



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAÚTITLAN

“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA  
DEL EXTRACTO DE *Allium sativum* EN BACTERIAS DE  
IMPORTANCIA MÉDICA”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER ÉL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A:  
VIRIDIANA LÓPEZ JIMÉNEZ

ASESORES: M.EN C. SOFÍA GONZÁLEZ GALLARDO  
M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ  
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:  
Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria del extracto de Allium sativum en bacterias  
de importancia médica

Que presenta la pasante: Viridiana López Jiménez  
Con número de cuenta: 303172282 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcallí, Méx. a de 29 de septiembre 2011.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	MVZ. Gerardo Cruz Jiménez	
<b>VOCAL</b>	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
<b>SECRETARIO</b>	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	
<b>2do SUPLENTE</b>	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ana Delia y Manuel, hermanos Tania, Vanessa y Manuel por todos los buenos momentos vividos, por la confianza y sobre todo por su inmenso apoyo brindado, en especial a ti mamá.

A mi abue Lola a ese ser celestial que desde donde quiera que esta no me deja y siempre está detrás de todas las cosas buenas que me pasan.

A mi abuelo Beto a Vero y Arturo por su confianza y todos los buenos momentos.

A ti Dani porque siempre tuviste un consejo en los momentos en que más dudaba. Gracias por tu comprensión y por tu buen humor.

A Extractos SIGMA por proporcionarme el extracto necesario para realizar este proyecto.

Mis más sinceros agradecimientos a la M. en C. Sofía González Gallardo y al profesor M.V.Z José Antonio Licea Vega por su colaboración en la tesis y por todas las atenciones y facilidades prestadas para este proyecto. MIL GRACIAS !!!!

Mis más efusivas gracias con admiración y respeto al profesor M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez, mi asesor y ahora amigo por brindarme la oportunidad de realizar el servicio social y este proyecto de tesis bajo su dirección.

Gracias también a cada uno de mis sinodales: Dra. Luisa Martínez Aguilar, QFB. Brígida del Carmen Camacho Enriquez, QFB. Leticia Cubillo Carrillo y QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez por su excelente calidad profesional y por su valioso tiempo prestado para revisar, corregir y aportar en este trabajo.

A mis compañeros de generación que aunque no tuve la oportunidad de interactuar con todos, me quedo con lo mejor de quienes si tuve la oportunidad de hacerlo. Muchas gracias por hacer de toda la carrera una experiencia inolvidable.

A todos los que compartieron conmigo buenos momentos durante la realización de mi servicio social y mi proyecto de tesis en el laboratorio 10 de microbiología de la Unidad de Posgrado Sra. Erika, Memo, Diego, Yan, Eulopa, Leticia Linares, Leticia Mendoza, Carolina, Yahel, Jenny. GRACIAS INFINITAS !!!!

A Ivonne, Mónica y Roxana por los buenos momentos compartidos y sobre todo por su solidaridad y amistad sincera.





## DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a todas las personas que me brindaron su apoyo de manera incondicional para poder concluir con mis estudios profesionales, al igual a todas las personas que compartieron buenos y malos momentos durante la carrera pero sobre todo a las personas que confiaron plenamente en mí.





# INDICE

	Pág
INDICE .....	I
INDICE DE FIGURAS .....	IV
INDICE DE FOTOS .....	V
INDICE DE TABLAS .....	VII
INDICE DE GRÁFICAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
RESUMEN .....	XI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Relación huésped bacteria .....	2
1.2 Antimicrobianos .....	2
1.2.1 Clasificación .....	2
1.3 Resistencia bacteriana .....	4
1.3.1 Mecanismos de resistencia .....	5
1.3.2 Valoración de los antimicrobianos .....	7
1.4 El poder curativo de las plantas medicinales. Diferencias frente a los medicamentos de síntesis química .....	7
1.5 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	8
1.5.1 Hábitat .....	8
1.5.2 Características generales .....	8
1.5.3 Epidemiología .....	8
1.6 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.6.1 Hábitat .....	9
1.6.2 Características generales .....	9
1.6.3 Epidemiología .....	9
1.7 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	10
1.7.1 Hábitat .....	10
1.7.2 Características generales .....	10
1.7.3 Epidemiología .....	10
1.8 <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.8.1 Hábitat .....	11
1.8.2 Características generales .....	11
1.8.3 Epidemiología .....	11
1.9 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	12
1.9.1 Hábitat .....	12
1.9.2 Características generales .....	12
1.9.3 Epidemiología .....	12
1.10 <i>Salmonella typhi</i> .....	13
1.10.1 Hábitat .....	13
1.10.2 Características generales .....	13
1.10.3 Epidemiología .....	13
1.11 <i>Shigella flexneri</i> .....	14
1.11.1 Hábitat .....	14
1.11.2 Características generales .....	14
1.11.3 Epidemiología .....	14
1.12 <i>Allium sativum</i> .....	15
1.12.1 Nombre científico .....	15
1.12.2 Nombre común .....	15



1.12.3 Descripción botánica .....	15
1.12.4 Fisiología del desarrollo .....	16
1.12.5 Hábitat .....	17
1.12.6 Parte utilizada.....	17
1.12.7 Historia .....	17
1.12.8 Composición química .....	18
1.12.9 Contenido alimenticio .....	20
1.12.10 Acciones farmacológicas .....	21
1.12.11 Toxicidad y efectos secundarios .....	22
1.12.12 Interacciones .....	22
1.12.13 Precauciones.....	22
1.12.14 Dosis .....	22
1.13 Microscopía electrónica de transmisión .....	23
2. OBJETIVOS .....	24
2.1. Objetivo General .....	24
2.2. Objetivos Particulares .....	24
3. JUSTIFICACIÓN .....	25
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	26
5. MATERIAL.....	27
5.1 Material.....	27
5.2 Material Biológico .....	27
5.3 Medios de Cultivo.....	28
5.4 Reactivos.....	28
5.5 Equipo .....	28
6. METODOLOGÍA.....	30
6.1 Diagrama general de trabajo.....	30
6.2 Preparación de la solución de trabajo del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	31
6.3 Identificación de bacterias.....	33
6.4 Estandarización de las bacterias .....	33
6.5 Método de difusión en agar (cilindro-placa) .....	33
6.6 Microdilución en placa.....	34
6.7 Determinación en placa del efecto bactericida y/o bacteriostático del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Shigella flexneri</i> .....	35
6.8 Técnica colorimétrica de Mosmann .....	35
6.8.1 Determinación de la MIC.....	36
6.9 Microscopía electrónica de transmisión .....	36
6.9.1 Preparación de las bacterias.....	36
6.9.2 Fijación .....	37
6.9.3 Tinción Negativa.....	37
7. RESULTADOS .....	38
7.1 Identificación .....	38
7.1.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	38
7.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
7.1.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	40
7.1.4 <i>Escherichia coli</i> .....	41
7.1.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	42
7.1.6 <i>Salmonella typhi</i> .....	43
7.1.7 <i>Shigella flexneri</i> .....	44
7.2 Prueba de esterilidad a la solución de trabajo .....	45
7.3 Método de difusión en agar (cilindro- placa) .....	46
7.3.1 Bacterias sensibles a la acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	46
7.3.2 Bacterias resistentes a la acción extracto de <i>Allium sativum</i> .....	48



---

---

7.4 Técnica colorimétrica de Mosmann .....	49
7.4.1 Determinación de la MIC del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	49
7.4.2 Determinación de la MIC del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
7.4.3 Determinación de la MIC del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	51
7.4.4 Determinación de la MIC del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Escherichia coli</i> .....	52
7.4.5 Determinación de la MIC del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	53
7.4.6 Determinación de la MIC del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Salmonella typhi</i> .....	54
7.4.7 Determinación de la MIC del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Shigella flexneri</i> .....	55
7.5 Efecto Bactericida/Bacteriostático del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Shigella flexneri</i> .....	56
7.6 Bacterias observadas en Microscopio Electrónico de Transmisión.....	60
7.6.1 Microfotografías de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	60
7.6.2 Microfotografías de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61
7.6.3 Microfotografías de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	61
7.6.4 Microfotografías de <i>Shigella flexneri</i> .....	62
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	63
9. CONCLUSIONES.....	67
10. ANEXOS.....	68
11. BIBLIOGRAFÍAS .....	83
12. HOJA TÉCNICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>ALLIUM SATIVUM</i> .....	87

---

---



# INDICE DE FIGURAS

	Pág
Fig.1 Planta de <i>Allium sativum</i> .....	15
Fig.2 Estructura de los principales componentes del ajo y sus derivados .....	19
Fig.3 Microscopio Electrónico de Transmisión.....	23
Fig.4 Metodología para la preparación de la solución de trabajo del extracto de <i>Allium sativum</i> ...	32
Fig.5 Procedimiento de técnica para determinar en el extracto de <i>Allium sativum</i> un posible efecto bactericida y/o bacteriostático en las 7 cepas trabajadas .....	35



## INDICE DE FOTOS

	Pág
Foto 1. Microplaca con microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> después de adicionar el reactivo MTT .....	36
Foto 2. <i>Streptococcus pyogenes</i> en placa de agar sangre.....	38
Foto 3. RM y VP para <i>Streptococcus pyogenes</i> . .....	38
Foto 4. Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar de sal y manitol. ....	39
Foto 5. Prueba de coagulasa para <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	39
Foto 6. RM y VP para <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	39
Foto 7. Crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en agar de sal y manitol.....	40
Foto 8. Prueba de coagulasa para <i>Staphylococcus epidermidis</i> . ....	40
Foto 9. Prueba RM y VP para <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	40
Foto 10. Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en placa de Agar Eosina - Azul de Metileno .....	41
Foto 11. Pruebas bioquímicas (1) para <i>Escherichia coli</i> .....	41
Foto 12. Pruebas bioquímicas (2) para <i>Escherichia coli</i> .....	41
Foto 13. Pruebas bioquímicas (1) para <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ....	42
Foto 14. Pruebas bioquímicas (2) para <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ....	42
Foto 15. Prueba VP y RM para <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	42
Foto 16. Pruebas bioquímicas (1) para <i>Salmonella typhi</i> . ....	43
Foto 17. Pruebas bioquímicas (2) para <i>Salmonella typhi</i> . ....	43
Foto 18. Crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en agar Sulfito bismuto .....	43
Foto 19. Pruebas bioquímicas (1) para <i>Shigella flexneri</i> . ....	44
Foto 20. Prueba de KIA para <i>Shigella flexneri</i> .....	44
Foto 21. Placa de agar BHI sembrada con el extracto de <i>Allium sativum</i> .....	45
Foto 22. Zona de inhibición del crecimiento de <i>Streptococcus pyogenes</i> por acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	46
Foto 23. Zona de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> por acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	46
Foto 24. Zona de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> por acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	47
Foto 25. Zona de inhibición del crecimiento de <i>Shigella flexneri</i> por acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	47
Foto 26. <i>Escherichia coli</i> resistente a la acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	48
Foto 27. <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a la acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	48
Foto 28. <i>Salmonella typhi</i> resistente a la acción del extracto de <i>Allium sativum</i> .....	48
Foto 29. Microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> con <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	49
Foto 30. Microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> con <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50



---

---

Foto 31. Microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> con <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	51
Foto 32. Microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> con <i>Escherichia coli</i> .....	52
Foto 33. Microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> con <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	53
Foto 34. Microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> con <i>Salmonella typhi</i> .....	54
Foto 35. Microdiluciones del extracto de <i>Allium sativum</i> con <i>Shigella flexneri</i> .....	55
Foto 36. Prueba bactericida y/o bacteriostático para <i>Streptococcus pyogenes</i> en placa de agar BHI.....	56
Foto 37. Prueba bactericida y/o bacteriostático para <i>Staphylococcus aureus</i> en placa de agar BHI.....	56
Foto 38. Prueba bactericida y/o bacteriostático para <i>Staphylococcus epidermidis</i> en placa de agar BHI.....	57
Foto 39. Prueba bactericida y/o bacteriostático para <i>Escherichia coli</i> en placa de agar BHI.....	57
Foto 40. Prueba bactericida y/o bacteriostático para <i>Klebsiella pneumoniae</i> en placa de agar BHI.....	58
Foto 41. Prueba bactericida y/o bacteriostático para <i>Salmonella typhi</i> en placa de agar BHI. ....	58
Foto 42. Prueba bactericida y/o bacteriostático para <i>Shigella flexneri</i> en placa de agar BH .....	59
Foto 43. Microfotografías electrónicas de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	60
Foto 43. Microfotografías electrónicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61
Foto 43. Microfotografías electrónicas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	61
Foto 43. Microfotografías electrónicas de <i>Shigella flexneri</i> .....	62

---

---



## INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Principales mecanismos de resistencia .....	5
Tabla 2. Contenido alimenticio del ajo por cada 100 gramos .....	20
Tabla 3. Pruebas de identificación realizadas a <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	38
Tabla 4. Pruebas de identificación realizadas a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
Tabla 5. Pruebas de identificación realizadas a <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	40
Tabla 6. Pruebas de identificación realizadas a <i>Escherichia coli</i> .....	41
Tabla 7. Pruebas de identificación realizadas a <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	42
Tabla 8. Pruebas de identificación realizadas a <i>Salmonella typhi</i> .....	43
Tabla 9. Pruebas de identificación realizadas a <i>Shigella flexneri</i> .....	44
Tabla 10. Prueba bactericida/bacteriostático en bacterias Gram (+).....	59
Tabla 11. Prueba bactericida/bacteriostático en bacterias Gram (-).....	59



## INDICE DE GRÁFICAS

	Pág
Gráfica 1. Ensayo de la actividad biológica del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Streptococcus pyogenes</i> . .....	49
Gráfica 2. Ensayo de la actividad biológica del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	50
Gráfica 3. Ensayo de la actividad biológica del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	51
Gráfica 4. Ensayo de la actividad biológica del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Escherichia coli</i> . .....	52
Gráfica 5. Ensayo de la actividad biológica del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	53
Gráfica 6. Ensayo de la actividad biológica del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Salmonella typhi</i> . .....	54
Gráfica 7. Ensayo de la actividad biológica del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Shigella flexneri</i> . .....	55



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Bco	Blanco
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Medio de cultivo)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
C/+	Control positivo
C/-	Control negativo
D	Dudoso
DAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroadherente difusa
DAS	Sulfuro de dialilo
DADS	Disulfuro de dialilo
DATS	Trisulfuro de dialilo
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
H <sub>2</sub> S	Ácido Sulfhídrico
h	Horas
IMVIC	Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer, Citrato
KIA	Agar Hierro de Kligler
LAP	Leucina-Aminopeptidasa
LIA	Agar Lisina Hierro
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2 y 1]-2,5-dimetiltetrazolio
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes
MIO	Motilidad, Indol, Ornitina
O/F	Oxidativo/Fermentativo
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PYR	Pirrolinodil-arilamidasa
p.m.	Peso molecular
RM	Rojo de Metilo
r.p.m	Revoluciones por minuto
SSF	Solución Salina Fisiológica
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril
SIM	Motilidad, Indol, Presencia de H <sub>2</sub> S
TSI	Triple Hierro Azúcar
Tn	Transposones
UFC	Unidad Formadora de Colonia
UI	Unidades Internacionales
VP	Voges-Proskauer
nm	Nanómetros
µm	Micrómetros
mm	Milímetro



---

---

cm	Centímetros
µl	Microlitros
ml	Mililitros
µg	Microgramo
mg	Miligramos
g	Gramo
°C	Grado Celsius
(+)	Positivo
(-)	Negativo



## RESUMEN

Con el fin de analizar el comportamiento del extracto de *Allium sativum* frente a cepas bacterianas de relevancia médica, se evaluó *in vitro* la actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*, realizando ensayos extracto-bacteria empleando la técnica de Mosmann. Para la realización de este estudio se identificó cada cepa bacteriana por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias así como su crecimiento en medios selectivos.

En cuanto al extracto de ajo (*Allium sativum*) se trabajó con uno de naturaleza hidroalcohólico el cual se esterilizó pasándolo a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y para comprobar dicha esterilidad se sembró de manera masiva en una placa de Agar BHI obteniendo un resultado negativo de crecimiento microbiano. El extracto se concentró hasta sequedad total en el horno Pasteur a una temperatura de 37-45 °C y realizando un raspado en el interior del desecador fue posible la obtención de los cristales del extracto, los cuales fueron recolectados, pesados y con ellos se preparó bajo condiciones estrictas de esterilidad una solución de trabajo de concentración (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Posteriormente se realizó la Técnica cilindro-placa (prueba cualitativa) con la finalidad de evaluar un posible efecto inhibitorio del extracto hacia el crecimiento de la bacteria. Con respecto a la técnica de Mosmann (prueba cuantitativa) se realizaron diluciones dobles decrecientes del extracto hasta una concentración de (0.390625  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) con un control negativo, positivo y un blanco con la finalidad de determinar la CMI y la actividad bactericida y/o bacteriostática del extracto. Finalmente con el propósito de evidenciar un posible daño en la bacteria se trabajó la Microscopía Electrónica de Transmisión empleando la técnica de tinción negativa.

El extracto de *Allium sativum* demostró poseer actividad inhibitoria en 4 de las 7 cepas bacterianas ensayadas (57.14%): *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Shigella flexneri*. Mientras que la Microscopía Electrónica de Transmisión nos aportó una idea del sitio donde se produjo el daño en las bacterias, ya que se logró observar la formación de protoplastos y esferoplastos en la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente.



# 1. INTRODUCCIÓN

Desde el principio de la existencia del ser humano, su lucha por la supervivencia se estableció con otros seres vivos de muy diversos tamaños. Algunos tan pequeños que no se veían ni se tocaban, sin embargo estos microorganismos, en la batalla por su propia supervivencia infligieron a la especie humana grandes pérdidas. Se les llamaron plagas (como las de Egipto), o pestes (como la Peste Bubónica) o, más modernamente epidemias como la gripe o el cólera. Fueron necesarios muchos años hasta que empezaron a identificarse, gracias al microscopio, bacterias, riketsias y virus.

En 1897, el médico francés E. Dúchense demostró que ciertos mohos podían tener la proliferación de cepas bacterianas.

En 1929, A. Fleming evidencio la acción lítica sobre el estafilococo dorado, de una cepa de *Penicillium notatum*. Gracias a él, se produjo el descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina, adentrándonos en la era antibiótica.

En 1941, E. B. Chain aisló la sal sódica, amorfa e impura de la penicilina aplicando diversas técnicas de extracción y purificación.

Años después, H. W. Florey la sintetizó a escala industrial.

Desde entonces, se han preparado numerosas moléculas en búsqueda del antibiótico ideal, caracterizado por ser efectivo para todas las infecciones, generar solo el efecto buscado, no generar resistencias, actuar en cualquier parte del organismo, ser útil por vía oral, ser económicamente accesible.

Los extractos de plantas se han usado desde la antigüedad para el tratamiento de distintas enfermedades. Con el descubrimiento de la penicilina, la fitoterapia pasó a un segundo plano y el desarrollo y uso de los antibióticos se volvió generalizado. En los últimos años, el renovado interés por lo natural y lo orgánico ha propiciado el resurgimiento de los extractos naturales y ha generado nuevas líneas de investigación. Se conocen aproximadamente 3.000 plantas con potencial antimicrobiano.

El ajo (*Allium sativum*) pertenece a la familia *Alliaceae* compuesta por 2250 géneros y unas 3.500 especies, en su mayoría geófilas productoras de bulbos como las cebollas y tulipanes. Además de carbohidratos (fructanos) y vitaminas, el bulbo de ajo contiene saponinas y también presenta un alto contenido de compuestos azufrados, uno de los cuales, es la aliína que constituye el 0.24 % del peso total del bulbo. Este compuesto está formado por el aminoácido cisteína con un grupo propenilo unido al azufre y éste último oxidado a sulfóxido, que se degrada enzimáticamente a alicina cuando el ajo es sometido a tratamiento mecánico de trozado o molido.<sup>71</sup>

En los últimos años, se le ha estado dando importancia y difusión a este vegetal al tratar de educarnos para estimularnos en su consumo, brindándonos mayor información en cuanto a sus propiedades y la manera cómo actúa como medio preventivo y curativo en las distintas enfermedades.



## 1.1 Relación huésped bacteria

La población normal de microorganismos que forman la flora microbiana del interior y exterior del cuerpo humano se encuentra en un permanente estado de equilibrio para evitar o neutralizar los mecanismos de defensa del huésped. En el huésped en circunstancias normales, un gran número de factores actúan para mantener el delicado balance huésped-microorganismo. Hay evidencia de que la ruptura de este equilibrio puede estar asociada con la disminución de la inmunocompetencia del huésped o con la adquisición o expresión de un factor de virulencia de la bacteria. Así la enfermedad infecciosa es generalmente la consecuencia de la interacción entre un microorganismo de relativamente alta virulencia con un huésped normal o entre un microorganismo menos virulento y un huésped normal con algún grado de disminución en sus mecanismos de defensa, ya sea transitorio o permanente.<sup>26</sup>

## 1.2 Antimicrobianos

En un principio los antimicrobianos se sintetizaron en el laboratorio denominándose quimioterápicos, posteriormente se obtuvieron a partir de otros microorganismos por lo que se creó el término de antibiótico.<sup>26</sup>

- **Antibióticos:** Sustancias químicas producidas por microorganismos que poseen acción antimicrobiana.<sup>18</sup>
- **Quimioterápicos:** Compuestos obtenidos por síntesis química dotados de acción antimicrobiana.<sup>18</sup>
- **Antimicrobianos:** Es el término más aceptado, pues incluye compuestos obtenidos a partir de microorganismos (antibióticos) y los producidos por síntesis química (quimioterápicos). Muchos antibióticos se pueden obtener por síntesis después de su caracterización. La mayoría de los más modernos son debidos a semisíntesis química. Los antimicrobianos ejercen su acción de forma específica sobre alguna estructura o función microbiana. Poseen una elevada potencia biológica, es decir, que inhiben o destruyen las bacterias a muy baja concentración lo cual les diferencia de otras sustancias con acción antimicrobiana, pero solamente cuando se utilizan a concentraciones muy elevadas y presentan una toxicidad selectiva, es decir, una mínima toxicidad para las células del organismo.<sup>18</sup>

### 1.2.1 Clasificación

Existen diferentes criterios para agruparlos: origen, efecto antimicrobiano, espectro, mecanismo de acción. Estructura química, etc.<sup>53</sup>

**Por su efecto antimicrobiano pueden ser:**

- a) **Bacteriostáticos:** A las concentraciones que alcanza en suero y tejidos impiden el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas. Cuando se retira el antibacteriano, el microorganismo puede multiplicarse de nuevo. Con este tipo antimicrobianos (cloranfenicol, tetraciclinas), es fundamental la actuación de los mecanismos defensivos del huésped.
- b) **Bactericidas:** Su acción es letal, produciendo la lisis bacteriana con efectos irreversibles (betalactámicos, glucopéptidos). No obstante a veces un determinado compuesto puede comportarse de forma diferente en función del tipo de bacteria sobre la que actúe<sup>53</sup>.

**Por el espectro pueden clasificarse en:**

- a) **Amplio espectro:** Moléculas que son activas sobre un número amplio de especies bacterianas (tetraciclinas).
- b) **Espectro intermedio:** Cuando tiene acción sobre un número limitado de especies (macrólidos)
- c) **Espectro reducido:** Son activos sobre un pequeño número de especies bacterianas (glucopéptidos)<sup>53</sup>.

**Por el mecanismo de acción;** cada familia o grupo de antibacterianos tiene una forma característica y preferente de actuación en relación con la estructura química que posean.

Pueden actuar:

- a) **Impidiendo la síntesis de la pared bacteriana.** La pared celular de las bacterias está compuesta por peptidoglicano. Esta estructura, que es más gruesa en las Gram positivas, entre otras funciones protege a la célula de su destrucción por estallido en un medio normal, no hiperosmótico puesto que las bacterias tienen una gran presión osmótica interna. Las células, debido a su crecimiento, están continuamente sintetizando nuevo peptidoglicano y transportándolo a su sitio adecuado en la pared celular. Varios antibióticos inhiben una o varias de las enzimas que se requieren para completar este proceso originando que la célula desarrolle puntos frágiles en su pared celular debido a la síntesis de peptidoglicano deficiente, lo que origina que sea osmóticamente frágil. Los antibióticos que producen este efecto se consideran bactericidas ya que la célula debilitada está sujeta a lisis. La mayor parte de estos antibióticos son activos frente a células en crecimiento ya que las células viejas no sintetizan peptidoglicano<sup>53</sup>.  
Casi todos los antibióticos dotados de este mecanismo de acción se clasifican como  $\beta$ -lactámicos (p.ej., penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos, monolactámicos) debido a que comparten una estructura común de anillo  $\beta$ -lactámico.



- b) Alterando la permeabilidad de las membranas citoplasmáticas de la bacteria.** La membrana bacteriana actúa como una barrera selectiva, controlando la composición del medio interno celular. Por ello, cuando es modificada se alteran los procesos de permeabilidad y la célula pierde proteínas, iones y ácidos nucleicos, y se produce de esta forma la lisis bacteriana.
- c) Inhibiendo la síntesis proteica.** La síntesis comienza con la transcripción a ARNm de la información genética presente en el ADN del cromosoma bacteriano por intervención de una ARN-polimerasa. El proceso se realiza en tres etapas: iniciación, elongación (que comprende tres fases: reconocimiento, transferencia y translocación) y terminación. Son varios los antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica. En general, los antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica son bacteriostáticos, excepto los aminoglucósidos y la mupirucina.
- d) Bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos.** La biosíntesis de moléculas de RNA y DNA consiste en una larga serie de reacciones catalizadas por enzimas que al igual que cualquier otro proceso complejo es susceptible de romperse en diferentes puntos. Una inhibición en un punto de la secuencia puede bloquear las reacciones posteriores. Los antibióticos que interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos esencialmente actúan bloqueando la síntesis de sus componentes, inhibiendo la replicación o parando la transcripción.
- e) Interfiriendo en las vías metabólicas.** Al inhibir la síntesis de metabolitos esenciales (bases púricas o pirimídicas) también se altera la síntesis de ácidos nucleicos. De esta forma actúan las sulfamidas y las diaminopirimidonas (trimetoprim).

