

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

“Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y de *Coriandrum sativum* (culantro) mediante el método de sensibilidad por difusión en agar Bauer-Kirby, sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* serovar *typhi* y *Salmonella entérica* serovar *choleraesuis*; en comparación con los antibióticos gentamicina y ampicilina”

CÉSAR SEBASTIÁN YAGUANA JIMÉNEZ

DIRECTORA: MÁSTER ELENA GRANDA MORENO

QUITO, 2015

# PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, César Sebastián Yaguana Jiménez, C.I.: 1716800121, autor del trabajo de graduación intitulado: **“Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y de *Coriandrum sativum* (culantro) mediante el método de sensibilidad por difusión en agar Bauer-Kirby, sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *typhi* y *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*; en comparación con los antibióticos gentamicina y ampicilina”** previa a la obtención del grado académico de **Licenciado en Microbiología Clínica y Aplicada** en la Escuela de **Bioanálisis**.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, respetando los derechos de autor.

2.-Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE, el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 21 de julio del 2015

César Sebastián Yaguana Jiménez

C.I.: 1716800121

## DEDICATORIA

A mis padres: mi madre **Rita Jiménez** y mi padre **Adriano Yaguana**. Por todas sus enseñanzas, sus sacrificios, su cariño y dedicación durante mi formación personal y profesional.

A mi hermana **Nelly** por su guía, por su cariño y comprensión durante todos estos años, algunos de ellos difíciles. A mi sobrina Rebecka, por su ternura, cariño y por considerarme su padre.

A mi familia: mi tía **Paulina Jiménez** por brindarme su apoyo durante mi carrera universitaria; mi tía **Regina Jiménez** por su ejemplo de vida, su constancia y su cariño de madre; mi primo **José Cabrera** por la alegría y cariño que me brindó, por su constancia y ganas de vivir, las cuales de ahora en adelante serán mi ejemplo a seguir.

A todos ellos por haber contribuido de una u otra manera para que haya conseguido alcanzar un logro más en mi formación profesional, va dedicado este trabajo de fin de carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiar mi camino.

A mi directora de tesis, Máster Elena Granda Moreno, por su amistad, su alegría, su dedicación y apoyo profesional para el desarrollo de este trabajo.

A los docentes y a todo el personal que trabaja en la Escuela de Bioanálisis quienes me supieron guiar y brindar la asistencia necesaria cuando la necesité.

A mi familia por su comprensión y apoyo incondicional durante toda mi vida estudiantil.

A todas las personas: familiares, amigos y compañeros que formaron parte de mi vida personal y universitaria.

## TABLA DE CONTENIDOS

### CAPITULO 1

#### ASPECTOS INTRODUCTORIOS

1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	4
1.3 Planteamiento del problema	6
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general	8
1.4.2 Objetivos específicos	8

### CAPÍTULO 2

#### MARCO TEÓRICO

2.1 Resistencia a los antimicrobianos	9
2.1.1 Mecanismos de resistencia	9
2.1.1.1 Resistencia por destrucción e inactivación del antibiótico	10
2.1.1.2 Resistencia por alteración del sitio blanco	11
2.1.1.3 Resistencia por barreras de permeabilidad	11
2.1.2 Otros fenómenos de resistencia	13
2.2 Características de <i>Staphylococcus aureus</i> y perfil de sensibilidad	13
2.3 Características de <i>Escherichia coli</i> y perfil de sensibilidad	15
2.4 Características del género <i>Salmonella</i> y perfil de sensibilidad	17

2.5 Búsqueda de alternativas antibióticas	19
2.5.1 Plantas con propiedades antibióticas	19
2.5.1.1 <i>Allium sativum</i> (ajo)	20
2.5.1.1.1 Características de la planta	21
2.5.1.1.2 Principales componentes	21
2.5.1.1.3 Efecto antibiótico y mecanismo de acción	22
2.5.1.2 <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro)	23
2.5.1.2.1 Principales componentes	23
2.5.1.2.2 Efecto antibiótico y mecanismo de acción	23

### **CAPÍTULO 3**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1 Localización del estudio	25
3.2 Origen de las muestras	25
3.3 Variables de estudio	27
3.4 Obtención de los extractos acuosos de <i>Allium sativum</i> y <i>Coriandrum sativum</i>	27
3.4.1 Maceración de los productos y dilución con agua destilada	27
3.4.2 Almacenamiento de los extractos	29
3.4.3 Tratamiento térmico de los extractos	30
3.4.4 Esterilización de los extractos	32
3.4.5 Almacenamiento final de los extractos	34

3.5 Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de <i>Allium sativum</i> (ajo) y <i>Coriandrum sativum</i> (culantro) mediante el método de difusión en agar (Bauer-Kirby)	34
3.5.1 Preparación de discos de sensibilidad	35
3.5.1.1 Impregnación de los discos con los extractos estériles de <i>Allium sativum</i> (ajo) y <i>Coriandrum sativum</i> (culantro)	36
3.5.2 Preparación de medios de cultivo con Agar Mueller – Hinton	37
3.5.3 Reactivación de cepas bacterianas	38
3.5.4 Identificación de cepas bacterianas	38
3.5.5 Siembra de las cepas en cajas Petri	38
3.5.6 Aplicación de discos de sensibilidad	39
3.5.7 Lectura de antibiogramas	41
3.5.6 Controles	43
3.6 Evaluación del efecto antibiótico del extracto de ajo sobre muestras de alimentos	43
3.6.1 Obtención de los alimentos	44
3.6.2 Preparación de los alimentos y obtención de muestras	44
3.6.3 Preparación de los extractos de ajo	45
3.6.4 Tratamiento de las muestras de alimento con el extracto de ajo	46
3.6.4.1 Aplicación del extracto de ajo	46
3.6.4.2 Eliminación del extracto de ajo de las muestras de alimento	47
3.6.5 Análisis microbiológico de las muestras de alimentos (Placas Petrifilm TM) y lectura de resultados	47
3.6.5.1 Siembra de las muestras y lectura de resultados	48

3.6.5.2 Controles	48
3.7 Análisis estadístico	48
3.7.1 Modelo lineal estadístico	49

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayos previos	50
4.1.1 Identificación de cepas bacterianas	50
4.2 Resultados de la primera parte del estudio: Pruebas de sensibilidad	
Por el método de difusión en agar Bauer-Kirby	50
4.2.1 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente frente al extracto de ajo	50
4.2.1.1 Análisis ANOVA para la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente frente al extracto de ajo	54
4.2.2 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente frente al extracto de culantro	63
4.2.3 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	65
4.2.3.1 Análisis ANOVA para la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	68
4.2.4 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de culantro	74
4.2.5 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Escherichia coli</i> Productora de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) frente al extracto de ajo	76

4.2.5.1 Análisis ANOVA para la cepa <i>Escherichia coli</i> <i>Productora de Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE)</i> frente al extracto de ajo	78
4.2.6 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Escherichia coli</i> Productora de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) frente al extracto de culantro	85
4.2.7 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 frente al extracto de ajo	86
4.2.7.1 Análisis ANOVA para la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 frente al extracto de ajo	89
4.2.8 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 frente al extracto de culantro	88
4.2.9 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo	93
4.2.9.1 Análisis ANOVA para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo	96
4.2.10 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de culantro	101
4.2.11 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo	102
4.2.11.1 Análisis ANOVA para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo	105
4.2.12 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de culantro	107

4.3 Resultados de las pruebas de sensibilidad de las cepas bacterianas frente a los antibióticos gentamicina y ampicilina	109
4.4 Resultados de la segunda parte del estudio: análisis microbiológico de muestras de alimentos previa y post exposición al extracto de ajo	111
4.4.1 Análisis microbiológico de la primera muestra de alimento: Ensalada 1	111
4.4.2 Análisis microbiológico de la segunda muestra de alimento: Ensalada 2	114
4.4.3 Análisis microbiológico de los controles	116

## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1 Conclusiones	117
5.2 Recomendaciones	118
Referencias	119
Anexos	129

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia bacteriana	10
Figura 2. Morfología de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figura 3. Morfología de <i>Escherichia coli</i>	16
Figura 4. Morfología de cepas bacterianas de <i>Salmonella</i>	18
Figura 5. Planta y bulbo de <i>Allium sativum</i>	21
Figura 6. Molécula de Alicina	22
Figura 7. Planta de <i>Coriandrum sativum</i>	23
Figura 8. Molécula de dodecenal	24
Figura 9. Gramos pesados de <i>Allium sativum</i>	28
Figura 10. Gramos pesados de <i>Coriandrum sativum</i>	28
Figura 11. Extractos acuosos de <i>Allium sativum</i>	29
Figura 12. Extractos acuosos de <i>Coriandrum sativum</i>	30
Figura 13. Extracto de ajo post tratamiento térmico (90°C)	31
Figura 14. Extracto de culantro post tratamiento térmico (90°C)	31
Figura 15. Centrifugación	32
Figura 16. Unidad de filtración Millex GP Millipore, 0.22 micras	32
Figura 17. Unidad de filtración Millex HV, 0.45 micras	33
Figura 18. Uso de las unidades de filtración Millex GP	33
Figura 19. Discos de papel cromatográfico de celulosa	35
Figura 20. Discos de sensibilidad impregnados con los extractos de <i>Allium sativum</i> (ajo)	36
Figura 21. Discos de sensibilidad impregnados con los extractos de <i>Coriandrum sativum</i> (culantro)	37

Figura 22. Agar Mueller-Hinton	38
Figura 23. Método de siembra para la realización de antibiogramas	39
Figura 24. Colocación de los discos de antibióticos	40
Figura 25. Colocación de los discos impregnados con los extractos de ajo y culantro	41
Figura 26. Método de lectura de un antibiograma	41
Figura 27. Ensalada 1 (Shawarma)	45
Figura 28. Ensalada 2 (Cevichocho)	45
Figura 29. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> MRSA enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico	52
Figura 30. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> MRSA enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C	52
Figura 31. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> MRSA enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C	53
Figura 32. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> MRSA enfrentada al extracto de ajo sometido a 90°C	53
Figura 33. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> MRSA enfrentada al extracto de culantro	65
Figura 34. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico	66
Figura 35. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C	66
Figura 36. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C	67

Figura 37. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sometido a 90°C	67
Figura 38. Antibiograma para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 enfrentada al extracto culantro	74
Figura 39. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> BLEE enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico	76
Figura 40. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> BLEE enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C	76
Figura 41. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> BLEE enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C	77
Figura 42. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> BLEE enfrentada al extracto de ajo sometido a 90°C	77
Figura 43. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> BLEE enfrentada al extracto de culantro	85
Figura 44. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico	87
Figura 45. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C	87
Figura 46. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C	88
Figura 47. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C	88
Figura 48. Antibiograma para la cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 enfrentada al extracto de culantro	92

Figura 49. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo sin tratamiento térmico	94
Figura 50. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo sometido a 35°C	94
Figura 51. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo sometido a 50°C	95
Figura 52. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo sometido a 90°C	95
Figura 53. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de culantro	101
Figura 54. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo sin tratamiento térmico	103
Figura 55. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo sometido a 35°C	103
Figura 56. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo sometido a 50°C	104
Figura 57. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo sometido a 90°C	104
Figura 58. Antibiograma para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de culantro	108

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos	26
Tabla 2. Perfiles de sensibilidad de <i>Staphylococcus</i> y <i>Enterobacterias</i> para los antibióticos gentamicina y ampicilina	42
Tabla 3. Halos de inhibición correspondientes a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	51
Tabla 4. Configuración óptima de los factores para <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo	54
Tabla 5. Análisis de Varianza para la variable halos de inhibición para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA)	56
Tabla 6. Regresión Múltiple - Halos de inhibición de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA) y ANOVA	58
Tabla 7. Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS (1) para el modelo <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA)	59
Tabla 8. Matriz de Correlación para las estimaciones de los coeficientes <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA)	60
Tabla 9. Análisis de regresión Múltiple - Halos de inhibición sin la variable de interacción <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA) y ANOVA	61

Tabla 10. Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS (2) para el modelo <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA)	61
Tabla 11. Halos de inhibición correspondientes a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente frente al extracto de culantro	64
Tabla 12. Halos de inhibición correspondientes a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	65
Tabla 13. Configuración óptima de los factores para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	68
Tabla 14. Análisis de Varianza para Halos de inhibición correspondientes a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	70
Tabla 15. Regresión Múltiple - Halos de inhibición correspondientes la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y ANOVA	72
Tabla 16. Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS para el modelo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	72
Tabla 17. Halos de inhibición para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de culantro	75
Tabla 18. Halos de inhibición para la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente al extracto de ajo	78
Tabla 19. Configuración óptima de los factores para la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente al extracto de ajo	79

Tabla 20. Análisis de Varianza para la variable halos de inhibición para la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE	80
Tabla 21. Regresión Múltiple (1) - Halos de inhibición para la cepa <i>Escherichia coli</i> BLEE y ANOVA	82
Tabla 22. Regresión Múltiple (2) - Halos de inhibición para la cepa <i>Escherichia coli</i> BLEE y ANOVA	82
Tabla 23. Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS para el modelo <i>Escherichia coli</i> BLEE	83
Tabla 24. Halos de inhibición de la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente al extracto de culantro	86
Tabla 25. Halos de inhibición obtenidos para la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 frente al extracto de ajo	89
Tabla 26. Configuración óptima de los factores para la cepa de cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 frente al extracto de ajo	90
Tabla 27. Análisis de Varianza para Halos de Inhibicion para la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	90
Tabla 28. Regresión Múltiple - Halos de inhibición para la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y ANOVA	91
Tabla 29. Halos de inhibición obtenidos para la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 frente al extracto de culantro	93
Tabla 30. Halos de inhibición para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo	96
Tabla 31. Configuración óptima de los factores para la cepa de cepa <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de ajo	96

Tabla 32. Análisis de Varianza para Halos de inhibición para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i>	99
Tabla 33. Regresión Múltiple - Halos de inhibición para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> y ANOVA	100
Tabla 34. Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS para el modelo <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i>	100
Tabla 35. Halos de inhibición para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> frente al extracto de culantro	102
Tabla 36. Halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad para la cepa <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo	105
Tabla 37. Configuración óptima de los factores para la cepa <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de ajo	106
Tabla 38. Análisis de Varianza para Halos de inhibición para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028	106
Tabla 39. Halos de inhibición de la cepa <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028 frente al extracto de culantro	108
Tabla 40. Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas frente al antibiótico gentamicina	109
Tabla 41. Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas frente al antibiótico ampicilina	110
Tabla 42. Análisis microbiológico para la Ensalada 1	112
Tabla 43. Recuentos para la Ensalada 1, antes y después del contacto con el extracto de ajo estéril	112

Tabla 44. Análisis microbiológico para la Ensalada 2 114

Tabla 45. Recuentos para la Ensalada 2, antes y después  
del contacto con el extracto de ajo estéril 115

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dispersión de los datos (halos de inhibición) en relación al concentración para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente (MRSA) frente al extracto de ajo	54
Gráfico 2. Dispersión de los datos en cada nivel para el factor temperatura para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente (MRSA) frente al extracto de ajo	55
Gráfico 3. Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo	57
Gráfico 4. Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo	60
Gráfico 5. Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo, para el modelo ajustado	62
Gráfico 6. Gráfico de contorno de superficies para la respuesta estimada para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo	63
Gráfico 7. Dispersión de los datos en cada nivel para el factor temperatura para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	68
Gráfico 8. Dispersión de los datos en cada nivel para el factor concentración para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	69
Gráfico 9. Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 frente al extracto de ajo	71
Gráfico 10. Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	73
Gráfico 11. Gráfico de contorno de superficies para la respuesta estimada para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	73
Gráfico 12. Dispersión de los datos en cada nivel para el factor Temperatura para la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente al extracto de ajo	79

Gráfico 13. Dispersión de los datos en cada nivel para el factor concentración para la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente al extracto de ajo	80
Gráfico 14. Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para de la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente al extracto de ajo	81
Gráfico 15. Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE	84
Gráfico 16. Gráfico de contorno de superficies para la respuesta estimada para la cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente al extracto de ajo	84
Gráfico 17. Dispersión de los datos en cada nivel para el factor concentración para la cepa de <i>Salmonella typhi</i>	97
Gráfico 18. Dispersión de los datos en cada nivel para el factor temperatura para la cepa de <i>Salmonella. typhi</i>	98
Gráfico 19. Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i>	99
Gráfico 20. Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para la cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028	107
Gráfico 21. Diferencias entre los recuentos para la Ensalada 1 (Shawarma)	113
Gráfico 22. Diferencias entre los recuentos para la Ensalada 2 (Cevichocho)	115

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Extracto del manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010	129
Anexo 2. Identificación de cepas bacterianas utilizadas en los ensayos	137
Anexo 3. Tabla de recolección de datos para la evaluación del efecto antibiótico de los extractos de ajo y culantro	141
Anexo 4. Tabla de registro de los halos de inhibición correspondientes a los antibióticos gentamicina y ampicilina	142
Anexo 5. Manual de uso Placas Petrifilm TM	143
Anexo 6. Diámetros de sensibilidad de las cepas bacterianas para los antibióticos gentamicina y ampicilina	147
Anexo 7. Análisis microbiológico para la Ensalada 1 (shawarma) posterior al contacto con el extracto de ajo estéril	157
Anexo 8. Análisis microbiológico para la Ensalada 2 (cevichocho) posterior al contacto con el extracto de ajo estéril	158
Anexo 9. Recuentos correspondientes a la Ensalada 2 para Enterobacterias luego del contacto con el extracto de ajo por 1, 2 y 5 minutos	159
Anexo 10. Análisis microbiológico de controles para los análisis microbiológicos de las muestras de alimentos	160
Anexo 11. Predicción de concentraciones necesarias del extracto de <i>Allium sativum</i> (ajo) para igualar la actividad antibiótica de los antibióticos gentamicina y ampicilina frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	161

## RESUMEN

En el presente estudio, el efecto antibiótico de extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo), y *Coriandrum sativum* (cilantro), en 3 concentraciones diferentes (250 mg / ml, 100 mg / ml y 62 mg / ml), bajo diferentes condiciones de temperatura, se evaluó, en comparación con el gentamicina y ampicilina antibióticos contra ATCC cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *typhi* y *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*. También se evaluó el posible uso de los extractos naturales como desinfectantes en alimentos sin procesos previos de cocción (ensaladas).

Los extractos fueron sometidos a 35°C, 50°C y 90°C durante 10 minutos. El extracto de culantro, en las condiciones en que se realizó la prueba, no mostró efecto antibiótico contra ninguno de los microorganismos utilizados en la investigación. El extracto acuoso de ajo mostró baja actividad antibiótica ante cepas de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 7001, *Salmonella enterica* serovar *typhi*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* productora de BLEE. El extracto de ajo mostró una actividad antimicrobiana significativa frente a las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El estudio muestra que, para obtener diámetros de halos de inhibición similares a los obtenidos con el antibiótico gentamicina, se debe utilizar concentraciones del extracto superiores 250 mg/mL. El estudio demuestra también que la mayor actividad antibiótica se produce cuando el extracto de ajo es sometido a una temperatura de 35°C durante 10 minutos.

Posteriormente, el extracto de ajo, en concentración de 100 mg/mL fue puesto en contacto con muestras de alimentos (ensaladas) por período de 15 minutos. Después se realizó un análisis microbiológico de las muestras de alimentos en placas Petrifilm®, antes y después del contacto con el extracto de ajo. Una vez realizados los contajes se observó que el extracto de ajo fue capaz de disminuir el número de colonias de microorganismos mesófilos aerobios y también de

mohos y levaduras, lo que demuestra que estos microorganismos son sensibles al extracto acuoso de ajo,

## ABSTRACT

In the present study, the antibiotic effect of aqueous extracts of *Allium sativum* (garlic), and *Coriandrum sativum* (coriander), in 3 different concentrations (250 mg/mL, 100 mg/mL and 62 mg/ mL), under different conditions of temperature, was evaluated, compared with the antibiotics gentamicin and ampicillin against ATCC bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteric* serovar *typhi* and *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*. Also was evaluated the possible use of such extracts as natural disinfectants on food with no prior process of cooking (salads).

The extracts were subjected to 35°C, 50°C and 90°C for 10 minutes. Coriander extract, under the conditions in which the test was conducted, didn't show antibiotic effect against none of the microorganisms used in this investigation. The aqueous garlic extract showed low antibiotic activity against strains of *Salmonella enteric* serovar *choleraesuis* ATCC 7001, *Salmonella enteric* serovar *typhi*, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* ESBL-producing. Garlic extract showed significant antimicrobial activity against bacterial strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) and ATCC 25923 strain. The study shows that, to get diameters of inhibitory halos equal to those obtained with the antibiotic gentamicin, should be use concentrations above 250 mg/mL of the aqueous garlic extract. The study also demonstrates that the highest antibiotic activity occurs when the garlic extract is exposed at 35°C for 10 minutes.

Garlic extract, at a concentration of 100 mg/mL was placed in contact with salads for a period of 15 minutes, then a microbiological analysis of food samples before and after contact with garlic extract was performed using Petrifilm ® plates. After counting the colonies, was observed that the extract was capable of decrease the number of aerobic mesophile and also molds and yeasts colonies, proving that these microorganisms are sensitive to the aqueous garlic extract.

# CAPÍTULO 1

## ASPECTOS PRELIMINARES

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Para la comunidad científica inmersa en las áreas de la Salud y de seguridad alimentaria, la búsqueda de nuevas alternativas antibióticas se ha convertido en toda una prioridad en la última década, puesto que los casos de cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos han ido en aumento, lo que dificulta el control de las enfermedades infecciosas, así como también incrementa los costos de atención sanitaria. Además la resistencia a los antibióticos prolonga la duración de las enfermedades y aumenta el riesgo de muerte; por ejemplo, se calcula que las personas infectadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que las infectadas por cepas no resistentes (Velázquez, M. ME. 2005).

