugiere hacer estudios referentes a la viabilidad y efectividad del extracto de acuerdo al tiempo de almacenamiento.

Realizar estudios *in vivo* en animales como una opción natural de tratamiento preventivo.  
Realizar pruebas con distintos tipos de ajo a diferentes concentraciones en bacterias que tienen cierta resistencia a los antibióticos comerciales.

Concluimos que el campo de estudio de la función antimicrobiana del ajo es amplio y debe profundizarse más en conocer la sustancia que inhibe el crecimiento de bacterias.

#### **XIV. LITERATURA CONSULTADA.**

**Abraham J.** (2010). Evaluation of antimicrobial activity of herbal extracts against Salmonella. *Journal of Pharmacy Research*. 3 (8):1981-1983.

**Adrian T. y Frangne R.** (1990). *La Ciencia de los Alimentos de la A a la Z*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

- Akerele O.** (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar, Foro Mundial de la Salud, 1993; 14 (4):390-395.
- Ankri S. y Mirelman, D.** (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and infection*, 1(2), 125-129.
- Arroyo L., Landin G., Alonso B. Sánchez M. y Suarez G.** (2015). Actividad inhibitoria de *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Veracruz.
- Banerjee S., Mukherjee, P.K. y Maulik, S.** (2003). Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. *Phytother. Res.* 17, 97–1
- Bauer A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., y Turck, M.** (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493.
- Bayan L. Koulivand P.H. y Gorji A.** (2014). Garlic a review of potential effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine* Vol. 4 (1), 114
- Bhandari P.R.** (2012). Garlic (*Allium sativum* L.) A review of potential therapeutic applicattions. *International Journal of Green Pharmacy*, 2:118.
- Cabieses F. y Rivas S.** (1995). En: 2° Congreso de Plantas Medicinales Chile 95. 28 al 31 de octubre. Centro el Canelo de Nos, San Bernardo, Chile. 27.
- Cacao V. J. y Mora C.C** (2019). Caracterización para el desarrollo de un inhibidor de crecimiento bacteriano a partir del ajo (*Allium sativum*) para superficies de trabajo en la cocaína. Universidad de Guayaquil. Abril, 2019.
- Celis A.** (1999). Ajos Chilotes o Blandinos: Una importante alternativa de exportación. *Agroanálisis*. pp. 36-37. Osorno, Chile.
- Chalar V.L., Moya M.J., Vargas A.E.; Sejas R.M. y Romero B.** (2014). Función Antimicrobiana de la Alisina de Ajo en cultivos de *Staphilococcus aureus*, *Pseudomonas aeroginosas* y *Escherichia coli*. *Revista Científica Ciencia Médica*, vol. 17 (1): 26-28. Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba Bolivia. En: <http://www.redalyc.org/pdf/4260/426041228008.pdf> [27/09/2019].

- Choi D.J., Lee S.J., Kang M.J., Cho H.S., Sung N.J. y Shin J.H.** (2014). Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum*). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr vol. 37(22) 465– 471.
- Christensen D.J., Gottlin E.B., Benson R.E. y Hamilton P.T.** (2001). Phage display for trager-based antibacterial drug discovery. Drug Discovery today, 6 (14), 721-7.
- CLSI** (2012). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard Eighth Edition. CLSI document M11-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CORFO** (1987). Monografías Hortícolas: ajo, cebolla, coliflor, repollito de bruselas, pimentón y ají haba. Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Corzo M., Corzo N. y Villamiel M.** (2007). Biological properties of onions and garlic, trends in food science and technology 18.12:609-625.
- Cota Rubio E., Hurtado Ayala L., Pérez Morales E. y Alcántara Jurado L.** (2014). Resistencia a antimicrobianos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. RelbCi, 1(1), 75-85.
- Davidson, P. M. y Parish, M. E.** (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food technology (USA).
- Domingo D, López J. y Brea M.** (2003). Plantas con acción Antimicrobiana, servicio de microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. Revista Española de quimioterapia, vol.16 (4):385393. En <http://www.seq.es/seq/02143429/16/4/38S.pdf>. [22/09/2019].
- Drago M.E., M. López y T. Sainz** (2006). Componentes bio-activos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas. 37: 58- en:<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=579408>>pd.f. [12/09/2019].
- Escaff M.** (1991). Variedades de ajo cultivadas en Chile. Primer Curso Taller de Ajos, 19-21.