### 1.3 Resistencia bacteriana

Se denomina resistencia a la susceptibilidad disminuida o nula de una cepa bacteriana a un antimicrobiano, o de forma práctica, cuando su crecimiento solamente se inhibe con concentraciones superiores a las que ese fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección. Puede estar relacionada por factores ambientales o del microorganismo. La resistencia ambiental es la debida a factores fisicoquímicos que puedan determinar que un antibiótico sea inactivo frente una bacteria.<sup>37</sup>

El problema de resistencia antimicrobiana se hace aún mayor cuando un microorganismo puede presentar más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no solo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie a través de mecanismos de conjugación o transducción.<sup>18</sup>

La resistencia dependiendo del microorganismo es la más importante y puede ser:

- **Natural o intrínseca o insensibilidad natural**, es la que presentan algunas bacterias de forma preestablecida.



- **Resistencia adquirida** que surge a lo largo del tiempo y es la más importante desde el punto de vista clínico. Está ocasionada por modificaciones en la carga genética de la bacteria, cromosómica o extracromosómico.<sup>37</sup>

### 1.3.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana aparece por cuatro mecanismos, que actúan aislada o asociadamente. El primero consiste en la inactivación (hidrólisis) y decodificación (introducción de distintos radicales en diferentes posiciones del antimicrobiano) enzimáticas. El segundo engloba los cambios en las dianas o puntos de acción (proteínas fijadoras de penicilinas, ribosomas, cadenas metabólicas, enzimas). El tercero se basa en alteraciones en la penetración al antimicrobiano e incluye modificaciones en la permeabilidad o difusión, que es un proceso pasivo, que aparece en bacterias Gram negativas, micobacterias y en la captación, que es un fenómeno de transporte activo. El cuarto consiste en la eliminación activa del antimicrobiano por parte de la bacteria y se conoce como eflujo.<sup>18</sup>

Tabla 1. Principales mecanismos de resistencia.<sup>18</sup>

<b>PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA</b>
<b>Enzimáticos de inactivación y detoxificación</b>
• Betalactámicos
• Aminoglucósidos
• Cloranfenicol
<b>Alteraciones en el lugar de acción</b>
• Betalactámicos
• Estreptomicina
• Eritromicina
• Clindamicina
• Quinolonas
• Rifampicina
• Sulfonamidas
• Tetraciclina
• Trimetoprima
<b>Alteraciones en la penetración</b>
• Betalactámicos
• Cloranfenicol
• Quinolonas
• Tetraciclina
• Trimetoprima
<b>“Eflujo” activo</b>
• Quinolonas
• Tetraciclina
• Macrólidos
• Betalactámicos



- **Mecanismos enzimáticos de inactivación**

Diversas enzimas pueden modificar los antibióticos destruyéndolos o convirtiéndolos en derivados inactivos. Es la principal forma de resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos.

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico. Puede inactivar penicilinas (penicilinasas), cefalosporinas (cefalosporinasas, carbapenems carbapenemasas) o distintas combinaciones de estos antimicrobianos (amplio espectro). Pueden ser cromosómicas, plasmídicas, inducibles o constitutivas (sintetizarse en presencia o ausencia de un inductor). Son producidas principalmente por *Estafilococos*, *Enterobacterias*, *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* y algunas bacterias anaerobias, pero otras muchas bacterias son capaces de sintetizarlas.

En los *Estafilococos*, las betalactamasas son plasmídicas, inducibles y generalmente extracelulares.

En las bacterias Gram negativas se sitúan en el espacio periplásmico, son de origen plasmídico o codificadas por transposones, casi siempre constitutivas o cromosómicas inducibles o constitutivas; éstas, por mutación, pueden desreprimirse y transformarse en constitutivas.

Los aminoglucósidos por modificaciones enzimáticas pierden afinidad por el ribosoma. Estas enzimas son codificadas por genes plasmídicos o cromosómicos, son de tipo constitutivo y en algunos casos son vehiculados por transposones. El cloranfenicol pierde afinidad por el ribosoma debido principalmente a una cloranfenicol-acetiltransferasa, generalmente plasmídica. Suele ser inducible en las bacterias Gram positivas y constitutivas en las Gram negativas. Otros antibióticos como macrólidos y tetraciclinas pueden ser inactivados por modificaciones enzimáticas, aunque generalmente éste no es el principal mecanismo de resistencia.

- **Cambios en los puntos de acción**

Las alteraciones en las proteínas ligadoras de penicilina PBP son una de las causas de la resistencia a los betalactámicos. Se deben a mutaciones cromosómicas o a transformación. La resistencia por alteraciones en los ribosomas es consecuencia de mutaciones que cambian la secuencia de las bases. En otras ocasiones, la resistencia se debe a la producción de una enzima de afinidad reducida por el antimicrobiano (dihidropteroato sintetasa o de hidrofolato reductasa en sulfamidas y trimetoprima, respectivamente).

- **Alteraciones en la penetración**

La resistencia se debe a que el antimicrobiano no puede llegar a su diana por la falta de difusión (aparece en Gram negativos y micobacterias). Está relacionada con la propia estructura de la bacteria (p.ej., los macrólidos no penetran bien en los Gram negativos por el carácter hidrofóbico de su membrana externa) con disminución o modificación de las purinas (betalactámicos), y por captación. Los aminoglucósidos penetran en las bacterias, gracias a su sistema de transporte activo oxígeno-dependiente, los anaerobios obviamente son resistentes a estos antimicrobianos.



- **“Eflujo” activo**

En ocasiones, la resistencia aparece cuando un antimicrobiano, una vez que ha penetrado en el interior de las bacterias, es eliminado por bombas de expulsión presentes en sus paredes o membranas. Este mecanismo se ha descrito en tetraciclinas, macrólidos y quinolonas, entre otros, tanto para Gram positivos como para Gram negativos.

### 1.3.2 Valoración de los antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad de las bacterias es necesario porque el espectro de actividad de los antimicrobianos es limitado y las bacterias tienen capacidad para desarrollar resistencia. Para ellos es necesario conocer el concepto de concentración mínima inhibitoria (**CMI**), que es la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas, y concentración mínima bactericida (**CMB**), que es la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de destruir el 99.9% de una muestra inoculada en unas condiciones normalizadas.<sup>18</sup>

## 1.4 El poder curativo de las plantas medicinales. Diferencias frente a los medicamentos de síntesis química.

La vida vegetal se caracteriza por su autotrofia, lo que significa capacidad de las plantas para nutrirse a sí mismas a partir de la materia muerta del suelo o sustancias inorgánicas y el uso de la energía. Otra propiedad vital de las plantas es su capacidad de sintetizar un elevado número de compuestos químicos o principios activos (se han identificado hasta el momento unos 12.000 diferentes); cuya función es primordial para la planta como adaptación al medio en que vive, a las condiciones atmosféricas, resistencia frente a otras plantas, animales o insectos, atracción o defensa frente a insectos. Este es el origen fundamental de los innumerables principios activos de las plantas y sus infinitas posibilidades terapéuticas.

**Los medicamentos de síntesis química** resultan de la obtención de un solo principio activo, normalmente también con una única acción terapéutica rápida, específica, potente y eficaz. Por el contrario al tratarse muchas veces de sustancias de carácter inorgánico o mineral que se comportan como sustancias extrañas al organismo humano, éste puede limitar su absorción; también se pueden dañar otros órganos o funciones del cuerpo humano, o provocar reacciones alérgicas, u otros efectos secundarios como la aparición de resistencias.

**Las plantas medicinales** sin embargo se caracterizan por aportar al organismo múltiples principios activos que al tratarse de moléculas orgánicas se absorben fácilmente y su efecto depende de la acción conjunta de variadas sustancias que se potencian y equilibran mutuamente pudiendo beneficiar a diferentes órganos o funciones del organismo. Si bien su acción es más lenta, seguramente será más persistente en el cuerpo; no es frecuente la aparición de resistencias, o provocar efectos tóxicos. Se tiene en cuenta sin embargo, que aunque no con la frecuencia de los medicamentos químicos, las plantas medicinales también tienen sus limitaciones y efectos secundarios que son precisos conocer.<sup>13</sup>



## 1.5 *Streptococcus pyogenes*

### 1.5.1 Hábitat

*Streptococcus pyogenes* habita el tracto respiratorio superior formando parte de la flora normal en muchos individuos.<sup>7</sup>

### 1.5.2 Características generales

*Streptococcus pyogenes* también denominado *Streptococcus* del grupo A, son cocos Gram positivos de forma esférica u oval, de 1-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se disponen en pareja o en cadenas por la existencia de puentes de pared celular.<sup>7</sup>

Son aerobios y anaerobios facultativos, creciendo ligeramente mejor en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 10%. Crecen bien a 35-37°C, aunque algunas especies pueden hacerlo perfectamente entre 10 y 50°C<sup>55</sup>. No producen catalasa, ni oxidasa y fermentan la glucosa con formación de ácidos. Son exigentes en sus necesidades nutritivas y de cultivo, siendo también inmóviles.

El crecimiento es óptimo en un medio de agar sangre enriquecido, pero se inhibe si el medio contiene una concentración elevada de glucosa. Después de 24 h de incubación se observan colonias blancas de 1 a 2 mm con grandes zonas de Beta hemólisis.<sup>56</sup>

Algunas cepas, las que producen en grandes cantidades ácido hialurónico capsular, crecen con la apariencia de una gota de agua en la placa, pero esto ocurre también de forma excepcional. Por lo general, las cepas menos mucosas asumen un aspecto arrugado denominado mate, mientras que las colonias pequeñas y opacas que carecen de cápsula y proteína M detectable se denominan brillantes<sup>58</sup>. *Streptococcus pyogenes* es incapaz de oxidar azúcares y posee un metabolismo fermentativo de la glucosa y otros carbohidratos formando ácido láctico, aunque nunca gas. Produce además leucina-aminopeptidasa (LAP) y pirrolidonil-arilamidasa (PYR). Esta última característica rara vez es compartida por otros miembros de su mismo género. Además, es uniformemente sensible a la Bacitracina.<sup>15</sup>

### 1.5.3 Epidemiología

Algunas especies forman parte de la "biota normal" del hombre y otras se relacionan con amigdalitis, celulitis, erisipela, faringitis, rinitis, pioderma, escarlatina, neumonía, caries, meningitis, infecciones en vías urinarias y de heridas, además de las secuelas no supurativas como la fiebre reumática, y la glomerulonefritis.

Los estreptococos del grupo A colonizan normalmente la orofaringe de los niños sanos y de los adultos jóvenes. Aunque se considera que la incidencia del estado de portador es del 15 al 20%. La colonización con *Streptococcus pyogenes* es transitoria, regulada tanto por la capacidad de la persona para desarrollar una inmunidad específica frente a la proteína M de la cepa colonizadora, como a la presencia de microorganismos competitivos en la orofaringe.

La faringitis producida por *Streptococcus pyogenes* es una enfermedad fundamentalmente de niños entre 5 y 15 años, aunque los lactantes y los adultos también son susceptibles. El patógeno se extiende de persona a persona a través de gotitas respiratorias. El hacinamiento



como en el caso de las aulas y las guarderías, aumenta las oportunidades que tiene el microorganismo de diseminarse, fundamentalmente en los meses de invierno.

Las infecciones de los tejidos blandos (por ejemplo Hypoderma, erisipela, celulitis, fascitis) se ven producidas por una colonización inicial de la piel con estreptococos del grupo A, después de la cual los microorganismos se introducen en los tejidos superficiales o profundos a través de una solución de continuidad en la piel.<sup>59</sup>

## 1.6 *Staphylococcus aureus*

### 1.6.1 Hábitat

*S. aureus* habita el tracto respiratorio superior especialmente la nariz, la garganta y la superficie de la piel, formando parte de la flora normal en muchos individuos incluyendo pacientes y personal de hospitales.<sup>18</sup>

### 1.6.2 Características generales

Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos, de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, catalasa positivo, se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétrado o formando racimos irregulares (término derivado del griego *staphylé*: racimo de uvas. Son inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula.<sup>60</sup>

Son bastante resistentes al frío y al calor y pueden tolerar altas concentraciones de sal (son bacterias halófilas). *S. aureus* especie coagulasa positiva, crece rápidamente en agar sangre, sus colonias miden de 1-3 mm y producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis entre las 24-36 horas.<sup>60</sup>

Su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre los que destaca el manitol, para producir ácido láctico lo que le diferencia de los demás estafilococos. Son poco exigentes en sus necesidades; crecen bien en cualquier medio ordinario, aunque lo hacen mejor en los medios enriquecidos con una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C.<sup>55</sup>

### 1.6.3 Epidemiología

*S. aureus* es un reconocido patógeno humano, siendo agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial, tratándose de un agente con una creciente resistencia a los fármacos antimicrobianos<sup>40</sup>. La resistencia de estas bacterias a condiciones adversas hace que sea un importante patógeno, ya que puede causar brotes epidémicos principalmente en hospitales.<sup>18</sup>

Posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce infecciones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus



enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además causa septicemia, impétigo y fiebres.<sup>60</sup>

Con respecto a la susceptibilidad a los antimicrobianos las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia y se pueden encontrar cepas resistentes y multiresistentes. La adquisición de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS)<sup>60</sup>. La presencia de la enzima  $\beta$ -lactamasa (codificada y transmitida mediante plásmidos), condiciona la resistencia de estos microorganismos a todos los antibióticos beta lactámicos (penicilina y derivados). La aparición de penicilinas que resisten la acción de las beta lactamasas, como oxacilina o meticilina, parece solucionar el grave problema que representaba la inutilidad terapéutica de la penicilina G.

En estos últimos años ha aparecido un aumento de resistencia de los estafilococos a la meticilina, considerándose un grave problema a nivel hospitalario. Estas cepas se denominan por sus siglas en inglés MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes).

Antibióticos tradicionales tales como vancomicina o lincomicina siguen siendo buenas opciones para el tratamiento de las infecciones producidas por estos microorganismos. Sin embargo nuevas moléculas como roxitromicina o teicoplanina aparecen para aliviar la presión que sufren los hospitales ante este aumento de resistencias a los antibióticos comúnmente utilizados.<sup>55</sup>

## 1.7 *Staphylococcus epidermidis*

### 1.7.1 Hábitat

Forma parte de la flora habitual de la piel y las mucosas, como fosas nasales, oído y axilas.

### 1.7.2 Características generales

Es un Gram positivo no móvil. No forma esporas, puede encontrarse solo, en cadenas cortas o en racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aeróbicas, es catalasa positiva, oxidasa y coagulasa negativa, no tiene la capacidad de fermentar al manitol y crece rápidamente en agar sangre formando colonias de color blanquecino. Es sensible a la novobiocina. Se caracteriza por su adherencia, que le permite colonizar catéteres y prótesis. Algunas cepas producen un biofilme o capa de polisacáridos que aumenta la adherencia y les protege de la acción de los antimicrobianos por lo que el tratamiento debe comenzar eliminando el material contaminado.<sup>18</sup>

### 1.7.3 Epidemiología

Las infecciones causadas por *S. epidermidis* son en general de poca gravedad, pero puede tener importancia si no se tratan a tiempo. Las más importantes son las infecciones de cuerpos extraños en el paciente hospitalizado (el 45% de las infecciones de catéteres intravenosos se deben a este microorganismo). Normalmente la retirada del catéter y la



administración empírica de vancomicina son suficientes para la curación, pero si el diagnóstico es tardío se puede producir una bacteriemia. Otra infección común por este patógeno son las endocarditis precoces y tardías por contaminación de válvulas infectada. Dispositivos como catéteres peritoneales, derivaciones de LCR o prótesis osteoarticulares también son susceptibles de contaminación por estos microorganismos y también son productores de infecciones urinarias en enfermos sondados, operados o trasplantados de riñón. En enfermos con neutropenia grave pueden ser causantes de bacteriemias por cepas multirresistentes.<sup>38</sup>

## 1.8 *Escherichia coli*

### 1.8.1 Hábitat

*Escherichia coli* es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano. El huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida. Sin embargo, se ha precisado que seis grupos patógenos de *E. coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos.<sup>50</sup>

### 1.8.2 Características generales

*E. coli* es un bacilo Gram negativo móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), se caracteriza por ser anaerobio facultativo y no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, su prueba de IMVIC es ++-- .Es catalasa positiva y oxidasa negativa<sup>7</sup>. Se encuentra clasificado dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas), existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas. Estas *E. coli* se clasifican con base a las características que presentan sus factores de virulencia únicos, cada grupo provoca la enfermedad por un mecanismo diferente. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos gruesos y delgados son codificadas por genes situados en plásmidos<sup>61</sup>. De manera similar las toxinas son mediadas por plásmidos o fagos. Este grupo de bacterias se encuentra constituido por las siguientes cepas: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroadherente difusa (DAEC)<sup>50</sup>. Existen otras cepas que no han sido perfectamente caracterizadas; de las cepas anteriores, las cuatro primeras están implicadas en intoxicaciones causadas por el consumo de agua y alimentos contaminados.<sup>61</sup>

### 1.8.3 Epidemiología

Estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo, incluido México, han demostrado que ETEC y EPEC son dos de los principales patógenos aislados en los casos de diarrea infantil<sup>9,34</sup>. Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud en México, se ha comunicado que EPEC se presenta en forma endémica hasta en



6% de la población, una cifra muy parecida a la informada para países industrializados como Alemania y Australia, en los que se ha encontrado que 5.9 y 7.6 %, respectivamente, de niños sanos son portadores normales de cepas de EPEC. En lo que respecta a niños con diarrea, en México se ha detectado un alto porcentaje de pacientes infectados con EPEC. En un estudio que se condujo en Guadalajara, Jalisco, en 1987, se logró aislar cepas de EPEC en 17.5% de los casos de niños menores de dos años con diarrea. En este estudio se identificó EPEC con mayor frecuencia que otros patógenos típicos, como *Shigella*, *Giardia*, *Salmonella* o rotavirus. Por otro lado, Cravioto y cols (1991) llevaron a cabo un estudio en niños con diarrea de una población rural del estado de Morelos. Ellos aislaron cepas de EPEC en 19% de los casos de diarrea en niños de esa región.<sup>10</sup> En la mayor parte de los estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo, así como en México, se ha observado que la infección por EPEC tiene una elevada tasa de morbilidad y mortalidad, lo que resalta la importancia de realizar un diagnóstico microbiológico certero y eficaz.

## 1.9 *Klebsiella pneumoniae*

### 1.9.1 Hábitat

*Klebsiella spp.* Es ubicua en la naturaleza. Probablemente tiene dos hábitats comunes: el medio ambiente y las superficies mucosas de los mamíferos. En humanos portadores de *Klebsiella pneumoniae* se encuentran en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal.<sup>42</sup>

### 1.9.2 Características generales

Se caracteriza por un crecimiento mucoide, grandes capsulas de polisacárido y ausencia de motilidad. Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas.

En la tinción de Gram son negativos; la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el Agar MacConkey donde las colonias son de color rosado y en el medio Kligler o TSI donde son Ácido/Ácido, es decir fermentador de la lactosa y en la prueba de Voges Proskauer son positivos<sup>54</sup>, por lo general dan pruebas positivas para lisina descarboxilasa y para el citrato. Sus condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo a 37 °C.

### 1.9.3 Epidemiología

Está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes mellitus o alcohólicos.<sup>7</sup>



Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. *K. pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías y es el segundo agente causal, tras *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas. Las terapias antimicrobianas, además, han sido a menudo responsables de la emergencia de cepas de *Klebsiella* resistentes a múltiples antibióticos en hospitales, lo cual ha generado un renovado interés en el estudio de *Klebsiella* como agente infeccioso.<sup>18</sup>

## 1.10 *Salmonella typhi*

### 1.10.1 Hábitat

Está ampliamente distribuida en la naturaleza, y se encuentra como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de diversos animales como aves, mamíferos, reptiles y algunas tienen su reservorio exclusivo en el hombre como es *Salmonella typhi*, que afecta al ser humano.<sup>7</sup>

### 1.10.2 Características generales

*Salmonella typhi* es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es móvil por medio de flagelos peritricos, anaerobio facultativo no encapsulado y no esporulado. Producen catalasa, pero no oxidasa. Dentro de sus propiedades bioquímicas, no fermenta la lactosa, fermentan glucosa con producción de gas, no producen indol, no degradan la urea, descarboxilan lisina. Se desarrollan entre 8 y 45°C y a un pH entre 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores de 70°C.<sup>28</sup>

### 1.10.3 Epidemiología

*Salmonella* es uno de los géneros bacterianos que se encuentran asociados a brotes de enfermedades de origen hídrico, ya que son aislados de agua fresca, agua dulce y agua salada, además de ciertos alimentos. Estas bacterias son capaces de sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés por largos períodos de tiempo, pueden resistir la deshidratación, sobrevivir en el suelo y en el agua.

La fiebre tifoidea es una infección de origen entérico que produce un cuadro febril con dolor abdominal difuso y que puede desarrollar complicaciones graves como perforación. Sólo afecta al hombre y en la mayoría de los casos el agente causal es *Salmonella typhi*; en otros casos se debe a otros serotipos como *S. paratyphi A*, *S. schottmuelleri* (antes paratyphi B), *S. hirschfeldenteii* (antes paratyphi C), siendo entonces denominado el cuadro como fiebre paratifoidea con una afectación menor del estado general.<sup>7</sup>

El mecanismo de contagio es feco-oral, siendo la causa inmediata el agua o alimentos contaminados. El desarrollo de la enfermedad dependerá del número de bacilos ingeridos para que colonicen la mucosa del intestino delgado, siendo  $\geq 10^9$  UFC/ingesta de agua o alimento.<sup>7</sup>



## 1.11 *Shigella flexneri*

### 1.11.1 Hábitat

El intestino del ser humano es el único reservorio conocido de este agente.

### 1.11.2 Características generales

*Shigella flexneri* es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Producen catalasa, pero no oxidasa, se caracteriza por no fermentar la lactosa, ser inmóvil y no producir lisina decarboxilasa, raramente produce gas a partir de hidratos de carbono.

### 1.11.3 Epidemiología

Las distintas especies de *Shigella* constituyen la principal causa de disentería, diarrea caracterizada por eliminación frecuente de heces conteniendo pus, sangre y/o mucus. El intestino del ser humano infectado es el único reservorio conocido. La transmisión se produce por mecanismo feco-oral, de persona a persona, es por lo tanto fácilmente transmisible a través de las manos, agua, alimentos o fómites contaminados con una fuente común y puede sobrevivir hasta 30 días en alimentos<sup>57</sup>. También se ha podido evidenciar que la mosca doméstica puede actuar como vector de éste germen.<sup>19</sup>

Afecta sobre todo a niños entre 1-6 años, es frecuente la aparición de epidemias en comunidades cerradas como guarderías, colegios, hospitales. Se distribuye de forma universal aunque su prevalencia es mayor en países subdesarrollados y más frecuentes en meses de verano y otoño.

Los brotes a gran escala, vinculados a alimentos, son más raros. A pesar de ello, constituye un importante problema de salud pública mundial, debido fundamentalmente a su elevada transmisibilidad<sup>62</sup>, existen reportes que vinculan esta enfermedad a una gran diversidad de ellos (leche, frutas y verduras crudas, alimentos preparados y luego manipulados por personas infectadas) así como al consumo de aguas contaminadas, y a la exposición a aguas recreativas (piscinas, parques acuáticos y/o fuentes, etc.)<sup>19, 57</sup>

En nuestro país se registraron tres brotes de enfermedad transmitida por alimentos ocasionados por *Shigella* en el año de 1993 y el 2001.<sup>70</sup>

Existen más datos de aislamientos de éste germen en diarrea infantil, donde se demuestra la participación no desdeñable de este agente en ese grupo etéreo. En casi todos ellos *Shigella* es un agente frecuente entre los agentes bacterianos<sup>35, 48</sup>. Por otra parte, es sin dudas el agente que se asocia con mayor frecuencia a diarrea con sangre y al menos en un caso se le ha aislado vinculado a síndrome hemolítico urémico.<sup>49</sup>

La enfermedad en adultos es menos habitual y se considera que personas en contacto con niños (madres, educadores preescolares, etc.) constituirían un grupo de mayor riesgo. El período de incubación varía de 1 a 7 días pero típicamente es de 2 a 4. Predomina en los meses de verano y la transmisión intrafamiliar ocurre frecuentemente. La infección intrahospitalaria por este agente es rara, dado que habitualmente se aíslan los pacientes. La posibilidad de infección existe mientras el microorganismo se excrete por las heces.