Últimos estudios de la OMS revelan que son muchos los países que carecen de instrumentos fundamentales para hacer frente a la resistencia a los antibióticos, tales como sistemas básicos de seguimiento y monitorización del problema, o en los que estos presentan grandes deficiencias. Algunos países han tomado medidas importantes para solucionar el problema como la prevención de las infecciones mediante una mejor higiene, el acceso al agua potable, el control de las infecciones en los centros sanitarios y la vacunación, a fin de reducir la necesidad de antibióticos (Gupta, S., Ravishankar, S. 2005).

Como última medida se ha apostado por la investigación y el desarrollo de nuevos productos diagnósticos, antibióticos y otros instrumentos que permitan a los profesionales sanitarios tener ventaja ante la resistencia emergente. En cuanto a la búsqueda de nuevas alternativas antibióticas, se ha recurrido, una vez más, al uso de sustancias bioquímicas cuya procedencia suele derivar del metabolismo de ciertos microorganismos y de otros organismos pluricelulares más complejos como plantas y algunos animales marinos.

La presente disertación es parte del proyecto macro N° 613095 financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, e intitulado “Evaluación del efecto antibiótico de los extractos de *Allium sativum* (Ajo), *Allium cepa* (cebolla), *Petroselinum crispum* (Perejil) y *Coriandrum sativum* (culantro) frente a los antibióticos gentamicina y ampicilina mediante la técnica de difusión en agar con seis cepas bacterianas, bajo diferentes condiciones de temperatura”, realizado entre agosto y diciembre del 2010.

En esta investigación se evaluó el efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* y *Coriandrum sativum* sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* productora de BLEE, *Salmonella enterica* serovar *typhi* y *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*; procedentes tanto del cepario del Laboratorio de Microbiología DISerLAB – PUCE como del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” Quito.

Los agentes microbianos ya mencionados, son de gran importancia clínica debido a que estos, no están implicados únicamente en el problema de la resistencia a los antibióticos, sino que además son los causantes más comunes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). Si nos referimos a nuestro país, una de las causas más comunes para que se produzcan estas enfermedades es la falta de buenas prácticas de manufactura, en el caso de pequeños locales de expendio de alimentos. Debido a la informalidad de ciertos negocios y a la ausencia de normas que controlen continuamente los procedimientos en dichos locales, resulta casi imposible controlar brotes de ETA's; de ahí que surge la necesidad de encontrar soluciones prácticas que permitan minimizar la transmisión de estas enfermedades y que, a su vez, sean compartidas a la población en general sin la necesidad de invertir grandes presupuestos.

Existen ya grandes aportes que nos permiten idealizar y materializar proyectos encaminados a la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos resistentes a antibióticos; estudios han demostrado que ciertas plantas como la cebolla, el ajo y el culantro presentan actividad antibiótica frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y algunos tipos de *Salmonella* (Gupta, S., Ravishankar, S. 2005, Benkeblia, N. 2004, Dankert J, Tromp TF, de Vries H, Klasen HJ 1979).

Con el fin de encontrar nuevas alternativas antibióticas, que puedan ser aplicadas a la práctica, el objetivo central de este estudio fue el de aportar evidencias que demuestren la utilidad de ciertos productos naturales como agentes antimicrobianos. En este estudio se obtuvieron extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y *Coriandrum sativum* (culantro), para utilizarlos en pruebas de sensibilidad in vitro con el fin de demostrar su actividad antibiótica frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de Espectro Extendido, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhi*. Los extractos fueron puestos en contacto con dichas cepas bacterianas para demostrar posibles efectos antibióticos, tomando en cuenta la literatura existente. Adicionalmente se evaluó la efectividad del extracto de ajo, como agente antimicrobiano, al ser puesto en contacto con alimentos sin tratamientos previos de cocción (ensaladas); esto con el fin de considerar posibles usos del ajo como agente “desinfectante” y pueda ser usado en locales de expendio de alimentos y hogares, para de esta manera prevenir la propagación y apareamiento de enfermedades transmitidas por alimentos.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Ante la creciente aparición de cepas bacterianas resistentes y la carencia de alternativas antibióticas, los esfuerzos de la comunidad científica se han depositado en el descubrimiento y estudio de nuevos antibióticos. Un ejemplo sobre los avances en la investigación en cuanto a este campo es el descubrimiento de la molécula antracimycin, la cual se aisló a partir de microorganismos marinos del género *Streptomyces spp.* Este compuesto ha demostrado tener un efecto antibiótico lo suficientemente efectivo como para combatir a *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente y al microorganismo *Bacillus anthracis*, causante del ántrax (Morales, R. I. 2003).

Estudios realizados en México por investigadores de la Universidad Autónoma de Guadalajara y de la Universidad de Berkeley en Estados Unidos revelaron que uno de los componentes del *Coriandrum sativum* (culantro) llamado dodecenal elimina a bacterias del género *Salmonella* y podría ayudar a la prevención de ciertas enfermedades gastrointestinales. El dodecenal fue aislado de hojas frescas de la planta de culantro, pero también se encuentra presente en sus semillas, casi en la misma cantidad. En pruebas de laboratorio se encontró que el dodecenal es dos veces más potente que la Gentamicina, antibiótico usado comúnmente para tratar casos de Salmonelosis (Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T. 2004). Estos hallazgos podrían conducir al uso del dodecenal como un aditivo de comidas con el fin de prevenir enfermedades, como conservante para carne u otros alimentos o a manera de desinfectante durante el lavado de manos o de alimentos, entre otras aplicaciones.

Varias investigaciones han demostrado el poder antibiótico del *Allium sativum* (ajo) sobre microorganismos patógenos, la sustancia a la cual es atribuida dicha propiedad es la alicina, la misma que actúa sobre enzimas implicadas en el metabolismo de los microorganismos y en cuya estructura se encuentra un grupo tiol (grupo funcional del aminoácido cisteína) (Benkeblia, N. 2004, Davis LE, Shen J.1994, González-Zorn, B. 2010).

También se ha evaluado el efecto antimicrobiano de pastas obtenidas de ajo, gengibre, zanahoria y cúrcuma, frente a la cepa de *Escherichia coli* O157:H7. Con respecto a la pasta de ajo, esta mostró la mayor actividad antimicrobiana, en relación al resto de productos, con una completa inactivación de la cepa *Escherichia coli* O157:H7 en 3 días a 4°C y 8°C.

En otro estudio realizado con extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.*, se observó que el extracto de *Allium sativum* mostró un apreciable efecto antibiótico sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* (González-Zom, B. 2010).

Al no encontrar referencias de estudios similares aquí en nuestro país, este trabajo de investigación resulta de gran importancia puesto que sería uno de los primeros en aportar pruebas concretas sobre el potencial antibiótico de ciertos productos naturales, los cuales son usados en la vida cotidiana y que son de fácil acceso para la población en general. Adicionalmente, este estudio podría ser usado como base para investigaciones futuras que profundicen este tema y permitan dar soluciones prácticas en cuanto al tratamiento y prevención de enfermedades causadas por microorganismos resistentes a antibióticos.

### 1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Ecuador, así como en otros países del mundo, el uso indebido de antibióticos ha tenido una repercusión negativa en el campo de la salud. Debido a este uso no apropiado, las cepas bacterianas han mutado constantemente, lo que ha permitido el apareamiento de cepas multi resistentes. Actualmente, los microorganismos de mayor preocupación son aquellos resistentes a los betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas.

En nuestro país, según datos del año 2008, emitidos por la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana de Ecuador (REDNARBEC), se ha reportado que a nivel comunitario la resistencia de *Shigella spp* a tetraciclina fue del 96% y a ampicilina 93%, *Salmonella spp* fue resistente a tetraciclina en un 30%. *Escherichia coli* era resistente a ampicilina y tetraciclina en un 71%, *Staphylococcus aureus* era resistente a eritromicina en un 30% y oxacilina en un 25% (Rodríguez, L. (n.d.)

Paralelamente, existe otra problemática concerniente a salud pública; las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son muy frecuentes en países en vías de desarrollo como el Ecuador. A pesar de que no existen ETA's oficialmente vigiladas en forma regular en el país, se sabe que las de mayor importancia son: cólera, fiebre tifoidea, salmonelosis, enfermedades diarreicas agudas, intoxicaciones alimentarias y Hepatitis A.

De lo señalado anteriormente, surge la necesidad de buscar alternativas antibióticas que contribuyan a dar una solución efectiva al problema de la resistencia a antibióticos, o en su defecto, ayuden a la reducción de brotes de enfermedades. Por otro lado, se busca además medidas preventivas que puedan ser usadas en conjunto con los sistemas de inocuidad alimentaria, de tal forma que al ser compartidas al público, dichas medidas ayuden a la reducción de brotes de ETA's.

Preguntas directrices:

¿Mostrarán los extractos acuosos de *Allium sativum* y *Coriandrum sativum* actividad antibiótica en pruebas de sensibilidad in vitro frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *typhi* y *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*, procedentes tanto del cepario del Laboratorio de

Microbiología DISerLAB – PUCE como del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez Quito”?

De existir un efecto antibiótico ¿Qué concentraciones de estos extractos son necesarias para producir una actividad antibiótica cercana a la obtenida con los antibióticos comerciales gentamicina y ampicilina?

¿Cuál será el efecto de estos extractos ante cepas de *Staphylococcus aureus* Metilino Resistente (MRSA) y de *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) procedentes tanto del cepario del Laboratorio de Microbiología DISerLAB – PUCE como del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez Quito”?

¿Mostrarán los extractos un efecto bactericida al ser puestos en contacto con alimentos que no han tenido tratamientos previos de cocción, disminuyendo la carga microbiana dichos alimentos?

En este estudio no se determinarán los principios activos del *Allium sativum* y del *Coriandrum sativum*, ni las técnicas de extracción y separación de los mismos. Tampoco se investigará el efecto desinfectante que tienen los extractos de *Allium sativum* y de *Coriandrum sativum* en alimentos preparados con calor. Estudios posteriores podrían abarcar estos temas y aportar más a la investigación.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo general

Comprobar, si los extractos acuosos de *Allium sativum* y *Coriandrum sativum* presentan una actividad antibiótica significativa frente a cepas bacterianas, mediante el uso de pruebas de sensibilidad *in vitro*, para así proponer, con pruebas concretas, su uso como una posible alternativa a los antibióticos comerciales.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el uso de discos de papel filtro impregnados con extractos de *Allium sativum* y *Coriandrum sativum* para que puedan ser utilizados en la prueba de sensibilidad *in vitro* por el método de difusión en agar (Método Bauer-Kirby) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente EB- I – 13, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* productora de Beta-lactamasas de Espectro Extendido EB - I - 9, *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 y *Salmonella enterica* serovar *typhi* MSt 01.
- Determinar cuál de los extractos presenta la mayor actividad antibiótica y su concentración más efectiva (expresada en mg/mL) para usarlo como un desinfectante natural sobre alimentos sin procesos previos de cocción (ensaladas) para así corroborar este potencial uso.
- Recopilar y comparar los resultados del estudio para así determinar la eficacia de estos extractos como agentes antimicrobianos.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Resistencia a los antimicrobianos (RAM)

La resistencia a los antimicrobianos es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Los microorganismos resistentes (entre ellos las bacterias, los virus y algunos parásitos) son inmunes a los efectos de los antimicrobianos, como los antibióticos, los antivíricos o los antipalúdicos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. La resistencia es una consecuencia del uso de los antimicrobianos, y en particular de su abuso, y surge por mutación del microorganismo o adquisición de genes de resistencia (Rodríguez, L. (n.d.).

##### 2.1.1 Mecanismos de resistencia

Gracias a la gran capacidad que tienen las bacterias para la adaptación, estas han desarrollado varios mecanismos de resistencia a los antibióticos, estos mecanismos pueden ser de origen natural o adquirido.

Los mecanismos naturales están determinados genéticamente y de manera permanente, por tanto no se correlacionan con el incremento de dosis de un antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprim sulfametoxazol; otro ejemplo es la resistencia de bacilos gram negativos aeróbicos a clindamicina (Rodríguez, L. n.d.).

Por otro lado, la resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el DNA ya sea por mutación o por la adquisición de material genético a través de plásmidos, trasposones e integrones. En el caso de la mutación se dan casos tales como la transformación de una betalactamasa en una betalactamasa de espectro extendido, o las mutaciones de los genes que codifican las porinas, con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo (Rodríguez, L. n.d., Todar, K. PhD. 2008).

Desde el punto de vista molecular y bioquímico, existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente a un efecto antibiótico, estos son:

- Por inactivación del antibiótico
- Por alteración del sitio blanco del antibiótico
- Por barreras de permeabilidad

Es importante señalar que estos tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente (Figura N°1).

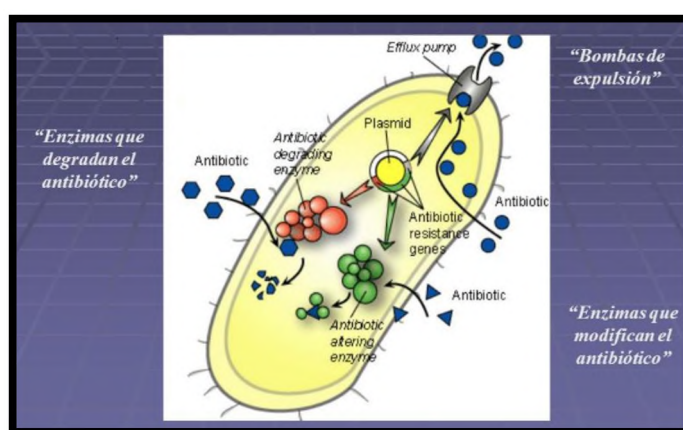


Figura N°1

### Mecanismos de resistencia bacteriana

Fuente: (Todar's online text of microbiology).

#### 2.1.1.1 Resistencia por destrucción e inactivación del antibiótico

Se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico, como es el caso de la producción de betalactamasas, betalactamasas de amplio espectro, eritromicina estereasa y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloranfenicol, lincosamidas y estreptograminas. (Todar, K. PhD. 2008).

### **2.1.1.2 Resistencia por alteración del sitio blanco**

En este mecanismo se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30s ribosomales, etc. De esta manera la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, conferirán resistencia a los b-lactámicos, dados que es esta enzima su sitio de acción.

Otros ejemplos son la resistencia a las quinolonas de bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Dichas resistencias obedecen a la modificación por mutación de los genes GyrA y Gyr B que codifican para las topoisomerasas II y IV. Todas estas mutaciones se presentan como cromosómicas y no como plásmidos. (Rodríguez, L. n.d., Todar, K. PhD. 2008).

En cuanto a las estructuras ribosomales encontramos modificaciones a nivel de múltiples subunidades como 30s, 50s. También por modificaciones de sitios de acción de aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos y tetraciclinas. Ejemplo de esto es la metilación del ARN ribosomal de la subunidad 50S en el caso de la resistencia de *S. aureus*, *Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens* a tetraciclinas, cloramfenicol y macrólidos.

Cabe destacar en este punto los mecanismos de metilino resistencia por producción de una proteína ligadora de penicilina (PBP), la resistencia a penicilina por *Streptococcus pneumoniae*, la resistencia a glicopéptidos por *Staphylococcus aureus*.

### **2.1.1.3 Resistencia por barreras de permeabilidad**

Estas barreras dependen de tres componentes básicos: 1) la estructura de la membrana externa de la bacteria, 2) las porinas (canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular y 3) características fisicoquímicas del antimicrobiano. En el caso de los medicamentos hidrofílicos (imipenem) requieren presencia de porinas para su transporte al interior de la célula.

En base a estos tres componentes, existen dos mecanismos de resistencia:

**1.- Resistencia por entrada disminuida del antibiótico.-** Esta disminución en la entrada del antibiótico se da por tres mecanismos:

- **Por alteración en la permeabilidad de la membrana externa.** Este tipo de resistencia está claramente definida en las bacterias Gram negativas que poseen una membrana lipídica externa, lo que constituye una barrera intrínseca para la penetración del antibiótico.
- **Por alteración de la permeabilidad de la membrana interna.** En el segundo caso la resistencia se puede dar por una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula y también por la presencia de una capa lipídica en la membrana, la cual actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos.
- **Modificación de porinas.-** Las porinas son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria. Cuando estas se modifican por mutación, se genera una disminución del paso del antibiótico. Ejemplos de este mecanismo de resistencia son: *Salmonella typhimurium* (OmpC) contra cefalosporinas de primera generación y *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* contra aminoglucósidos y carbapenem.

**2.- Resistencia por eflujo activo.-** Se da por la presencia de proteínas de membrana especializadas. Se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada del antibiótico, sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloramfenicol y B-lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario.

### 2.1.2 Otros fenómenos de resistencia

Existen también otros fenómenos de resistencia, tales como:

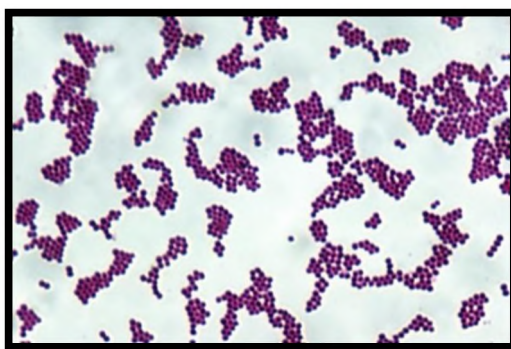
- **Resistencia relativa o intermedia:** ocurre un incremento gradual de la MIC (concentración inhibitoria mínima) a través del tiempo. Por ende, para obtener un efecto terapéutico es necesario alcanzar niveles séricos y tisulares adecuados. En este caso, la susceptibilidad o resistencia del germen es dependiente de la concentración del antibiótico
- **Resistencia absoluta:** Se da cuando se presenta un incremento súbito en la MIC de un cultivo durante o después de la terapia. En este caso el incremento de la dosis clínica usual es inefectivo. Ejemplo de esto es la resistencia del género *Pseudomonas spp.* a gentamicina, y la resistencia del *Streptococcus pneumoniae* a penicilina y al uso de levofloxacina.
- **Pseudoresistencia:** Se presenta cuando ocurre una resistencia in vitro pero existe una gran efectividad in vivo.

Cabe mencionar también el fenómeno de tolerancia antibiótica, en el cual la diferencia entre la MBC (concentración bactericida mínima) y la MIC es muy grande lo cual ocurre con relaciones MBC/MIC mayores de 8 lo que permite la persistencia del microorganismo. (Rodríguez, L. n.d., Todar, K. PhD. 2008).

## 2.2 Características de *Staphylococcus aureus* y perfil de sensibilidad

*Staphylococcus aureus* es la principal especie patógena de su género, causa común de infecciones diversas, tanto de origen comunitario como hospitalario. El interés actual del estudio de este patógeno deriva, bien de su elevada frecuencia, o por representar, en el caso de cepas resistentes a metilina (MRSA), una de las principales causas de brotes de infección nosocomial en nuestro país. Taxonómicamente el género *Staphylococcus* está en la familia bacteriana Staphylococcaceae, la cual incluye 3 géneros menos conocidos, *Gamella*, *Macrococcus* y *Salinococcus*. El género *Staphylococcus* incluye actualmente 32 especies y 8 subespecies aerobias y anaerobias facultativas, con la excepción de *Staphylococcus saccharolyticus* y *Staphylococcus aureus* subespecie anaerobius, que son anaerobias estrictas. (Camarena, J. J., Sánchez, R. n.d.)

Aparecen como bacterias cocáceas Gram-positivas agrupadas en parejas, tétradas, cadenas cortas o, de forma característica, como racimos irregulares. Son inmóviles y no esporuladas (**Figura N°2**). Su temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 °C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pH mucho más extremos. Soportan tasas elevadas de cloruro sódico, hasta un 15%. Crecen bien en los medios de cultivo habituales, muestran  $\beta$ -hemólisis en medios con sangre, y son capaces de desarrollarse a altas concentraciones de NaCl (medio selectivo de Chapman). Su metabolismo es de tipo fermentativo y anaerobio facultativo.



**Figura N°2**  
**Morfología de *Staphylococcus aureus***

**Fuente:** Nordichphotos.

El antibiótico usado comúnmente para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* es la penicilina, uno de los primeros antibióticos usados para tratar infecciones por *Staphylococcus aureus*, sin embargo, menos del 10 por ciento de las cepas de hoy en día son susceptibles a ella. Por lo tanto, los derivados de la penicilina, la amoxicilina-clavulánico y ampicilina-sulbactam, se utilizan más frecuentemente (Anónimo. 2010).

La cefazolina es una cefalosporina de primera generación utilizado para el tratamiento de las infecciones invasoras por *Staphylococcus aureus* de la sangre y el corazón, sin embargo la cefazolina no puede penetrar bien en el líquido cerebro-espinal y por lo tanto, es ineficaz contra el centro de las infecciones del sistema nervioso. Debido a la gravedad de la enfermedad, el antibiótico se administra generalmente por vía intravenosa.

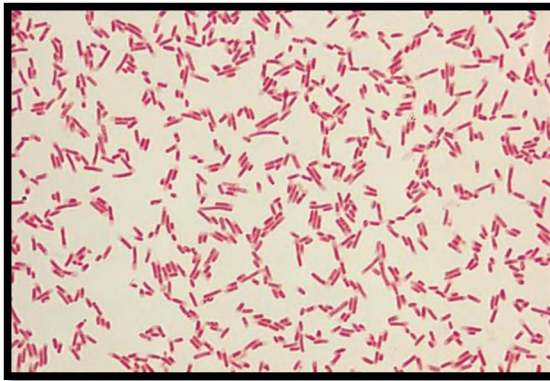
Otro de los antibióticos de elección para el tratamiento de esta cepa es la clindamicina, la cual es una buena opción para tratar una variedad de infecciones de piel y tejidos blandos.