**Fernández R.F., López H.J., Ponce M.M. y Machado B.C.** (2003). Resistencia Bacteriana, Hospital Militar Central “Dr. Luis Diaz Soto” Revista Cubana de Medicina Militar vol.8 (1) Ciudad de la Habana.

**Florencio G. M** (2011). Estudio de procesos de deshidratación industrial del ajo con la finalidad de preservar la alicina como principio activo, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

**Fonnegra G.R. y Jiménez R.S.** (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 2ª ed. Ed. Universidad de Antioquia.

**Ganado P.** (2001). Estudio de diferentes fracciones y extractos de *Allium sativum* sobre la reactividad vascular, niveles de colesterol y cultivos celulares, Universidad Complutense de Madrid, departamento de farmacología. Madrid.

**García G. J. J. y Sánchez M. F. J.** (2000). Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*), Departamento de nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, vol. 50 (3).

#### **Google maps:**

<https://www.google.com.mx/maps/place/Centro+de+Investigaci%C3%B3n+y+Estudios+Avanzados+en+Salud+Animal/@18.2632832,-100.5863011,8z/data=!4m8!1m2!2m1!1sCIESA!3m4!1s0x85d277526dd83a37:0x4af5c946af25868a!8m2!3d19.3992479!4d-99.7130349> [Abril 2018].

**Gutiérrez R.A.** (2014). Investigación diagnóstica, Laboratorio de reactivos para diagnóstico., Instructivo\*Multibac I. D®.

**Hoffmann A. (1992).** Plantas medicinales de uso común en Chile. 2a Edición. Ediciones Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile.

**Infobae** (2018). Identifican la base molecular de las bacterias resistentes a antimicrobianos, Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), Rev.Cell.

**Jang, E. K., Seo, J. H., y Lee, S. P.** (2008). Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. Korean Journal of Food Science and Technology, 40(4):443-448.

**Jonkers D, Sluimer J. y Stobberingh E.** (1999). Effect of garlic on vancomycinresistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother, 43: 3045

- Kumar R. y Jain P.** (2010). Antimicrobial activity of *Allium sativum* ethanolic extract against food associated bacteria and fungi. *Drugs Invention Today*: 2(4): 229-232.
- Lanzavechia S.** (2007). Contribución al conocimiento para la producción de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) En Mendoza Argentina. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-tesis\\_ajo\\_elefante.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-tesis_ajo_elefante.pdf)
- Lawson L. D, Wang Z.J. y Hughes B.G** (2005). Identification and HPLC Quantitation of the Sulfides and Dialk Thyosulfinates in Commercial Garlic Products. *Planta Médica*, vol. 57, 363-370.
- Ledezma E. y Apitz C.** (2006). Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. *Revista iberoamericana de micología*, 23(2): 75-80.
- Lee E.N., Choi Y.W. Kim H.K., Park J.K., Kim H.J., Kim M.J., Lee H.W., Kim K.H., Bae S.S. y Kim B.S.** (2011). Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF $\alpha$ -induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF- $\kappa$ B activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother. Res.* 25, 92–100.
- López T.** (2007). El ajo propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas.
- Lucero A.** (1999). Evaluación del efecto sobre la presión arterial de extractos de *Allium ampeloprasum*. Tesis, M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- Maye B. y Guzmán M.** (1984). El antibiograma de discos, normalización de la técnica de Kirby Bauer, *Biomedica* vol.4:3-4.
- Medina T. Á.** (2017). Optimización de la elaboración y caracterización fisiológica, físico-química del ajo negro, Universidad de Córdoba, España.
- Minogue T. D., Daligault H. A., Davenport K. W., Bishop Lilly K. A., Broomall S. M., Bruce D. C. y Frey K. G.** (2014). Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome announcements*, 2 (5):14.
- Mirelman D. y Serge A.** (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic.
- Morejón G. M.** (2013). *Escherichia coli* multirresistentes, Servicio de

Medicina Interna del Hospital "Comandante Manuel Fajardo". La Habana, Cuba. Revista Cubana de Urología 2(1):4-6. En:

<http://www.medigraphic.com/pdfs/revcuburool/rcu-2013/rcu131b.pdf> [10/08/2019].