## 1.12 *Allium sativum*

1.12.1 Nombre científico: *Allium sativum* L.

1.12.2 Nombre común: Ajo

### 1.12.3 Descripción botánica

Se trata de una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las Alliaceas (Liliaceas), caracterizada por crecer formando bulbos (popularmente conocidos como “cabezas”) de hasta 20 dientes o más. El tallo nace a partir de estos bulbos, pudiendo alcanzar una altura cercana a los 50 cm. A partir de la vaina alargada que rodea el tallo nacen las hojas, lineares, dispuestas en forma de roseta, pudiendo alcanzar hasta 60 cm de largo. Las flores son blancas o rosadas, conformando una umbela en el extremo del tallo que se cierra antes de la floración. Hacen su aparición generalmente en el verano.<sup>1</sup>

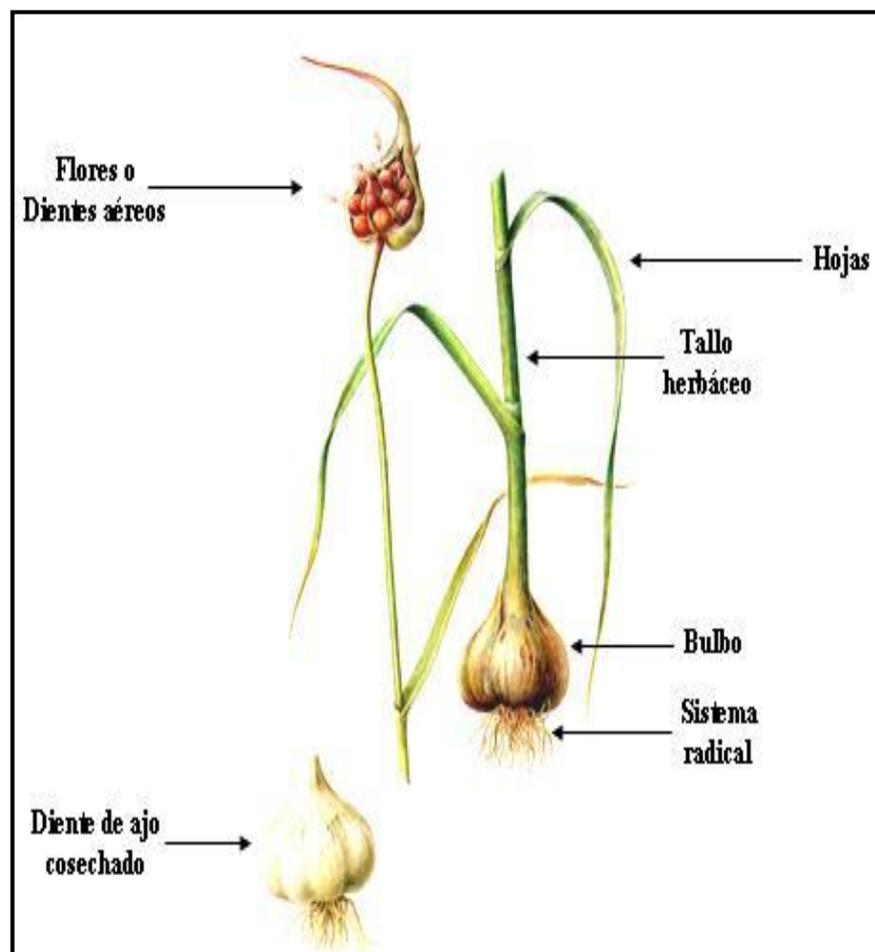


Fig.1 Planta de *Allium sativum* L.<sup>72</sup>



#### 1.12.4 Fisiología del desarrollo

El bulbo está formado por los dientes que, una vez plantados en condiciones adecuadas, darán lugar a nuevas plantas. Un diente de ajo está constituido por un resto de tallo, una hoja protectora que lo envuelve y una hoja transformada en almacén de reservas nutritivas, en cuyo interior, en la base del diente donde se encuentra el resto del tallo, se halla la yema terminal que dará lugar a la nueva planta.<sup>1</sup>

Etapas del desarrollo del cultivo del ajo:

- **Periodo de dormancia:** cuando se cosecha el ajo, esta yema terminal reducida a un pequeño abultamiento de menos de un milímetro de diámetro, se aletarga. Los dientes entran en un estado de dormancia durante un periodo de tiempo variable en función de la variedad y de las condiciones en que se conservan estos dientes.
- **Brotación:** pasados unos meses (entre 3 y 5 según tipo de ajo y condiciones de conservación de la semilla), en el diente, incluso sin plantar, se inicia la actividad de la yema terminal, alargándose en dirección a la punta, al ápice del diente. La primera hoja que emerge es una protección de las hojitas que darán lugar a la nueva planta y las acompaña hasta romper la costra del terreno, quedando como una funda. Durante este tiempo la plantita toma el alimento que precisa de las sustancias nutritivas del propio diente y comienza a emitir las raicillas.
- La **plantación** debe realizarse cuando el brote alcanza un 50% de la longitud del diente, en todo caso, siempre antes de que el brote asome por el ápice del diente.
- **Crecimiento vegetativo:** después de la brotación se van desarrollando las raíces y las hojas de la planta que servirán para transformar las extracciones nutritivas del suelo en tejidos vegetales. Este periodo termina cuando comienza la formación del bulbo. El crecimiento vegetativo se desarrolla en un espacio de tiempo variable, alrededor de 100 a 150 días según las condiciones de conservación de la semilla y las técnicas de cultivo que se apliquen, característico para cada variedad y muy directamente influido por las condiciones de fotoperiodo, temperatura y humedad.
- **Bulbificación:** es la fase del desarrollo de la planta en que se forma el bulbo. El comienzo de la bulbificación se produce cuando se alcanzan unas condiciones determinadas de temperatura, humedad y fotoperiodo, aplicando técnicas de cultivo convencionales, definidas para cada variedad y ecotipo en un área geográfica determinada. Puede modificarse sometiendo la semilla a condiciones especiales de temperatura o fotoperiodo.
- **Floración:** en condiciones normales de cultivo, las variedades y ecotipos morados (o rojos), chino, gigantes y otros producen tallo floral y flores, generalmente estériles. Las variedades y ecotipos blancos y rosas no desarrollan tallo floral, en condiciones normales de cultivo.



- **Maduración:** en condiciones normales de cultivo, las plantas, entre los 25-30 días de la floración llegan a formar la cabeza, quedando los dientes bien marcados y las hojas de la mitad inferior de las plantas marchitas, adquiriendo el pseudotallo una consistencia flácida. En este momento se llega a la maduración de la cabeza de ajo, que se podrá sacar unos días después.<sup>1</sup>

### 1.12.5 Hábitat

El género *Allium* comprende alrededor de 700 especies<sup>1</sup>, nativas en su mayoría del hemisferio norte. En cuanto a *Allium sativum*, es originario de Asia central, probablemente del sudoeste de Siberia. En la actualidad se encuentra distribuido y cultivado en casi todo el mundo.

### 1.12.6 Parte utilizada

Los bulbos.<sup>1</sup>

### 1.12.7 Historia

El uso del ajo se remonta a los comienzos de la humanidad. El término *Allium* deriva del celta *all* = “caliente”, “picante”. Tres mil años AC era utilizado por los sumerios para combatir parasitosis y prevenir epidemias. Ha sido mencionado 22 veces en el papiro egipcio de Ebers que data de aproximadamente el año 1500 AC mencionándose varios usos: cefaleas, trastornos cardiacos, mordeduras de serpiente, parásitos y tumoraciones. Asimismo, existen escritos que mencionan a un dentista egipcio llamado Hesy Ra, que solía taponar las caries de sus pacientes con un empaste basado en dientes de ajo mezclado con miel, lo cual proporcionaba inmediato alivio.

El historiador griego Herodoto hizo mención al consumo de ajo por parte de los esclavos egipcios para evitar que las epidemias de tifus y cólera mermaran sus fuerzas durante la construcción de la pirámide de Keops. Incluso en algunas obras de Homero se hace referencia al uso propiciado por los *iatros* (médicos griegos) que lo empleaban junto con hierbas aromáticas en calidad de analgésico y desinfectante en heridas de guerra. Otros escritos hacen referencia al empleo de ajo durante los primeros juegos Olímpicos llevados a cabo en Grecia, el cual era empleado como estimulante.

También las culturas nórdicas, representadas en el mundo antiguo por los fenicios y vikingos, lo llevaban en sus navíos para mantener el vigor y las fuerzas durante las largas travesías. Los romanos conocieron las virtudes del ajo a partir de los usos conferidos por los griegos.

Plinio el viejo hace mención a 61 usos terapéuticos del ajo. Hipócrates refería sus propiedades diuréticas y laxantes mientras que Aristóteles lo recomendaba contra la hidrofobia. Quizás el máximo difusor romano de las virtudes del ajo haya sido el médico militar viajero. Dioscórides a través de sus escritos.

Al llegar la Edad Media, el ajo sufre una etapa de eclipsamiento ya que se le relacionaba con conjuros malignos al formar parte de muchas fórmulas elaboradas por las “brujas”.

Durante la epidemia de peste, la población pobre colocaba ristras de ajos en sus hogares como preventivo. Este uso por la clase humilde hizo relacionar al ajo con la pobreza, a tal punto que el rey de Castilla Alfonso XI, en el año 1330, funda la orden de la Banda en la cual



prohibía su consumo a nobles e hidalgos caballeros, bajo pena a no ser admitidos en la corte durante 30 días. A tal fin, se solía “oler” a todo aquel que se acercaba al rey. Hacia fines del siglo XVIII en la zona de los Balcanes, se mantenía aún la costumbre de colocar ristras de ajo en las noches de luna llena sobre puertas y ventanas de las casas con el fin de ahuyentar a los espíritus malignos conocidos como “wurdalaks”.

En 1884 el Dr. Twertheim aísla el aceite de ajo para uso culinario y medicinal. Ya en el siglo XX, los médicos que acompañaban a las tropas durante la Primera Guerra Mundial, utilizaban extractos de ajo para evitar infecciones y gangrenas en las heridas de los soldados. En la década de los 30's el doctor Ragnar Huss realiza con éxito los primeros ensayos terapéuticos con extractos de ajo en casos de poliomeilitis. A principios de 1950 es aislada la *alicina*, mientras que los chinos comienzan a tratar los síntomas de la gripe con inyecciones de extracto de ajo. En la década de los 60's, científicos japoneses logran demostrar que las inyecciones del ajo inhibían el crecimiento de algunos tipos de células tumorales en ratas.

En las décadas 70's y 80' la cantidad de estudios relativos a los beneficios del ajo, llama la atención del Instituto del Cáncer de USA, quien lo recomienda en la dieta diaria como método preventivo. En la actualidad el ajo es la especie que mayor cantidad de estudios científicos cuenta, incluso comparándolo con cualquiera de los productos de síntesis. Por último, dado a los continuos avances acerca del estudio terapéutico del ajo, en 1991 se realiza el 1º Congreso Mundial sobre ajo, el cual se repite anualmente hasta nuestros días.<sup>1</sup>

### 1.12.8 Composición química

#### COMPUESTOS AZUFRADOS (0.1-0.2%).

- **Solubles en agua:** Derivados de la cisteína: S-alil-cisteína; S-metil cisteína y  $\gamma$ -glutamil-cisteína. Este último componente da origen a la S-alil-cisteína. Caracterizan por ser inodoros.
- **Solubles en aceite:** Sulfuro dialílico; disulfuro dialílico (dialil-disulfuro), alicina (u óxido de disulfuro dialílico), trisulfuro dialílico (dietil-trisulfuro); trisulfuro alilmetílico; aliína (precursor de la alicina), ditiínas, viniloditiínas y ajoeno caracterizados por ser olorosos.<sup>1</sup>

La alicina es un componente oxidante producido por el ajo crudo cuando sus células se rompen (durante el acto de corte). En su producción interviene una enzima denominada aliinasa la cual cataliza la conversión de aliina en alicina, en contacto con el aire siempre y cuando el pH sea superior a 3,<sup>31</sup>. A continuación, la alicina sufre una descomposición rápida hacia compuestos sulfurados solubles en aceite tales como sulfuro dialílico, disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo. Esta transformación puede ocurrir también por destilación de la alicina. Asimismo en presencia de la acción conjunta del calor y de determinados disolventes orgánicos (autocondensación), la alicina puede convertirse en ajoeno y viniloditiínas<sup>6,1</sup>, los cuales son compuestos solubles en aceite. Todos ellos caracterizan por ser fuertemente olorosos. La combinación de tres moléculas de alicina da lugar a dos moléculas de ajoeno: Cis y Trans.



La composición cualitativa y cuantitativa de los derivados azufrados se encuentra sujeta a importantes variaciones según al proceso al que sean sometidos los bulbos de ajo, lo cual incide a su vez en su actividad<sup>25, 47</sup>. Por ejemplo, la destilación en corriente de vapor permite obtener disulfuro dialílico. Los procesos naturales de añejamiento en los que se troza el ajo crudo y se coloca en conserva dentro de tanques de acero durante no menos de 20 meses de procesamiento, permite convertir los compuestos irritantes en compuestos sulfurosos solubles en agua, más estables y seguros, como la S-alil-cisteína, S-mercaptocisteína, S-metil-cisteína y aminoácidos sulfurosos. También en los procesos de cocción o maceración en vinagre (a la antigua usanza china) se obtienen compuestos solubles en agua.

**COMPUESTOS NO AZUFRADOS:** allixina (compuesto fenólico), saponinas, polisacáridos (fructosanos), mucílago, minerales y oligoelementos.<sup>1</sup>

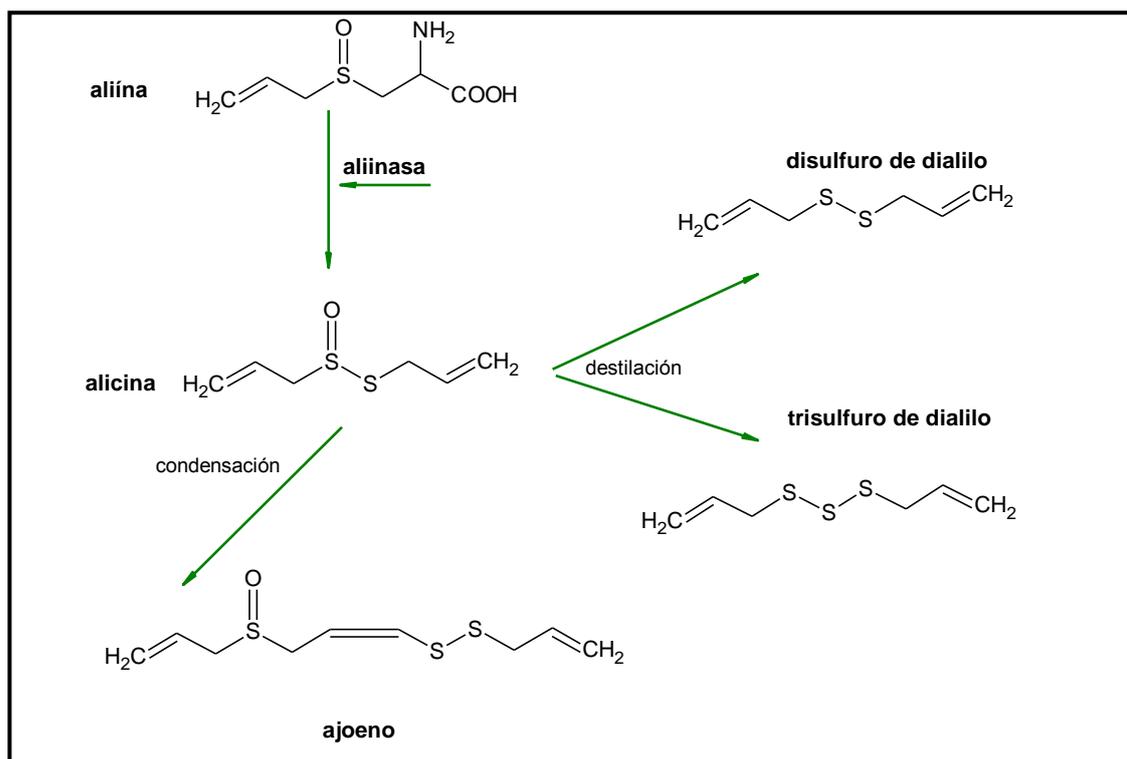


Fig. 2 Estructura de los principales componentes del ajo y sus derivados.<sup>39</sup>



### 1.12.9 Contenido alimenticio

El ajo, contiene una elevada proporción de agua. Presenta como componentes mayoritarios carbohidratos caracterizados por la presencia de fructosa, seguidos por compuestos azufrados, proteínas, aminoácidos libres, derivados fenólicos y fibra, así como un contenido apreciable en distintos minerales (fósforo, potasio, azufre, zinc) y saponinas, junto con niveles moderados de selenio y vitaminas A y C, pequeñas cantidades de otros minerales (calcio, magnesio, sodio, hierro, manganeso) y distintas vitaminas del complejo B.<sup>39</sup>

Tabla 2. Contenido alimenticio del ajo por cada 100g.<sup>14</sup>

Agua	64 g
Calorías	128-135
Proteínas (principalmente aliinasa)	6.1g
Aminoácidos libres (principalmente arginina)	1.2 g
Hidratos de carbono (principalmente fructosanos)	27.5 g
Grasas	0.1g
Fibra	0.7-1.5 g
Cenizas	1.5 g
Calcio	38 mg
Fósforo	134 mg
Magnesio	26 mg
Azufre	80 mg
Yodo	0.004 mg
Sílice	Trazas
Sodio	45 mg
Hierro	1-1.4 mg
Níquel	10 µg
Selenio	20 µg
Provitamina A	0.1 mg
Vitamina B1	0.1-0.2 mg
Vitamina B2	0.08-0.10 mg
Vitamina B3	0.6 mg
Vitamina C	14-17 mg



### 1.12.10 Acciones farmacológicas

Desde 1844 hasta la fecha se han descubierto más de 200 sustancias componentes del ajo. Entre ellos, la *alicina* ocupó siempre el lugar más destacado pensándose que era la sustancia más activa desde el punto de vista terapéutico. Sin embargo, estudios desarrollados en los últimos 20 años han demostrado que los compuestos azufrados solubles en agua (presentes en el ajo añejado o el ajo estacionado) podrían ser quizás aún más activos.

Destacan en el ajo las siguientes propiedades:

- **Antimicrobiana:** Las investigaciones relacionadas con la actividad antiinfecciosa son numerosas y abarcan un amplio espectro de gérmenes<sup>1</sup>. Entre los componentes de ajo implicados en su actividad biocida destaca la alicina<sup>44</sup>. La actuación de la alicina frente a las bacterias parece ser debida a su capacidad para reaccionar rápidamente con los grupos tiólicos de enzimas como las cisteína proteasas y alcohol deshidrogenasas, esenciales para la nutrición y el metabolismo de las bacterias.<sup>39</sup>  
La actividad antimicrobiana de los extractos de ajo ha sido probada contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Brucella*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Aeromonas*.<sup>29</sup>
- **Antiagregante plaquetaria:** La presencia de componentes sulfurosos, así como la aliína y del ajoeno, la hace muy importante en otorgar a esta planta propiedades antitrombóticas por lo que resulta muy adecuada para fluidificar la circulación sanguínea y evitar las enfermedades circulatorias como arteriosclerosis, hipertensión, colesterol, infarto de miocardio, angina de pecho y otras relacionadas con una mala.  
El aceite de ajo inhibe la función plaquetaria, probablemente al interferir con la síntesis del tromboxano.<sup>1</sup>
- **Antiparasitaria:** A nivel parasitario; el ajo cuenta con una actividad inhibitoria casi legendaria, debido a la actividad repelente de los compuestos azufrados contra hospedantes del intestino humano como *Taenia saginata*, *Oxyuros sp.*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*. La presencia de alicina y aliilsulfuro es la responsable de la actividad antiparasitaria del ajo<sup>29</sup>. En México se ha demostrado su actividad antihelmíntica en humanos a dosis de 200 mg de bulbo por litro de agua, dos veces por día.<sup>23</sup>
- **Cardiovascular:** Los efectos beneficiosos del ajo a este nivel están en relación a su capacidad hipolipemiante, hipotensora arterial, antiagregante, antioxidante y fibrinolítica.<sup>1</sup>
- **Actividad hipoglicemiante:** El ajo ha demostrado tener propiedades hipoglicemiante tanto en animales como en humanos<sup>29,46</sup>. Se ha notado un incremento en la concentración de insulina y un mejoramiento en el almacenamiento del glucógeno luego de la administración de ajo.<sup>29</sup>

**Otras acciones:**

- El ajo puede tener propiedades diuréticas y carminativas.<sup>29</sup>
- Se cree que la reacción de la alicina con los grupos sulfhidrilo, cuya concentración se ve incrementada considerablemente, en las células de rápida división, pueden contribuir a la actividad antineoplásica.<sup>23</sup>
- Algunos estudios indican que el ajo puede tener cierta actividad antiespasmódica y antiflatulenta<sup>41, 29</sup> y puede ser utilizado en casos de desordenes de hipermotilidad gástrica.<sup>46</sup>
- En ratones se ha observado en efecto hepatotóxico.<sup>23</sup>
- En enfermedades respiratorias inflamatorias, tosferina y bronquitis.<sup>41</sup>

**1.12.11 Toxicidad y efectos secundarios**

En términos generales, el consumo de ajo es considerado como seguro. Sin embargo, el consumo excesivo de derivados del ajo, sobre todo de los que contienen como componentes principales compuestos azufrados liposolubles (alicina, DADS, DATS), puede ocasionar efectos indeseables tales como diarrea, irritación de las mucosas, sensación de ardor y molestias digestivas<sup>49</sup>. Por otra parte, un consumo crónico a dosis altas puede dar lugar a cambios hematológicos, entre los que se encuentran el descenso tanto en el número de eritrocitos como en los valores del hematocrito y en la concentración de hemoglobina, debido probablemente a un proceso hemolítico.<sup>32</sup>

**1.12.12 Interacciones**

Puede incrementar el efecto anticoagulante de la warfarina, se ha reportado incremento en los tiempos de coagulación con el uso concomitante de warfarina y suplementos de ajo.<sup>23</sup> Un estudio reciente señala que el ajo puede inducir el citocromo P450 3 A4, lo que puede interferir con el metabolismo de agentes farmacológicos que utilicen esa vía.<sup>3</sup>

**1.12.13 Precauciones**

Se debe evitar el uso concomitante con anticoagulantes y antiplaquetarios ya que puede aumentar el riesgo de sangrados, tampoco se recomienda su uso en pacientes con desordenes hemorrágicos, debido al efecto antiplaquetario y fibrinolítico del ajo.<sup>3, 41</sup>

**1.12.14 Dosis**

Las dosis reportadas por el Physican Desk Reference for Herbal Medicine para el ajo son:

- General (dolor de cabeza, fatiga, mialgia, vértigo, etc.): 4 mg a 8 mg al día
- Tratamiento de arteriosclerosis: 600 mg a 800 mg diarios
- Hiperlipidemia: 600 mg a 900 mg diarios
- Hipertensión: 200 mg a 300 mg tres veces al día.<sup>41</sup>

### 1.13 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión ha revolucionado el conocimiento de ciencias como la biología o la medicina, aunque su campo de aplicación se ha extendido a la mayoría de disciplinas científicas. La principal ventaja de este tipo de microscopía es alcanzar una extraordinaria amplificación de la imagen de la muestra manteniendo un poder de resolución casi mil veces mayor que el óptico. Estas magníficas propiedades se debe a que la fuente de iluminación usada es un haz de electrones con una longitud de onda mucho menor que la de los fotones.<sup>63</sup>

Las técnicas convencionales más usadas en la microscopía electrónica son: la tinción negativa, la microsomía y la congelación. La tinción negativa, es una técnica sencilla y económica y su uso se ha generalizado como técnica fundamental para contrastar muestras particuladas. El contraste se obtiene embebiendo la partícula a observar en una sal de un metal pesado (ácido fosfotúngstico al 2%, acetato de uranilo al 4%), que perfila mínimos detalles ultra estructurales sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de “contraste negativo” o de tinción negativa<sup>27</sup>. Esta técnica ha tenido amplia aplicación en el estudio de las macromoléculas, virus y organelos bacterianos.<sup>65</sup>



Fig. 3 Microscopio Electrónico de Transmisión.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Evaluar de manera *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*) para una alternativa de tratamiento en las enfermedades ocasionadas por las bacterias anteriormente mencionadas.

### 2.2. Objetivos Particulares

- Aislar e Identificar por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias a las bacterias *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*.
  - Esterilizar el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* a través de un sistema de filtración y concentrar hasta sequedad total para preparar una solución de trabajo de concentración conocida.
  - Determinar la valoración del extracto de *Allium sativum* en las bacterias a estudiar a través del método de difusión en agar (cilindro-placa).
  - Realizar ensayos extracto-bacteria, empleando la técnica de microdilución en placa (técnica de Mosmann).
  - Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), así como la actividad bactericida y/o bacteriostática del extracto de *Allium sativum* en cada una de las bacterias ya mencionadas.
  - Evidenciar por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) el posible sitio donde el extracto de *Allium sativum* produjo el efecto en las bacterias.
- 
-



### 3. JUSTIFICACIÓN

El empleo de fuentes naturales como antibióticos nace de la inquietud por el diferente patrón de sensibilidad de algunos microorganismos a antibióticos clásicos o incluso a algunos de reciente introducción. La producción de numerosas moléculas sintéticas, el alto costo y el uso indiscriminado de diferentes medicamentos, comenzaron a causar la resistencia bacteriana así como muchos efectos tóxicos, esto explica la necesidad de retornar a la utilización de plantas medicinales, lo cual representa un fácil acceso de tratamiento en los países de bajo desarrollo, menos riesgos a la salud y efectos secundarios. Por tal motivo en el presente trabajo, se decidió evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria del extracto de *Allium sativum* sobre el crecimiento de siete cepas bacterianas de importancia médica, como son: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*.



## 4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si el extracto de *Allium sativum* presenta actividad inhibitoria *in vitro* en las bacterias *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*, entonces podrá ser utilizado como una alternativa de tratamiento en enfermedades ocasionadas por las bacterias anteriormente mencionadas.