La combinación de los antibióticos Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX) se puede utilizar para tratar infecciones potencialmente mortales causadas por cepas sensibles a meticilina y resistente a la meticilina de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo no se recomienda el uso de este antibiótico para tratar infecciones de la sangre o del corazón.

Otro antibiótico usado es también la vancomicina. Se utiliza para tratar infecciones por causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Se recomienda la vancomicina en el TMP-SMX para el tratamiento de infecciones leves por estafilococos. Debido a que la resistencia a la vancomicina ha ido en aumento se recomienda usarlo sólo para el tratamiento de MRSA, o para aquellos con alergias severas a la penicilina (Centers for Disease Control and Prevention. (2010), Flores Q., Velasco A. & Figueroa S. N. 1999).

### **2.3 Características de *Escherichia coli* y perfil de sensibilidad**

*Escherichia coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Forma parte de la familia Enterobacteriaceae, la misma que está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados (**Figura N°3**), móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA (Anónimo n.d., Organización Mundial de la Salud (OMS). Mayo, 2013).



**Figura N°3**

**Morfología de *Escherichia coli***

**Fuente:** Procedimientos microbiológicos.

La bacteria está presente en grandes concentraciones en la microflora intestinal normal de las personas y los animales donde, por lo general, es inocua. Sin embargo, en otras partes del cuerpo *E. coli* puede causar enfermedades graves, como infecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis. Un número reducido de cepas enteropatógenas pueden causar diarrea aguda.

En cuanto al tratamiento para esta bacteria, se puede señalar que la sensibilidad de la diferentes cepas de *E. coli* varía ampliamente. Como organismo Gram negativo, *E. coli* es resistente a los muchos antibióticos que son efectivos contra microorganismos gram positivos. Los antibióticos que pueden ser usados para tratar infecciones causadas por esta bacteria incluyen amoxicilina así como también otras penicilinas semi-sintéticas, algunas cefalosporinas, carbapenems, Aztreonam, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Ciprofloxacina, Nitrofurantoina y los aminoglucósidos (Anónimo n.d., Beloin E., Roux A., & Ghigo J. 2010, Organización Mundial de la Salud Mayo, 2013).

Las cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos pueden también pasar los genes responsables de la resistencia a otras especies bacterianas, como por ejemplo *Staphylococcus aureus*, a través de un proceso llamado transferencia horizontal de genes. *E. coli* con frecuencia lleva plásmidos de resistencia. De hecho es un miembro frecuente de biofilms, donde muchas especies bacterianas existen en una proximidad estrecha una con otra. Esta mezcla de especies permite a las cepas de *E. coli*, que son portadoras de pili, aceptar y transferir plásmidos de una a otra bacteria. Así, esta y las otras

enterobacterias son importantes reservorios de resistencia a antibióticos transferible (Morales, R. I. 2003).

La resistencia a antibióticos beta-lactámicos ha llegado a ser un problema particular en décadas recientes en especial la aparición de cepas bacterianas que producen beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), la cual es cada vez más común. Estas beta-lactamasas han hecho que penicilinas and cefalosporinas sean inefectivas como terapia. Por otro lado, las cepas de *E. coli* productoras de beta-lactamasas de amplio espectro (BLEA) son altamente resistentes a una amplia gama de antibióticos por lo que las infecciones producidas por estas cepas son difíciles de tratar.

## **2.4 Características del género *Salmonella* y perfil de sensibilidad**

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram negativos móviles que no fermentan la lactosa, aunque la mayoría producen sulfuro de hidrógeno o gas por fermentación de los hidratos de carbono (**Figura N°4**). Inicialmente, se agruparon en más de 2000 especies (serotipos) en función de sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (esquema de Kauffman-White). Actualmente se considera que esta clasificación está por debajo del nivel de especie: en realidad sólo hay dos o tres especies (*Salmonella enterica* o *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella bongori* y *Salmonella typhi*) y los serotipos se consideran subespecies. Todos los agentes patógenos entéricos, excepto *Salmonella typhi*, pertenecen a la especie *Salmonella enterica*. Por convención, las subespecies se abrevian, de modo que el serotipo *Salmonella enterica* Paratyphi A se transforma en *Salmonella Paratyphi A* (González-Zorn, B. 2010).

El tratamiento de primera línea es la ciprofloxacina, dada la aparición de aislamientos de *Salmonella enterica* serovar *typhi* multirresistentes a nivel mundial (resistencia a cloranfenicol, ampicilina y trimetoprima-sulfametoxazol). El fracaso terapéutico se definió ante la disminución de la sensibilidad a la ciprofloxacina, con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0.125 a 1 µg/ml. Sin embargo, actualmente también se han detectado cepas resistentes a ciprofloxacina (Harish B., Menezes G, 2011).



**Figura N°4**

**Morfología de cepas bacterianas de *Salmonella***

**Fuente:** Institute of tropics and subtropics.

El cloranfenicol continúa siendo el medicamento de primera elección para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella typhi* sensibles. Tiene muy buena difusión tisular y bajo costo, sin embargo el inconveniente del cloramfenicol es su toxicidad hematológica caracterizada por la depresión medular relacionada con la dosis y representada por reticulocitopenia, vacuolización de los eritrocitos, aumento del hierro sérico y de la celularidad de la médula ósea. La segunda forma, más rara y de mayor gravedad es la pancitopenia o aplasia medular idiosincrásica (Harish B., Menezes G, 2011, Todar, K. PhD. 2008).

La ampicilina tiene buena concentración sanguínea y linfática; cuando se administra por vía oral se concentra y elimina en forma activa por la bilis. Otro de los antibióticos usados, perteneciente al grupo de las ampicilinas, es la amoxicilina. Tiene la ventaja de tener mejor absorción, mayor concentración y menores efectos gastrointestinales que la ampicilina.

Se puede usar además la combinación de los antibióticos Sulfametoxazol-trimetoprim. Se utilizan en el tratamiento de fiebres entéricas incluida la fiebre tifoidea, con resultados variables. Las fluoroquinolonas han demostrado ser muy activas in vitro contra cepas de *Salmonella*, incluida *Salmonella enterica* serovar *typhi*. Dentro de éstas la ciprofloxacina es una buena alternativa. La norfloxacina es útil en el tratamiento de portadores crónicos de *Salmonella enterica* serovar *typhi*, observándose negativización de las heces y la bilis en dosis de 400 mgs. Igualmente, ha sido utilizada la ofloxacina en el tratamiento de los portadores crónicos (Todar, K. PhD. 2008).

Dentro del grupo de las Cefalosporinas, las de tercera generación son las mejor estudiadas en el tratamiento de las bacteremias y fiebres entéricas por *Salmonella*, incluidas aquellas por *Salmonella typhi*. Los mejores resultados observados son los obtenidos con la cefoperazona y la ceftriaxona.

Por último, el uso de dosis elevadas de dexametasona se utiliza en el manejo de la fiebre tifoidea, sin embargo debe ser usada solamente en el tratamiento de la fiebre tifoidea severa y en forma temprana. De ésta manera de dexametasona puede reducir la mortalidad en forma importante.

## **2.5 Búsqueda de alternativas antibióticas**

Ante el aumento de casos de resistencia a antibióticos, la ciencia médica desarrolla nuevas formas de combatir infecciones microbianas y sobre todo nuevos compuestos químicos naturales. En el planeta existe una infinidad de plantas y especias con reconocidas propiedades y virtudes terapéuticas para curar o aliviar enfermedades y varios tipos de infecciones. Experimentos recientes se han dedicado a desarrollar un antibiótico extraído de microorganismos marinos mediante espectroscopia, este antibiótico (denominado anthracimycin) es capaz de combatir infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (Mary E Hensler<sup>1</sup>, Kyoung Hwa Jang<sup>2</sup>, 2014).

Los científicos señalan que si empezamos por reducir drásticamente el uso de los antibióticos y limitamos su uso a los casos de amenaza grave para la salud, quizá podamos superar, al menos, parte del problema, pues los investigadores han descubierto también que cuando las bacterias no topan regularmente con antibióticos, empiezan a olvidar cómo resistirse a ellos.

### **2.5.1 Plantas con propiedades antibióticas**

La gran mayoría de los antibióticos utilizados en la medicina moderna son o han sido producidos por microorganismos tipo levaduras u hongos, sin embargo las plantas superiores producen antimicrobianos principalmente como mecanismo de defensa contra infecciones o pueden ser sustancias constituyentes del metabolismo celular; entre estas

sustancias tenemos alcaloides, cumarinas, fenoles simples, flavonas, quinonas y taninos, entre los más comunes:

- ***Acacia farnesiana*** (Acacia).- De esta se utilizan las hojas y los frutos. Su actividad antibiótica se debe a su contenido en taninos, los cuales interactúan sobre las sobre las adhesinas (proteínas de la pared celular), y a su capacidad de unirse a polisacáridos.
- ***Allium sativum*** (Ajo).- Se utiliza el bulbo. Tiene actividad antiviral así como también antibacteriana. El principio activo que le confiere estas propiedades es un aminoácido azufrado, la alicina.
- ***Coriandrum sativum*** (Culantro o Cilantro).- Se utilizan las hojas. Su aceite esencial tiene propiedades antibióticas frente a bacterias Gram negativas,
- ***Cuminum cyminum*** (Comino).- Su aceite esencial presenta una marcada actividad antibacteriana y antifúngica. El componente responsable de este efecto es el cuminaldehído.
- ***Eucalyptus globulus*** (Eucalipto).- Se utilizan las hojas de ramas no jóvenes. El aceite esencial es muy activo por su contenido en eucaliptol, que le confiere el aroma característico y se utiliza como antiséptico de las vías respiratorias y vías urinarias. Ha demostrado es eficaz contra *Candida albicans*, así como también contra bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- ***Origanum vulgare*** (Oregano).- Los extractos acuosos y alcohólicos así como el aceite esencial presentan potente actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*.

#### **2.5.1.1 *Allium sativum* (Ajo)**

Esa una planta monocotiledónea, perteneciente al orden Liliiflora, que abarca unas 3.500 especies de plantas herbáceas y árboles. Muchas de sus especies formas bulbos o engrosamientos subterráneos del tallo y todas ellas son ricas en aceites esenciales sulfurados muy volátiles.

### **2.5.1.1.1 Características de la planta**

Las hojas son planas y delgadas, de hasta 30 cm de longitud. Las raíces alcanzan fácilmente profundidades de 50 cm o más. Las flores son blancas, y en algunas especies el tallo también produce pequeños bulbos (**Figura N°5**).



**Figura N°5**

**Planta y bulbo de *Allium sativum***

Fuente: Etnobotania.

El bulbo, de piel blanca, forma una cabeza dividida en gajos que comúnmente son llamados dientes. Cada cabeza puede contener de 6 a 12 dientes, cada uno de los cuales se encuentra envuelto en una delgada película de color blanco o rojizo. Cada uno de los dientes puede dar origen a una nueva planta, ya que poseen en su base una yema terminal que es capaz de germinar incluso sin necesidad de plantarse previamente.

### **2.5.1.1.2 Principales componentes**

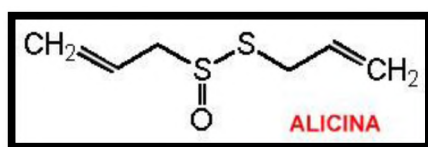
En cada diente de *Allium sativum* se encuentran los siguientes componentes (5):

- Aminoácidos: Ácido glutamínico, argenina, ácido aspartico, leucina, lisina, y valina, entre los más importantes.
- Minerales: Manganeso, potasio, calcio y fósforo, principalmente. En cantidades menores: magnesio, selenio, sodio, hierro, zinc y cobre.
- Vitaminas: Principalmente: vitamina B6, también vitamina C y en cantidades menores: ácido fólico, pantoténico y niacina.

- Aceite esencial con muchos componentes sulfurosos.
- Aliína que, mediante la enzima alinasa, se convierte en alicina.
- Ajoeno, producido por condensación de la alicina.
- Quercetina
- Azúcares: fructosa y glucosa.

### 2.5.1.1.3 Efecto antibiótico y mecanismo de acción

La Aliina es el componente “madre” -farmacológicamente inactivo e inodoro- del que deriva la sustancia activa, la alicina (**Figura N°6**). Esta sustancia por sí sola no tiene valor como medicamento, pero cuando se pica o machaca el ajo, la aliina se combina con la enzima del mismo ajo llamada aliinasa y esto se transforma en una sustancia química que recibe el nombre de alicina, la que constituye un poderoso antibiótico de potente acción capaz de inhibir el desarrollo de gérmenes patógenos (Dankert J, Tromp TF, de Vries H, Klasen HJ, 1979, Davis LE, Shen J.1994).



**Figura N°6**  
**Molécula de alicina**

Fuente: IQB.

La alicina también ha mostrado actividad antifúngica y antiviral; en el caso de la primera se ha demostrado que la alicina inhibe la formación de micotoxinas como la aloflotoxina de *Aspergillus parasiticus*, así como también inhibir su crecimiento. Otro estudio de sensibilidad in vitro demostró que, un extracto concentrado de ajo que contenía 34% de alicina, 44% de tiosulfatos totales y 20% de vinilditinas, poseía una actividad antifúngica potente frente a tres diferentes aislados de *Cryptococcus neoformans* (Davis LE, Shen J.1994).

El principal efecto antimicrobiano de la alicina se debe a la reacción química de la misma con varias enzimas pertenecientes al grupo thiol, como por ejemplo la alcohol deshidrogenasa, tioredoxin reductasa y la RNA polimerasa. En el caso de las bacterias, la

alicina inhibe específicamente las enzimas acetato quinasa y la fosfotransacetil-CoA sintetasa, esenciales para la formación de acetil-CoA. Un estudio ha mostrado también que la alicina a inhibe la síntesis de proteínas y de ADN en cepas de *Salmonella typhimurium*, sin embargo el efecto inhibitorio en la síntesis de ARN fue inmediato, lo que sugiere que este podría ser su blanco primario sobre el cual actúa (García, R., Herrera, A., 2007, Serge A., Mirelman D., 1999).

### **2.5.1.2 *Coriandrum sativum* (Culantro)**

El culantro o cilantro pertenece a familia Apiaceae, y es originario de la región mediterránea. Es la hierba más utilizada en el mundo. La semilla de esta planta es la especia coriandro y la hoja es la hierba cilantro (**Figura N°7**).



**Figura N°7**

**Planta de *Coriandrum sativum***

Fuente: Plantas medicinales.

#### **2.5.1.2.1 Principales componentes**

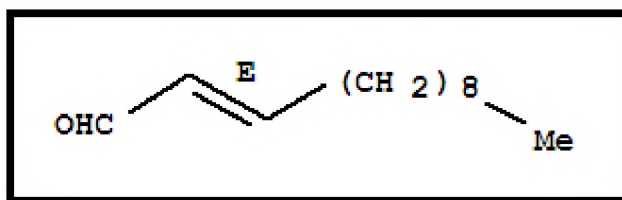
La composición química del cilantro se basa principalmente en sus aceites esenciales, los cuales contienen decanal, dodecenal, decano, huleno, cerofileno, linanol, taninos, ácido málico. También se ha reportado que en su composición nutritiva se encuentra calcio, potasio y vitamina A.

#### **2.5.1.2.2 Efecto antibiótico y mecanismo de acción**

En el estudio realizado por el Dr. Isao Kubo, en la universidad de Berkley (Estados Unidos) se aislaron 13 compuestos volátiles que se encuentran presentes en las hojas frescas del *Coriandrum sativum*, de los cuales 11 eran aldehídos acíclicos (productos típicos de la escisión oxidativa ácidos grasos insaturados). Posteriormente se comprobó su efecto

antibiótico frente a cepas de *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus vulgaris*; usando el método de dilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria MIC (Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T.2004).

La actividad antibiótica se correlacionó con la longitud de la cadena alquilo hidrofóbica (cola) que forman parte de los grupos aldehído (cabeza), los cuales son hidrofílicos. Así, *Salmonella choleraesuis* mostró diferentes susceptibilidades a aldehídos que poseían diferentes longitudes de cadena de carbonos. Parece ser que el incremento de actividad antibiótica depende del incremento en la longitud de las cadenas de carbono, por tanto el compuesto que mejor efecto antibiótico mostró frente a esta bacteria fue el compuesto (2E)-dodecenal con una cadena de 12 átomos de carbono (**Figura N°8**) (Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T.2004).



**Figura N°8**  
**Molécula de dodecenal**  
**Fuente:** (LookChem).

Cabe señalar que los compuestos (2E)-dodecenal y (2E)-decenal son los compuestos volátiles más abundantes que se encuentran presentes en las hojas del culantro; corresponden al 85% del total de los compuestos identificados, por tanto se deduce que estos dos compuestos son los principales responsables del efecto antibiótico del *Coriandrum sativum*. El mecanismo de acción, en el caso del efecto antibiótico del compuesto (2E)-dodecenal frente a *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*, se debe en su mayoría a la actividad no aniónica surfactante de este compuesto, esto quiere decir que se produce una alteración en la tensión superficial de la membrana celular de la bacteria, comprometiendo así su estructura y funcionalidad (Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T.2004).

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y METODOLOGÍA

El objetivo de este trabajo de tesis fue demostrar el potencial antibiótico que tienen las plantas de *Allium sativum* (ajo) y *Coriandrum sativum* (culantro), mediante pruebas de sensibilidad *in vitro*, donde se usaron los extractos acuosos de estas plantas. Para fines prácticos se estableció un plan de trabajo, el cual incluyó el desarrollo de la metodología que a continuación se explicará detalladamente.

#### 3.1 Localización del estudio

El estudio fue realizado en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los experimentos se realizaron en los laboratorios N°1 y N°2 de docencia de la carrera de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis.

#### 3.2 Origen de las muestras

Para la elección de las plantas, no se consideraron parámetros específicos, salvo la buena conservación y estado de las mismas. Por tanto en este trabajo se utilizó bulbos de *Allium sativum* (ajo) y plantas de *Coriandrum sativum* (culantro), provenientes de dos supermercados de la ciudad de Quito. Para los ensayos se utilizaron dientes de ajo sin cáscara, y las hojas y ramas de la planta de culantro.

Para la evaluación del efecto antibiótico de los extractos se emplearon seis cepas bacterianas, las cuales fueron identificadas mediante microscopía y pruebas bioquímicas. Las cepas bacterianas empleadas en el estudio fueron:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente
- *Escherichia coli*
- *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de Espectro Extendido
- *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*
- *Salmonella enterica* serovar *typhi*

Las cepas bacterianas empleadas y su procedencia se listan en la **Tabla N° 1**.

**Tabla N°1**  
**Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos**

<b>Nombre de la cepa</b>	<b>Código de identificación</b>	<b>Origen</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	CRSau1	Cepario del Laboratorio de Microbiología DISerLAB – PUCE.
<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente (MRSA)	EB- I – 13	Cepario del Laboratorio de Microbiología DISerLAB – PUCE.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	CREco4	Cepario del Laboratorio de Microbiología DISerLAB – PUCE.
<i>Escherichia coli</i> productora de Beta-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	EB – I – 9	Cepario del Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. DISerLAB
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> (ATCC 14028)	CRSch2	Cepario del Laboratorio de Microbiología DISerLAB – PUCE.
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i>	MSt 01	Cepario del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” Quito.

### **3.3 Variables de estudio**

Para evaluar el efecto antibiótico de los extractos acuosos de ajo y culantro se tomaron como base las siguientes variables:

1. Concentración de los extractos.
2. Influencia de la temperatura en la actividad antibiótica de los extractos.

### **3.4 Obtención de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y *Coriandrum sativum* (culantro)**

En este trabajo se emplearon los extractos acuosos de plantas de ajo y culantro, a diferencia de estudios previos donde se han puesto a prueba los principios activos de dichas plantas. Los extractos acuosos se obtuvieron de acuerdo al método de B.A. Iwalokun, et al (2004), constando de cinco pasos:

- 1) Maceración de los productos (dientes de ajo, hojas y tallos de culantro) y dilución con agua destilada estéril.
- 2) Almacenamiento de los extractos acuosos en tubos de ensayo.
- 3) Tratamientos de los extractos de ajo y culantro a diferentes condiciones de temperatura.
- 4) Esterilización de los extractos acuosos en unidades de filtración Millex GP.
- 5) Almacenamiento de los extractos en tubos de ensayo con tapa rosca para su posterior uso.

#### **3.4.1 Maceración de los productos y dilución con agua destilada estéril**

Para la obtención de los extractos acuosos se pesaron 150 gramos de dientes de ajo, y de igual forma, 150 gramos de culantro (correspondientes a los tallos y las hojas). Una vez pesados los productos, los 150 gramos de cada uno de ellos se dividieron en tres porciones de 50 gramos cada una (**Figuras N° 9 y N°10**).



**Figura N°9**  
**Gramos pesados de *Allium sativum* (ajo)**  
**Fuente:** Yaguana C.



**Figura N°10**  
**Gramos pesados de *Coriandrum sativum* (culantro)**

**Fuente:** Yaguana C.

Cada una de las porciones fue macerada en morteros de porcelana estériles en forma individual. Con forme se realizaba la maceración a cada porción se le añadió un cierto volumen de agua destilada estéril. Así:

- Primera porción: 50 gramos de producto + 20 mL de agua destilada
- Segunda porción: 50 gramos de producto + 50 mL de agua destilada
- Tercera porción: 50 gramos producto + 80 mL de agua destilada

Una vez alcanzada la capacidad de los morteros, los extractos acuosos fueron trasvasados a vasos de precipitación de 100 mL para continuar así con el proceso de maceración del resto de producto.

La concentración de los extractos acuosos de ajo y culantro se determinó en base a la siguiente relación:

$$\frac{\text{Gramos de soluto}}{\text{1 mililitro de solución}} = \text{concentración mg/mL}$$

Como resultado se obtuvieron extractos acuosos de ajo y culantro en concentraciones de: 200 mg/mL, 500 mg/mL y 800 mg/mL.