**Mujica, H. y Mogollón M.** (2004). Bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. Bioagro 16(1): 55-60.

**Nataro J.P. y Kaper J.B.** (1998). Diarrheagenetic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 11:142-201.

**O'Gara E. A., Hill D. J. y Maslin D. J.** (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Applied Environmental Microbiology. 66:2269-2273.

**OMS** (2018 a). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antimicrobianos en todo el mundo, Organización mundial de la salud. Disponible en:<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistancefound/es/>. [10/08/2019].

**OMS** (2018 b). *E. coli*, Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [15/08/2019].

**Paredes F. y Roca J.J.** (2004). Acción de los antimicrobianos, Perspectiva de la medicación antimicrobiana, Ámbito farmacéutico, vol.23, 3.

**Paz R. E. L., Ponce de León P. D. y Ramírez P. R.** (2008). Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual, Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima, Perú, Revista Acta Medica Peruana.

**Pla N. R.** (2003). El Uso de Plantas medicinales, Cap del Servei de Planificació Farmaceutica, Direcció general de recursos sanitaris, vol. 15 (8).

**Rahman K. y Lowe G.M.** (2006). Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. J Nutr 2006, 136: 736S740S.

**Rahman, M.S.** (2007). Allicin and other functional active components in garlic: Health benefits and bioavailability. Int. J. Food Prop. 10, 245–268.

**Ramírez-Concepción H.R., Castro-Velasco L.N. y Martínez-Santiago, E.** (2016). Efectos Terapeuticos del ajo (*Allium sativum*).

**Ramos A. N. E., Santacruz J. y Frankshescoly S.** (2012). Evaluación de tres diluciones de un extracto de *Allium sativum* (ajo) y su posible uso como insecticida natural contra el *zabrotes subfasciatus* (gorgojo común del frijol) en grano almacenado. Facultad de El Salvador Química y farmacia. San Salvador, El Salvador Centro América.

**Ramos G.** (1991). El cultivo del ajo en el Estado de Mérida. Maracay, Fondo nacional de investigaciones Agropecuarias.

**Riveros M. y Ochoa T. J. (2015):** Enteropatógenos de importancia en Salud Pública, Rev. Perú Med. Exp. Salud Publica 2015,32 (1): 157-64.

**Rodríguez G.** (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, Revista Salud Publica vol.44 (5) Cuernavaca.

**Rodríguez-Noriega E., León-Garnica G., Petersen-Morfín S., Pérez-Gómez H. R., González-Díaz E. y Morfín-Otero R.** (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. Biomédica, 34(1).

**Salazar C. L.** (2014). Efecto antimicrobiano de extractos de *Allium sativum* L."ajo" sobre el crecimiento *in vitro* de *Escherichia Coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Shin J.H., Choi D.J., Lee S.J., Kwon O.C., Cha J.Y y Sung N.J.** (2008). Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum*). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37, 965–971.

**Sivam G. P.** (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic J Nutr. 131(3s):1106S-8S.

**Souci S.W., Fachman W. y Krant H.** (1994). Food Composition and tables. Stuttgart Press.

**Stoll A. y Seebeck E.** (1952). Chemical investigations on allin, the specific principle of garlic. Advances in Enzimology and Related Areas of molecular Biology, Wiley Interscience, Ed. F.F. Nord, vol.11, 377-400.

**Torija M. E., Matallana M. C. y Nahir C.** (2013). El ajo y la cebolla: de las medicinas antiguas al interés actual Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol., 107, 2937 ISSN: 0366-3272.

**Yaguana J.** (2015). Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y de *Coriandrum sativum* (cilantro) mediante el método de sensibilidad por difusión en agar Bauer-Kirby, sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica serovar typhi* y *Salmonella entérica serovar cholerae suis*: en comparación con los antimicrobianos gentamicina y ampicilina PUCE, Quito.