## 5. MATERIAL

### 5.1 Material

- Espátula
- Asa bacteriológica
- Cajas Petri (PYREX)
- Matraces Erlenmeyer con tapa de rosca de 250 ml (KIMAX)
- Portaobjetos 75x26x1 mm (MARIENFELD)
- Hisopos estériles
- Palillos estériles
- Propipeta
- Mechero bunsen y manguera de látex
- Gradilla
- Frascos de vidrio estériles
- Tubos de vidrio con tapa de rosca (PYREX)
- Vasos de precipitado de 250 ml (KIMAX)
- Probeta graduada de 250 ml (KIMAX)
- Cristalizador 190x100 (PYREX)
- Pipetas graduadas de 2 ml, 5 ml y 10 ml (KIMAX)
- Viales color ámbar con capacidad de 10 ml
- Micropipeta de 5  $\mu$ l (AIVA NUCLEAR)
- Micropipeta de 100  $\mu$ l (OXFORD®)
- Puntas para micropipeta estériles
- Microplaca de 96 pozos de fondo plano (SARSTEDT)
- Membranas de Nitrato de celulosa de 0.45  $\mu$ m (Millipore)
- Cilindros de acero inoxidable de dimensiones (diámetro externo 8 mm; diámetro interno 6 mm y longitud 10 mm)

### 5.2 Material Biológico

- Sangre de carnero desfibrinada estéril
- Plasma humano
- Cepas bacterianas aisladas de muestras clínicas tales como: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*.
- Extracto de *Allium sativum* hidroalcohólico (EXTRACTOS SIGMA)



### 5.3 Medios de Cultivo

- Agar Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)
- Agar MacConkey (BIOXON)
- Agar Sales Manitol (BIOXON)
- Agar Base Sangre (BIOXON)
- Agar Eosina Azul de Metileno (MERCK)
- Agar Salmonella-Shigella (MERCK)
- Medio SIM (BIOXON)
- Medio MR-VP (BIOXON)
- Agar Citrato de Simmons (MAC-LAB)
- Agar de Hierro y Triple Azúcar (BIOXON)

### 5.4 Reactivos

- Aceite de inmersión
- Cristal violeta (HYCEL)
- Lugol (REAMEX)
- Alcohol-acetona
- Safranina (FISHER)
- Peróxido de hidrógeno 3%
- Discos para prueba de oxidasa
- Discos de Novobiocina 5 mcg.
- Solución Salina Fisiológica estéril 0.85%
- Agua destilada estéril
- Indicador rojo de metilo
- Alfa naftol al 5%
- Reactivo de Kovac's o Erlich (p-dimetil-aminobenzaldehído)
- MTT SIGMA M-2118
- Reactivo de Karnosky como fijador
- Ácido fosfotúngstico para teñir
- Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.2
- Etanol al 96°

### 5.5 Equipo

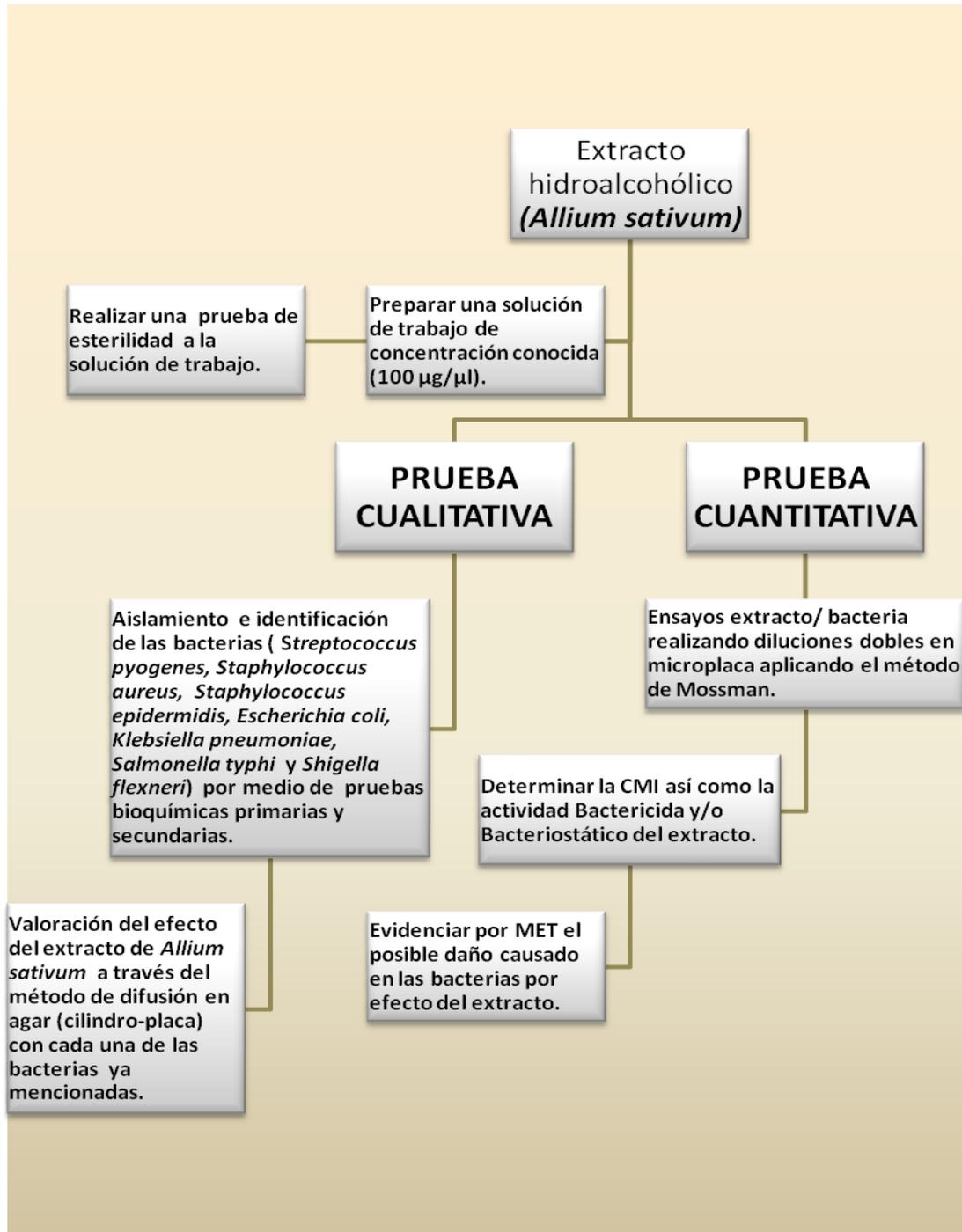
- Refrigerador (AMERICAN)
- Estufa bacteriológica (RIOSSA)
- Autoclave (All American Modelo 1925X)
- Microscopio óptico (Olympus modelo CH-S)
- Balanza granataría (Triple Beam 700 series)



- Parrilla con agitador (NUOVA II STIR PLATE)
- Vortex (Genie-2)
- Centrifuga (Dynac)
- Campana de Flujo laminar Horizontal (VECO)
- Portafiltros metálico tipo bala (Millipore)
- Bomba de vacío (Hoffman Pinter modelo 0210)
- Espectrofotómetro (Sanofi Diagnostic Pasteur Rx)
- Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM 100S)

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Diagrama general de trabajo





## 6.2 Preparación de la solución de trabajo del extracto de *Allium sativum*

El extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* utilizado para la realización de la solución de trabajo, fue proporcionado por la empresa "EXTRACTOS SIGMA".

La metodología para la preparación de la solución de trabajo se realizó de la siguiente manera:

- A) El extracto se esterilizó haciéndolo pasar a través de un sistema de filtración, usando un filtro Millipore con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . El extracto final ya estéril fue transferido a un frasco estéril y se conservó a 4°C hasta su empleo.
  
  - B) Para corroborar dicha esterilidad, se colocó 100  $\mu\text{l}$  del extracto en la superficie de una placa de agar BHI y con un asa bacteriológica se realizó un sembrado masivo sobre toda la placa. Se incubó durante 24 horas a 37 °C obteniendo un resultado negativo de crecimiento microbiano.
  
  - C) El extracto se transfirió a un cristalizador estéril y se colocó dentro del horno Pasteur a una temperatura entre 37-45°C con la finalidad de evaporar los disolventes y llevar hasta sequedad total.
  
  - D) Con una espátula estéril se raspó la superficie del cristalizador para así recolectar el extracto seco.
  
  - E) Se pesó 1700 mg del extracto seco y se disolvió en 17 ml de solución salina fisiológica estéril. Obteniéndose así la solución de trabajo con una concentración de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
  
  - F) Finalmente se realizó una prueba de esterilidad a la solución de trabajo, colocando 100  $\mu\text{l}$  de la solución en la superficie de una placa de agar BHI y con una asa bacteriológica se realizó un sembrado masivo sobre la placa. Se incubó durante 24 horas a 37°C obteniendo un resultado negativo de crecimiento microbiano.
-

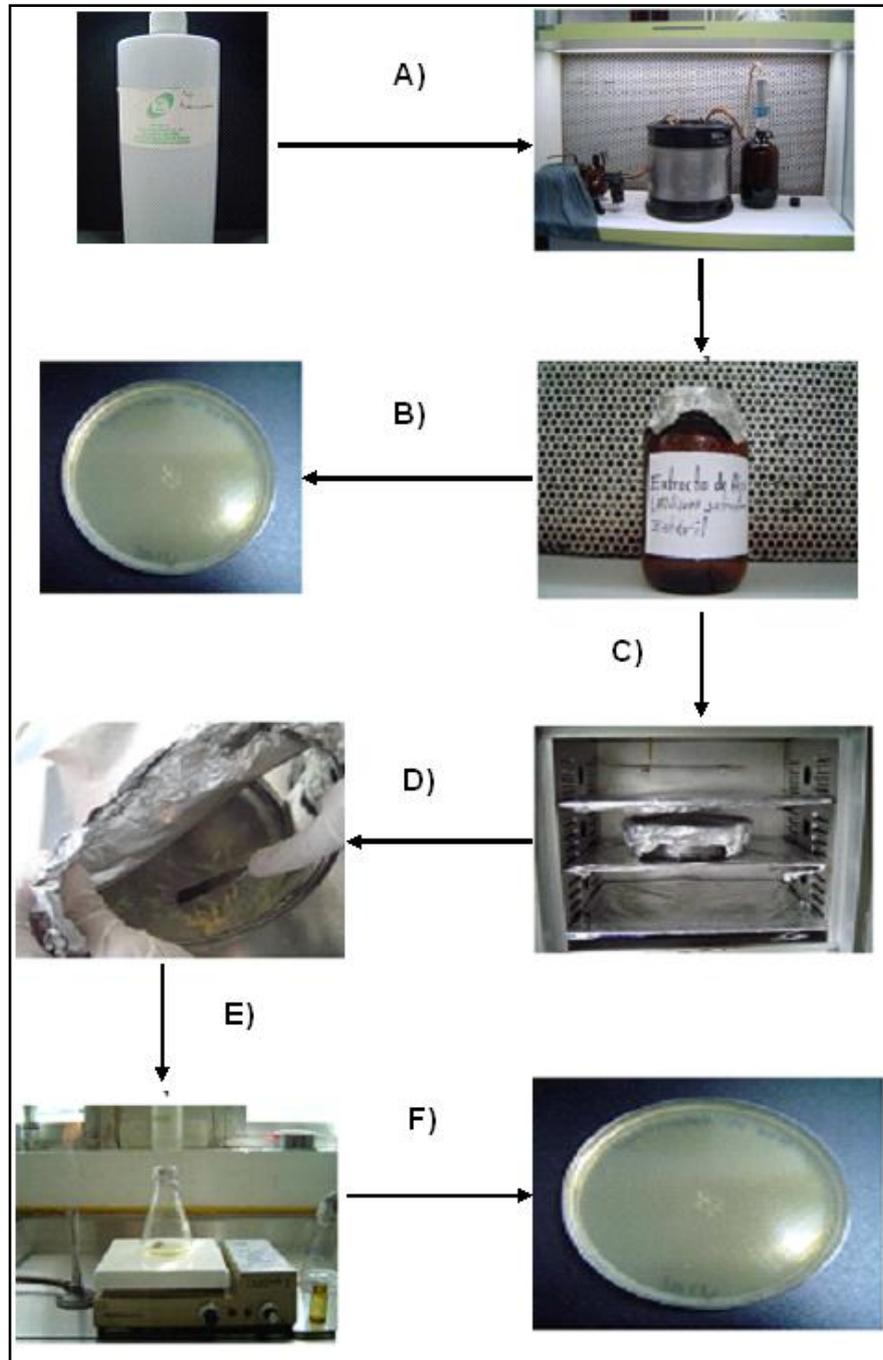


Fig. 4 Metodología para la preparación de la solución de trabajo del extracto de *Allium sativum*.



### 6.3 Identificación de bacterias

Cada cepa bacteriana se identificó mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias así como su crecimiento en medios selectivos.

Una vez identificadas, cada bacteria se sembró en tubos con medio de conservación (agar BHI) solidificado en posición inclinada y se incubaron en una estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación se etiquetó cada uno de los tubos con la bacteria correspondiente y se conservó en refrigeración hasta su uso.

### 6.4 Estandarización de las bacterias

Previo a la estandarización de la suspensión bacteriana se reactivó cada una de las bacterias en placas de agar BHI y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, se resuspendió de manera individual el crecimiento de cada bacteria en 4 ml de caldo BHI estéril a doble concentración y se ajustó al 0.5 del nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml).

### 6.5 Método de difusión en agar (cilindro-placa)

Esta prueba se realizó con cada una de las suspensiones bacterianas previamente estandarizadas al 0.5 del nefelómetro de McFarland de la siguiente manera:

1. Se sumergió en el tubo de la suspensión bacteriana un hisopo estéril y de manera uniforme se distribuyó sobre toda la superficie de una placa de agar de BHI el inóculo impregnado en el hisopo.
2. Se colocó sobre la superficie de la placa inoculada, un cilindro de acero inoxidable estéril y en su interior se depositó 100 µl de la solución de trabajo de *Allium sativum*.
3. Se incubó las placas durante 24 horas a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación se realizó la lectura que consistió en retirar el cilindro de la superficie de la placa inoculada y en observar la existencia o no de una “zona de inhibición” sobre el sitio en donde se depositó los 100 µl de la solución de trabajo.



## 6.6 Microdilución en placa

Cada ensayo extracto-bacteria se realizó por triplicado en una microplaca de 96 pozos conformada por 12 columnas y 8 filas. Cada columna representa una dilución y cada 3 filas una bacteria distinta. Cabe mencionar que se inicio con una concentración de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en los pozos de la primera columna y en los pozos de las columnas 2-9 se realizaron las diluciones dobles decrecientes hasta una concentración de 0.390625  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

La metodología se realizó de la siguiente manera:

- A. Colocar en los pozos de las columnas 2-9, 100  $\mu\text{l}$  de SSFE al 0.85%.
- B. Colocar en los pozos de las columnas 1 y 2, 100  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo de *Allium sativum*.
- C. A partir de los pozos de las columnas 2, realizar una serie de diluciones dobles, transfiriendo 100  $\mu\text{l}$  al pozo de la columna 3, así mismo transferir 100  $\mu\text{l}$  de este al pozo de la columna 4 y así sucesivamente hasta el pozo de la columna 9, desechando 100  $\mu\text{l}$  de este pozo.
- D. Adicionar 100  $\mu\text{l}$  de bacteria estandarizada al 0.5 del Nefelómetro de McFarland desde el pozo de la columna 1 hasta el pozo de la columna 9 en las tres primeras filas. Realizar este mismo procedimiento con cada una de las bacterias a trabajar.
- E. Los pozos de la columna 10 corresponden al control (+), colocar 100  $\mu\text{l}$  de SSFE y 100  $\mu\text{l}$  de la bacteria estandarizada en cuestión.
- F. Los pozos de la columna 11 corresponden al control (-), colocar 100  $\mu\text{l}$  de SSFE y 100  $\mu\text{l}$  de caldo BHI a doble concentración.
- G. Los pozos de la columna 12 corresponden al blanco, colocar 100  $\mu\text{l}$  de caldo BHI a doble concentración y 100  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo de *Allium sativum*.
- H. Incubar la microplaca durante 24 horas a 37°C.

## 6.7 Determinación en placa del efecto bactericida y/o bacteriostático del extracto de *Allium sativum* en *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*

Transcurridas las 24 horas de incubación de la microplaca trabajada en la microdilución en placa, se toma por separado y con el asa de sembrado, una muestra de cada uno de los pozos de uno de los tres ensayos realizados para cada bacteria, incluyendo el control positivo, control negativo y blanco y sembrar en placas de agar BHI e incubar durante 24 horas a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación realizar la lectura de las placas que consiste en detectar si hubo crecimiento o no de la bacteria; efecto bacteriostático o bactericida respectivamente.

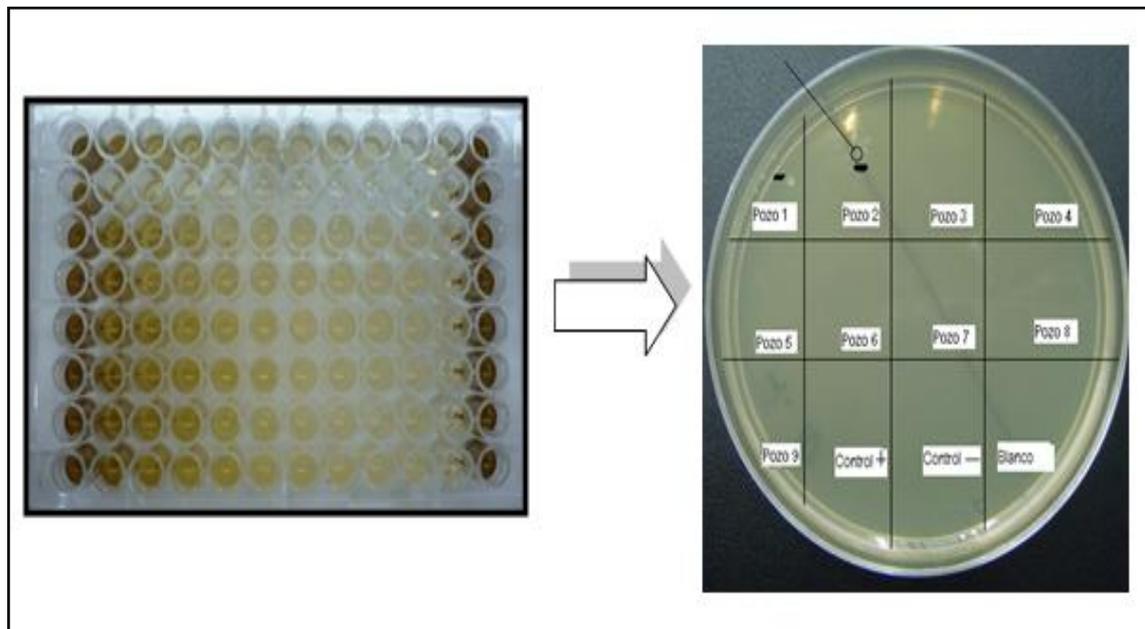


Fig. 5 Procedimiento de técnica para determinar en el extracto de *Allium sativum* un posible efecto bactericida y/o bacteriostático en las 7 cepas trabajadas.

## 6.8 Técnica colorimétrica de Mosmann

Después de haber empleado la microplaca para la determinación del efecto bactericida y/o bacteriostático, a todos los pozos de la microplaca adicionar 5  $\mu$ l del reactivo MTT (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) e incubar a 37°C por un periodo de 30-60 minutos o el tiempo necesario hasta observar que los controles (+) cambien de color (de amarillo a púrpura). Posteriormente realizar la lectura de las placas en un lector ELISA a una longitud de 655 nm.

### 6.8.1 Determinación de la MIC

De manera visual se pudo determinar a través de la técnica colorimétrica que emplea el colorante MTT: (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bromuro difeniltetrazolio), el cual es reducido a formazan (producto coloreado, púrpura intenso) por la presencia de bacterias vivas.<sup>68</sup>

La MIC se determinó a partir de las lecturas obtenidas de la placa (Ver anexo 1) y se considera como la concentración más baja del extracto que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación.

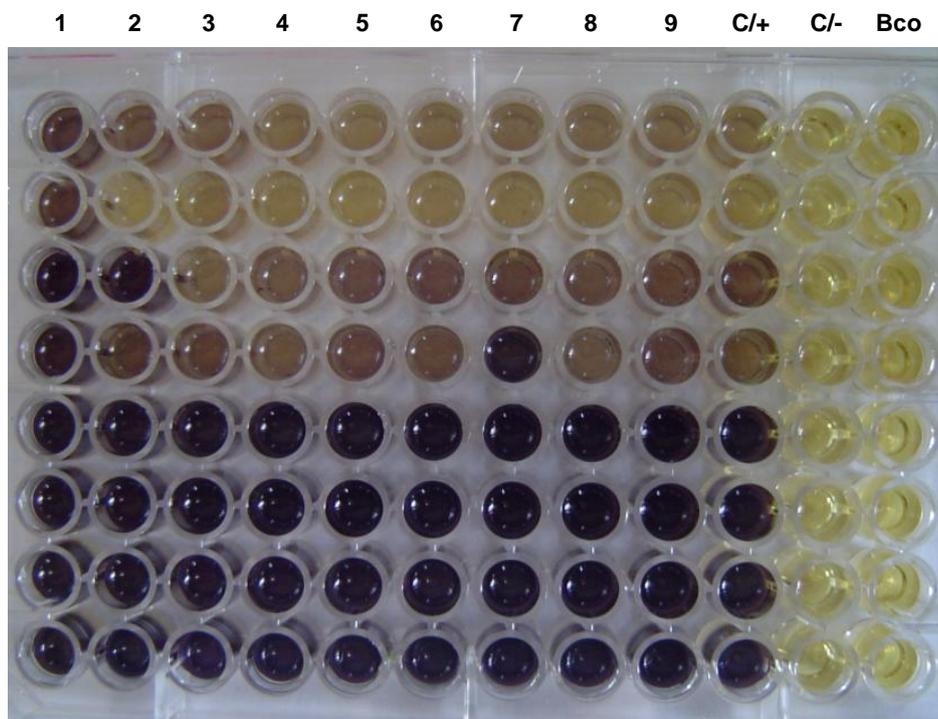


Foto 1. Microplaca con microdiluciones del extracto de *Allium sativum* después de adicionar el reactivo MTT. Diluciones del extracto de *Allium sativum* pozos (1-9), control positivo (10), control negativo (11), blanco (12). Obsérvese que la cantidad de bacterias vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido, compuesto púrpura intenso.

## 6.9 Microscopía electrónica de transmisión

### 6.9.1 Preparación de las bacterias

Realizar una suspensión bacteriana en caldo BHI estéril a doble concentración de cada una de las bacterias que presentaron sensibilidad en el Método de difusión en agar (cilindro-placa) y el método de microdilución en placa (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Shigella flexneri*), ajustar al 0.5 del Nefelómetro de McFarland y preparar las muestras como se menciona a continuación:



**Tubo 1: Muestra problema:** 2.5 ml de suspensión bacteriana en caldo BHI estéril a doble concentración + 2.5 ml de la solución de trabajo del Extracto de *Allium sativum*.

**Tubo 2: Control positivo:** 2.5 ml de suspensión bacteriana en caldo BHI estéril a doble concentración + 2.5 ml de Solución Salina Fisiológica Estéril.

Incubar todos los tubos durante 24 horas a 37°C.

### 6.9.2 Fijación

Transcurrido el tiempo de incubación, centrifugar los tubos durante 15 minutos a 2500 rpm y decantar el sobrenadante. Resuspender el sedimento en 7 ml de SSFE y centrifugar por segunda vez durante 10 minutos a 2500 rpm, este último procedimiento realizarlo 2 veces más. Posteriormente adicionar a cada tubo 1 ml del reactivo de Karnosky. Dejar reposar durante una hora y centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos. Finalmente decantar el sobrenadante de cada tubo y la pastilla formada en la superficie del tubo resuspenderla en Buffer de fosfatos o en SSF.

### 6.9.3 Tinción Negativa

Colocar una gota de suspensión bacteriana sobre papel parafilm y sobre esta, colocar 2 rejillas con membranas fomvar durante 20 minutos con la finalidad de que se adsorba la muestra, posteriormente tomar las rejillas colocarlas en una gota de agua destilada. Quitar el exceso con papel filtro enseguida teñirlas con una gota de ácido fosfotúngstico durante un minuto y secarlas a temperatura ambiente o en una estufa a 35°C. Las muestras son observadas y fotografiadas en el Microscopio Electrónico de Transmisión

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Identificación

#### 7.1.1 *Streptococcus pyogenes*

Tabla 3. Pruebas de identificación realizadas a *Streptococcus pyogenes*.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Cocos Gram positivos agrupados en cadena
Catalasa	-
RM	+
VP	-
CAMP	-
Sensibilidad a Bacitracina 0.04 UI	+
Hemólisis	$\beta$ -hemólisis
Bilis Esculina	-



Foto 2. *Streptococcus pyogenes* en placa de agar sangre. Obsérvese una hemólisis de tipo  $\beta$ .



Foto 3. De izquierda a derecha: RM (+) y VP (-).

### 7.1.2 *Staphylococcus aureus*

Tabla 4. Pruebas de identificación realizadas a *Staphylococcus aureus*.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Catalasa	+
RM	+
VP	-
Coagulasa	+
Fermentación del manitol	+
Sensibilidad a Novobiocina de 5 mcg	-



Foto No 4. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en agar Sal y manitol. Obsérvese la fermentación del manitol virando el medio de color rojo a color amarillo.

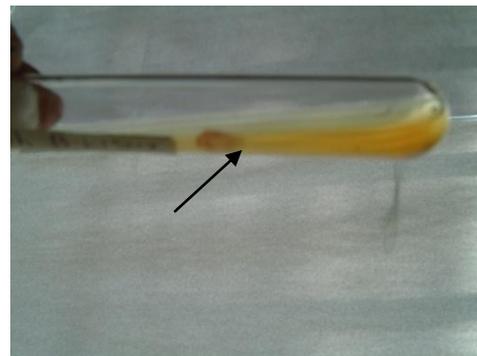


Foto No 5. Prueba de coagulasa positiva para *Staphylococcus aureus*.



Foto 6. De izquierda a derecha: RM (+) y VP (-).

### 7.1.3 *Staphylococcus epidermidis*

Tabla 5. Pruebas de identificación realizadas a *Staphylococcus epidermidis*.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Catalasa	+
RM	+
VP	-
Coagulasa	-
Fermentación del manitol	-
Sensibilidad a Novobiocina de 5 mcg	+

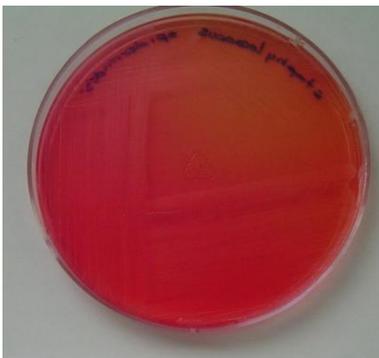


Foto 7. Crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* en agar Sal y manitol. Obsérvese que la bacteria no fermenta el manitol, no evidenciando un cambio de color en el medio.