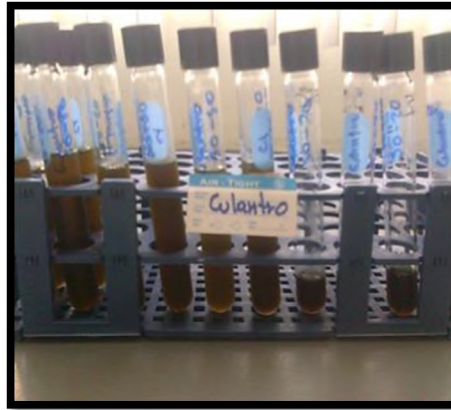
### 3.4.2 Almacenamiento de los extractos en tubos de ensayo

Los extractos de ajo y culantro, contenidos en vasos de precipitación de 100 mL fueron distribuidos en tubos de ensayo de tapa rosca, con 10 mL de capacidad. De un total de 32 tubos, 16 de ellos se designaron para almacenar los extractos de ajo, mientras que los 16 restantes fueron designados para los extractos de culantro. (Figuras N°11 y N°12).



**Figura N°11**  
**Extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo)**

Fuente: Yaguana C.



**Figura N°12**

**Extractos acuosos de *Coriandrum sativum* (culantro)**

**Fuente:** Yaguana C.

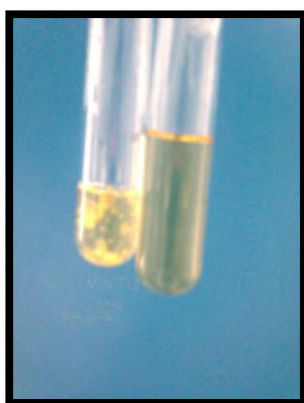
### **3.4.3 Tratamiento térmico de los extractos**

Con el fin de aportar datos relevantes para futuros estudios, se realizaron ensayos para determinar la influencia de la temperatura sobre la actividad antibiótica de los extractos. Los extractos acuosos de ajo y culantro fueron sometidos a diferentes tratamientos térmicos durante un período de tiempo de 10 minutos. Las temperaturas y los tiempos de los tratamientos fueron establecidos en base a un estudio previo sobre la influencia de la temperatura en la actividad antibiótica del extracto acuoso de ajo (Zakaria Y. Al-Astal, 2003), donde los extractos fueron expuestos a 30, 50, 70, 90 y 100°C, durante 10 minutos en baño María.

Los 16 tubos, tanto del extracto de ajo como los de culantro, fueron divididos en 4 grupos para llevar a cabo los tratamientos térmicos, así:

- **Grupo 1** no tuvo tratamiento térmico, fue designado con las iniciales “ST” (Sin Tratamiento). Este grupo fue tomado como control.
- **Grupo 2** fue sometido a una temperatura de 35°C por 10 minutos. fue designado con las siglas **T35°C**.
- **Grupo 3** fue sometido a 50°C por 10 minutos. fue designado con las siglas **T50°C**.
- **Grupo 4** fue sometido a 90°C por 10 minutos. fue designado con las siglas **T90°C**.

Una vez transcurrido los tiempos de tratamiento, los tubos con los extractos de ajo y culantro fueron sacados del baño maría y colocados en tuberías de plástico hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la centrifugación de aquellos tubos sometidos a las temperaturas de 50°C y 90°C, puesto que después del tratamiento se observó la aparición de grumos (**Figuras N°13 y N°14**). Los tubos fueron centrifugados a una velocidad de 4000 rpm durante 10 minutos (**Figura N°15**). Finalmente todos los extractos fueron almacenados en tubos de ensayo de tapa rosca estériles, hasta su posterior uso.



**Figura N°13**

**Extracto de ajo post tratamiento (T°90)**

**Fuente:** Yaguana C.



**Figura N°14**

**Extracto de culantro post tratamiento (T°90)**

**Fuente:** Yaguana C.



**Figura N°15**

**Centrifugación**

**Fuente:** Yaguana C.

#### **3.4.4. Esterilización de los extractos**

Los extractos de ajo y culantro fueron esterilizados en unidades de Filtración Millex GP de 0,25  $\mu\text{m}$  de diámetro (**Figuras N°16 y N°17**), esto con el fin de garantizar la esterilidad de los mismos para su uso en las pruebas de sensibilidad. El método para la esterilización de los mismos se describe en la **Figura N°18**.



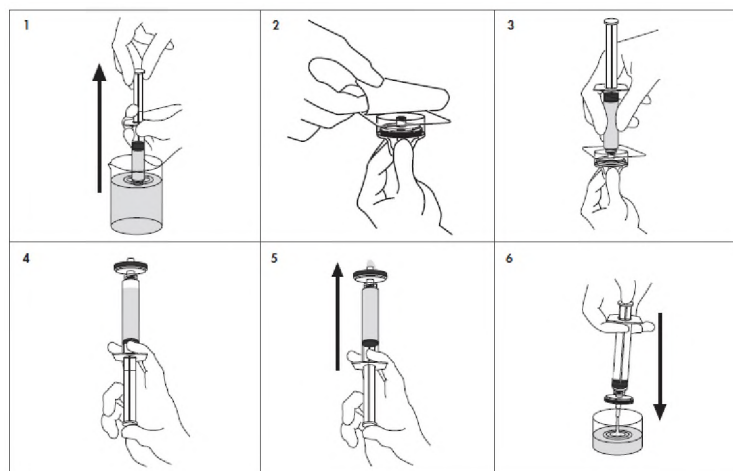
**Figura N°16**

**Unidad de filtración Millex GP millipore, 0.22 micras**

**Fuente:** Millipore Corp.



**Figura N°17**  
**Unidad de filtración Millex HV**  
**0.45 micras**  
**Fuente: Millipore Corp.**



**Figura N°18**  
**Uso de las unidades de filtración Millex GP**  
**Fuente: Millipore Corp.**

**Pasos:**

- 1.- Se tomó, con una jeringuilla estéril 10mL de los extractos.
- 2.-Se abrió el empaque de los filtros Millex Gp de 0,22 micras y 0,45 micras cuidadosamente, sin tocar directamente con las manos las unidades de filtración estériles.
- 3.-Se conectó la unidad de filtración a la jeringuilla con los extractos, enroscando y asegurando ambas partes.

**4 y 5.**-Se colocó verticalmente la jeringuilla, y con la unidad de filtración orientada hacia arriba; se eliminó restos de aire que pudiera haber dentro de la jeringuilla.

**6.**-Finalmente se depositó el extracto estéril en tubos de ensayo con topa rosca de 10 mL de volumen.

### **3.4.5 Almacenamiento final de los extractos**

Los tubos con los extractos acuosos esterilizados fueron colocados en gradillas y almacenados a una temperatura de 3°C hasta su uso en las pruebas de sensibilidad, lo que correspondió a un período de aproximadamente 72 horas.

### **3.5 Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y *Coriandrum sativum* (culantro) mediante el método de difusión en agar (Bauer-Kirby)**

La actividad antibiótica de los extractos fue evaluada mediante difusión en agar, según el método Bauer-Kirby según la norma de la National Committee for Clinical Laboratory Standards CLSI M100 – S20 2010. Las pruebas de sensibilidad se realizaron por duplicado. Los ensayos consistieron, básicamente, en antibiogramas; cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* Productora de Betalactamasas de Espectro Extendido, *Salmonella typhi* y *Salmonella choleraesuis*, fueron enfrentadas a discos de sensibilidad impregnados con los extractos acuosos de ajo y culantro, obtenidos previamente. Además, las cepas bacterianas fueron enfrentadas a discos de antibióticos comerciales de gentamicina y ampicilina en concentraciones de 10 µg con el fin de comparar la actividad antibiótica de los mismos con la de los extractos.

El ensayo se desarrolló en cuatro etapas:

- 1) Preparación de discos de sensibilidad impregnados con los extractos acuosos.
- 2) Preparación de medios de cultivo.
- 3) Reactivación de cepas bacterianas.
- 4) Pruebas de sensibilidad por difusión en agar.

### 3.5.1 Preparación de discos de sensibilidad

La preparación de discos de sensibilidad se realizó tomando en cuenta la técnica descrita por M. Yusha'u et al. (2008) para evaluación del efecto antibiótico de extractos de plantas mediante estas pruebas de sensibilidad por difusión en agar, sin embargo se realizaron algunas variaciones de acuerdo a la disponibilidad de materiales y a ciertos requerimientos de los ensayos, puesto que, con el fin de reproducir las mismas condiciones que tiene un antibiograma, los discos de sensibilidad debían cumplir las mismas condiciones que se mencionan en el Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y Normas CLSI M100-S20, 2010 (**Anexo N°1**).

Para la preparación de los discos se procedió a perforar una lámina de 20 cm x 30 cm de papel cromatográfico de celulosa; la perforación se realizó con una perforadora de escritorio, obteniendo en total se 384 discos con un diámetro final de 6 mm cada uno (**Imagen N° 10**).



**Figura N°19**

**Discos de sensibilidad de papel cromatográfico de celulosa**

**Fuente:** Yaguana C.

Finalmente, los discos fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de 160 °C por un lapso de dos horas.

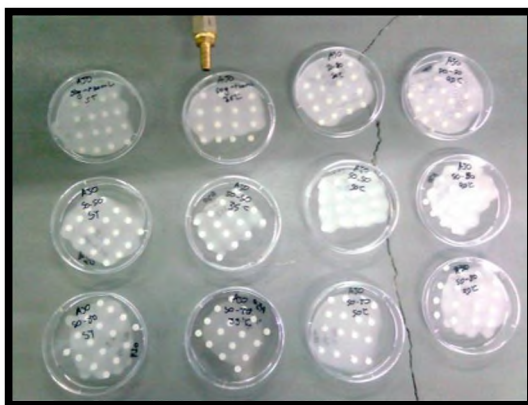
### 3.5.1.1 Impregnación de los discos con los extractos estériles de *Allium sativum* (ajo) y *Coriandrum sativum* (culantro)

Para la impregnación con los extractos, los discos de papel filtro, preparados anteriormente, fueron distribuidos en veinticuatro cajas Petri, cada una de ellas contenía, a su vez, dieciséis discos de papel filtro. De las veinticuatro cajas, doce fueron designadas para la impregnación con los extractos de ajo, mientras que las doce restantes fueron impregnadas con los extractos de culantro. Cada disco fue impregnado con un volumen de 40  $\mu$ L de cada extracto.

Posteriormente, los discos contenidos en las doce cajas fueron divididos en tres grupos, cada grupo corresponde a una concentración diferente de los extractos, así:

- **Grupo N°1:** Concentración del extracto 200 mg/dL
- **Grupo N°2:** Concentración del extracto 500 mg/dL
- **Grupo N°3:** Concentración del extracto 800 mg/dL.

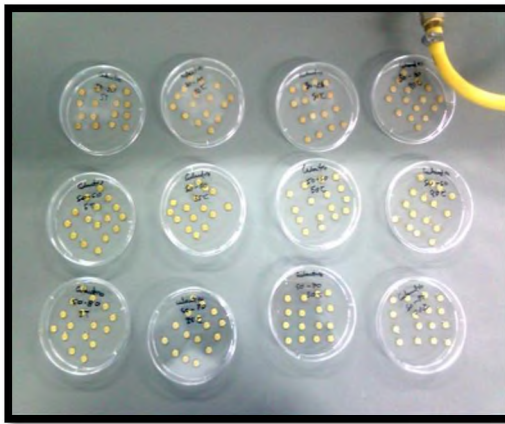
Una vez impregnados los discos con los extractos acuosos de ajo y culantro, estos fueron secados a temperatura ambiente (25°C) por un lapso de 24 horas (**Figuras N°20 y N°21**). Finalmente las cajas con los discos se almacenaron, hasta posterior uso, a una temperatura de 3°C en una refrigeradora, garantizando así su estabilidad y esterilidad.



**Figura N°20**

**Discos de sensibilidad impregnados con los extractos de *Allium sativum* (ajo)**

**Fuente:** Yaguana C.



**Figura N° 21**

**Discos de sensibilidad impregnados con los extractos de *Coriandrum sativum* (culantro)**

**Fuente:** Yaguana C.

### **3.5.2 Preparación de medios de cultivo con Agar Mueller - Hinton**

El medio de cultivo se preparó en base a las especificaciones de la casa comercial; se suspendió 38 gramos del medio en un litro de agua purificada. Se calentó la solución con agitación suave hasta su completa disolución y se hirvió durante un minuto (**Figura N°22**). Posteriormente el medio fue esterilizado en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos, una vez estériles, los medios fueron enfriados a una temperatura entre 45°C para luego dispensar a cada placa Petri un volumen de 15 mL del medio de cultivo. Finalmente las cajas con el medio de cultivo fueron almacenadas a una temperatura de 3°C hasta su posterior uso.



**Figura N°22**  
**Agar Mueller-Hinton**  
**Fuente:** Yaguana C.

### **3.5.3 Reactivación de cepas bacterianas**

La reactivación de las cepas bacterianas se realizó dos horas antes de los ensayos de sensibilidad; esto debido a que las cepas bacterianas se mantuvieron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para la reactivación se procedió a tomar hisopados de los preservados de las cepas (contenidas en tubos Eppendorf) que fueron colocados en los tubos con caldo BHI ajustando la turbidez de los inóculos al valor de 0,5 correspondiente a la Escala McFarland.

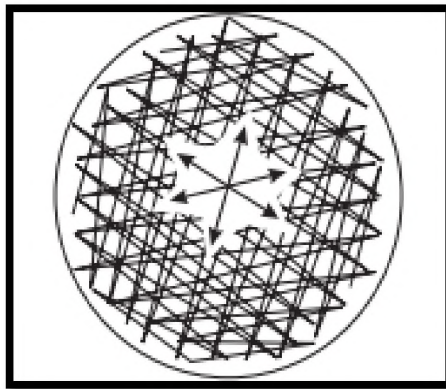
### **3.5.4 Identificación de cepas bacterianas**

Una vez reactivadas las cepas bacterianas, se procedió a la identificación de las mismas mediante pruebas bioquímicas, las mismas que se detallan en el **Anexo N°2**.

### **3.5.5 Siembra de las cepas bacterianas en las placas Petri**

Una vez preparadas las suspensiones bacterianas se procedió a la siembra de las mismas en las placas con agar Mueller-Hinton para comenzar con las pruebas de sensibilidad (antibiogramas). Las cajas fueron sembradas en ambiente estéril, cerca de un mechero Buncen, siguiendo la siguiente metodología:

- Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces y presionando firmemente contra la pared interior del tubo para eliminar el exceso de líquido.
- Se inoculó la superficie seca de las placas de agar, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (**Figura N°23**).
- Las placas fueron secadas a temperatura ambiente durante 5 minutos, para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.



**Figura N°23**

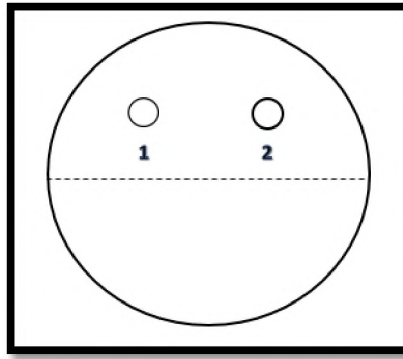
**Método de siembra para la realización de antibiogramas**

**Fuente:** Velásquez J.

### **3.5.6 Aplicación de discos de sensibilidad**

Como se mencionó anteriormente, para evaluar el efecto antibiótico de los extractos se tomaron en cuenta dos variables; la concentración de los extractos de ajo y culantro, y la temperatura a las cuales fueron sometidos dichos extractos. La metodología que se describe a continuación fue la misma para cada uno de los ensayos, tanto para los extractos de ajo, así como para los extractos de culantro.

Para la colocación de los discos, cada placa de agar fue dividida en dos partes, trazando una línea imaginaria en la parte central de las mismas. En la parte superior de las placas se colocaron los discos de gentamicina y ampicilina (concentración 10 µg) con pinzas estériles. El disco de gentamicina fue colocado en la parte superior izquierda, mientras que el disco de ampicilina fue colocado en la parte superior derecha. La distancia de separación de los discos de antibiótico fue de 3,5 cm (**Figura N°24**).

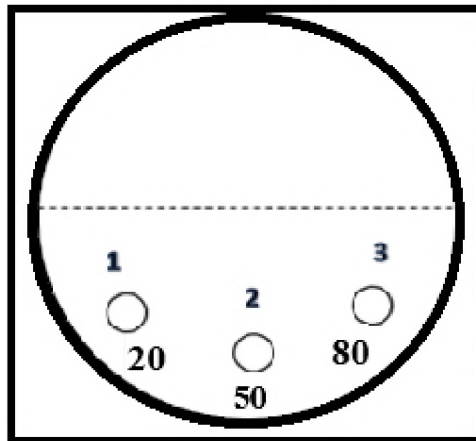


**Figura N°24**  
**Colocación de los discos de antibióticos**  
**1) gentamicina y 2) ampicilina**

**Fuente:** Yaguana C.

En la parte inferior de las placas se colocaron los discos impregnados con los extractos de ajo y culantro. Se colocaron un total de tres discos por placa, cada uno de ellos impregnado con una concentración diferente de los extractos. La distancia de separación de los discos fue de 3 cm los discos fueron identificados mediante números, los cuales corresponden al volumen de agua destilada utilizado en la preparación de los extractos (**Figura N°25**), así:

- Parte inferior izquierda de la placa: Disco del extracto en concentración 200 mg/mL. Identificado con el número 20.
- Parte inferior media de la placa: Disco de concentración 100 mg/mL. Identificado con el número 50.
- Parte inferior derecha de la palca: Disco de concentración 62,5 mg/mL. Identificado con el número 80.



**Figura N°25**

**Colocación de los discos impregnados con los extractos de ajo y culantro**

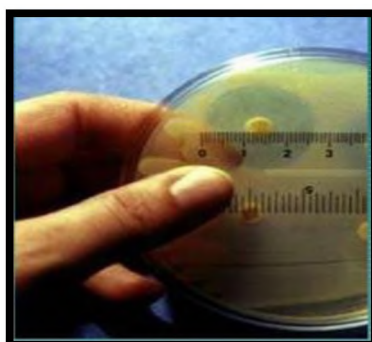
1) Concentración 200 mg/dL, 2) Concentración 500 mg/dL y 3) Concentración 800mg/dL

Fuente. Yaguana C.

Una vez colocados los discos, las placas fueron incubadas a una temperatura de 35°C por 24 horas.

### **3.5.7 Lectura de antibiogramas**

Una vez transcurridas las 24 horas se realizó la lectura de los antibiogramas. Se usó una regla y se midió el radio del halo de inhibición (milímetros) como se muestra en la **Imagen N°26**.



**Figura N°26**

**Método de lectura de un antibiograma**

Fuente: Collazos R.

Los microorganismos fueron clasificados como Resistentes (**R**), Intermedios (**I**) y Sensibles (**S**) a los antibióticos gentamicina y ampicilina, tomando en cuenta los parámetros recomendados por la norma de susceptibilidad antimicrobiana CLSI 2010, los cuales se resumen a en la **tabla N°2**:

**Tabla N°2**  
**Perfiles de sensibilidad de Estafilococos y Enterobacterias para los antibióticos gentamicina y ampicilina**

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en milímetros		
		Resistente < ó =	Intermedio	Sensible > ó =
<b>Ampicilina</b>	<b>10 µg</b>			
<b>Estafilococos</b>		28	.....	29
<b>Enterobacterias</b>		13	14 - 16	17
<b>Gentamicina</b>	<b>10 µg</b>			
<b>Estafilococos</b>		12	13 - 14	15
<b>Enterobacterias</b>		12	13 - 14	15

Una vez realizadas las lecturas, los datos obtenidos fueron registrados en tablas diseñadas para este estudio, las mismas que se muestran en el **Anexo N°3**.

Para la evaluación del efecto antibiótico de los extractos de ajo y culantro se midieron también los halos de inhibición de los mismos. El método de lectura fue el mismo descrito anteriormente, posteriormente los valores fueron registrados en tablas diseñadas para este propósito, las mismas que se muestran en el **Anexo N°4**.

### **3.5.8 Controles**

En cada prueba de sensibilidad se realizó un control por cada cepa bacteriana ensayada. En total fueron 4 controles que incluían los siguientes parámetros:

- Control para incubadora.- Para esto se colocó una caja de agar Mueller-Hinton con la tapa abierta durante 15 minutos dentro de la incubadora utilizada para los ensayos. Pasado el tiempo se procedió a tapar la caja de agar e incubarla por 24 horas a 35°C.
- Control para medio de cultivo.- Se incubó una caja de agar Mueller-Hinton por 24 horas a 35°C, esto con el fin de comprobar la esterilidad del medio de cultivo.
- Control para el ambiente.- Se dejó una caja destapada de agar Mueller Hinton, por 15 minutos, en el medio del laboratorio asignado para la investigación. Pasado el tiempo se incubó la caja por 24 horas a 35 °C.
- Control de cepas bacterianas.- Se realizó la siembra de todas las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos en cajas de agar Mueller Hinton y se incubaron por 24 horas a 35°C. Posteriormente se verificó, mediante observación, el crecimiento de colonias con morfología uniforme.

### **3.6 Evaluación del efecto antibiótico del extracto de ajo sobre muestras de alimentos**

Adicional al tema de estudio de este trabajo de tesis, se realizó un corto ensayo en el cual el extracto de ajo fue puesto en contacto con muestras de alimentos durante un cierto período de tiempo, posteriormente se realizaron análisis microbiológicos de las muestras de alimentos antes y después del tratamiento con los extractos para de esta forma determinar si el extracto de ajo era capaz de disminuir la carga microbiana de dichos alimentos.

Dicho esto, se evaluó la actividad antibiótica del extracto de ajo aplicado sobre alimentos elaborados sin procesos de cocción (ensaladas frescas) mediante un ensayo desarrollado en cinco etapas:

1. Obtención de los alimentos.
2. Preparación de los alimentos y obtención de muestras.
3. Preparación de los extractos de ajo.
4. Exposición de los alimentos al extracto de ajo estéril y no estéril.
5. Análisis microbiológico de las muestras de alimentos para evaluación de su carga microbiana, mediante siembra en placas Petrifilm®.

### **3.6.1 Obtención de los alimentos**

Los alimentos utilizados en los ensayos fueron alimentos sin tratamientos previos de cocción, generalmente ensaladas. Se tomaron en cuenta estos alimentos puesto que son de consumo frecuente y de fácil preparación, sin embargo estas características hacen que estos alimentos sean susceptibles de contaminación por descuido en su manipulación y por un inadecuado almacenamiento.

Los alimentos seleccionados para el estudio fueron ensaladas de chochos (cevichochos) y shawarmas., para facilidad del estudio, el shawarma fue identificado como **Ensalada 1**, mientras que el cevichocho fue identificado como, **Ensalada 2**. Los alimentos fueron obtenidos de dos locales de expendio de alimentos cercanos a la universidad. En cuanto al shawarma, este fue elaborado en el mismo instante de su obtención, a diferencia del cevichocho que se encontraba almacenado en contenedores y que denotaba que había permanecido ahí por un largo período de tiempo.

Para su movilización al laboratorio, los alimentos fueron colocados desde su envase original en fundas Ziploc® con cierre hermético, una vez sellados, estos fueron trasladados al laboratorio para su inmediato procesamiento.

### **3.6.2 Preparación de los alimentos y obtención de muestras**

Una vez en el laboratorio, los alimentos fueron debidamente separados e identificados, y siguiendo las recomendaciones de la norma INEN NTE 1 529-2:99, 1999-02 para el control microbiológico de alimentos; toma, envío y preparación de muestras, se procedió con la siguiente metodología:

- Se colocó todo el alimento en una licuadora, se selló la misma y se desmenuzó el alimento utilizando la revolución más baja por un período de 30 segundos.
- Se tomaron obtuvieron 6 muestras, de 10 gramos cada una, por cada alimento. Las muestras fueron colocadas en frascos plásticos estériles (**Figura N°27 y N°28**) y fueron debidamente identificadas para el siguiente ensayo.



**Figura N°27**  
Ensalada 1 (Shawarma). Peso 10 gr

Fuente: Yaguana C.



**Figura N°28**  
Ensalada 2 (Cevichocho). Peso 10 gr

Fuente: Yaguana C.

### 3.6.3 Preparación de los extractos de ajo

Para este ensayo se prepararon, nuevamente, extractos acuosos de ajo. Se pesaron dos porciones de ajo de 250 gramos cada una, las mismas que fueron trituradas en morteros estériles. Posteriormente se añadió de forma progresiva 100 mL de agua estéril para obtener dos extractos acuosos, con una concentración de 250 mg/mL cada uno; siendo esta la concentración más alta. Uno de los extractos se esterilizó mediante unidades de filtración Millex GP estériles, mientras que el otro se mantuvo sin esterilizar, a fin de poder establecer sí el proceso de esterilización puede ser considerado como una variable a tomar en cuenta durante el análisis de la actividad antibiótica del extracto. Una vez obtenidos los extractos, estos fueron almacenados en vasos de precipitación de 100 mL hasta su posterior uso.

### **3.6.4 Tratamiento de las muestras de alimentos con el extracto acuoso de ajo**

Las muestras de alimentos fueron puestas en contacto con el extracto de ajo por períodos de tiempo determinados. Posteriormente se realizó un análisis microbiológico, mediante conteo en placas Petrifilm®, tanto de las muestras de alimento, así como de las muestras expuestas al extracto para comprobar si existió una disminución de la carga bacteriana inicial. El ensayo se realizó en tres etapas:

1. Aplicación del extracto de ajo sobre las muestras de alimentos.
2. Retiro del extracto de ajo de las muestras de alimentos.
3. Siembra de las muestras de alimentos en placas Petrifilm® y lectura de resultados.

#### **3.6.4.1 Aplicación del extracto de ajo**

Tanto de la ensalada 1 (shawarma), como de la ensalada 2 (cevichocho) se obtuvieron seis muestras de 10 gramos cada una, las muestras fueron colocadas en frascos plásticos estériles donde sería agregado el extracto de ajo. Las muestras de alimentos fueron expuestas al extracto de la siguiente manera:

##### **Tratamiento para la Ensalada N°1**

1. **Muestra 1.-** Ensalada 1 tratada con 15mL del extracto de ajo ESTÉRIL por 1 minuto.
2. **Muestra 2.-** Ensalada 1 tratada con 15mL del extracto de ajo ESTÉRIL por 2 minutos.
3. **Muestra 3.-** Ensalada 1 tratada con 15mL del extracto de ajo ESTÉRIL por 5 minutos.

##### **Tratamiento para la ensalada N°2**

4. **Muestra 1.-** Ensalada 2 tratada con 15mL del extracto de ajo ESTÉRIL por 1 minuto.
5. **Muestra 2.-** Ensalada 2 tratada con 15mL del extracto de ajo ESTÉRIL por 2 minutos.

6. **Muestra 3.-** Ensalada 2 tratada con 15mL del extracto de ajo ESTÉRIL por 5 minutos.

#### **3.6.4.2 Eliminación del extracto de ajo de las muestras de alimentos**

Como siguiente paso se procedió a eliminar el extracto de ajo de las muestras mediante decantación, posteriormente se agregó 90 mL de agua peptonada estéril al 0.1% a cada una de estas, homogeneizándolas y dejándolas reposar por un minuto, quedando listas para el siguiente paso.

#### **3.6.5 Análisis microbiológico de las muestras de alimentos mediante siembra en placas Petrifilm® y lectura de resultados.**

Como último paso se realizó el análisis microbiológico de las muestras de alimentos para comprobar si existió una disminución de la carga bacteriana inicial de los mismos con respecto a aquellos que fueron puestos en contacto con el extracto. Las muestras fueron sembradas en placas Petrifilm TM, por duplicado, para el análisis de los siguientes parámetros:

- Mesófilos – Aerobios
- Coliformes totales
- *Escherichia coli*
- Enterobacterias
- *Staphylococcus aureus*
- Mohos y Levaduras

##### **3.6.5.1 Siembra de las muestras y lectura de resultados**

Una vez transcurrido el minuto desde que se agregó el agua peptonada a las muestras de alimentos, se tomó 1 mL de cada una de las muestras para ser sembradas en cada una de las placas Petrifilm®, durante 24 horas, siguiendo la técnicas descritas por la casa comercial (**Anexo N°5**). De igual forma la interpretación y lectura de resultados se realizó según las técnicas descritas en el anexo mencionado anteriormente.

### 3.6.5.2 Controles

Como parte importante de los ensayos se realizaron, por duplicado, controles microbiológicos de parámetros clave, a fin de garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos e identificar factores que hayan influido en los resultados. Se llevaron a cabo dos controles:

- **Control microbiológico de los extractos de ajo.**- Tanto para el extracto de ajo estéril, como para el extracto de ajo no estéril, se realizaron análisis microbiológicos para determinar la presencia de microorganismos mesófilos – aerobios, coliformes totales, *Escherichia coli*, enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, además de mohos y levaduras. Para esto se tomó 1 mL de cada uno de los extractos para ser sembrados en placas Petrifilm® para la determinación de los microorganismos descritos anteriormente. De esta manera se comprobó tanto la eficacia del proceso de esterilización del extracto de ajo estéril, así como también se determinó la carga microbiana del extracto de ajo no estéril.
- **Controles para el agua peptonada y agua purificada estériles.**- Se sembraron también en placas Petrifilm® 1mL de agua peptonada al 1% estéril y 1 mL de agua purificada estéril, con la cual se prepararon los extractos acuosos de ajo. De igual forma se analizó la presencia de microorganismos mesófilos – aerobios, coliformes totales, *Escherichia coli*, enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, además de mohos y levaduras.

### 3.7 Análisis estadístico

El método de análisis estadístico escogido para el presente estudio se realizó tomando en cuenta dos factores importantes como son la temperatura y la concentración de los extractos, a diferentes niveles, fue el **Diseño Factorial de dos Factores o Diseño Bifactorial**, para de esta manera observar si los factores o la interacción entre ambos son estadísticamente significativos para poder describir las observaciones mediante el siguiente modelo lineal estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (*)$$

Donde  $\mu$  es el efecto medio general, A es el efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor, B es el efecto  $j$ -ésimo nivel del factor, AB es el efecto de interacción entre el factor A y el factor B y  $\varepsilon_{ijk}$  es el componente del error aleatorio (Durán, J. (2011).

Además,

$$i=1,\dots,a$$

$$j=1,\dots,b$$

$$k=1,\dots,n$$

Donde a y b son los niveles de cada factor y n el número de observaciones. Para el estudio se consideró lo siguiente:

A:= factor concentración del extracto con a=3 niveles de concentración 62.5 mg/dL, 100 mg/dL y 250 mg/dL.

B:= factor temperatura con b=3 niveles 35°C, 50°C y 90°C.

### **3.7.1 Modelo lineal estadístico**

El modelo lineal estadístico, construido en este estudio, tiene como finalidad describir y predecir las observaciones entre las interacciones de los factores concentración y temperatura, en relación con la variable de estudio que son los halos de inhibición. A partir de este modelo se obtiene una ecuación que permite el estudio de los factores y la variable sin necesidad de realizar la parte práctica nuevamente. Para la elaboración del modelo estadístico se consideró lo siguiente (Durán, J. (2011).:

- Fue construido con todos los factores, interacciones y la constante.
- Luego, se verificó la significancia estadística de cada uno de ellos (en el caso de no ser significativos, fueron retirados del modelo).
- Una vez que se comprueba la significancia de todos, se procede a realizar las respectivas pruebas de los residuos, es decir, si los residuos son independientes y tienen una distribución normal con media 0 y varianza constante.
- Finalmente, comprobados los 3 anteriores se puede dar ecuación del modelo que ajusta a los datos.

Estos procedimientos se realizaron con todas las cepas bacterianas.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ENSAYOS PREVIOS

##### 4.1.1 Identificación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos fueron identificadas mediante microscopía, pruebas bioquímicas y observación de colonias a nivel macroscópico. Las pruebas de identificación de las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos se detallan en el **Anexo N°2**. Mediante la identificación se comprobó que los cultivos de las cepas eran puros, por tanto se procedió a realizar los ensayos conforme se describe la metodología.

#### 4.2 RESULTADOS DE LA PRIMERA PARTE DEL ESTUDIO: PRUEBAS DE SENSIBILIDAD POR EL MÉTODO DE DISFUSIÓN EN AGAR BAUER-KIRBY

A continuación se detallan los resultados obtenidos en los antibiogramas donde las cepas bacterianas, ya mencionadas, fueron enfrentadas a los extractos de ajo y culantro, así como también a los antibióticos gentamicina y ampicilina. Los diámetros de los halos de inhibición de los antibiogramas fueron registrados para posteriormente realizar los análisis estadísticos pertinentes.

##### 4.2.1 *Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de Staphylococcus aureus Meticilino Resistente frente al extracto de ajo*

En la **tabla N°3** se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad correspondientes a la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, la cual fue enfrentada a los extractos de ajo y culantro.

Tabla N°3

Halos de inhibición correspondientes a la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino  
Resistente frente al extracto de ajo

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	21	20	16	23	18	16	21	18	16	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	22	18	17	22	20	17	19	16	14	6	6	6

- A continuación se observa el resultado de cuatro de los antibiogramas realizados con esta cepa bacteriana. (Figuras N°29, N°30, N°31 y N°32).

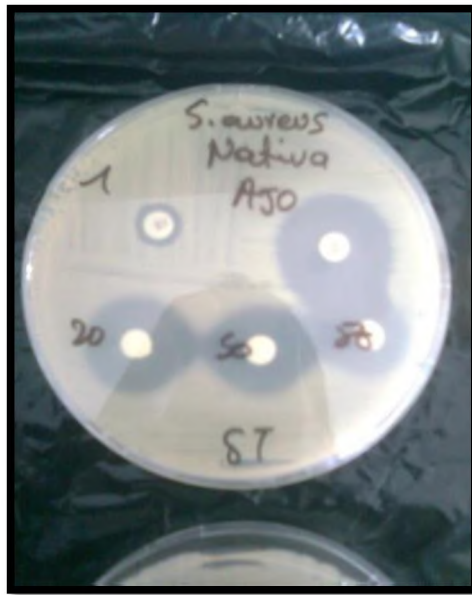


Figura N°29

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* MRSA enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico

Fuente: Yaguana C.



Figura N°30

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* MRSA enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C

Fuente: Yaguana C.

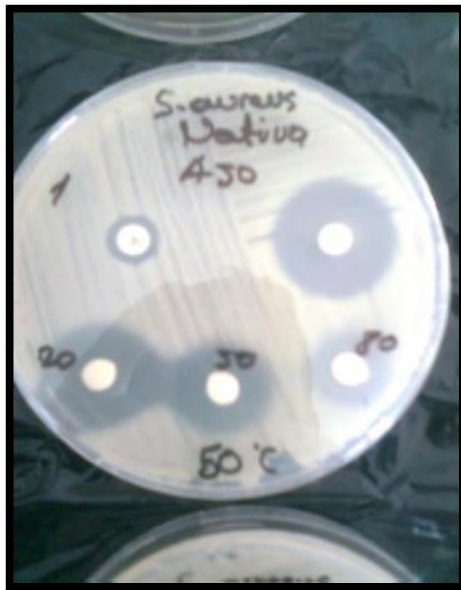


Figura N°31

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* MRSA enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C

Fuente: Yaguana C.

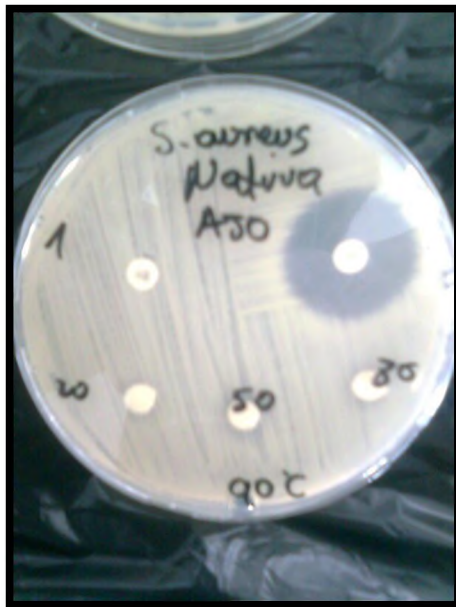


Figura N°32

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* MRSA enfrentada al extracto de ajo sometido a 90°C

Fuente: Yaguana C.

#### 4.2.1.1 Análisis ANOVA para la cepa *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente frente al extracto de ajo

Con los datos de la **Tabla N°3** se realizó la configuración óptima de los factores para realizar el análisis ANOVA, los datos se presentan en la **Tabla N°4**.

**Tabla N°4.**

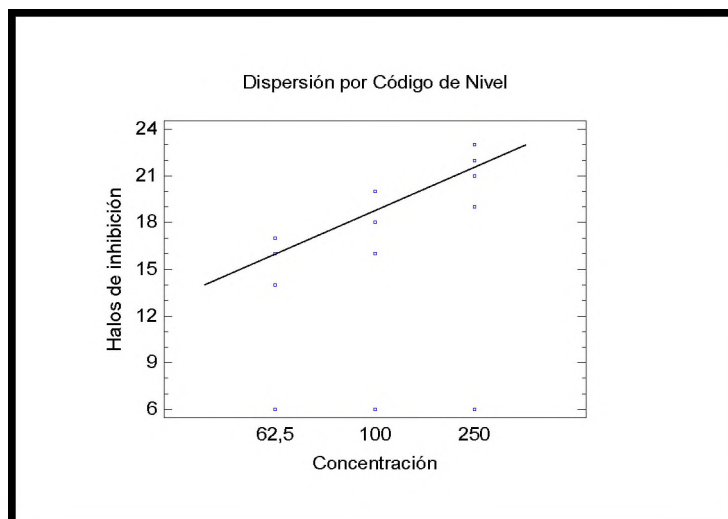
**Configuración óptima de los factores para *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo**

Concentración (mg/mL)	Temperatura (°C)					
	35°		50°		90°	
62,5	16	17	16	14	6	6
100	18	20	18	16	6	6
250	23	22	21	19	6	6

Gráficamente se puede observar la dispersión de los datos en cada nivel de ambos factores (**gráfico N°1 y N°2**).

**Gráfico N°1**

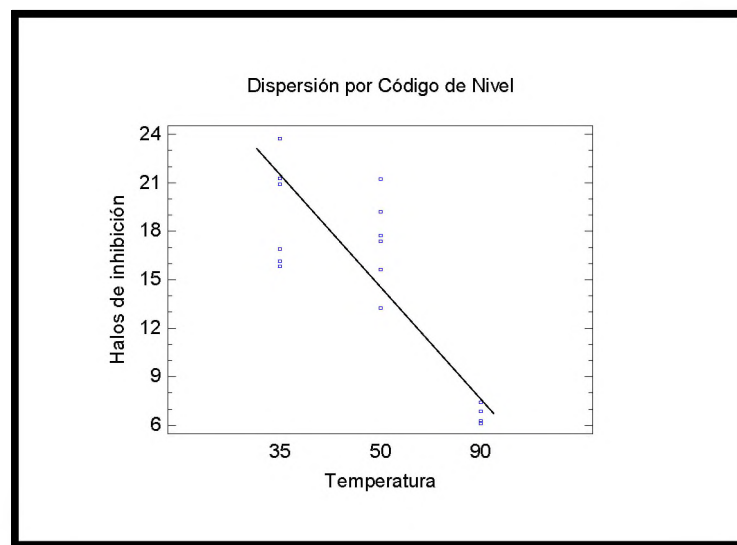
**Dispersión de los datos (halos de inhibición) en relación al factor concentración para la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (MRSA) frente al extracto de ajo**



- Observando el gráfico se puede corroborar que existe una correlación lineal positiva entre la variable halos de inhibición y el factor concentración. Es decir que, mientras sea mayor la concentración del extracto de ajo, se obtendrán halos de inhibición mucho mayores. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Zakaria Y. Al-Astal, 2003, donde se observó la misma tendencia.

### Gráfico N°2.

Dispersión de los datos en relación al factor temperatura para la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (MRSA), frente al extracto de ajo



- Observando el gráfico se puede corroborar que existe una correlación lineal negativa entre la variable halos de inhibición y el factor temperatura. Es decir que, cuando se aumenta la temperatura del extracto de ajo, su actividad antibiótica disminuye, obteniendo así halos de inhibición menores. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Zakaria Y. Al-Astal, 2003, donde se observó además que el extracto de ajo pierde por completo su actividad antibiótica al ser sometido a una temperatura de 100°C por 10 minutos.

Utilizando la tabla N°4 se realizó el ANOVA para demostrar si existe interacción entre los factores concentración y temperatura en relación a la variable halos de inhibición, dicho análisis se muestra en la **tabla N°5**.

Tabla N°5

**Análisis de Varianza ANOVA para la variable halos de inhibición de la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA)**

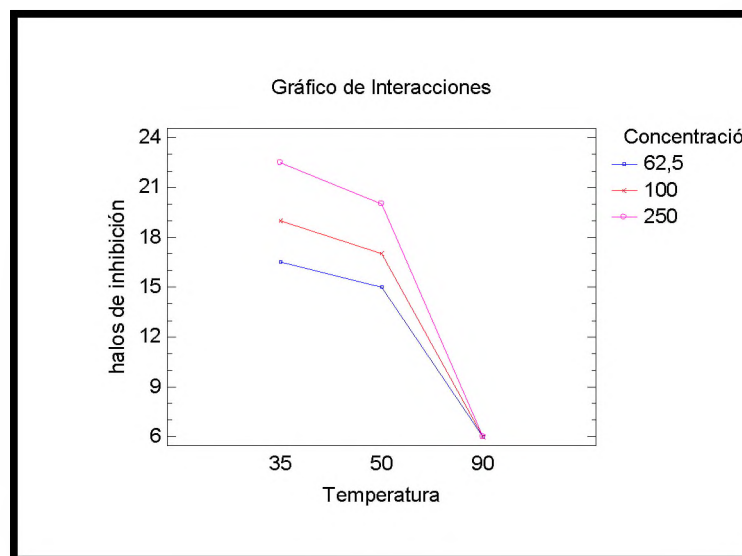
Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	620,444	2	310,222	310,22	0,0000
B:Concentración	40,7778	2	20,3889	20,39	0,0005
INTERACCIONES					
AB	20,8889	4	5,22222	5,22	0,0187
RESIDUOS	9,0	9	1,0		
TOTAL (CORREGIDO)	691,111	17			

- Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, los factores concentración y temperatura, y la relación entre ambos, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable halos de inhibición, con un 95,0% de nivel de confianza.

En referencia a la tabla anterior se construyó un gráfico representando la concentración y la temperatura para poder observar la influencia de estos factores sobre los halos de inhibición. (**Gráfico N°3**).