Foto 8. Prueba de coagulasa negativa para *Staphylococcus epidermidis*.

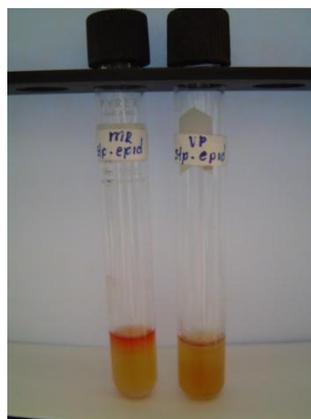
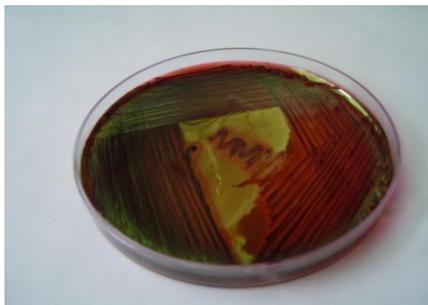
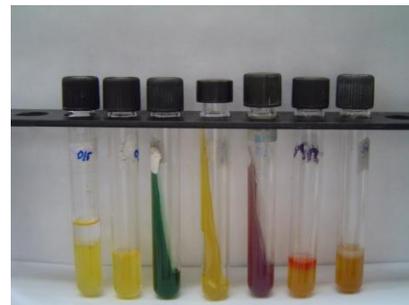


Foto 9. De izquierda a derecha: RM (+) y VP (-).

### 7.1.4 *Escherichia coli*

Tabla 6. Pruebas de identificación realizadas a *Escherichia coli*.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Bacilos Gram negativos
Oxidasa	-
Catalasa	+
O/F	F
MR	+
VP	-
Citratos	-
KIA	Amarillo/amarillo=ácida/ácida: fermentadora de lactosa y glucosa
Lisina	+
Motilidad	+
Indol	+
Ornitina	+

Foto 10. Crecimiento de *Escherichia coli* en placa de agar Eosina - Azul de Metileno. Obsérvese las colonias que varían de púrpura a verde metálico.Foto 11. Pruebas bioquímicas (1) para *Escherichia coli*. De izquierda a derecha: O/F= F, Citratos (-), KIA= ácido-ácido: fermentadora de lactosa, Lisina (+), MR (+), VP (-).Foto 12. Pruebas bioquímicas (2) para *Escherichia coli*. De izquierda a derecha: MIO: Ornitina (+). SIM: Indol (+), motilidad (+), H<sub>2</sub>S (-).

### 7.1.5 *Klebsiella pneumoniae*

Tabla 7. Pruebas de identificación realizadas a *Klebsiella pneumoniae*.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Bacilos Gram negativos
Oxidasa	-
Catalasa	+
O/F	F
MR	-
VP	+
Citratos	D
KIA	Amarillo/amarillo=ácido/ácido: Fermentadora de lactosa y glucosa
Lisina	+
Motilidad	-
Indol	-
Ornitina	-
Urea	+



Foto 13. Pruebas bioquímicas (1) para *Klebsiella pneumoniae*. De izquierda a derecha: O/F=F, Citratos(D), KIA: amarillo/amarillo=ácido/ácido: fermentadora de lactosa y glucosa, Lisina (+).



Foto 14. Pruebas bioquímicas (2) para *Klebsiella pneumoniae*. De izquierda a derecha: MIO: Ornitina (-). SIM: Motilidad (-), Indol (-), H<sub>2</sub>S (-).

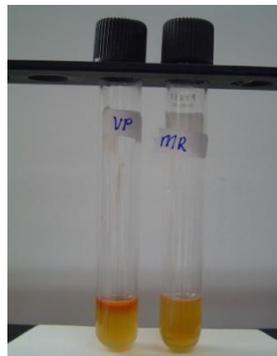
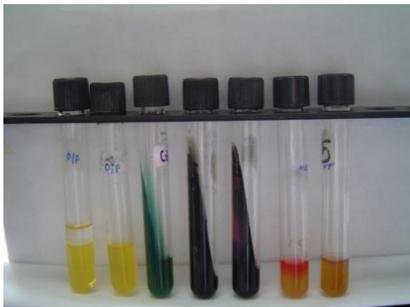


Foto 15. De izquierda a derecha V P (+), RM (-).

### 7.1.6 *Salmonella typhi*

Tabla 8. Pruebas de identificación realizadas a *Salmonella typhi*.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Bacilos Gram negativos
Oxidasa	-
Catalasa	+
O/F	F
MR	+
VP	-
Citratos	+
KIA	Alcalina/ácida: fermentadora de glucosa. (H <sub>2</sub> S+).
Lisina	+
Motilidad	+
Indol	-
Descarboxilación de la Ornitina	-
H <sub>2</sub> S	+

Foto 16. Pruebas bioquímicas (1) para *Salmonella typhi*. De izquierda a derecha O/F=F, Citratos (+), KIA= alcalino/ácido: Fermentadora de glucosa, Lisina (+), MR (+), VP (-).Foto 17. Pruebas bioquímicas (2). De izquierda a derecha: MIO: Ornitina (-). SIM: Motilidad (+), Indol (-), H<sub>2</sub>S (+).Foto 18. Crecimiento de *Salmonella typhi* en agar Sulfito bismuto. Obsérvese las colonias negras con brillo metálico.

### 7.1.7 *Shigella flexneri*

Tabla 9. Pruebas de identificación realizadas a la bacteria *Shigella flexneri*.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Bacilos Gram negativos
Oxidasa	-
Catalasa	+
O/F	F
MR	+
VP	-
Citratos	-
KIA	Rojo/amarillo=alcalino/ácido = fermentadora de glucosa
Lisina	-
Motilidad	-
Indol	-
Ornitina	-

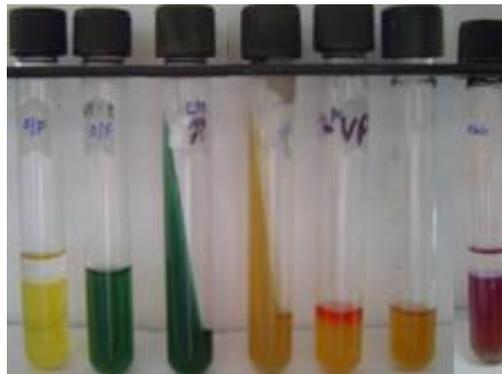


Foto 19. Pruebas bioquímicas (1) para *Shigella flexneri*. De izquierda a derecha: O/F= F, Citratos (-), Lisina (-), RM (+), VP (-), Ornitina (-).



Foto 20. KIA Rojo/amarillo=alcalino/ácido fermentadora de glucosa.



## 7.2 Prueba de esterilidad a la solución de trabajo

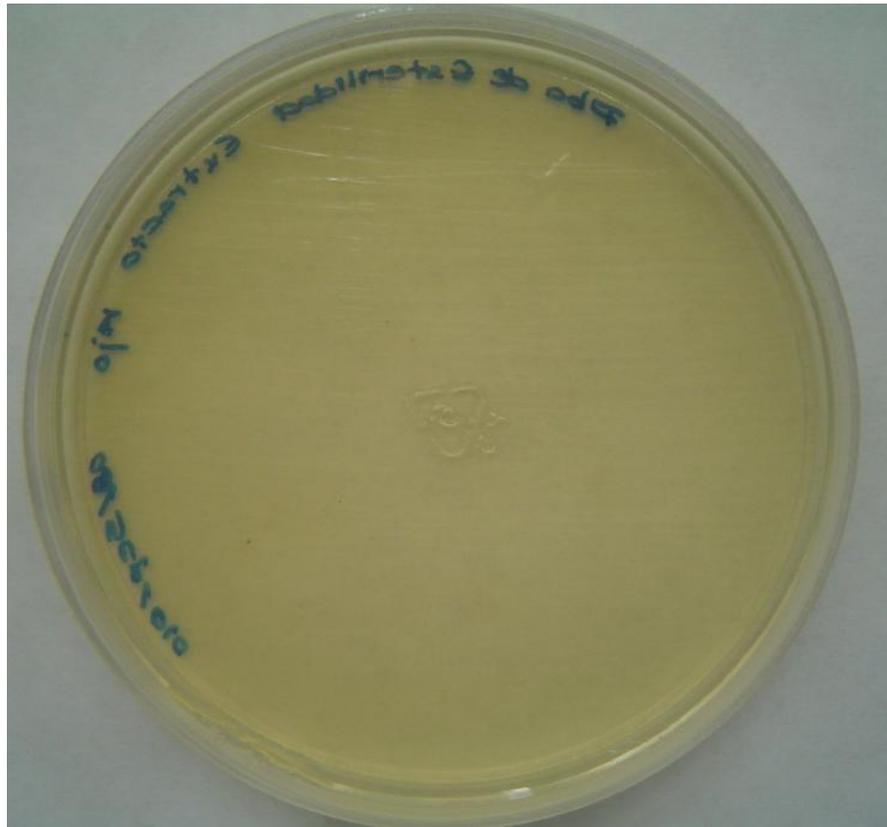


Foto 21. Placa de agar BHI sembrada con el extracto de *Allium sativum*. Obsérvese que no hay ningún tipo de crecimiento bacteriano después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C.

### 7.3 Método de difusión en agar (cilindro-placa)

En esta prueba solo cuatro de las siete cepas bacterianas trabajadas, presentaron inhibición por acción del extracto de *Allium sativum*, después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C.

#### 7.3.1 Bacterias sensibles a la acción del extracto de *Allium sativum*

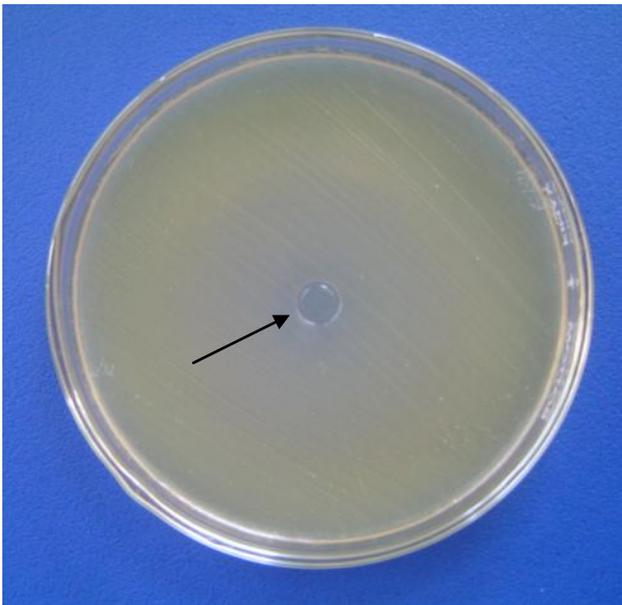


Foto 22. Zona de inhibición del crecimiento de *Streptococcus pyogenes*.



Foto 23. Zona de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



Foto 24. Zona de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus epidermidis*.

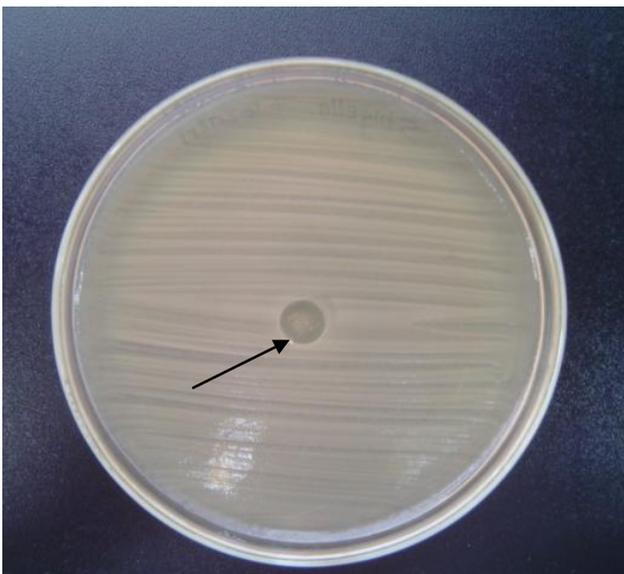


Foto 25. Zona de inhibición del crecimiento de *Shigella flexneri*.

### 7.3.2 Bacterias resistentes a la acción del extracto de *Allium sativum*



Foto 26. *Escherichia coli* resistente a la acción del extracto de *Allium sativum* después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Obsérvese que no hay zona de inhibición en la placa.



Foto 27. *Klebsiella pneumoniae* resistente a la acción del extracto de *Allium sativum* después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Obsérvese que no hay zona de inhibición en la placa.

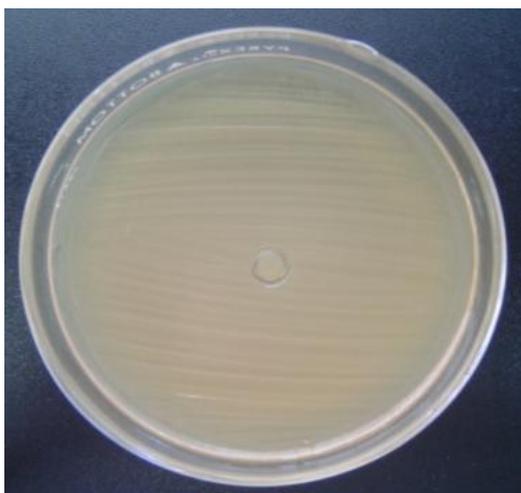


Foto 28. *Salmonella typhi* resistente a la acción del extracto de *Allium sativum* después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Obsérvese que no hay zona de inhibición en la placa.

## 7.4 Técnica colorimétrica de Mosmann

### 7.4.1 Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Streptococcus pyogenes*

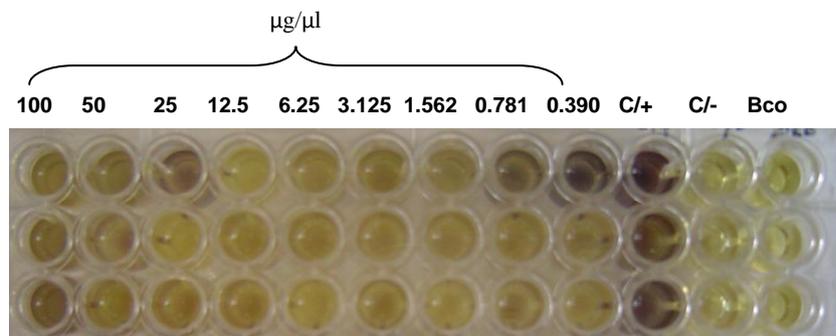
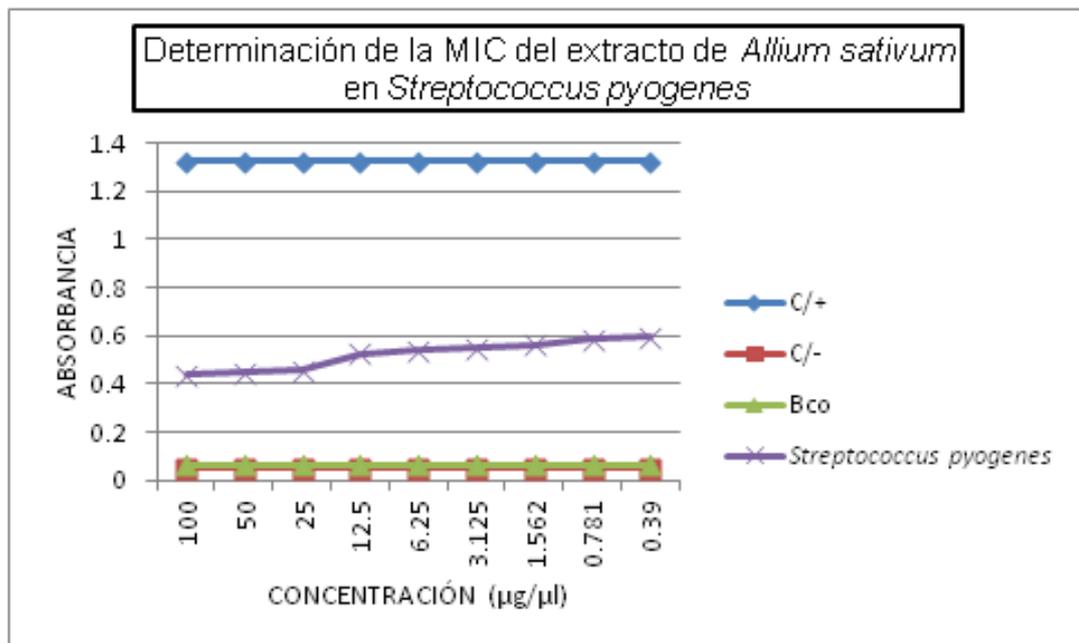


Foto 29. Microdiluciones del extracto de *Allium sativum* con *Streptococcus pyogenes*, después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C y de adicionar el reactivo MTT. Obsérvese la inhibición del desarrollo de la bacteria en todas las concentraciones trabajadas del extracto, ya que al agregar el MTT, este no se reduce a formazan (compuesto púrpura intenso), a comparación del control (+).



Gráfica 1. Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Streptococcus pyogenes* a diferentes concentraciones. Obsérvese que en todas las concentraciones del extracto trabajadas el desarrollo de la bacteria es inhibido.

### 7.4.2 Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Staphylococcus aureus*

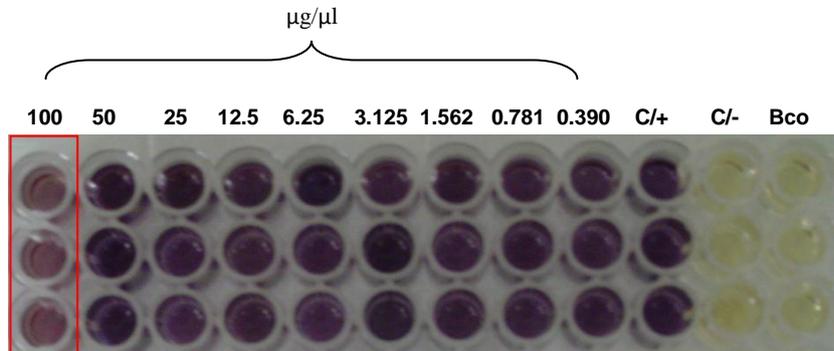
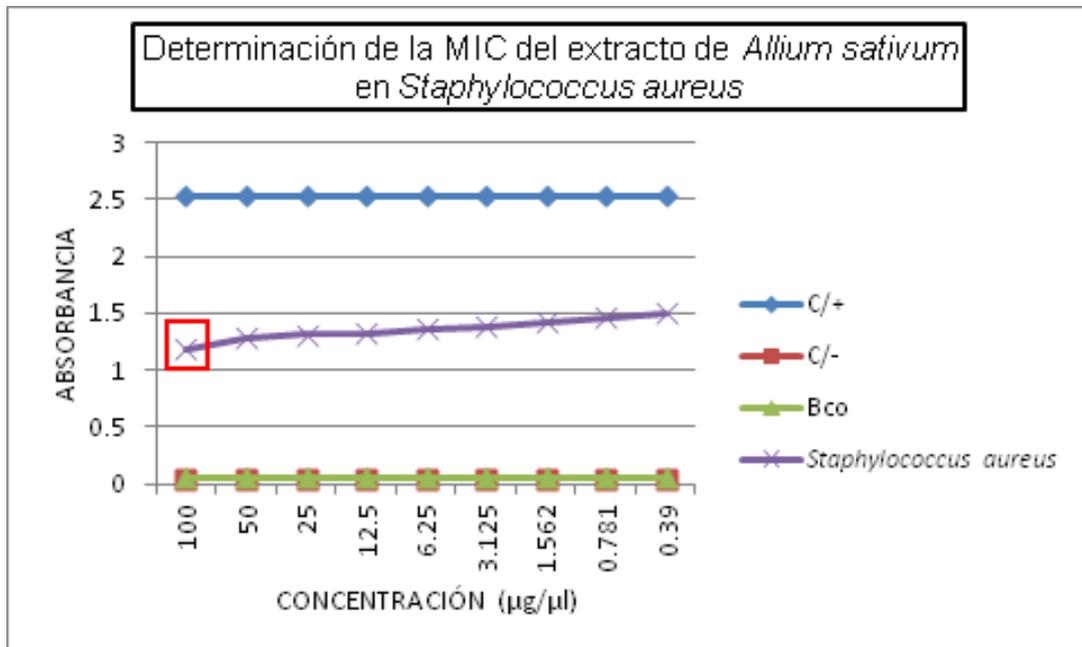


Foto 30. Microdiluciones del extracto de *Allium sativum* con *Staphylococcus aureus* después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C y de adicionar el reactivo MTT. Obsérvese que a una concentración de 100 µg/µl hay una ligera inhibición de la bacteria a comparación del resto de las diluciones, ya que al agregar el MTT este se reduce en menor proporción a formazan (compuesto púrpura intenso) a comparación del resto de las diluciones, incluido el control (+).



Gráfica 2. Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones. Obsérvese que en una concentración de 100 µg/µl hay una ligera inhibición en el desarrollo de la bacteria, inferior a esta concentración ya no hay inhibición. El rectángulo en rojo señala la MIC.

### 7.4.3 Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Staphylococcus epidermidis*

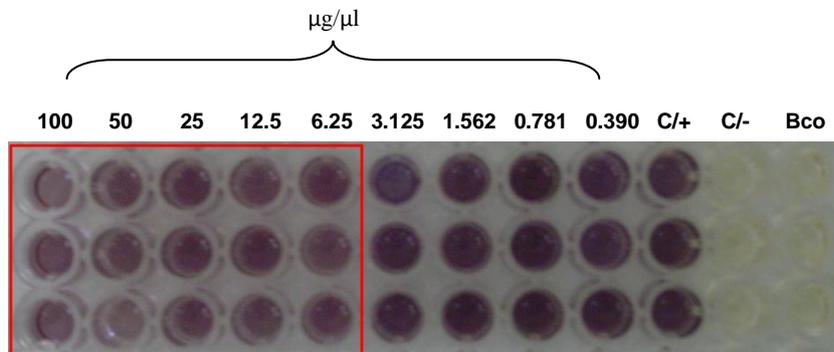
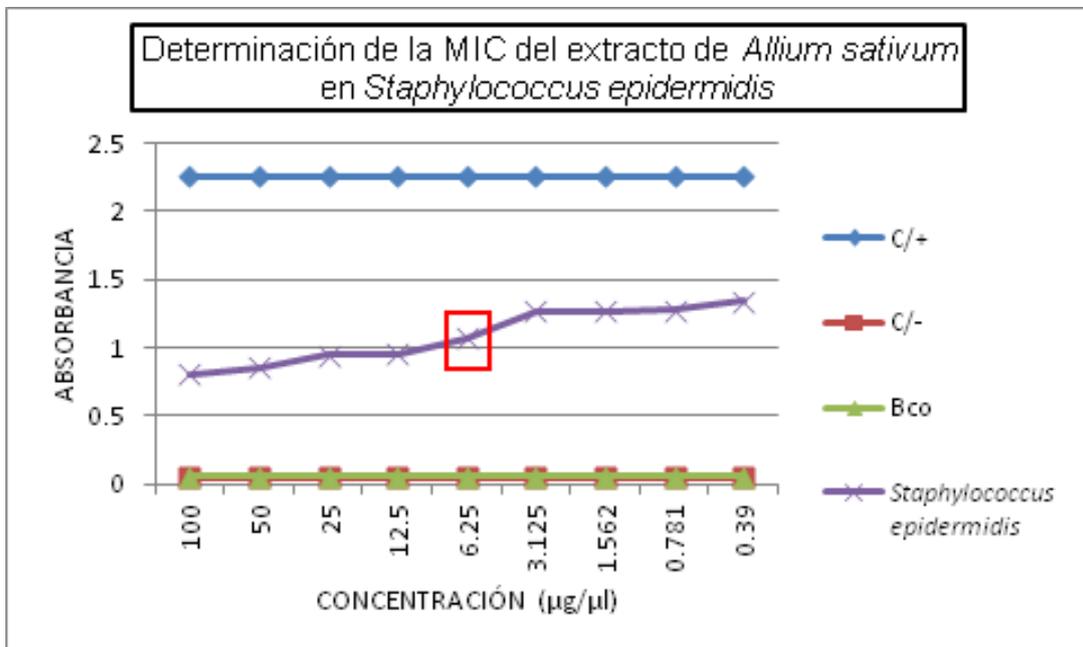


Foto 31. Microdiluciones del extracto de *Allium sativum* con *Staphylococcus epidermidis*, después un periodo de incubación de 24 horas a 37°C, y de adicionar el reactivo MTT. Obsérvese que a concentraciones de 6.25-100 µg/µl hay una ligera inhibición en el desarrollo de la bacteria ya que al agregar el MTT este se reduce en menor proporción a formazan (compuesto púrpura intenso) a comparación del resto de las diluciones. Incluido el control (+).



Gráfica 3. Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Staphylococcus epidermidis* a diferentes concentraciones. Obsérvese que en el rango de 6.25-100 µg/µl el desarrollo de *Staphylococcus epidermidis* es ligeramente inhibido. El rectángulo en rojo señala la MIC.