### Gráfico N°3

Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para de la cepa de *Staphylococcus aureus* (MRSA) frente al extracto de ajo



- En el gráfico se puede observar que, independientemente de la concentración del extracto de ajo, la máxima actividad antibiótica del mismo se registra cuando este es sometido a una temperatura de 35°C por 10 minutos. Este resultado concuerda con el estudio realizado por Zakaria Y. Al-Astal, 2003 donde se demuestra que la eficacia del efecto antibiótico del extracto de ajo se incrementa cuando este es sometido a temperaturas de entre 35°C y 50°C por 10 minutos. Como se menciona en dicho estudio, la explicación a este fenómeno se debe al exceso de actividad de la enzima alinasa, la cual es responsable del cambio del compuesto alina a alicina, lo cual ocurre a dichas temperaturas.
- Se observa además que, a una temperatura 90°C, el extracto no muestra actividad antibiótica en ninguna de las concentraciones. Esto se debe a que a temperaturas de entre 70°C y 100°C, el efecto antibiótico del extracto desaparece ya que, tanto el compuesto alina como la enzima alinasa, cambian su composición química o son destruidas a estas temperaturas (Zakaria Y. Al-Astal, 2003).
- Puesto que los factores y la interacción resultaron significativas para el modelo, se realizó una regresión múltiple incluyendo a la variable halos de inhibición, con los demás factores explicativos para posteriormente realizar un nuevo ANOVA (tabla N°6).

Tabla N°6

**Regresión Múltiple - Halos de inhibición de la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA) y ANOVA**

- Variable dependiente: halos de inhibición (mm)
- Variables independientes:
  - Temperatura (°C)
  - Concentración (mg/ml)
  - Temperatura\*Concentración

		Error	Estadístico	
Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	21,926	1,59163	13,7758	0,0000
Temperatura	-0,174718	0,0253514	-6,89182	0,0000
Concentración	0,0503976	0,0099733	5,05326	0,0002
Temperatura*Concentración	-0,000553756	0,000158854	-3,48593	0,0036

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	668,622	3	222,874	138,75	0,0000
Residuo	22,4888	14	1,60635		
Total (Corr.)	691,111	17			

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 96,0487%.

- Esto nos indica que el modelo ajustado explica el 96.0487% de la variabilidad de los halos de inhibición. Finalmente, se creó una ecuación en base al modelo ajustado; dicha ecuación permite predecir el comportamiento de la variable halos de inhibición en función de los factores Temperatura y Concentración. De esta manera, si queremos obtener un determinado diámetro de halo de inhibición para esta cepa, basta con reemplazar los datos de la variable y los factores con la siguiente ecuación:

$$\text{Halos de inhibición} = 21,926 - 0,174718 \cdot \text{Temperatura} + 0,0503976 \cdot \text{Concentración} - 0,000553756 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Concentración}$$

A continuación se probó la idoneidad del modelo, para esto se comprobó el cumplimiento de las siguientes condiciones que deben tener los residuos:

- Los residuos deben seguir una distribución normal con media cero y varianza constante.
- Los residuos deben ser independientes, es decir, los residuos no deben seguir ningún patrón en la gráfica de dispersión.

Se realizó una prueba de normalidad para los residuos utilizando la **tabla N° 7**

**Tabla N°7**  
**Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS para el modelo**  
***Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA)**

Normal		
Media = 9,44444E-7		
desviación	estándar	=
1,15016		

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,914806	0,106786

- Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que RESIDUOS proviene de una distribución normal con 95% de confianza. En efecto los residuos cumplen con la condición de seguir una distribución normal con media cero.

Para probar si la varianza es constante, se realizó la prueba de Breusch-Pagan

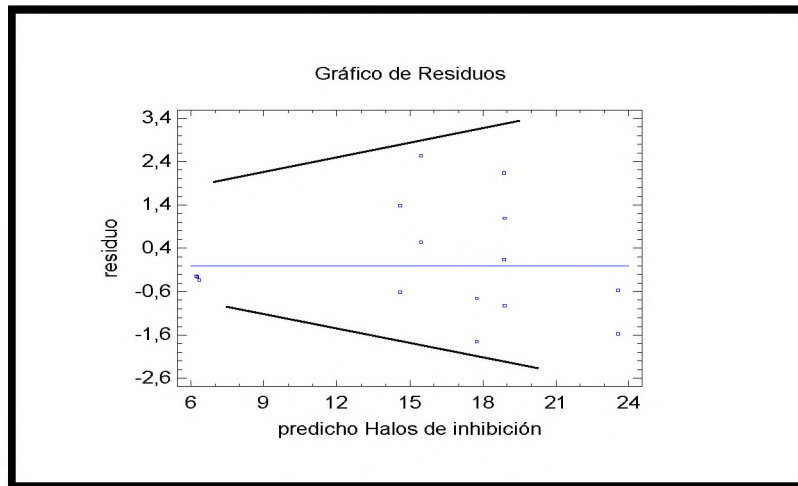
#### Breusch-Pagan test

**Halos de inhibición ~ Temperatura + Concentracion + Temperatura.Concentracion**  
**BP = 2.6768, df = 1, valor-p = 0.1018**

- Como el valor-p es mayor que 0.05 entonces los residuos no tienen varianza constante, lo cual podemos observar en el **gráfico N°4**.

**Gráfico N° 4**

**Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo**



- Por tanto se observa que no se cumple la condición del modelo, esto se debe a que hay una alta correlación de las variables, es así que se observa el fenómeno **multicolinealidad** entre las mismas, en concreto la variable de interacción; esto se debe a que esta depende de las variables anteriores. Esto se corroboró mediante una matriz de correlación, mostrada en la **tabla N°8**:

**Tabla N°8**

**Matriz de Correlación para las estimaciones de los coeficientes**

	CONSTANTE	Temperatura	Concentración	TempConc
CONSTANTE	1,0000	-0,9291	-0,8616	0,8005
Temperatura	-0,9291	1,0000	0,8005	-0,8616
Concentración	-0,8616	0,8005	1,0000	-0,9291
TempConc	0,8005	-0,8616	-0,9291	1,0000

- Ahora se probó quitar la variable de interacción en el modelo mediante un nuevo análisis de regresión, mostrado en la **tabla N°9**.

**Tabla N°9**

**Análisis de regresión Múltiple - Halos de inhibición sin la variable de interacción  
Staphylococcus aureus Meticilino resistente (MRSA) y ANOVA**

- Variable dependiente: Halos de inhibición (mm)
- Variables independientes:
  - Temperatura (°C)
  - Concentración (mg/ml)

		Error	Estadístico	
Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	26,3676	1,25948	20,9354	0,0000
Temperatura	-0,250859	0,0169918	-14,7636	0,0000
Concentración	0,0180952	0,00486915	3,7163	0,0021

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	649,102	2	324,551	115,89	0,0000
Residuo	42,0087	15	2,80058		
Total (Corr.)	691,111	17			

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 93,1111 por ciento

- Ahora se observa que se ha bajado un 3% en la explicación de la variabilidad de los halos de inhibición pero se presume que se elimina la heterocedasticidad (varianza no constante) para que el modelo ajustado pueda cumplir con el análisis de residuos. Se realizó entonces una nueva prueba de normalidad (tabla N°10) y se obtuvieron nuevos datos para las distribuciones.

**Tabla N°10**

**Pruebas de Normalidad para RESIDUOS**

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,933455	0,227787

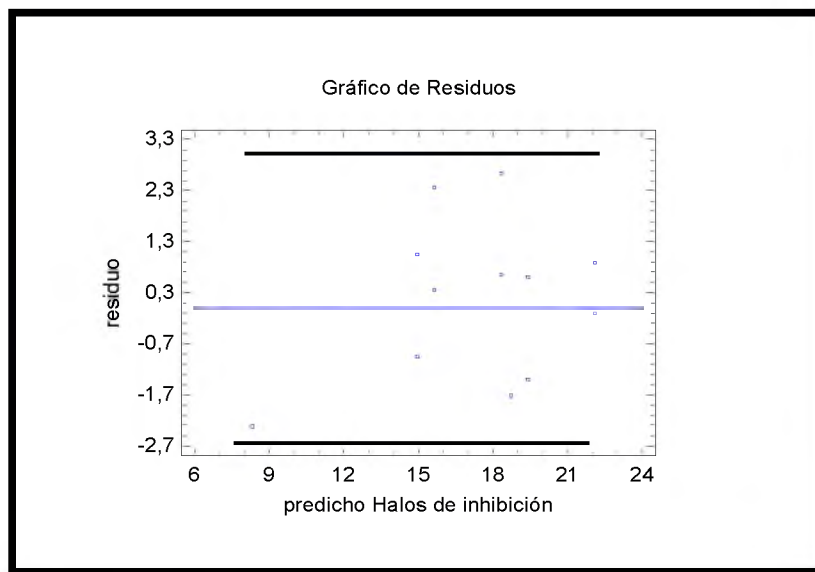
**Distribuciones Ajustadas**

Normal
media = 3,33333E-7
desviación estándar = 1,57197

- Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor o igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que RESIDUOS proviene de una distribución normal con 95% de confianza, como se muestra en el **gráfico N°5**.

**Gráfico N°5**

**Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo, para el modelo ajustado**



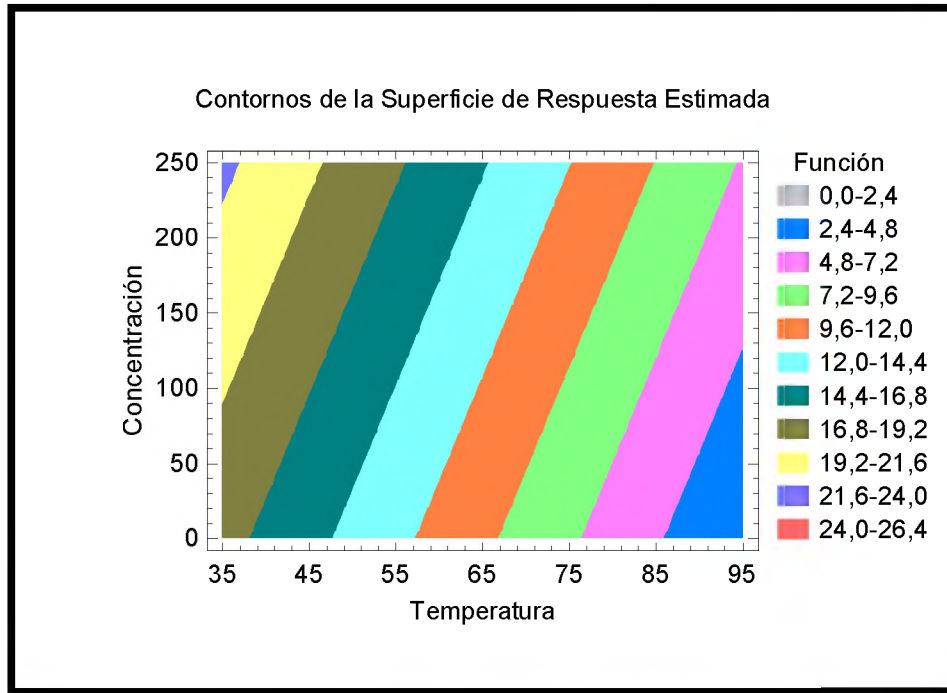
Por tanto, la ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Halos de inhibición} = 26,3676 - 0,250859 \cdot \text{Temperatura} + 0,0180952 \cdot \text{Concentración}$$

- Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables (Temperatura-Concentración) con un nivel de confianza del 95,0%. Mediante un gráfico de contorno de superficie de la respuesta estimada se puede observar que, si queremos obtener mayores diámetros de halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad, se deben usar concentraciones del extracto de ajo superiores a 250 mg/dL y sometiendo al mismo a una temperatura de 35°C (**Gráfico N°6**).

Gráfico N°6

Gráfico de contorno de superficies para la respuesta estimada para la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA) frente al extracto de ajo



- Mediante el gráfico de superficie se pueden buscar combinaciones óptimas entre dos conjuntos de datos. Los colores y las tramas indican áreas que contienen el mismo rango de valores. Observando el gráfico se puede ver que si el extracto es enfrentado a la cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA en una concentración de 250 mg/mL y se lo somete a 35°C por 10 minutos, se espera obtener diámetros de halos de inhibición entre 21,6 mm y 24 mm.

#### 4.2.2 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente frente al extracto de culantro

En la tabla N°11 se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la bacteria de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente frente al extracto de culantro. Se observa que en todos los ensayos no se obtuvieron halos de inhibición en ninguna de las concentraciones del extracto.

Tabla N°11

**Halos de inhibición correspondientes a la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente frente al extracto de culantro**

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

- A diferencia del estudio realizado por Filomena Silva, Susana Ferreira, João A. Queiroz & Fernanda C. Domingues, 2011, donde se observó que los aceites esenciales de culantro mostraban una actividad antibiótica frente a cepas de *Staphylococcus aureus.*, bajo las condiciones en las que se realizó este estudio, el extracto acuoso de culantro no presenta actividad antibiótica frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA. Se presume entonces que los compuestos responsables de la actividad antibiótica, encontrados en los aceites esenciales de culantro, no se encuentran en los extractos acuosos, posiblemente por la diferente metodología que se utiliza para la obtención de dichos aceites. A continuación se observa el resultado de uno de los antibiogramas realizados con esta cepa bacteriana (**Figura N°33**).



**Figura N°33**

**Antibiograma para la cepa de *S. aureus* MRSA enfrentada al extracto de culantro**

Fuente: Yaguana C.

**4.2.3 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de ajo**

En la **tabla N° 12** se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto acuoso de ajo.

**Tabla N° 12**

**Halos de inhibición correspondientes a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de ajo**

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	23	20	16	25	21	19	24	20	18	6	8	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	24	20	15	24	21	21	22	18	16	6	6	6



Figura N°34

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico

Fuente: Yaguana C.



Figura N°35

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C

Fuente: Yaguana C.



Figura N°36

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C

Fuente: Yaguana C.



Figura N° 37

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 enfrentada al extracto de ajo sometido a 90°C

Fuente: Yaguana C.

#### 4.2.3.1 Análisis ANOVA para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de ajo

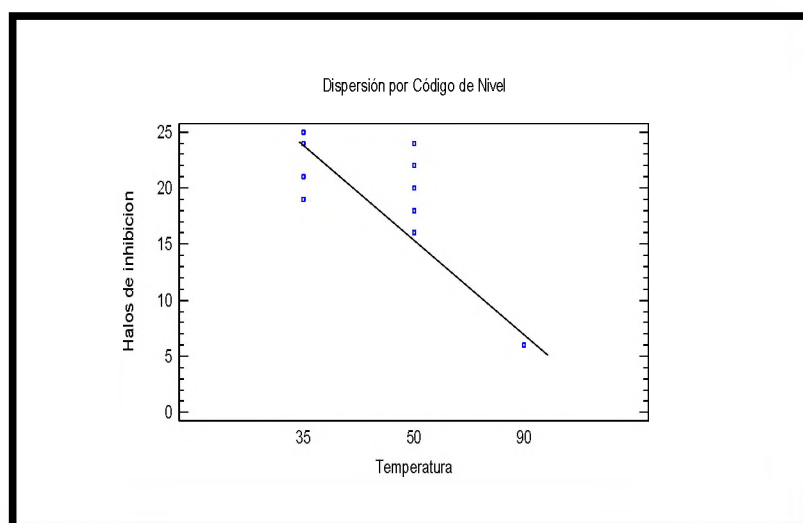
De los datos obtenidos se construyó una tabla para ordenar los datos y poder realizar los análisis estadísticos (tabla N°13).

**Tabla N° 13**  
**Configuración óptima de los factores para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de ajo**

Concentración (mg/ml)	Temperatura (°C)					
	35°		50°		90°	
62,5	19	21	18	16	6	6
100	21	21	20	18	8	6
250	25	24	24	22	6	6

Gráficamente se puede observar la dispersión de los datos en cada nivel de ambos factores, tanto para el factor concentración así como para el factor temperatura (Gráficos N°7 y N°8).

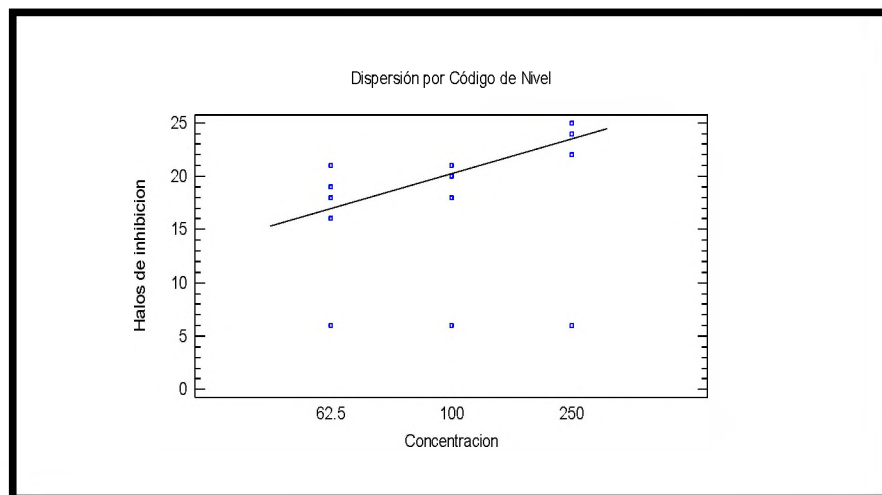
**Gráfico N°7**  
**Dispersión de los datos en cada nivel para el factor temperatura para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de ajo**



- Observando el gráfico se puede corroborar que existe una correlación lineal negativa entre la variable halos de inhibición y el factor temperatura. Es decir que, cuando se aumenta la temperatura del extracto de ajo, su actividad antibiótica disminuye, obteniendo así halos de inhibición menores. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Zakaria Y. Al-Astal, 2003, donde se observó además que el extracto de ajo pierde por completo su actividad antibiótica al ser sometido a una temperatura de 100°C por 10 minutos.

**Gráfico N°8**

**Dispersión de los datos en cada nivel para el factor concentración para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de ajo**



- Observando el gráfico se puede corroborar que existe una correlación lineal positiva entre la variable halos de inhibición y el factor concentración. Es decir que, mientras sea mayor la concentración del extracto de ajo, se obtendrán halos de inhibición mucho mayores. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Zakaria Y. Al-Astal, 2003, donde se observó la misma tendencia.

Se realizó entonces el análisis de varianza de los datos (**tabla N°14**):

Tabla N°14

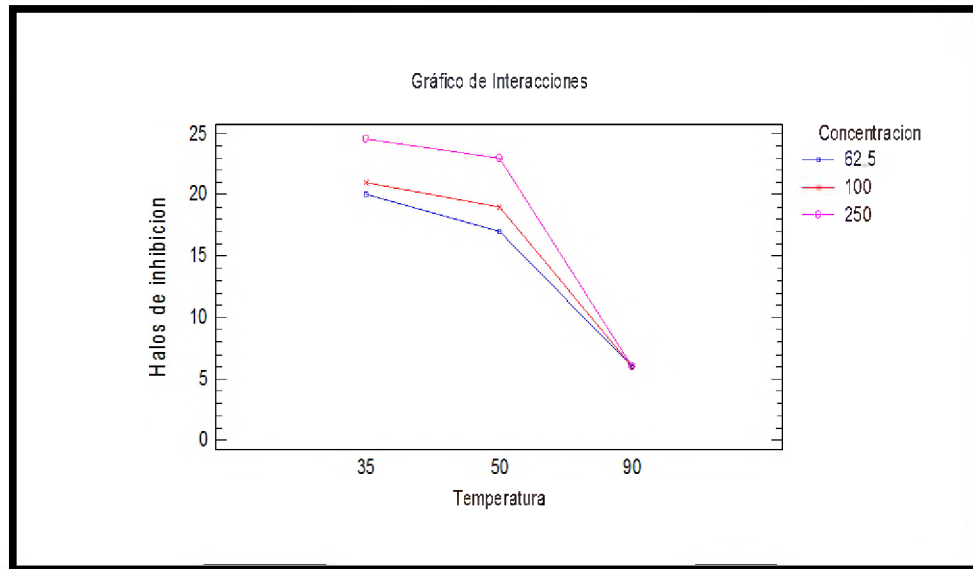
**Análisis de Varianza para Halos de inhibición correspondientes a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A:Temperatura</b>	884.333	2	442.167	468.18	<b>0.0000</b>
<b>B:Concentracion</b>	39.0	2	19.5	20.65	<b>0.0004</b>
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	20.6667	4	5.16667	5.47	<b>0.0163</b>
<b>RESIDUOS</b>	8.5	9	0.944444		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	952.5	17			

- Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza. En el **gráfico N°9** se representa este fenómeno, observándose que se obtienen mayores diámetros de halos de inhibición con la máxima concentración y con el extracto sometido a una temperatura de 35°C. También se observa que la actividad antibiótica del extracto disminuye conforme este es sometido a temperaturas superiores a 35°C.

### Gráfico N°9

Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de ajo



- En el gráfico se puede observar que la máxima actividad antibiótica del extracto se obtiene usando la concentración más alta del extracto sometido a una temperatura de 35°C. Mientras que a los 90°C el extracto no muestra actividad antibiótica en ninguna de las concentraciones.
- Puesto que los factores y la interacción resultaron significativas para el modelo, se realizó una regresión múltiple incluyendo a la variable halos de inhibición, con los demás factores explicativos (**tabla N°15**).

**Tabla N° 15**

**Regresión Múltiple - Halos de inhibición correspondientes a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ANOVA**

- Variable dependiente: Halos de inhibición (mm)
- Variables independientes:
  - Temperatura (°C)
  - Concentración (mg/mL)

		Error	Estadístico	
Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
<b>CONSTANTE</b>	30.7851	1.32952	23.1551	0.0000
<b>Temperatura</b>	-0.298969	0.0179367	-16.668	0.0000
<b>Concentration</b>	0.0180952	0.00513994	3.52052	0.0031

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>Modelo</b>	905.689	2	452.844	145.11	0.0000
<b>Residuo</b>	46.8111	15	3.12074		
<b>Total (Corr.)</b>	952.5	17			

R-cuadrado (ajustado para G.I.) = 94.4302 por ciento

- Esto nos indica que el modelo ajustado explica el 94.4302 % de la variabilidad de los halos de inhibición. Posteriormente se realizó un análisis de residuos para comprobar si se verifican la hipótesis del modelo (**tabla 16**)

**Tabla N°16**

**Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS (1) para el modelo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

<b>Normal</b>
media = -6.11111E-7
desviación estándar = 1.6594

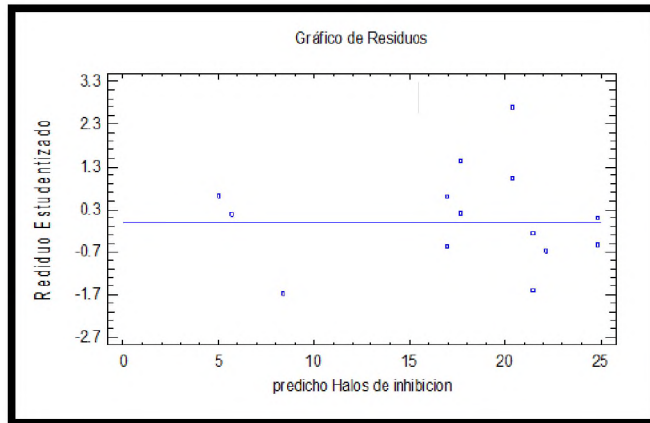
**Pruebas de Normalidad para RESIDUOS**

Prueba	Estadístico	Valor-P
<b>Estadístico W de Shapiro-Wilk</b>	0.960214	0.598032

En el **gráfico N° 10** se observa que los datos siguen una distribución normal.

**Gráfico N° 10**

**Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



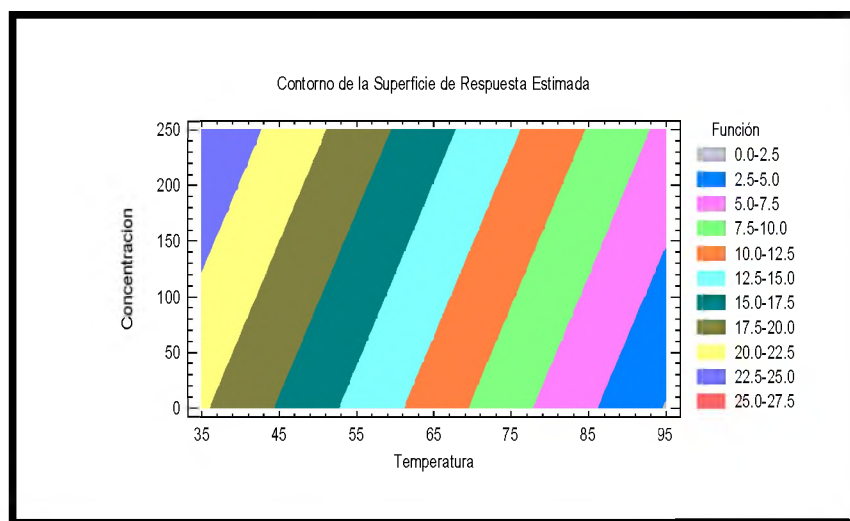
Entonces la ecuación para el modelo ajustado es:

$$\text{Halos de inhibicion} = 30.7851 - 0.298969 * \text{Temperatura} + 0.0180952 * \text{Concentración}$$

- Con este modelo se puede entonces predecir el comportamiento de la variable halos de inhibición, en función de los factores temperatura y concentración. Dicha predicción se puede ilustrar mediante un gráfico de superficie para la respuesta estimada (**Gráfico N°11**)

**Gráfico N°11**

**Gráfico de contorno de superficies para la respuesta estimada para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



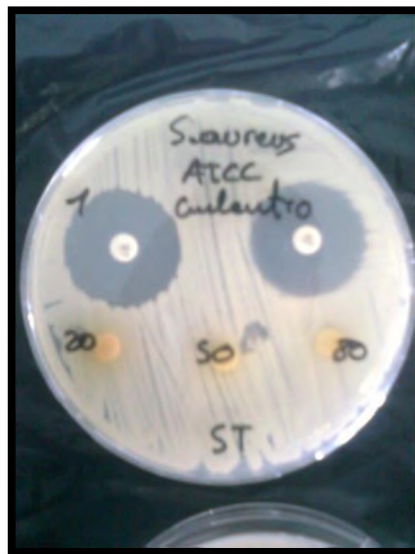
- Mediante el gráfico de superficie se pueden buscar combinaciones óptimas entre dos conjuntos de datos. Los colores y las tramas indican áreas que contienen el mismo rango de valores. Observando el gráfico se puede ver que si el extracto de ajo es enfrentado a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en una concentración de 250 mg/mL y se lo somete a 35°C por 10 minutos, se espera obtener diámetros de halos de inhibición entre 22,5 mm y 25.0 mm.

#### 4.2.4 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de culantro

En la figura N°38 se observa uno de los antibiogramas realizados para esta cepa bacteriana puesta en contacto con el extracto de ajo.

Figura N°38

Antibiograma para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 enfrentada al extracto culantro



Fuente: Yaguana C.

En la tabla N°17 se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la bacteria de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de culantro.

Tabla N°17

Halos de inhibición para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto de culantro

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

- Al igual que ocurrió con la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente bajo las condiciones en las que se realizó este estudio, el extracto acuoso de culantro no presenta actividad antibiótica frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por tanto la explicación de este fenómeno es la misma mencionada anteriormente. Se presume entonces que los compuestos responsables de la actividad antibiótica, encontrados en los aceites esenciales de culantro, no se encuentran en los extractos acuosos, posiblemente por la diferente metodología que se utiliza para la obtención de dichos aceites.

#### 4.2.5 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Escherichia coli* Productora de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) frente al extracto de ajo

En las figuras N°39, N°40, N°41 y N°42 se muestran cuatro de los antibiogramas realizados a esta cepa frente a los extractos de ajo en los diferentes tratamientos térmicos.



Figura N°39

Antibiograma para la cepa de *E. coli* BLEE enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico

Fuente: Yaguana C.

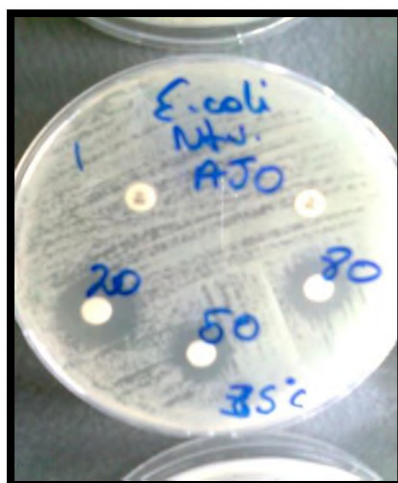


Figura N°40

Antibiograma para la cepa de *E. coli* BLEE enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C

Fuente: Yaguana C.



Figura N°41

Antibiograma para la cepa de *E. coli* BLEE enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C

Fuente: Yaguana C.



Figura N°42

Antibiograma para la cepa de *E. coli* BLEE enfrentada al extracto de ajo sometido a 90°C

Fuente: Yaguana C.

#### 4.2.5.1 Análisis ANOVA para la cepa *Escherichia coli* Productora de Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE) frente al extracto de ajo

En la **tabla N°18** se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la bacteria de *Escherichia coli* Productora de Betalactamasas de Espectro Extendido frente al extracto de ajo.

**Tabla N°18**

**Halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad de la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de ajo**

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	12	10	6	16	13	12	12	11	11	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	11	9	6	12	10	7	11	11	7	10	9	9

- Posteriormente se creó una configuración óptima de los factores que influyen en el modelo (**tabla N°19**), que sirve para determinar la significancia estadística de los efectos.

Tabla N°19

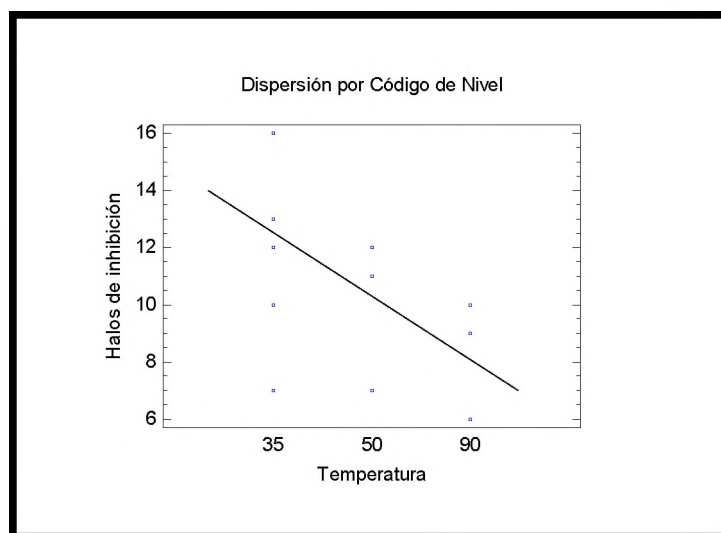
Configuración óptima de los factores para la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de ajo

Concentración (mg/ml)	Temperatura (°C)					
	35°		50°		90°	
62,5	12	7	11	7	6	9
100	13	10	11	11	6	9
250	16	12	12	11	6	10

Gráficamente podemos observar la dispersión de los datos en cada nivel de ambos factores (Gráficos N°12 y N°13):

Gráfico N°12

Dispersión de los datos en cada nivel para el factor temperatura para la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de ajo

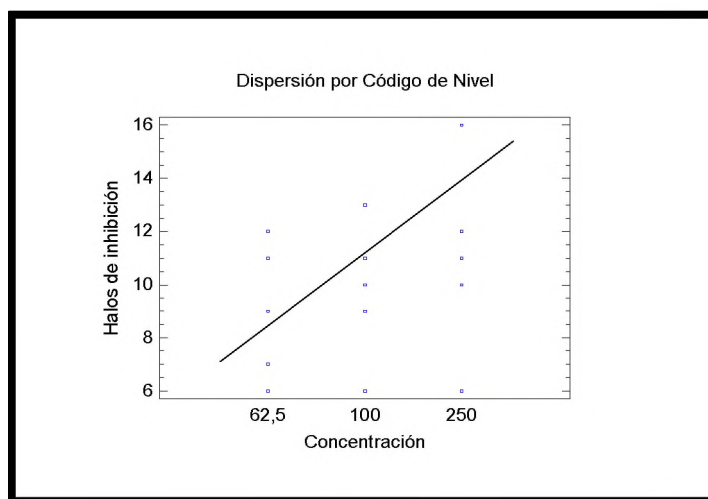


- Observando el gráfico se puede corroborar que existe una correlación lineal negativa entre la variable halos de inhibición y el factor temperatura. Es decir que, cuando se aumenta la temperatura del extracto de ajo, su actividad antibiótica disminuye, obteniendo así halos de inhibición menores. Estos resultados

conducen con el estudio realizado por Zakaria Y. Al-Astal, 2003, donde se observó la misma tendencia.

**Gráfico N°13**

**Dispersión de los datos en cada nivel para el factor temperatura para la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de ajo**



- Observando el gráfico se puede corroborar que existe una correlación lineal positiva entre la variable halos de inhibición y el factor concentración. Es decir que, mientras sea mayor la concentración del extracto de ajo, se obtendrán halos de inhibición mucho mayores. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Zakaria Y. Al-Astal, 2003, donde se observó la misma tendencia.

Se realizó entonces el análisis de varianza de los datos (tabla N°20).

**Tabla N°20**

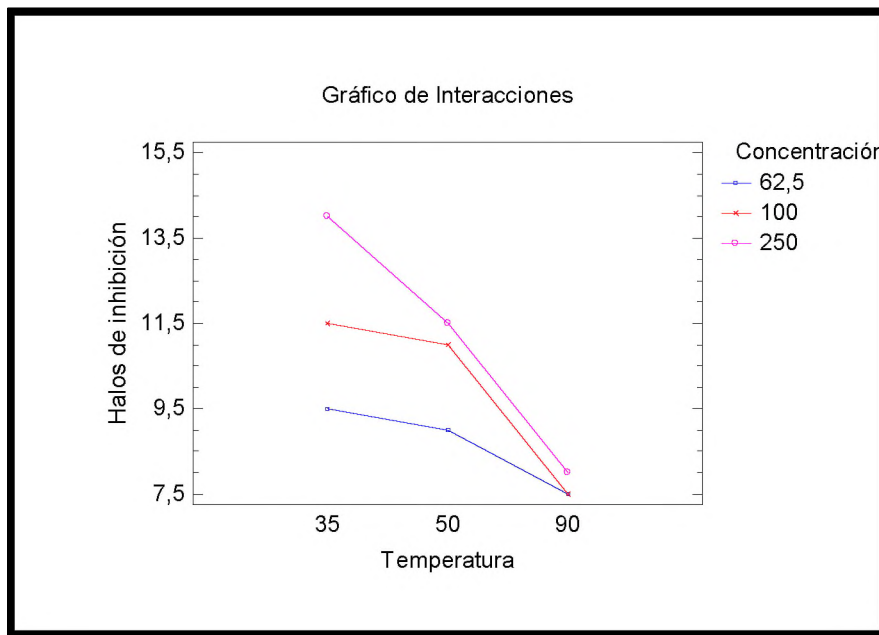
**Análisis de Varianza para Halos de inhibición para la cepa *Escherichia coli* BLEE**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Temperatura	50,7778	2	25,3889	4,52	0,0437
B: Concentración	18,7778	2	9,38889	1,67	0,2411
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	8,88889	4	2,22222	0,40	0,8068
RESIDUOS	50,5	9	5,61111		
TOTAL (CORREGIDO)	128,944	17			

- Puesto que un valor-P es menor que 0,05, el factor temperatura tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable Halos de inhibición con un 95,0% de nivel de confianza. Esto se puede ilustrar mediante el **gráfico N° 14**.

**Gráfico N°14**

**Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para de la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de ajo**



- En el caso de esta cepa bacteriana el factor concentración, y la interacción entre este y el factor temperatura, no son estadísticamente significativos para ajustar un modelo. No es de extrañarse si los factores no resultan significativos, o no cumplen con la prueba de los residuos, la explicación a esto es que los datos no sirven para ajustar el modelo estadístico ya sea por falta de datos, que es lo más seguro, o por otras circunstancias.
- Se realizó entonces un análisis de regresión múltiple con cada uno de los factores y con la interacción entre los mismos (**tabla N°21**)

**Tabla N°21**

**Regresión Múltiple (1) - Halos de inhibición para la cepa Escherichia coli BLEE y ANOVA**

- Variable dependiente: Halos de inhibición (mm)
- Variables independientes:
  - Concentración (mg/ml)
  - Temperatura (°C)
  - Temperatura\*Concentración

Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Valor-P
		Estándar	T	
CONSTANTE	10,029	2,50278	4,00713	0,0013
Concentración	0,0300736	0,0156826	1,91764	0,0758
Temperatura	-0,029136	0,0398642	-0,730881	0,4769
Temperatura*Concentración	-0,000314188	0,000249792	-1,25779	0,2290

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	73,3377	3	24,4459	6,15	0,0069
Residuo	55,6068	14	3,97191		
Total (Corr.)	128,944	17			

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 47,6344 por ciento

- Luego de hacer el análisis notamos que quitando la constante el modelo mejora como se muestra en la **tabla N°22**.

**Tabla N°22**

**Regresión Múltiple (2) - Halos de inhibición para la cepa *Escherichia coli* BLEE y ANOVA**

- Variable dependiente: Halos de inhibición (mm)
- Variables independientes:
  - Concentración (mg/ml)
  - Temperatura (°C)
  - Temperatura\*Concentración

		Error	Estadístico	
Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
Concentración	0,0842177	0,0112688	7,47353	0,0000
Temperatura	0,119284	0,0208651	5,71693	0,0000
Temperatura*Concentración	-0,00111547	0,000211909	-5,26393	0,0001

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1789,62	3	596,539	74,95	0,0000
Residuo	119,384	15	7,95893		
Total	1909,0	18			

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 92,9124 %

Posteriormente se probó la normalidad de los residuos mediante pruebas de normalidad (tabla N°23)

**Tabla N° 23**

**Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS para el modelo *Escherichia coli* BLEE**

Normal
media = 3,33333E-7 = 0
desviación estándar = 1,86908

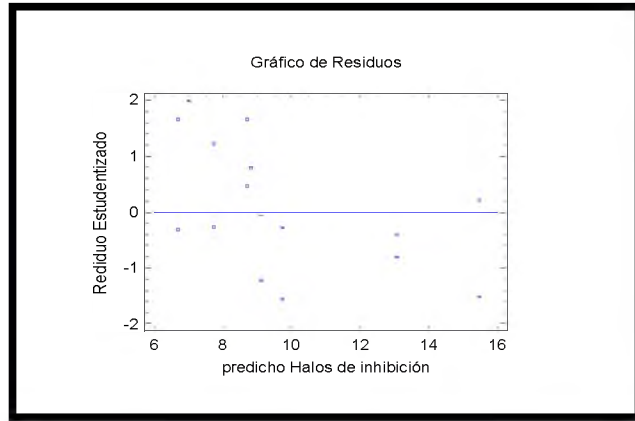
**Pruebas de Normalidad para RESIDUOS**

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,971079	0,798869

- Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, acepta la idea de que RESIDUOS proviene de una distribución normal con 95% de confianza como se puede evidenciar en el **gráfico N°15**.

**Gráfico N°15**

**Gráfico de residuos y predicho de halos de inhibición para la cepa de *Escherichia coli* BLEE**



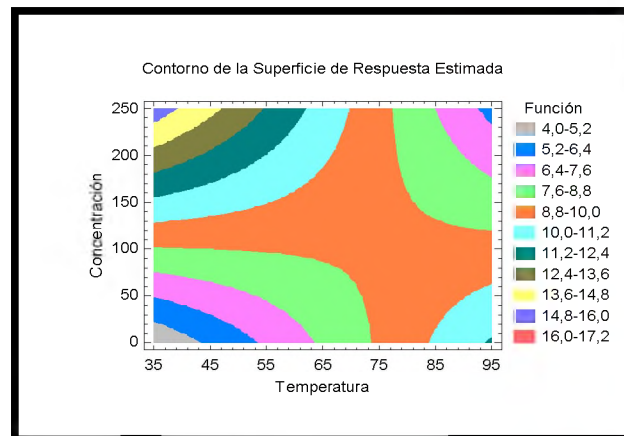
- Como se puede observar en la gráfica los residuos tienen una variabilidad constante e independiente por tanto cumple las condiciones, entonces se establece el modelo ajustado:

$$\text{Halos de inhibición} = 0,0842177 \cdot \text{Concentración} + 0,119284 \cdot \text{Temperatura} - 0,00111547 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Concentración}$$

Las predicciones de las respuestas estimadas se representan en el **gráfico N°16**.

**Gráfico N°16**

**Gráfico de contorno de superficies de la respuesta estimada para la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de ajo**



- Como se observa en el gráfico, se obtiene un rango máximo de halos de inhibición de entre 14,8 mm a 16,0 mm, usando la máxima concentración del extracto de ajo (250 mg/mL) sometido a una temperatura de 35°C por 10 minutos.

#### **4.2.6 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de culantro**

En la figura N°43 se observa uno de los antibiogramas realizados con esta cepa bacteriana enfrentada al extracto de culantro.



**Figura N°43**

**Antibiograma para la cepa de *E. coli* BLEE enfrentada al extracto de culantro**

**Fuente:** Yaguana C.

En la **tabla N°24** se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la bacteria de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de culantro.

Tabla N°24

Halos de inhibición de la cepa de *Escherichia coli* BLEE frente al extracto de culantro

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

- Se observa que en todos los ensayos no se obtuvieron halos de inhibición, por tanto se concluye que el extracto acuoso de culantro no presenta actividad antibiótica frente a la cepa bacteriana y por tanto no se requiere análisis estadístico de los datos.

#### **4.2.7 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de ajo**

En las figuras N°44, N°45, N°46 y N°47 se observan cuatro de los antibiogramas realizados para esta cepa bacteriana enfrentada al extracto de ajo en sus diferentes tratamientos térmicos.

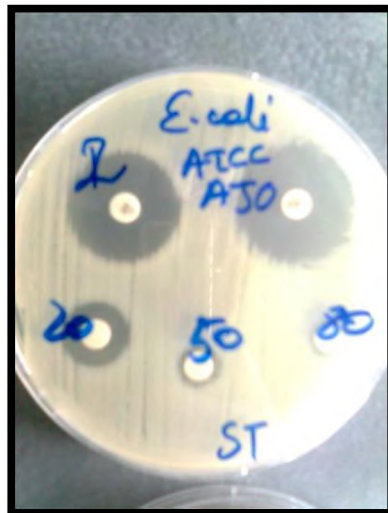


Figura N°44

Antibiograma para la cepa de *E. coli* ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sin tratamiento térmico

Fuente: Yaguana C.

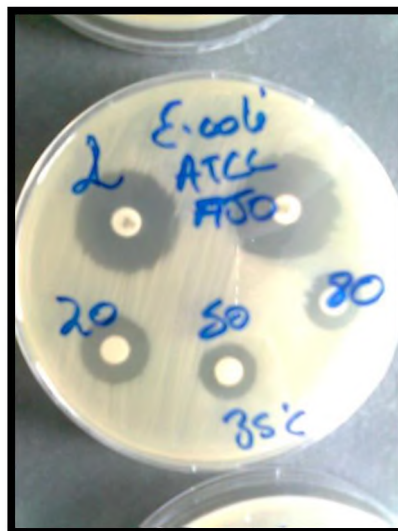


Figura N°45

Antibiograma para la cepa de *E. coli* ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sometido a 35°C

Fuente: Yaguana C.