#### 7.4.4 Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Escherichia coli*

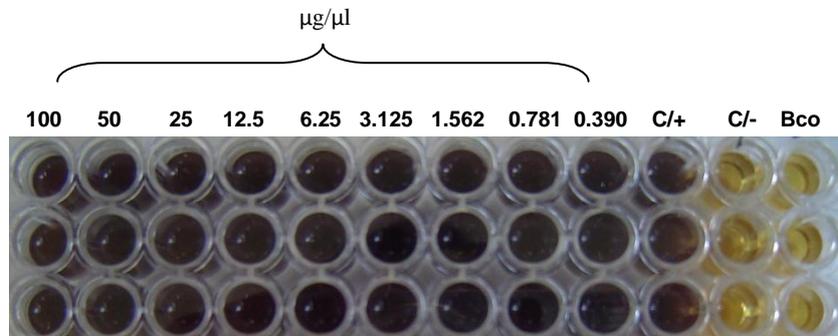
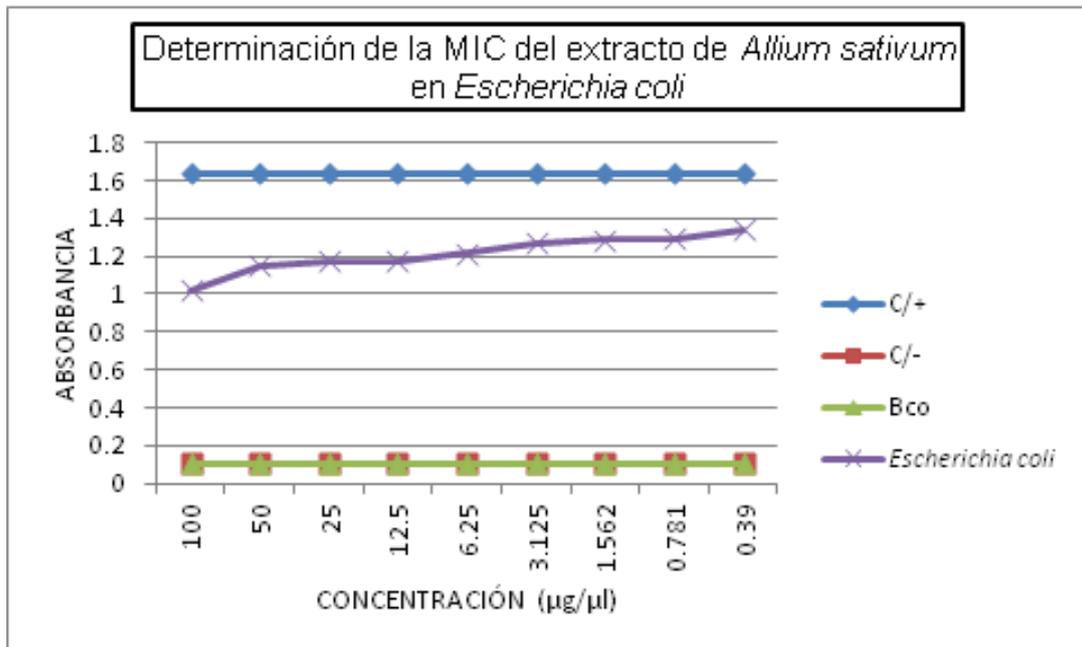


Foto 32. Microdiluciones del extracto de *Allium sativum* con *Escherichia coli* después de las 24 horas a 37°C de incubación y de adicionar el reactivo MTT. Obsérvese que no hay inhibición de la bacteria en ninguna de las concentraciones trabajadas. La producción de formazan (compuesto púrpura intenso) en los pozos de las columnas 1-9, incluido el control (+) es homogéneo.



Gráfica 4. Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* a diferentes concentraciones en *Escherichia coli*. Obsérvese que no hay inhibición en el desarrollo de la bacteria a ninguna concentración del extracto. Por lo tanto no se puede determinar la MIC.

#### 7.4.5 Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Klebsiella pneumoniae*

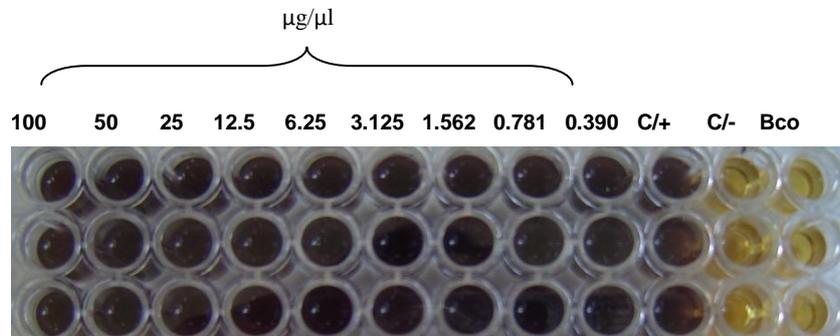
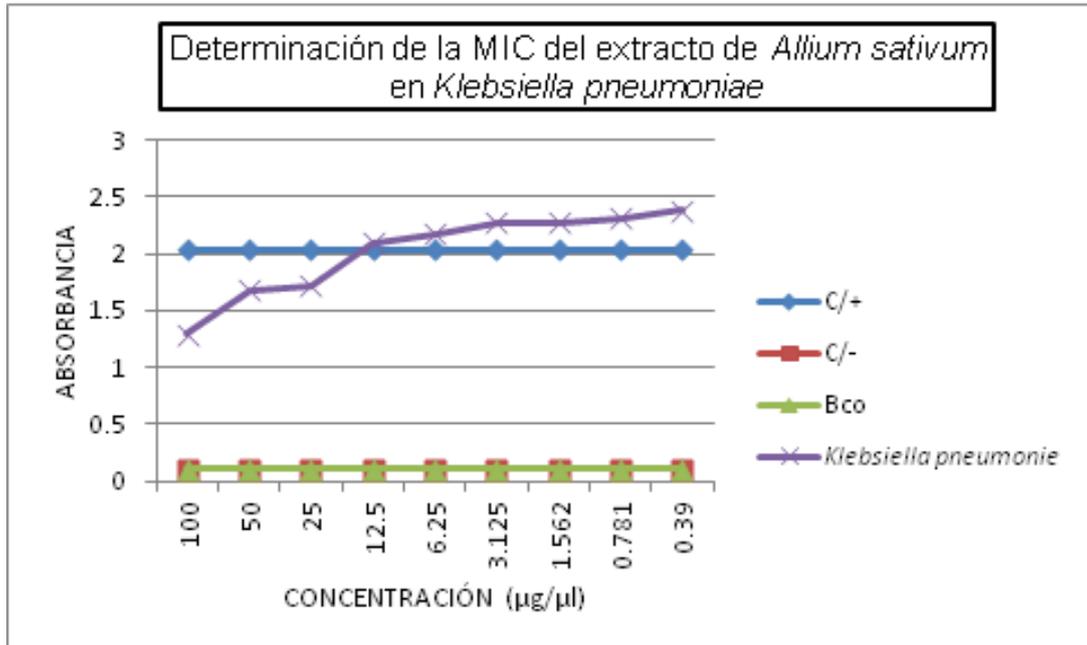


Foto 33. Microdiluciones del extracto de *Allium sativum* con *Klebsiella pneumoniae*, después de las 24 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y de adición del reactivo MTT. Obsérvese que no hay inhibición de la bacteria en ninguna de las concentraciones trabajadas. La producción de formazan (compuesto púrpura intenso) en los pozos de las columnas 1-9, incluido el control (+) es homogéneo.



Gráfica 5. Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* a diferentes concentraciones en *Klebsiella pneumoniae*. Obsérvese que no hay inhibición en el desarrollo de la bacteria a ninguna concentración del extracto. Por lo tanto no se puede determinar la MIC.

#### 7.4.6 Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Salmonella typhi*

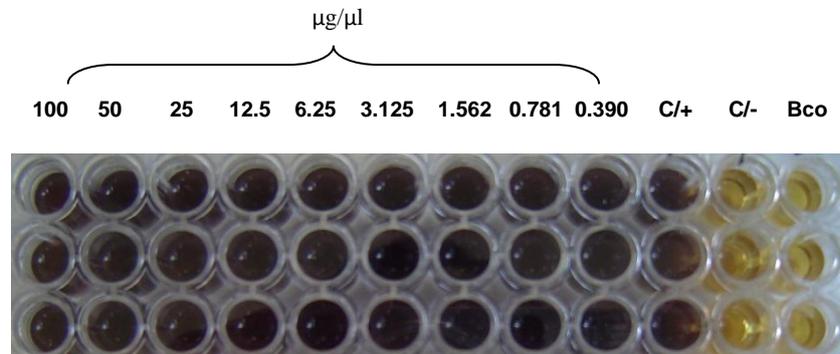
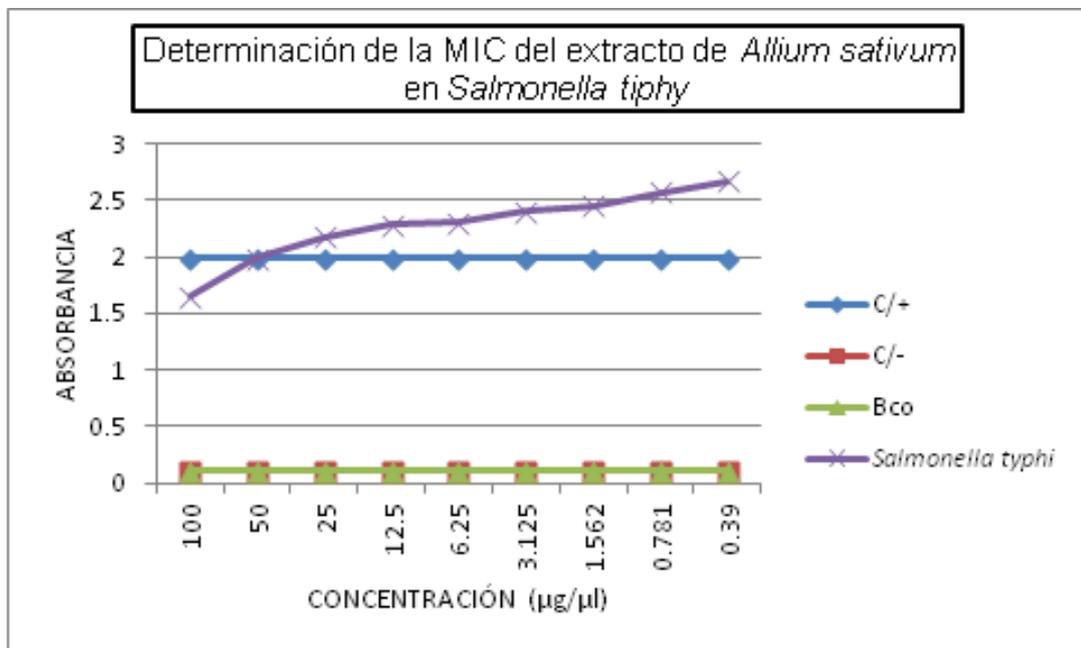


Foto 34. Microdiluciones del extracto de *Allium sativum* con *Salmonella typhi* después de las 24 horas de incubación a 37°C y de adicionar el reactivo MTT. Obsérvese que no hay inhibición de la bacteria en ninguna de las concentraciones trabajadas. La producción de formazan (compuesto púrpura intenso) en los pozos de las columnas 1-9, incluido el control (+) es homogéneo.



Gráfica 6. Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* a diferentes concentraciones en *Salmonella typhi*. Obsérvese que no hay inhibición en el desarrollo de la bacteria a ninguna concentración del extracto. Por tanto no se puede determinar la MIC.

### 7.4.7 Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* en *Shigella flexneri*

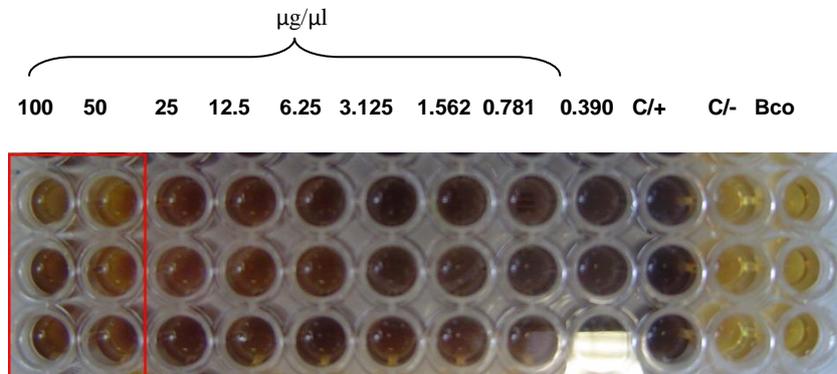
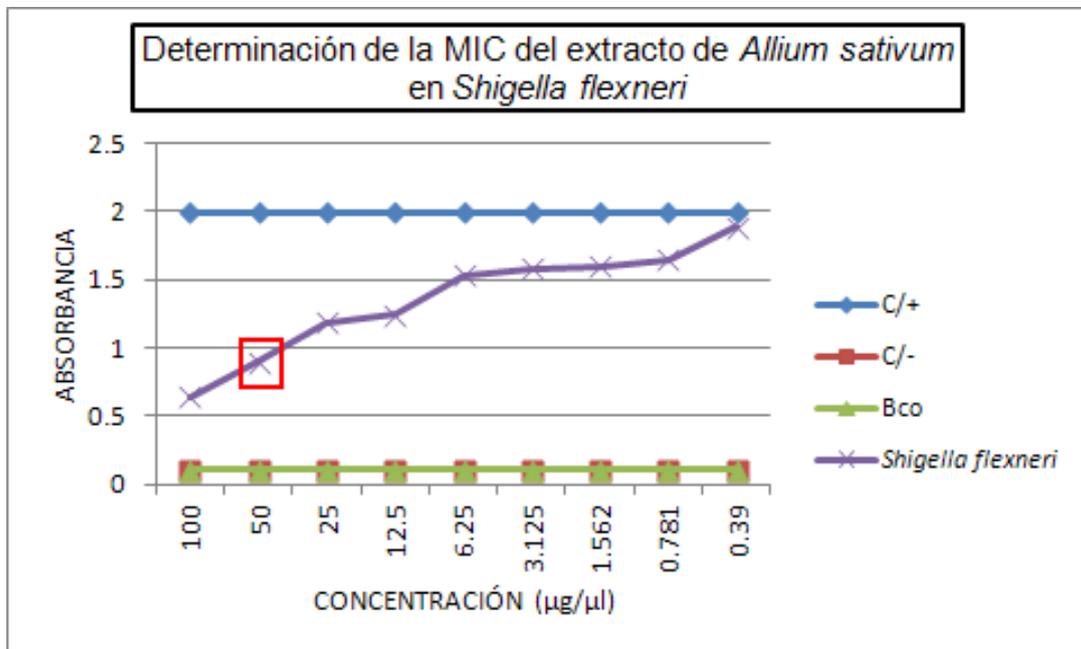


Foto 35. Microdiluciones del extracto de *Allium sativum* con *Shigella flexneri* después de las 24 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y de adicionar el reactivo MTT. Obsérvese que la cantidad de bacterias vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido (compuesto púrpura intenso). En concentraciones de  $50\text{-}100\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , la cantidad de bacterias presentes es inferior a la cantidad de bacterias presentes en concentraciones de  $0.390\text{-}25\ \text{mg}/\text{ml}$ , incluido el control (+).



Gráfica 7. Determinación de la MIC del extracto de *Allium sativum* a diferentes concentraciones en *Shigella flexneri*. Obsérvese la MIC a una concentración de  $50\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . El rectángulo en rojo señala la MIC.

### 7.5 Efecto Bactericida-Bacteriostático del extracto de *Allium sativum* en *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*

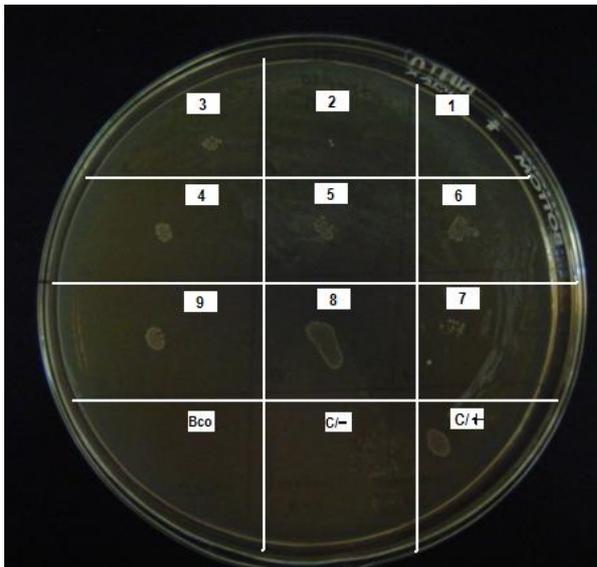


Foto 36. Prueba bactericida/bacteriostático para *Streptococcus pyogenes* en placa de agar BHI. Obsérvese que en la primer división correspondiente a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , el extracto presenta un efecto bactericida hacia la bacteria, concentraciones inferiores a esta se presenta un efecto bacteriostático ya que al disminuir la concentración del extracto el crecimiento bacteriano va en aumento.

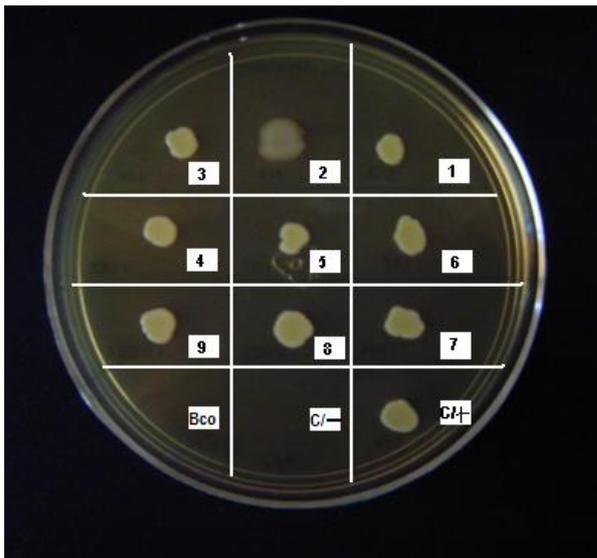


Foto 37. Prueba bactericida/bacteriostático para *Staphylococcus aureus* en placa de agar BHI. Obsérvese que en las divisiones 1-5 el crecimiento bacteriano es menor al resto de las divisiones incluido el control positivo. No hubo ninguna inhibición que se pudiera comparar con el control negativo. El efecto del extracto de *Allium sativum* fue bacteriostático para esta bacteria.

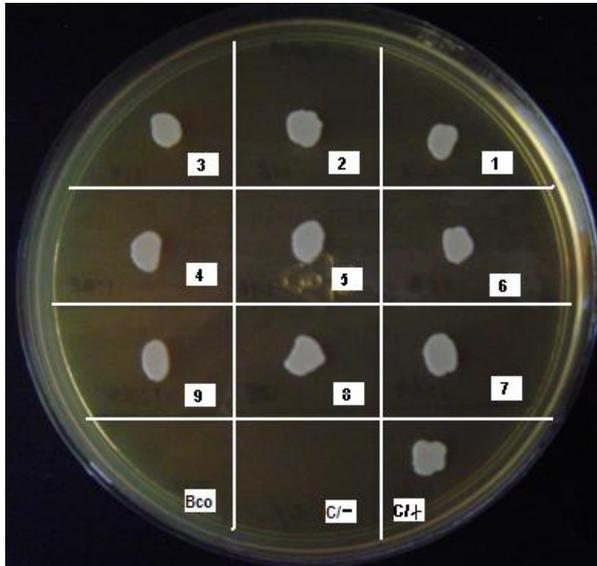


Foto 38. Prueba bactericida/bacteriostático para *Staphylococcus epidermidis* en placa de agar BHI. Obsérvese un crecimiento homogéneo y similar al control positivo en todas las divisiones. El efecto del extracto de *Allium sativum* fue bacteriostático para esta bacteria.

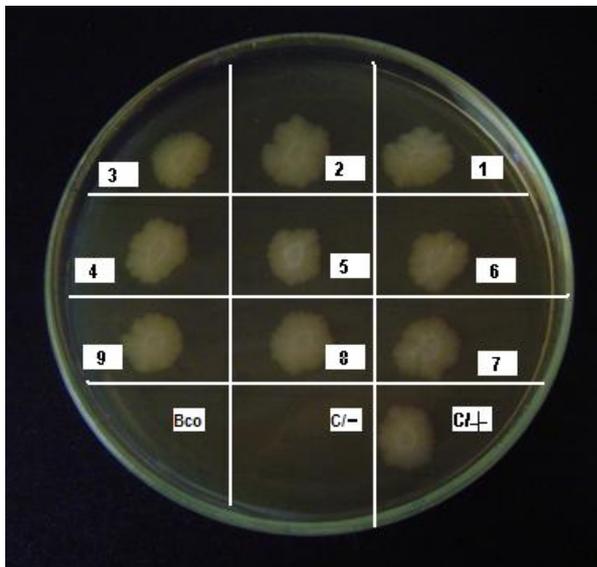


Foto 39. Prueba bactericida/bacteriostático para *Escherichia coli* en placa de agar BHI. Obsérvese un crecimiento homogéneo y similar al control positivo en todas las divisiones. El efecto del extracto de *Allium sativum* fue bacteriostático para esta bacteria.

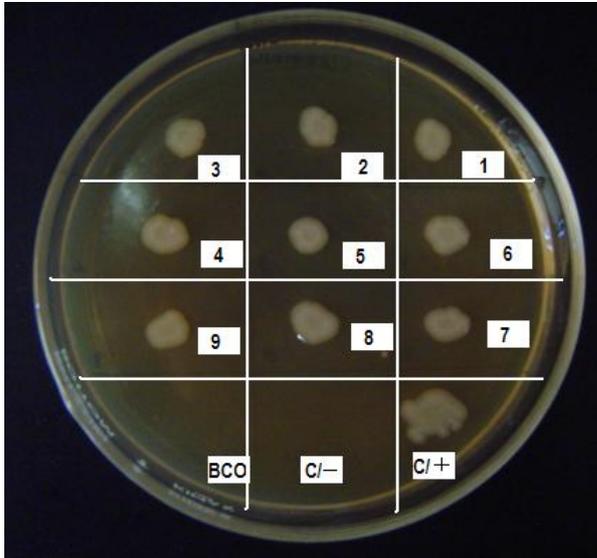


Foto 40. Prueba bactericida/bacteriostático para *Klebsiella pneumoniae* en placa de agar BHI. Obsérvese un crecimiento homogéneo y similar al control positivo en todas las divisiones. El efecto del extracto de *Allium sativum* fue bacteriostático para esta bacteria.

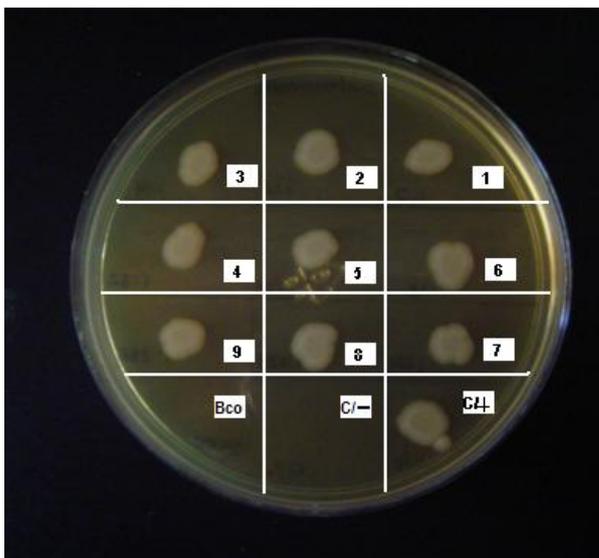


Foto 41. Prueba bactericida/bacteriostático para *Salmonella typhi* en placa de agar BHI. Obsérvese un crecimiento homogéneo y similar al control positivo en todas las divisiones. El efecto del extracto de *Allium sativum* fue bacteriostático para esta bacteria.

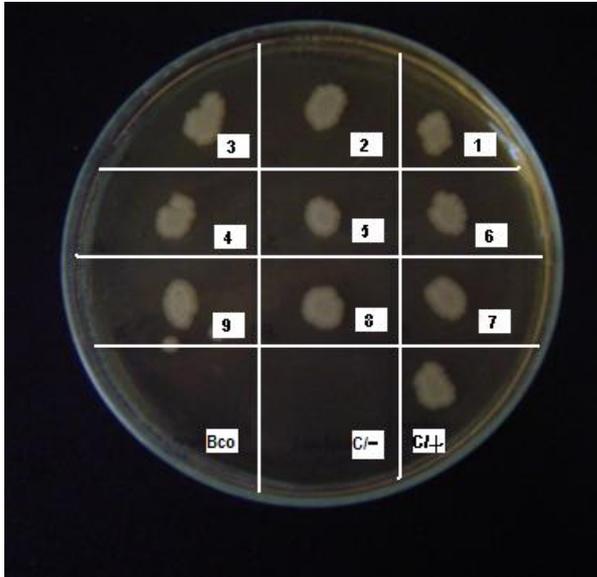


Foto 42. Prueba bactericida/bacteriostático para *Shigella flexneri* en placa de agar BHI. Obsérvese un crecimiento homogéneo y similar al control positivo en todas las divisiones. El efecto del extracto de *Allium sativum* fue bacteriostático para esta bacteria.

Tabla 10 .Prueba Bactericida/Bacteriostático para bacterias Gram (+).

BACTERIA	EFEECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriostático
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteriostático

Tabla 11. Prueba Bactericida/Bacteriostático para bacterias Gram (-).

BACTERIA	EFEECTO BACTERICIDA Y/O BACTERIOSTÁTICO
<i>Escherichia coli</i>	Bacteriostático
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacteriostático
<i>Salmonella typhi</i>	Bacteriostático
<i>Shigella flexneri</i>	Bacteriostático

## 7.6 Bacterias observadas en Microscopio Electrónico de Transmisión

Para la observación en microscopio electrónico de transmisión, se trabajó solamente a las bacterias que presentaron susceptibilidad al efecto del extracto de *Allium sativum* durante la técnica cilindro en placa: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Shigella flexneri*. Cada una de las bacterias fue procesada por la técnica de tinción negativa y observada en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 100S) a 10,000 magnificaciones.

### 7.6.1 Microfotografías electrónicas de *Streptococcus pyogenes*

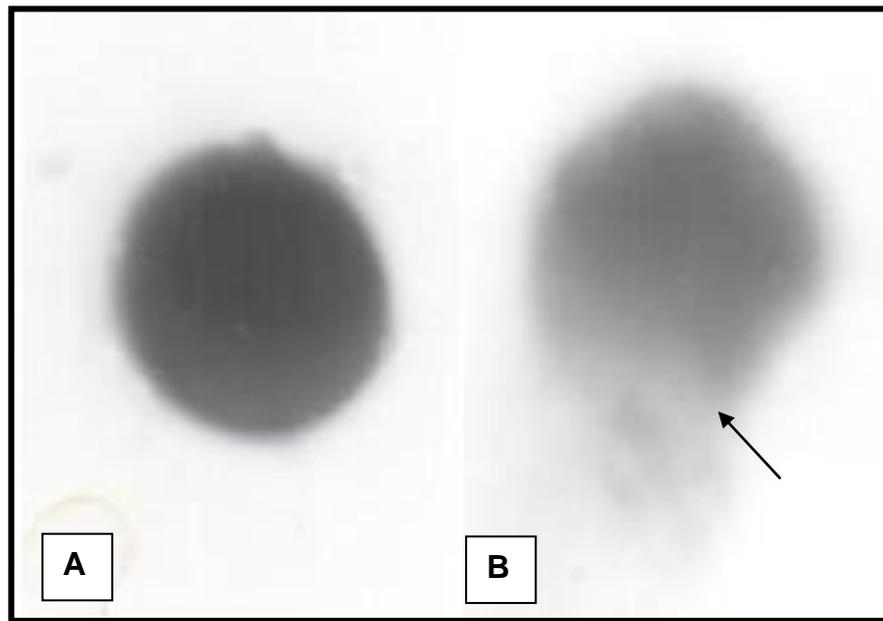


Foto 43. **A:** *Streptococcus pyogenes* (Control positivo). Obsérvese que la superficie bacteriana es totalmente homogénea sin protuberancias ni deformaciones. **B:** *Streptococcus pyogenes* tratado con el extracto de *Allium sativum*. Obsérvese en la bacteria una posible lisis, exponiendo su contenido al medio y deformando su superficie bacteriana.

### 7.6.2 Microfotografías electrónicas de *Staphylococcus aureus*

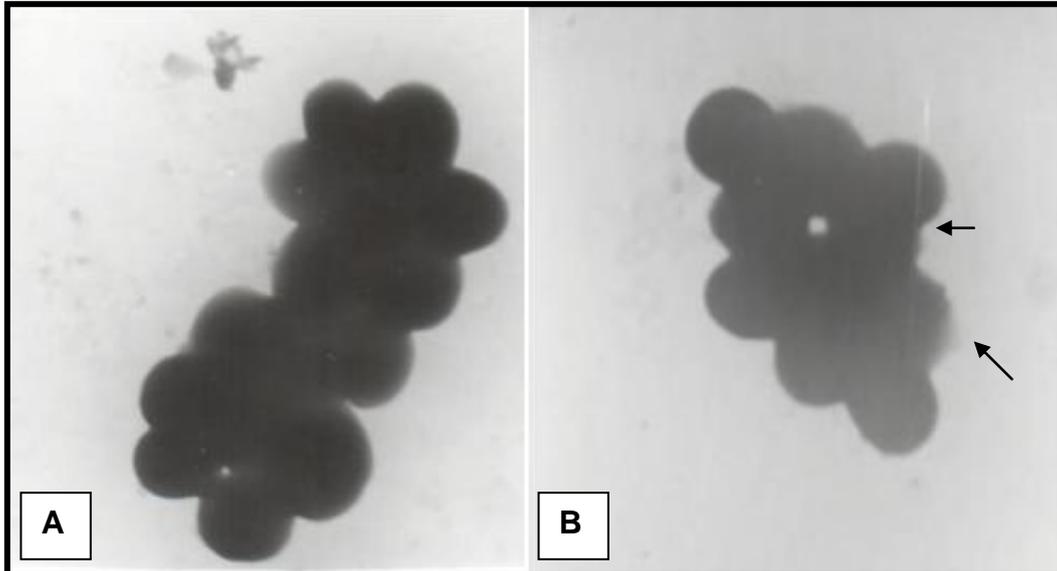


Foto 44. **A:** *Staphylococcus aureus* (Control positivo). Obsérvese una agrupación en racimo típica de un *Staphylococcus* y una superficie bacteriana homogénea sin protuberancias ni deformaciones. **B:** *Staphylococcus aureus* tratado con el extracto de *Allium sativum*. Obsérvese que la superficie bacteriana muestra deformaciones.

### 7.6.2 Microfotografías electrónicas de *Staphylococcus epidermidis*

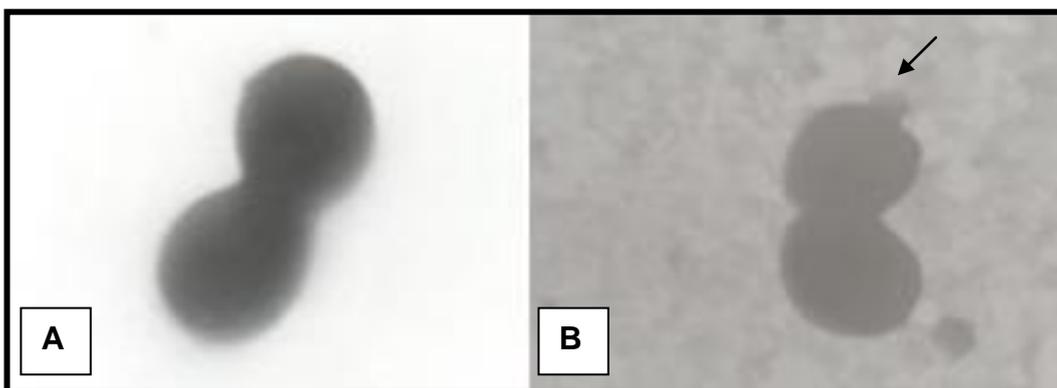


Foto 45. **A:** *Staphylococcus epidermidis* (Control positivo). Obsérvese una superficie bacteriana homogénea sin protuberancias ni deformaciones. **B:** *Staphylococcus epidermidis* tratado con el extracto de *Allium sativum*. Obsérvese que la superficie bacteriana muestra deformaciones con la posible formación de protoplastos.

### 7.6.2 Microfotografías electrónicas de *Shigella flexneri*

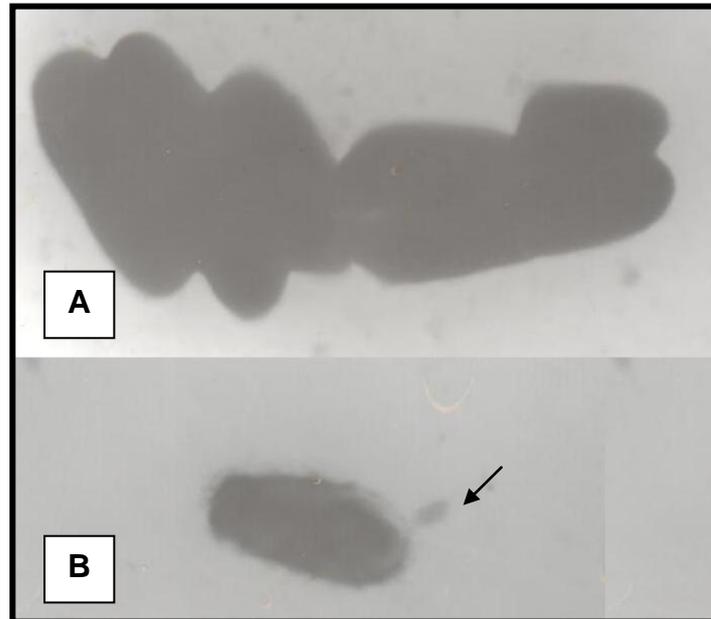


Foto 46. **A:** *Shigella flexneri* (control positivo). Obsérvese la forma bacilar característica de la bacteria y una superficie bacteriana totalmente homogénea. **B:** *Shigella flexneri* tratado con el extracto de *Allium sativum*. Obsérvese la alteración de la superficie bacteriana con la posible formación de esferoplastos.



## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El empleo de fuentes naturales como antibióticos nace de la inquietud por el diferente patrón de sensibilidad de algunos microorganismos a antibióticos clásicos o incluso a algunos de reciente introducción. La producción de numerosas moléculas sintéticas, el alto costo y el uso indiscriminado de diferentes medicamentos comenzaron a causar la resistencia bacteriana así como muchos efectos tóxicos, esto explica la necesidad de retornar a la utilización de plantas medicinales, lo cual representa un fácil acceso de tratamiento en países de bajo desarrollo, menos riesgos a la salud y efectos secundarios.

En el presente estudio se analizó el efecto inhibitorio del extracto de *Allium sativum* en 7 cepas bacterianas de importancia médica adquiridas en el laboratorio de microbiología de la Unidad de Posgrado, demostrando poseer una mayor inhibición en el crecimiento de bacterias Gram positivas con una actividad pronunciada contra *Streptococcus pyogenes* y muy escasa actividad contra bacterias Gram negativas ya que solo inhibió a *Shigella flexneri* de las cuatro bacterias Gram negativas trabajadas.

Cabe mencionar que las bacterias utilizadas para este proyecto, fueron seleccionadas bajo revisión bibliográfica. García Rico (2007) menciona que en estudios realizados en diferentes laboratorios del mundo, han reportado que el ajo ejerce una acción inhibitoria sobre el crecimiento de géneros bacterianos tan diversos como: *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, y *Streptococcus*<sup>17</sup>.

El extracto de ajo fue esterilizado por filtración con filtros Millipore de 0.45 micras para evitar la degradación de compuestos termolábiles presentes en el extracto. Se llevó hasta sequedad total a una temperatura de 37-45°C para evaporar el etanol y así evitar que el efecto antimicrobiano estuviera asociado a este y no a los compuestos del ajo.

Se realizó una prueba cualitativa: método de difusión en agar (cilindro-placa) con el fin de determinar la actividad del extracto de *Allium sativum* en las bacterias estudiadas. Con éste método se pudo probar la eficacia del extracto realizando una siembra de una suspensión bacteriana con un inóculo normalizado sobre la superficie de un medio sólido, colocando sobre la misma un cilindro de acero inoxidable y depositando en el una cantidad conocida de la solución del extracto. Tras un periodo de incubación se obtuvo, alrededor del cilindro, si el microorganismo es sensible, una zona de inhibición del crecimiento bacteriano, tal fue el caso de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Shigella flexneri* que presentaron sensibilidad (Ver fotos 22-25, respectivamente) mientras que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* presentaron resistencia (Ver fotos 26-28, respectivamente).

Este método tuvo la ventaja de ser sencillo y útil para determinar la sensibilidad del extracto en las bacterias trabajadas, además de que la zona de inhibición del crecimiento bacteriano fue perfectamente definida.



Para determinar la MIC, se utilizó la técnica de microdilución en placa, realizando microdiluciones dobles del extracto. Posteriormente se sometió a cada una de las bacterias a las diferentes concentraciones del extracto, utilizando como medio de cultivo BHI. Para leer los resultados obtenidos en cada una de las microdiluciones realizadas, se realizó una lectura visual detectando turbidez y/o nitidez; crecimiento e inhibición respectivamente. En este tipo de lectura se tienen ciertas desventajas como el de ser subjetivo ya que una persona puede hacer una interpretación diferente a la de otra y por lo tanto los resultados son poco confiables. Para evitar tal inconveniente se trabajó con el método de Mosmann, adicionando a cada pozo de la microplaca un volumen conocido del reactivo de MTT, pues nos da la opción de realizar lecturas en un Elisómetro y por lo tanto proporcionarnos datos cuantitativos.

Este método colorimétrico fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang<sup>66</sup>. Se basa en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de las células viables para transformar la sal MTT (compuesto soluble y amarillo) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio a Formazan (compuesto púrpura intenso e insoluble). De lo contrario el colorante permanece en su forma oxidada de color amarillo.

Amal G. et al 2007 utiliza la sal de MTT para determinar la actividad antimicrobiana de algunos extractos, comenta que la actividad antimicrobiana puede ser detectada al realizar un recuento viable después de la exposición al extracto, tomando como base el control positivo, que sería al 100% de crecimiento y de esta manera poder analizar el resto de los pozos.<sup>22</sup>

Los resultados obtenidos de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para las bacterias Gram positivas (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) se muestran en las gráficas No 1, 2 y 3, respectivamente. Para el caso de *Streptococcus pyogenes* la MIC fue de 0.390625 µg/µl para *Staphylococcus aureus* de 100 µg/µl y para *Staphylococcus epidermidis* de 6.25 µg/µl, siendo *Streptococcus pyogenes* la más susceptible a la acción del extracto.

Anteriormente se mencionó que el MTT solo es reducido por la presencia de bacterias viables de lo contrario el reactivo permanece en su forma oxidada de color amarillo, tal fue el caso del ensayo con *Streptococcus pyogenes* en el que en todas las concentraciones trabajadas hubo inhibición del crecimiento de la bacteria a comparación del control positivo. (Ver foto No 29).

Para el caso de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias en las Bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*) no se pudo determinar en las tres primeras bacterias ya que el extracto no tuvo ningún efecto sobre su crecimiento en ninguna de las concentraciones trabajadas (Ver fotos No 32, 33 y 34) a comparación de la última con una MIC de 50 µg/µl (Ver foto No 35 y gráfica No 7).

También se evaluó la actividad bactericida y/o bacteriostática del extracto en cada una de las bacterias trabajadas. Los resultados correspondientes para las bacterias Gram positivas y Gram negativas, se presentan en las tablas No 10 y 11 respectivamente, siendo *Streptococcus pyogenes* la única bacteria que presentó una respuesta bactericida a la acción del extracto a una concentración de 100 µg/µl (Ver foto 36). En el caso de *Staphylococcus*



*aureus* y *Staphylococcus epidermidis* el efecto fue bacteriostático, teniendo resultados iguales en las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*) ya que al sembrarlas en un medio carente del inhibidor que en este caso fue el extracto, estas bacterias vuelven recuperar su crecimiento.

Finalmente se selecciono a las bacterias que presentaron sensibilidad en el método de difusión en agar: cilindro-placa y en la microdilución en placa (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Shigella flexneri*) para realizar observaciones en el Microscopio Electrónico de Transmisión empleando la técnica de tinción negativa y evidenciar el daño causado por el extracto de ajo.

En base a los datos obtenidos en la MIC y en la Microscopía Electrónica de Transmisión la bacteria que tuvo mayor impacto a la acción del ajo fue *Streptococcus pyogenes*, ya que la muestra tratada se ve totalmente lisada a comparación de la no tratada (Ver foto No 43) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Shigella flexneri* (Ver fotos No 44, 45 y 46 respectivamente) mostraron una ligera alteración en la pared celular y la posible formación de protoplastos para el caso de *Staphylococcus epidermidis* y esferoplastos para *Shigella flexneri*; asociado posiblemente a que el extracto está actuando a nivel de la pared celular.

Hay dos posibles métodos por los cuales se puede destruir la pared celular, uno es el ataque al peptidoglicano, como lo hace la enzima lisozima que rompe los enlaces que une el ácido N-acetilmurámico con el carbono 4 de la N-acetilglucosamina, que en consecuencia debilitan la pared, lo que ocasiona que el agua pueda entrar a la célula produciendo lisis. Pero si esta se encuentra en condiciones isotónicas, la lisozima puede digerir el peptidoglicano y como consecuencia el agua no entraría a la célula provocando la lisis de la célula formándose un protoplasto como formas normales libres de cualquier material residual de la pared celular de bacterias Gram positivas, mientras que los esferoplastos, son restos de la pared unidos a la membrana de Gram negativos<sup>22</sup>. El otro método por los cuales se puede destruir la pared celular es por la inhibición de la síntesis de nuevo peptidoglicano en células en crecimiento.

Haciendo comparación de la sensibilidad del extracto de *Allium sativum* en las bacterias Gram positivas y Gram negativas trabajadas en este proyecto, encontramos que las Gram positivas fueron mas sensibles a la acción del extracto con respecto a las Gram negativas posiblemente a las diferencias de la pared celular ya que las Gram negativas poseen una pared celular mucho más compleja compuesta por una pared celular interna, una pared de peptidoglucano, una bicapa lipídica externa, una membrana externa y un espacio periplasmático mientras que las Gram positivas solo poseen una pared celular interna y una pared de peptidoglucano y la presencia de ácidos teicoicos y lipoteicoicos, que sirven como agentes quelantes y en ciertos tipos de adherencia. No tienen una membrana externa y no tiene un espacio periplasmático.

Los componentes del ajo implicados en la actividad antimicrobiana ya demostrada en este proyecto son de diferente naturaleza química, de ellos el más conocido es la alicina que se obtiene por hidrólisis enzimática de la aliína<sup>1</sup>. El mecanismo de acción implicado en esta actividad, consiste en la capacidad de la alicina de inhibir a algunas enzimas involucradas en las rutas metabólicas celulares.<sup>73</sup>



Cualquier alteración en el comportamiento normal de las enzimas de un microorganismo puede tener consecuencias de funcionamiento y por lo tanto afectar el desarrollo celular.

La composición cualitativa y cuantitativa de los derivados azufrados depende , en primer termino, de la especie botánica y de factores abióticos tales como el medio ambiente, clima, condiciones del suelo y de factores socioculturales como prácticas culturales, estado de desarrollo, manejo poscosecha previo a la extracción y método de extracción, lo cual incide a su vez en su actividad.<sup>73</sup>

Los resultados obtenidos en las Concentraciones Mínimas inhibitorias y en la Microscopía Electrónica de Transmisión en este trabajo, nos da la pauta para seguir realizando más investigaciones poniendo mayor atención en la concentración para garantizar su efectividad.



## 9. CONCLUSIONES

- El conocimiento generado con la realización del presente proyecto, servirá como aporte al desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento que puedan ser aplicados en enfermedades ocasionadas por patógenos sensibles al extracto, siempre y cuando sean las concentraciones necesarias para garantizar su efectividad.
  - Se logró identificar por pruebas bioquímicas primarias y secundarias ,asi como su crecimiento en medios selectivos a las bacterias *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*.
  - Se esterilizó el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* a través de un sistema de filtración obteniendo resultados negativos de crecimiento bacteriano
  - Se determinó la valoración del extracto de *Allium sativum* (Resistencia-Sensibilidad) en las bacterias anteriormente mencionadas, a través del método de difusión en agar: cilindro-placa presentando inhibición en sólo 4 de las 7 bacterias trabajadas.
  - Se realizó ensayo extracto-bacteria con la técnica de microdilución en placa, empleando la técnica de Mosmann siendo *Streptococcus pyogenes* la bacteria más susceptible a la acción del extracto.
  - Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), así como la actividad bactericida y/o bacteriostática del extracto en cada una de las bacterias ya mencionadas.
  - Se logró evidenciar por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) el posible sitio donde el extracto de *Allium sativum* produjo el efecto en las bacterias.
- 
-



## 10. ANEXOS

### ANEXO 1.

Absorbancias obtenidas después de realizarse las lecturas de las placas a una longitud de onda de 655 nm en el lector de ELISA.

Pozo	Concentración (µg/µl)	Abs. <i>Streptococcus pyogenes</i>	C/+	C/-	Bco
1	100	0,437	1,325	0,052	0,065
2	50	0,448	1,325	0,052	0,065
3	25	0,457	1,325	0,052	0,065
4	12.5	0,525	1,325	0,052	0,065
5	6.25	0,538	1,325	0,052	0,065
6	3.125	0,547	1,325	0,052	0,065
7	1.562	0,563	1,325	0,052	0,065
8	0.781	0,584	1,325	0,052	0,065
9	0.390	0,595	1,325	0,052	0,065

Pozo	Concentración (µg/µl)	Abs. <i>Staphylococcus aureus</i>	C/+	C/-	Bco
1	100	1,182	2,534	0,045	0,054
2	50	1,289	2,534	0,045	0,054
3	25	1,312	2,534	0,045	0,054
4	12.5	1,325	2,534	0,045	0,054
5	6.25	1,361	2,534	0,045	0,054
6	3.125	1,387	2,534	0,045	0,054
7	1.562	1,424	2,534	0,045	0,054
8	0.781	1,463	2,534	0,045	0,054
9	0.390	1,507	2,534	0,045	0,054

Pozo	Concentración (µg/µl)	Abs. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	C/+	C/-	Bco
1	100	0,803	2,257	0,047	0,059
2	50	0,858	2,257	0,047	0,059
3	25	0,949	2,257	0,047	0,059
4	12.5	0,956	2,257	0,047	0,059
5	6.25	1,073	2,257	0,047	0,059
6	3.125	1,268	2,257	0,047	0,059
7	1.562	1,27	2,257	0,047	0,059
8	0.781	1,28	2,257	0,047	0,059
9	0.390	1,34	2,257	0,047	0,059



Pozo	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Abs. <i>Escherichia coli</i>	C/+	C/-	Bco
1	100	1,022	1,638	0,107	0,105
2	50	1,153	1,638	0,107	0,105
3	25	1,173	1,638	0,107	0,105
4	12.5	1,175	1,638	0,107	0,105
5	6.25	1,214	1,638	0,107	0,105
6	3.125	1,268	1,638	0,107	0,105
7	1.562	1,286	1,638	0,107	0,105
8	0.781	1,294	1,638	0,107	0,105
9	0.390	1,341	1,638	0,107	0,105

Pozo	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Abs. <i>Salmonella typhi</i>	C/+	C/-	Bco
1	100	1,646	1,991	0,11	0,105
2	50	1,986	1,991	0,11	0,105
3	25	2,172	1,991	0,11	0,105
4	12.5	2,287	1,991	0,11	0,105
5	6.25	2,303	1,991	0,11	0,105
6	3.125	2,407	1,991	0,11	0,105
7	1.562	2,448	1,991	0,11	0,105
8	0.781	2,567	1,991	0,11	0,105
9	0.390	2,673	1,991	0,11	0,105

Pozo	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Abs. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	C/+	C/-	Bco
1	100	1,291	2,04	0,11	0,105
2	50	1,679	2,04	0,11	0,105
3	25	1,717	2,04	0,11	0,105
4	12.5	2,093	2,04	0,11	0,105
5	6.25	2,176	2,04	0,11	0,105
6	3.125	2,269	2,04	0,11	0,105
7	1.562	2,272	2,04	0,11	0,105
8	0.781	2,309	2,04	0,11	0,105
9	0.390	2,383	2,04	0,11	0,105



Pozo	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Abs. <i>Shigella</i> <i>flexneri</i>	C/+	C/-	Bco
1	100	0.705	1,994	0,11	0,105
2	50	0,896	1,994	0,11	0,105
3	25	1,184	1,994	0,11	0,105
4	12.5	1,243	1,994	0,11	0,105
5	6.25	1,535	1,994	0,11	0,105
6	3.125	1,583	1,994	0,11	0,105
7	1.562	1,596	1,994	0,11	0,105
8	0.781	1,647	1,994	0,11	0,105
9	0.390	1,888	1,994	0,11	0,105



## ANEXO 2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### A) MEDIOS DE CULTIVO

#### ❖ Agar Infusión cerebro Corazón, (BHI)

Se emplea para el cultivo de bacterias exigentes como *Streptococos*, *Neumococos*, *Meningococos* y otros. Por la adición de *Streptomycin*, *Gentamicin* o *Cloranfenicol* resulta un medio selectivo para hongos.

#### Fundamento

Por la presencia de peptona, infusión de cerebro de ternera e infusión de corazón de res, se tienen los componentes necesarios para nutrir microorganismos exigentes. La glucosa se emplea para la fermentación y el fosfato como tampón. Por la adición de antibiótico es un medio adecuado para el estudio de hongos patógenos. Debido a su contenido de glucosa es menos indicado para la caracterización de hemólisis, pero puede usarse suplemento de sangre.

Fórmula (litro)

COMPONENTE	(g)
Agar Infusión de Cerebro Corazón	8.0
Peptona de carne	5.0
Peptona de caseína	16.0
Fosfato disódico	2.5
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	2.0
Agar	13.5

pH final: 7.4+/- 0.2

#### Método de preparación

Suspender 52 g del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas estériles con 20 ml cada una. Dejar gelificar las placas. Etiquetar cada lote con los siguientes datos: número de lote, nombre del medio de cultivo, fecha de elaboración, fecha de caducidad, nombre de la persona que lo preparó. Empaquetar en paquetes de 10 cajas y dejar en refrigeración hasta su uso.



### ❖ Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

Se emplea como medio diferencial para el aislamiento y diferenciación de bacterias entéricas Gram-negativas.

#### Fundamento

Por la combinación de estos dos colorantes y los dos hidratos de carbono se pueden distinguir algunos géneros. Las bacterias lactosa-negativas y sacarosa negativas (*Salmonella* y *Shigella*) dan colonias incoloras, mientras que las lactosa y/o sacarosa positivas dan colonias púrpura-violetas-negruzco con/sin centro obscuro y quedan rodeadas de una zona incolora. Por efecto de estos mismos colorantes también queda inhibido el crecimiento de la microflora acompañante, sobre todo la Gram (+). También es posible la identificación de *Candida Albicans*.

Fórmula (Litro)

COMPONENTE	(g)
Eosina	0.4
Azul de Metileno	0.064
Lactosa	5.0
Peptona bacteriológica	10.0
di-Potasio-Hidrógeno-Fosfato	2.0
Sacarosa	5.0
Agar	13.5

pH final: 7.4+/- 0.2

#### Preparación

Suspender 36 g en un litro de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. No sobrecalentar. Distribuir y esterilizar a 121<sup>0</sup>C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45<sup>0</sup>C y distribuir en placas estériles con 20 ml cada una. Dejar gelificar las placas. Etiquetar cada lote con los siguientes datos: número de lote, nombre del medio de cultivo, fecha de elaboración, fecha de caducidad, nombre de la persona que lo preparó. Empaquetar en paquetes de 10 cajas y dejar en refrigeración hasta su uso.

### ❖ Agar Salmonella-Shigella

Se emplea para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de muestras de productos alimenticios u otros que pudieran contener otros gérmenes. Se trata de un medio altamente selectivo.



## Fundamento

Por la presencia de las sales biliares, verde brillante y citrato se consigue la inhibición de bacterias Gram (+). Por el mismo citrato conjuntamente con el tiosulfato se frena notablemente el desarrollo de coliformes y Proteus que podrían acabar cubriendo todo el cultivo. Las bacterias que no fermentan la lactosa dan colonias incoloras, mientras que las que la fermentan hacen virar el rojo neutro por la producción de ácido y quedan claramente diferenciadas. También se diferencian los microorganismos productores ácido sulfhídrico que da un precipitado negro de Sulfuro de Hierro (II), que se observa en el centro de la colonia. La peptona y extracto de carne son aportes nutritivos suficientes para estas especies patógenas.

### Fórmula (Litro)

COMPONENTE	(g)
Extracto de carne	5.0
Citrato férrico	1.0
Lactosa	10.0
Peptona	5.0
Sales biliares	8.5
Rojo neutro	0.025
Citrato tri-sódico	8.5
Tiosulfato de sodio	8.5
Verde brillante	0.330
Agar	13.5

pH final :7.0+/- 0.2

## Preparación

Suspender 60 g en un litro de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Dejar enfriar hasta 45<sup>0</sup>C y distribuir en placas estériles con 20 ml cada una. Dejar gelificar las placas. Etiquetar cada lote con los siguientes datos: número de lote, nombre del medio de cultivo, fecha de elaboración, fecha de caducidad, nombre de la persona que lo preparó. Empaquetar en paquetes de 10 cajas y dejar en refrigeración hasta su uso.

## ❖ Agar MacConkey

Medio de cultivo utilizado en la investigación de organismos coliformes.

## Fundamento

Por la presencia de sales biliares y el cristal violeta se inhibe el crecimiento de las bacterias



Gram-positivas. Por la presencia de la lactosa, las bacterias capaces de fermentarla acidifican el medio, cambiando el color del rojo neutro y formando colonias rojas o rosadas, pudiendo presentar un halo turbio correspondiente al precipitado biliar. Las bacterias lactosa negativas dan colonias incoloras.

#### Fórmula (Litro)

COMPONENTE	(g)
Lactosa	10.0
Peptona	10.0
Sales biliares	1.5
Peptona de gelatina	17.0
Rojo neutro	0.03
Cloruro de sodio	5.0
Cristal violeta	0.001
Agar	13.5

pH final :7.1+/- 0.2

#### Preparación

Suspender 50 g en un litro de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121<sup>o</sup>C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45<sup>o</sup>C y distribuir en placas estériles con 20 ml cada una. Dejar gelificar las placas. Etiquetar cada lote con los siguientes datos: número de lote, nombre del medio de cultivo, fecha de elaboración, fecha de caducidad, nombre de la persona que lo preparó. Empaquetar en paquetes de 10 cajas y dejar en refrigeración hasta su uso.

#### ❖ Agar Sangre

Se emplea para el cultivo y aislamiento de microorganismos exigentes, sobre todo patógenos.

#### Fundamento

Dada la excelente base nutritiva, permite el crecimiento de un gran número de microorganismos que pudieran estar presentes. La adición de sangre puede determinar las distintas formas de hemólisis que pudieran tener lugar, ya que las bacterias que producen hemolisinas generan un halo transparente alrededor de la colonia a consecuencia de la lisis de los glóbulos rojos.



## Fórmula (Litro)

COMPONENTE	
Infusión de músculo cardiaco	375.0 g
Peptona de carne	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Sangre desfibrinada	5.8 %

pH final: 6.8 +/- 0.2

**Preparación**

Suspender 40 g en un litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121<sup>0</sup>C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45<sup>0</sup>C e incorporar de 6-8% de sangre desfibrinada. Ajustar el pH a 6.8 +/- 0.2 y distribuir en placas estériles con 20 ml cada una. Dejar gelificar las placas. Etiquetar cada lote con los siguientes datos: número de lote, nombre del medio de cultivo, fecha de elaboración, fecha de caducidad, nombre de la persona que lo preparó. Empaquetar en paquetes de 10 cajas y dejar en refrigeración hasta su uso.

**❖ Agar Sulfito Bismuto**

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella typhi* y otros bacilos entéricos.

**Fundamento**

La peptona, el extracto de carne y la dextrosa proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El sulfato ferroso actúa como indicador en la producción de sulfuro de hidrógeno que se manifiesta en el centro de la colonia por un precipitado negro y un halo negro grisáceo con brillo metálico por la reducción de los iones bismuto en presencia del sulfuro de hidrógeno.

El sulfito de bismuto y el verde brillante inhiben considerablemente el crecimiento de bacterias contaminantes.

## Fórmula (Litro)

COMPONENTE	(g)
Extracto de carne	5.0
Dextrosa	5.0
Fosfato disódico	4.0



Peptona especial	10.0
Sulfato ferroso	0.3
Indicador de sulfito de bismuto	8.0
Agar	20.0
Verde brillante	0.025

pH final :7.6 +/- 0.2

### Preparación

Rehidratar 52 gramos del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. No calentarse por tiempo prolongado y evitar así que pierda su selectividad. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Enfriar aproximadamente a 45°C. El precipitado característico del medio se debe dispersar uniformemente durante en vaciado en las cajas de Petri estériles. Una vez solidificado presenta un aspecto crema uniforme y gradualmente un color verde pálido. Es importante protegerlo de la luz y conservarlo en refrigeración de 2 a 8°C. De lo contrario, el medio de cultivo que está en forma reducida se va oxidando hasta adquirir un color francamente verde, cuando esto ocurre se descarta el medio.

### ❖ Agar de Sal y Manitol

Medio selectivo empleado para el aislamiento de estafilococos a partir de diversas muestras.

### Fundamento

La degradación del manitol con producción de ácido cambia el color del medio, de rosado a amarillo. La formación de colonias de estafilococos no patógenos son de tamaño pequeño rodeadas de una zona roja. Los estafilococos patógenos producen ácido del manitol, desarrollan colonias más grandes rodeadas de una zona amarilla. La elevada concentración de Cloruro de sodio inhibe a la mayoría de las bacterias que son halo-sensibles y favorecen a los estafilococos halo-resistentes.

Fórmula (Litro)

COMPONENTE	(g)
Agar	15.0
Cloruro de sodio	75.0
Extracto de carne	1.0
D-Manitol	10.0
Peptona especial	10.0
Rojo de fenol	0.025

pH final :7.4 +/- 0.2



## Preparación

Rehidratar 111 gramos del medio En un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

### ❖ Solución Salina Fisiológica al 8.5 %

Disolver 8.5 g de NaCl en un litro de agua destilada, agitar frecuentemente para disolver por completo, verter en tubos de ensaye y estandarizar la autoclave a 121°C (15 libras de presión) 15 minutos, pH = 7.4 mas menos 0.2.

## B) REACTIVOS

### ❖ MTT ò 3-[4,5-dimetiltiazol-2 y 1]-2,5-dimetiltetrazolio

Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5 mg/ml. Filtrar la solución con una membrana de 0.22µm. Guardar a una temperatura de congelación, hasta su uso.

### ❖ Acido Fosfotúgstico

El acido es una solución al 2% ajustada pH de 7.0 mediante NaOH 1N.

### ❖ Glutaraldehido-Paraformaldehido (KARNOSKY)

Prepare una solución amortiguadora de fosfatos al 0.2M o una solución de cacodilato al 0.2N a pH 7.0. Prepare 20ml de una solución de paraformaldehido al 10% disolviendo 2g de paraformaldehido en polvo en 20ml de agua destilada calentando a 60-70°C mientras se agita vigorosamente (en campana de extracción de gases). Agregue unas gotas de NaOH 0.2N hasta que la solución se vuelva transparente. Esperar a que se enfríe.

Ya fría la solución anterior se prepara el fijador.

Amortiguador de fosfatos al 0.2	50ml
Paraformaldehido al 10% en agua	20ml
Glutaraldehido al 25% en agua	10ml
Glutaraldehido al 25% en agua	100ml

**ANEXO 3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

PRUEBAS PRIMARIAS				
PRUEBA	REACTIVOS	PROCEDIMIENTO	FUNDAMENTO	INTERPRETACIÓN
TINCION DE GRAM	1) Agua estéril 2) Cristal violeta 3) Lugol 4)Alcohol/acetona 5) Safranina	Extendido de bacterias en portaobjetos. Cubrir el frotis con cristal violeta y dejarlo actuar 1 minuto. Enjuagar con agua corriente. Cubrir el frotis con la solución de lugol durante un minuto. Enjuagar. Colocar el frotis en forma vertical y decolorar añadiendo gota a gota el alcohol durante 45 a 60 seg. Enjuagar. Cubrir el frotis con safranina y dejarla actuar durante 1 minuto. Enjuagar, dejar secar y observar al microscopio.	El cristal violeta actúa como colorante primario que se une a la pared bacteriana luego de un tratamiento con yodo (lugol) las bacterias Gram (+) por su naturaleza química retienen el cristal violeta, aun después de una decoloración con alcohol/acetona y aparecen de color azul intenso. Las bacterias Gram (-) no son capaces de retener el cristal violeta debido a un mayor contenido lipídico en su pared después de la decoloración y se contracolorean de rojo con la safranina.	Las bacterias Gram positivas se colorean de azul-violeta y las bacterias Gram negativas se colorean de rojo-rosado después de la tinción de Gram.
CATALASA	Peróxido de hidrogeno al 3%	Con un aplicador de madera estéril, transferir una porción de colonia bacteriana a la superficie de un portaobjetos. Agregar una Gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas.	Se estudia la hidrólisis del peróxido de hidrógeno, por la acción de la enzima catalasa transformándolo en agua y oxígeno.	La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva a la presencia de la enzima catalasa.



<b>O/F</b>	1) Medio básico de Hugh y Leifson 2) Glucosa 3) Aceite mineral estéril	Ambos tubos se inoculan por picadura y uno de los tubos se cubre con aceite mineral estéril.	Se determina si la glucosa se metaboliza por vía oxidativa o fermentativa, ya que se detecta la producción de ácidos en medios aerobios y anaerobios con la correspondiente disminución del pH y el vire del indicador.	Se pueden observar los siguientes resultados: <u>Abierto Cerrado Metabolismo</u> ácido alcalino oxidativo <u>amarillo verde</u> ácido ácido fermentativo <u>amarillo amarillo</u> alcalino alcalino no sacarolítico verde verde
<b>OXIDASA</b>	Tiras de papel impregnadas con tetrametil-p-fenilendiamina	Con un aplicador de madera estéril, transferir una porción de colonia bacteriana a la superficie de una tira de papel impregnada con tetrametil-p-fenilendiamina.	Se determina la presencia de la enzima citocromo oxidasa, la cual transfiere electrones al oxígeno en la cadena respiratoria y en presencia de oxígeno oxida la tetrametil-p-fenilendiamina (incolores) formando azul de indofenol (azul intenso).	Una coloración azul intenso indica una prueba positiva a la actividad de la citocromo oxidasa.
<b>MOTILIDAD</b>	SSFE	Con un asa bacteriológica, transferir una porción de colonia bacteriana a un cubreobjetos que contenga una gota de solución salina fisiológica estéril.	Las bacterias que poseen motilidad son capaces de cruzar el campo microscópico en una gota suspendida.	Una bacteria posee motilidad (+) cuando cruza el campo microscópico en una gota suspendida.



PRUEBAS SECUNDARIAS				
PRUEBA	REACTIVOS	PROCEDIMIENTO	FUNDAMENTO	INTERPRETACION
SIM, MIO (indol)	Reactivo de Kovac o Erlich (p-aminobenzaldeído)	Inocular por picadura. Incubar a 35°C durante 24 horas.	Se determina la producción de indol a partir de la producción del triptófano mediante la enzima triptofanasa.	Un color rojo indica una prueba positiva.
RM	1)Caldo RM/VP 2)Indicador: rojo de metilo.	Inocular el caldo rojo de metilo con el microorganismo en estudio. Incubar a 35°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de inoculación agregar unas gotas del reactivo de Rojo de Metilo.	Se determina la producción de ácidos fuertes a partir de la fermentación de glucosa.	Un color rojo indica una prueba positiva.
VP	1)Caldo RM/VP 2)Alfa naftol 5% 3)KOH 40%	Inocular el caldo RM/VP con el microorganismo en estudio. Incubar a 35 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación transferir 1 ml del caldo MR/VP a un tubo limpio y agregar 0.6 ml de alfa naftol al 5% y 0.2 ml de KOH al 40%, dejar reposar durante 10-15 minutos.	Se produce acetoina la cual es detectable al convertirla en diacetilo.	Un anillo rojo indica una prueba positiva.
LIA	Caldo descarboxilasas base de Møeller	El aminoácido se añade al medio base antes de inocular el microorganismo Al tubo se le adiciona una capa de aceite mineral para crear condiciones de anaerobiosis. incubar por 24 horas a 37°C.	Se determina la capacidad de un microorganismo para atacar el aminoácido lisina descarboxilandolo o desaminandolo, para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.	Un cambio de color púrpura a amarillo y con un retorno a púrpura indica un resultado positivo a las prueba de Lisina.



<b>KIA</b>	Medio KIA	Inocular los tubos de TSI con punta (alambre recto). Para eso introducir la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar el alambre del fondo, estriar el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Incubar a 35°C durante 24 horas.	La fermentación de los azúcares que da lugar a una producción de ácido, se detecta por medio del indicador rojo de fenol, los cambios de color al amarillo por una acidificación y a rojo por una alcalinización se evidencian perfectamente. El tío -sulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.	<p>Pico rojo / Fondo rojo : No fermenta azúcares.</p> <p>Pico rojo/Fondo amarillo:Fermenta glucosa.</p> <p>Pico rojo/Fondo amarillo (negro): Glucosa fermentada, lactosa no fermentada,Producción de H<sub>2</sub>S.</p> <p>Pico amarillo/Fondo amarillo: Glucosa y Lactosa fermentadas.</p>
<b>CITRATOS</b>	Medio de cultivo: Citratos de Simmons	Inocular en forma de estría el microorganismo en estudio sobre el medio, e incubar por 24 horas a 37°C.	Se detecte la utilización del Citrato como única fuente de carbono con la formación de productos alcalinos.	Un cambio de color azul intenso, indica una prueba positiva.
<b>UREA</b>	Medio de cultivo : Agar urea de Christensen	Inocular en forma de estría el microorganismo en estudio sobre el medio, e incubar por 24 horas a 37°C.	Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniaco por la acción de la enzima ureasa produciendo un cambio de color rojo en el medio.	Una coloración rojo indica una alcalinización del medio por las presencia de productos de la hidrólisis de la urea por actividad de la ureasa.



<b>CAMP</b>	Sangre ovina o bovina	En una placa de agar sangre trazar una estría de <i>Streptococcus</i> (por identificar) en forma perpendicular a otra estría de una cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> productora de beta lisina. Las dos líneas no deben unirse. Las placas se incuban en aerobiosis.	La actividad hemolítica de la beta lisina estafilocócica sobre los eritrocitos se ve intensificada por un factor extracelular producida por los estreptococos del grupo B, llamado factor CAMP y al estar presentes se superponen y se observa una intensificación de la hemólisis beta causada a los eritrocitos.	Una zona de intensificación de lisis con forma de una cabeza de flecha en la intersección de ambas estrías, indica una prueba positiva al factor CAMP y la presencia de un <i>Streptococcus</i> del grupo B.
<b>COAGULASA</b>	Plasma humano o de conejo	Colocar asépticamente 0.5 ml de plasma en el fondo del tubo estéril. Añadir 0.5 ml de un cultivo puro de 18 a 24 horas en caldo del organismo por investigar. Mezclar por rotación la suspensión suavemente sin agitar el contenido. Colocar el tubo en un baño de agua a 37°C. Observar la formación del coágulo.	Es una sustancia semejante a la trombina, que se encuentran presentes en los filtrados de los cultivos. Cuando la suspensión bacteriana productora de coagulasa se mezcla en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma, se forma un coagulo visible por la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.	Una reacción positiva se observa por la presencia de un coágulo en el fondo del tubo de una a cuatro horas.
<b>BILIS ESCULINA</b>	Medio Bilis-Esculina	Se estría el organismo en tubos en pico de flauta, del medio bilis-esculina. Se incuba a 37°C durante 24 horas.	Las bacterias capaces de desarrollar en bilis y también hidrolizar esculina, producen glucosa y esculetina y esta puede visualizarse en un medio con una sal de hierro, por formación de un complejo marrón oscuro o negro.	La esculetina difunde hacia el medio de agar por ser hidrosoluble. La reacción es positiva si se observa un ennegrecimiento difuso del tubo.



## 11. BIBLIOGRAFÍAS

1. Alonso, J. (2004). Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Argentina: Corpus.
2. Amal, G. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid MTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods* , 19-25.
3. Bernad. (2001). Garlic:the miracle food. *Can pharm J.* , 9-28.
4. Block, E. (1985). The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* , 94-99.
5. Blumenthal, M. (2000). Herbal medicine Expanded Commission E Monographs. American Botanical Council.
6. Bruneton, J. (1995). Elementos de fitoquímica y farmacognosia. Zaragoza España: Acribia.
7. Cobo, F. M. (2003). Enfermedades infecciosas. Recogida de muestras. Aspectos novedosos en bacteriología. Alcalá.
8. Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Review* , 564-582.
9. Clarke SC, H. R. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* a global pathogen. *Clin Microbial* , 365-378.
10. Cravioto A, T. A. (1991). Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with types and duration of diarrhea. *Lancet* , 262-264.
11. Cruz de la Concha, M.M. (2000). Determinación de la población bacteriana en productos fitofarmacéuticos de uso terapéutico (cápsulas). Tesis de licenciatura Q.F.B.UNAM FES-C Estado de México.
12. Cruz, S. J. (2007). Plantas medicinales. *Medicina Naturista Fitoterapia* , Universidad de Lanzarote.
13. Domingo D, L. B. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Quimioter* , 385-393.
14. Elmadfa I, A. W. (1994). La gran guía de la composición de los alimentos. España: Integral.
15. Escorza, M. A. (2007). Incidencia de *Streptococcus pyogenes*, mecanismos de patogenicidad en infecciones respiratorias en los últimos cuatro años y tratamiento.
16. Franzolin MR, B. A. (2005). Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea. 359-363.
17. García Rico, R. H. (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium* cepa: Estudio preliminar in vitro. *Bistua: Revista de la facultad de Ciencias Básicas* , 68-79.



18. García Rodríguez José A, P. J. Compendio de Microbiología Médica. Madrid España: Elsevier.
19. Gomez H.F, C. T. (1998). Shigella in Feigin and Cherry . Textbook of Pediatric infectious disease , 1307-1317.
20. González Sofía, e. a. (2003). Guía de Microscopia Electrónica. Edo de México: UNAM FES-C.
21. Gorsky, T. (2000). The herbalist will see you now. BMJ , 1142.
22. Guzmán Ortega B. (2010). Determinación del efecto antimicrobiano del extracto de Melissa officinalis en bacterias gram positivas y gram negativas, de interés médico. Tesis de licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Estado de México.
23. Hall Ramírez V, M. R. (2002). Plantas medicinales volumen II. Centro Nacional de Información de Medicamentos , 3-8.
24. Harris JC, C. S. (2001). Antimicrobial propiedades of Allium sativum (garlic). 282-286.
25. Jastrzebski Z, L. H. (2007). The bioactivity of processed garlic (Allium sativum L.) as shown in vitro and in vivo studies on rats. Food Chem Toxicol , 1626-1623.
26. Jawetz, M. (2005). Microbiología Médica. Mexico, D.F.: El Manual Moderno.
27. Jurado S, P. M. (2005). Aplicaciones de Microscopia Electrónica de Transmisión en el diagnóstico microbiológico. Veterinaria , 18-24.
28. Koneman E, e. a. (1999). Diagnóstico microbiológico, texto y atlas color. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
29. La valle J, e. a. (2000). Natural Therapeutics Pocked Guide.
30. Lamm D, R. D. (2001). The potential application of Allium sativum for treatment of bladder cancer. Abstract , 157-162.
31. Lawson L, H. B. (1992). Characterization of formation of illicit and other thiosulfinates from garlic. Planta Med , 345-350
32. Lee KW, Y. O. (2000). Hematologic chances associated with the appearance of eccentrocytes after intragastric administration of garlic extract to dogs. Am J Vet Res , 1446-1450.
33. Ledezma E, A.-C. R. (2006). Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (Allium sativum), un nuevo agente antifúngico. Rev Iberoam Micol , 75-80.
34. Levine MM, F. C. (1993). Epidemiologic studies of Escherichia coli diarrhea infections in a low socioeconomic level periurban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol, 849-869.
35. Mendez, MV. (1994). Diarrea persistente en niños hospitalizados menores de 30 meses. Academia Nacional de Medicina .



36. Morales López, J. (1999). Efecto bacteriostático de aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) sobre dos microorganismos presentes en carnes. Tesis de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F.
37. Muñoz Flores, I.G. (2010). Actividad inhibitoria del extracto de *Cymbopogon nardos* en bacterias gram positivas y gram negativas. Tesis de licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Estado de México.
38. Murray Patrick, S. R. (2006). *Microbiología Médica*. Elsevier.
39. Navarro, M. C. (2007). Posibilidades Terapéuticas del Bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Revista de Fitoterapia*, 131-151.
40. Organización Panamericana de la Salud. (2004). *Staphylococcus aureus*, meticilina resistente: informe. Ateneo general sobre *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, Montevideo Uruguay. OPS.
41. Physicians Desk Reference for Herbal Medicines. (2000). Medical Economics Company.
42. Poschun R. (1998). *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clin microbial*, 589-603.
43. Pravuseenivasan S, J. M. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*, 39-47.
44. Reuter HD, K. H. (1996). Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations.
45. Rivera Matos, C.T. (1996). Food borne and Waterborne illness in children. *Adv Pediatr Infect*.
46. Sosa R. (1997). El poder medicinal de las plantas. Asociación Publicadora Interamericana.
47. Thomson M, A.-Q. K. (2006). Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol and triglycerides. *J Nutr*, 800-802.
48. Torres ME, P. M. (2001). Etiology of children's diarrhea in Montevideo. *J. Clin Microbiological*, 2134-2139.
49. Varela G, e. a. (1991). Diarrea con sangre y síndrome hemolítico urémico.
50. Vidal JE, C. R. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública Mexicana*, 376-386.
51. Vukovic, L. (2005). La maravillosa Equinacea y otros remedios para los resfriados. Mexico, D.F.: Panorama.
52. Zinsser. (1998). *Microbiología*. Buenos Aires: Medica Panamericana.



## ENLACES

53. <http://coli.usal.es/Web/educativo/micro2/tema20.html>: Agentes antimicrobianos y Microorganismos. II Definición y clasificación de los antibióticos.
54. [http://es.wikipedia.org/wiki/Klebsiella\\_pneumoniae](http://es.wikipedia.org/wiki/Klebsiella_pneumoniae)
55. <http://chopo.pntic.mec.es/gdiaz3/apuntes/UT124.pdf>
56. <http://streptococcuspyogenes.blogspot.com>
57. [www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/cap18.pdf](http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/cap18.pdf)
58. [www.idap.com.mx/Apuntes/microbiología/patogenicidad\(3\).doc](http://www.idap.com.mx/Apuntes/microbiología/patogenicidad(3).doc)
59. <http://streptococcuspyogenes.blogspot.com/>
60. <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf>
61. [http://depa.pquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP\\_6529.pdf](http://depa.pquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf)
62. <http://www.bvsops.org.uy/pdf/shigella.pdf>
63. [http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/material\\_clase/04.pdf](http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/material_clase/04.pdf)
64. <http://www.uam.es/investigacion/servicios/sidi/especifica/transmision.html> : Servicio interdepartamental de investigación (Microscopia electrónica de Transmisión) Universidad autónoma de Madrid
65. [http://mvz.unipaz.edu.co/textos/biblioteca/microbiologia/microbiologia\\_y\\_parasitologia\\_medicas\\_-\\_tomo\\_i/microcap04.pdf](http://mvz.unipaz.edu.co/textos/biblioteca/microbiologia/microbiologia_y_parasitologia_medicas_-_tomo_i/microcap04.pdf)
66. [http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-IV-2.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf) : Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT
67. <http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-02/RVM31204.pdf> : Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino frescos y congelados
68. <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n1/3.pdf> : Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro en líneas de Melanoma
69. [www.educa2.madrid.org/.../09.-...-España:Morfología\\_y\\_estructura\\_bacteriana](http://www.educa2.madrid.org/.../09.-...-España:Morfología_y_estructura_bacteriana)
70. <http://intranet.inppaz.org.ar> : Presencia de Shigella spp y resistencia al ácido nalidíxico
71. [http://www.unne.edu.ar/investigacion/com2010/CV-Web/wCV-013\\_013.pdf](http://www.unne.edu.ar/investigacion/com2010/CV-Web/wCV-013_013.pdf)
72. <http://www.ecosystema.ru/07referats/cultrast/114.htm>
73. <http://148.206.53.231/UAM3500.PDF>



## 12. Hoja técnica

**AJO***Allium sativum*

CODIGO 3084HC

DESCRIPCIÓN	Extracto hidroalcoholico de Ajo
APARIENCIA	Líquido ligeramente turbio
COLOR	Incoloro - ligeramente amarillo
OLOR	Característico
MEDIO	Agua - alcohol
SOLUBILIDAD	Agua - Alcoholes - Glicoles - Tensoactivos
<b>ESPECIFICACIONES</b>	
DENSIDAD (20°C)	0.900 - 1.000
INDICE DE REFRACCIÓN	1.3478 - 1.3638
°BRIX	10.0 - 20.0
MESOFILCOS AEROBIOS	< 100 ufc / ml
HONGOS Y LEVADURAS	< 100 ufc / ml
COLIFORMES	< 10 ufc / ml
COMPONENTES PRIMARIOS	Vitaminas, glúcidos, prótidos, lípidos, minerales y aceites esenciales.
PROPIEDADES	Antifúngico, antiséptico, antiparasitario, rubefaciente, combate la caspa, Insecticida, fortificante de uñas, limpieza del cabello graso.
USO	Cosmético
ALMACENAMIENTO	Temperatura ambiente y protegido de la luz, si presenta precipitado agite hasta su completa incorporación.
DOSIFICACIÓN	Capilar 1 - 4 %, Corporal 3 - 5 %, Facial 7 - 10 %