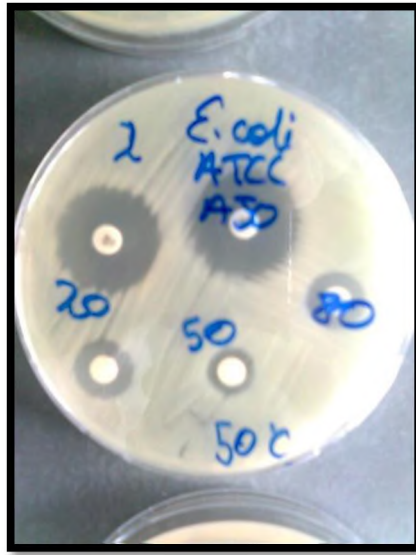


Figura N°46

Antibiograma para la cepa de *E. coli* ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C

Fuente: Yaguana C.

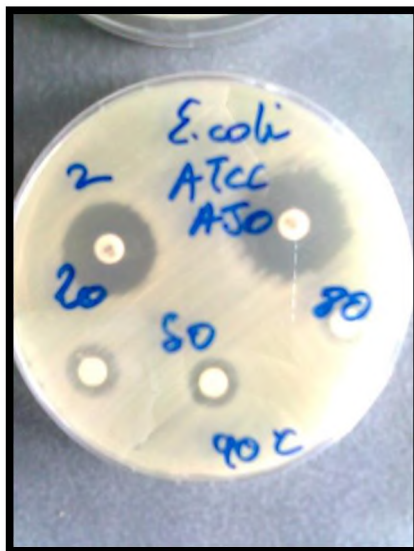


Figura N°47

Antibiograma para la cepa de *E. coli* ATCC 25922 enfrentada al extracto de ajo sometido a 50°C

Fuente: Yaguana C.

En la **tabla N°25** se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la bacteria de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de ajo.

**Tabla N°25**

**Halos de inhibición obtenidos para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de ajo**

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	11	6	11	16	11	9	11	6	6	13	9	11
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	14	9	9	15	13	13	12	11	12	12	11	9

#### **4.2.7.1 Análisis ANOVA para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de ajo**

En base a la tabla anterior, se creó una configuración óptima de los factores (**tabla N°26**), de tal manera que se pueda determinar la significancia estadística de los mismos mediante un análisis ANOVA.

**Tabla N°26**  
**Configuración óptima de los factores para la cepa de cepa de *Escherichia coli***  
**ATCC 25922 frente al extracto de ajo**

Concentración (mg/ml)	Temperatura (°C)					
	35°		50°		90°	
62.5	9	13	6	12	11	9
100	11	13	6	11	9	11
250	16	15	11	12	13	12

Se realizó entonces el análisis de varianza correspondiente, detallado en la **tabla N°27**.

**Tabla N°27**  
**Análisis de Varianza para Halos de Inhibición para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922**

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Temperatura	30.7778	2	15.3889	3.01	0.0997
B:Concentracion	38.1111	2	19.0556	3.73	0.0662
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2.88889	4	0.722222	0.14	0.9624
RESIDUOS	46.0	9	5.11111		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	117.778	17			

- Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, se concluye que ninguno de los factores e interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable Halos de inhibición, con un 95.0% de nivel de confianza. Se probó entonces retirar del modelo al factor temperatura, posteriormente se realizó un análisis de regresión múltiple con los factores restantes y un nuevo ANOVA (**tabla N°28**):

**Tabla N°28**

**Regresión Múltiple - Halos de inhibición para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y ANOVA**

- Variable dependiente: Halos de inhibición (mm)
- Variables independientes:
  - Temperatura (°C)
  - Concentración (mg/mL)

		Error	Estadístico	
Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	8.66667	1.04117	8.32398	0.0000
Concentration	0.0177778	0.00652405	2.72496	0.0150

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	37.3333	1	37.3333	7.43	0.0150
Residuo	80.4444	16	5.02778		
Total (Corr.)	117.778	17			

R-cuadrado (ajustado para G.I.) = 27.4292 %

Se determina entonces la ecuación para el modelo ajustado:

**Halos de inhibition = 8.66667 + 0.0177778\*Concentration**

- Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, se demuestra que el factor concentración es estadísticamente significativo con respecto a la variable halos de inhibición, con un nivel de confianza del 95.0%.
- A pesar de que el modelo explica solamente el 27.4292% de la variabilidad de los resultados, este resulta útil para predecir el comportamiento de la variable halos de inhibición en función del factor concentración; sí comparamos este resultado con el obtenido para la cepa de *Escherichia coli* BLEE, la cepa ATCC resulta ser más sensible al extracto de ajo.

#### 4.2.8 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de culantro

En la **figura N°48** se observa uno de los antibiogramas realizados para esta cepa frente al extracto de culantro.



**Figura N°48**

**Antibiograma para la cepa de *E. coli* ATCC 25922 enfrentada al extracto de culantro**

**Fuente:** Yaguana C.

En la **tabla N°29** se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de culantro.

Tabla N°29

Halos de inhibición obtenidos para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de culantro

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

- Se observa que en todos los ensayos no se obtuvieron halos de inhibición, por tanto se concluye que el extracto acuoso de culantro no presenta actividad antibiótica frente a la cepa bacteriana y por tanto no se requiere análisis estadístico de los datos.

#### **4.2.9 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo**

En las figuras N°49, N°50, N°51 y N°52 se observan los antibiogramas correspondientes a esta cepa bacteriana enfrentada al extracto de ajo en sus diferentes tratamientos térmicos.



Figura N°49

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo sin tratamiento térmico

Fuente: Yaguana C.



Figura N°50

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo sometido a 35°C

Fuente: Yaguana C.

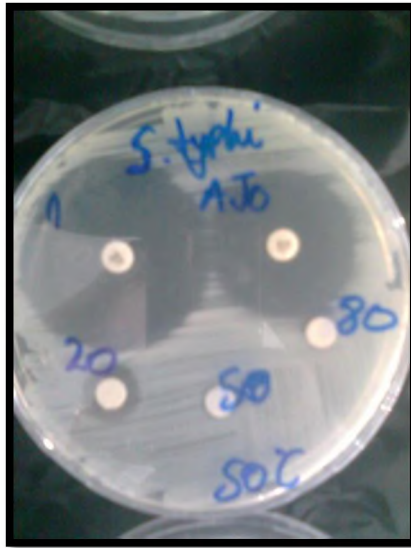


Figura N°51

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo sometido a 50°C

Fuente: Yaguana C.



Figura N°52

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo sometido a 90°C

Fuente: Yaguana C.

#### 4.2.9.1 Análisis ANOVA para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo

En la tabla N°30 se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la bacteria *Salmonella entérica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo.

**Tabla N°30**

**Halos de inhibición para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo.**

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	12	8	11	11	6	11	12	6	6	10	8	9
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	13	8	11	11	6	10	10	6	6	10	6	10

Posteriormente se creó una configuración óptima de los factores que influyen en el modelo (tabla N°31), que sirve para determinar la significancia estadística de los efectos.

**Tabla N°31**

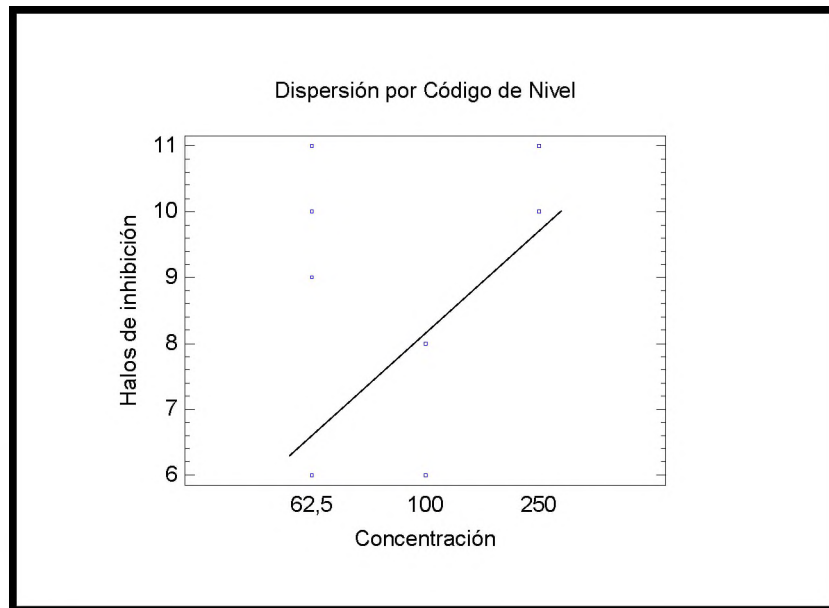
**Configuración óptima de los factores para la cepa de cepa *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de ajo**

Concentración (mg/ml)	Temperatura (°C)					
	35°		50°		90°	
62,5	11	6	9	9	10	6
100	6	6	6	6	8	6
250	11	11	11	10	10	10

Gráficamente podemos observar la dispersión de los datos en cada nivel de ambos factores (Gráfico N°17 y N°18).

**Gráfico N°17**

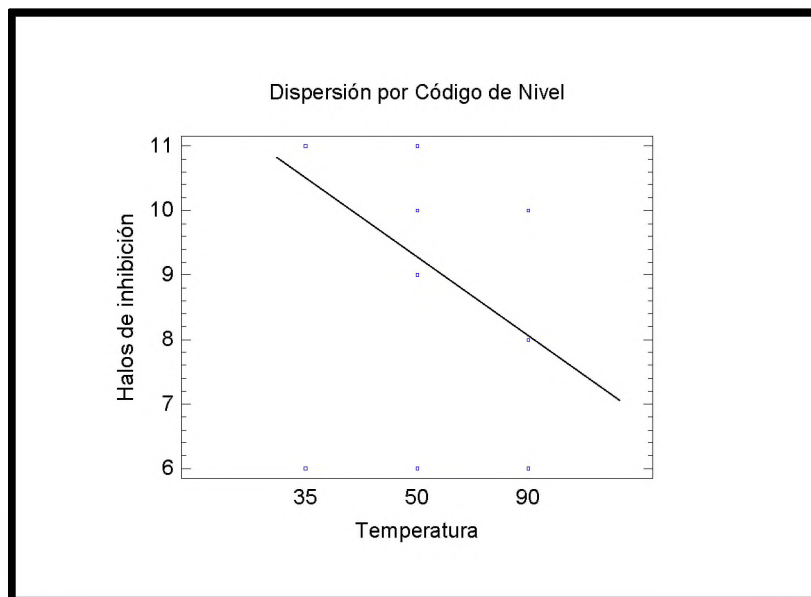
**Dispersión de los datos en cada nivel para el factor concentración para la cepa de *Salmonella enterica serovar typhi***



- Observando el gráfico se puede observar que existe una correlación lineal positiva entre la variable halos de inhibición y el factor concentración. Es decir que, mientras sea mayor la concentración del extracto de ajo, se obtendrán halos de inhibición mucho mayores. Sin embargo, en comparación con las cepas bacterianas anteriores, el extracto de ajo tiene una actividad antibiótica muy baja frente a la cepa de *Salmonella enterica serovar choleraesuis*.

**Gráfico N°18**

**Dispersión de los datos en cada nivel para el factor temperatura para la cepa de *Salmonella enterica serovar typhi***



- Observando el gráfico se puede observar que existe una correlación lineal negativa entre la variable halos de inhibición y el factor temperatura. Es decir que, cuando se aumenta la temperatura del extracto de ajo, su actividad antibiótica disminuye, obteniendo así halos de inhibición menores. Sin embargo, en comparación con las cepas anteriores, el extracto de ajo tiene una actividad antibiótica muy baja frente a esta cepa bacteriana.

Se realizó entonces el análisis de varianza respectivo (**tabla N°32**).

Tabla N°32

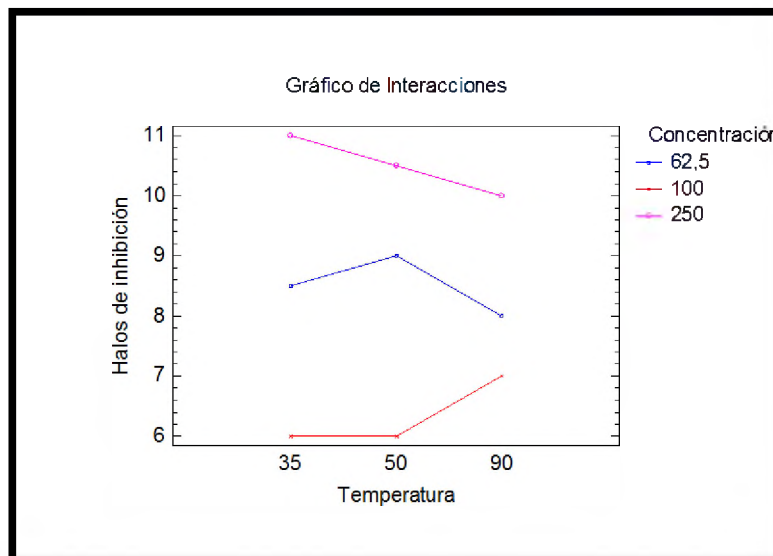
Análisis de Varianza para Halos de inhibición para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi*

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Temperatura	0,111111	2	0,0555556	0,02	0,9785
B:Concentración	52,1111	2	26,0556	10,20	0,0049
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	3,22222	4	0,805556	0,32	0,8608
RESIDUOS	23,0	9	2,55556		
TOTAL (CORREGIDO)	78,4444	17			

- Puesto que un valor-P es menor que 0,05, el factor concentración tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable Halos de inhibición con un 95,0% de nivel de confianza (gráfico N°19).

Gráfico N° 19

Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para de la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi*



- En este caso el factor temperatura y la interacción entre ambos factores no son estadísticamente significativos para ajustar un modelo

Se realizó entonces un análisis de regresión múltiple con cada uno de los factores (tabla N°33):

**Tabla N°33**

**Regresión Múltiple - Halos de inhibición para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* y ANOVA**

- Variable dependiente: Halos de inhibición (mm)
- Variables independientes:
  - Concentración (mg/mL)

		Error	Estadístico	
Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	6,30556	0,819698	7,69253	0,0000
Concentración	0,0155556	0,0051363	3,02855	0,0080

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	28,5833	1	28,5833	9,17	0,0080
Residuo	49,8611	16	3,11632		
Total (Corr.)	78,4444	17			

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 32,465 %

- Aunque el modelo solo explica el 32.45% este sirve para poder describir el fenómeno. Posteriormente se probó la normalidad de los residuos mediante pruebas de normalidad

**Tabla N°34**

**Distribuciones Ajustadas y pruebas de Normalidad para RESIDUOS para el modelo *Salmonella enterica* serovar *typhi***

Normal
media = -2,77778E-7

**Prueba de Normalidad para RESIDUOS**

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,906754	0,0764936

- Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0,05, se acepta la idea de que RESIDUOS proviene de una distribución normal con 95% de confianza. La ecuación para el modelo ajustado es la siguiente

**Halos de inhibición = 6,30556 + 0,015556\*Concentración**

#### **4.2.10 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de culantro**

En la **figura N°53** se observa uno de los antibiogramas correspondientes a esta cepa bacteriana enfrentada al extracto de culantro.



**Figura N°53**

**Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de culantro**

**Fuente:** Yaguana C.

En la **tabla N°35** se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de culantro.

Tabla N°35

Halos de inhibición para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* frente al extracto de culantro

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	6	6	6	8	6	6	6	6	6	6	6	6

- Se observa que en todos los ensayos no se obtuvieron halos de inhibición, por tanto se concluye que el extracto acuoso de culantro no presenta actividad antibiótica frente a la cepa bacteriana y por tanto no se requiere análisis estadístico de los datos.

#### 4.2.11 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo

En las figuras N°54, N°55, N°56 y N°57 se observan cuatro de los antibiogramas realizados para esta cepa bacteriana frente al extracto de ajo en sus diferentes tratamientos térmicos.



Figura N°54

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo sin tratamiento térmico

Fuente: Yaguana C.



Figura N°55

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo sometido a 35°C

Fuente: Yaguana C.



Figura N°56

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo sometido a 50°C

Fuente: Yaguana C.



Figura N°57

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo sometido a 90°C

Fuente: Yaguana C.

#### 4.2.11.1 Análisis ANOVA para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo

En la tabla N°36 se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo.

Tabla N°36

Halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad para la cepa *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de ajo

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	10	6	11	11	6	8	9	9	6	6	9	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	10	6	10	10	6	10	9	6	6	9	6	10

Se realizó una configuración óptima de los factores que influyen en el modelo, tabla N°37, que sirve para determinar la significancia estadística de los efectos.

**Tabla N°37**  
**Configuración óptima de los factores para la cepa de cepa**  
***Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de**  
**ajo**

Concentración (mg/ml)	Temperatura (°C)					
	35°		50°		90°	
62.5	8	10	9	9	6	10
100	6	6	9	6	9	6
250	11	10	9	9	6	9

Con estos datos se realizó el análisis de varianza correspondiente (Tabla N°38).

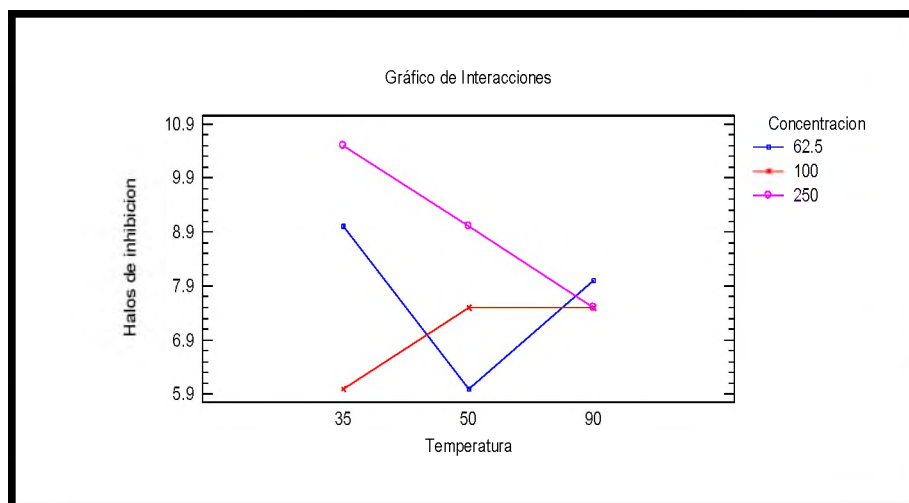
**Tabla N°38**  
**Análisis de Varianza para Halos de inhibición para la cepa de**  
***Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028**

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A:Temperatura</b>	3.44444	2	1.72222	0.65	0.5469
<b>B:Concentracion</b>	12.4444	2	6.22222	2.33	0.1526
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	17.8889	4	4.47222	1.68	0.2383
<b>RESIDUOS</b>	24.0	9	2.66667		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	57.7778	17			

- Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores ó interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza. Esto se puede observar mediante el gráfico N°20.

Gráfico N°20

Gráfico de interacciones Concentración-Temperatura respecto a los halos de inhibición para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028



- En este caso, los factores no resultan ser estadísticamente significativos ya que la actividad antibiótica del extracto de ajo, frente a esta cepa bacteriana es casi nula.

#### 4.2.12 Resultados de las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de culantro

En la **figura N°58** se observa uno de los antibiogramas correspondientes a esta cepa bacteriana enfrentada al extracto de culantro.



Figura N°58

Antibiograma para la cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de culantro

Fuente: Yaguana C.

En la **tabla N°39** se muestran los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad para la cepa de *Salmonella enterica*, serovar *choleraesuis* frente al extracto de culantro.

Tabla N°39

Halos de inhibición de la cepa *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028 frente al extracto de culantro

Tratamiento térmico del extracto	ST (Sin tratamiento)			35°C			50°C			90°C		
	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5	250	100	62.5
Concentración del extracto (mg/mL)												
Halos de inhibición (mm) Primer Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Halos de inhibición (mm) Segundo Ensayo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

- Se observa que en todos los ensayos no se obtuvieron halos de inhibición, por tanto se concluye que el extracto acuoso de culantro no presenta actividad antibiótica frente a la cepa bacteriana y por tanto no se requiere análisis estadístico de los datos

#### 4.3. Resultados de las pruebas de sensibilidad de las cepas bacterianas frente a los antibióticos gentamicina y ampicilina

Los diámetros de los halos de inhibición registrados para cada cepa bacteriana frente a los antibióticos gentamicina y ampicilina se detallan en el **Anexo N°6**. En la **tabla N°40** se muestran los promedios de halos de inhibición obtenidos de cada una de las cepas bacterianas frente al antibiótico gentamicina, así como también el promedio de halos de inhibición obtenidos frente al extracto de ajo en la concentración de 250 mg/mL, sometido a 35°C, puesto que fué este extracto el que presentó mayor actividad antibiótica.

**Tabla N°40**

**Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas frente al antibiótico gentamicina**

CEPA BACTERIANA	PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	PERFIL DE SENSIBILIDAD	PROMEDIO HALOS DE INHIBICIÓN EXTRACTO DE AJO (mm) (Concentración 250 mg/mL)	PERFIL DE SENSIBILIDAD
<i>Staphylococcus aureus</i> Metcilino Resistente	24,6	SENSIBLE	22,5	SENSIBLE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25,6	SENSIBLE	24,5	SENSIBLE
<i>Escherichia coli</i> Productora de BLEE	7,3	RESISTENTE	14,0	INTERMEDIO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25,2	SENSIBLE	15,5	SENSIBLE
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i>	30,0	SENSIBLE	11,0	RESISTENTE
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028	24,1	SENSIBLE	10,5	RESISTENTE

- Como se puede observar en la tabla, la efectividad del extracto de ajo es comparable a la del antibiótico gentamicina frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que en el caso de la cepa de *Escherichia coli* BLEE, la efectividad del extracto es superior a la del antibiótico comercial. En cuanto a las demás cepas bacterianas, el antibiótico gentamicina resulta ser superior.

En la **tabla N°41** se muestran los promedios de halos de inhibición obtenidos de cada una de las cepas bacterianas frente al antibiótico ampicilina, así como también el promedio de halos de inhibición obtenidos frente al extracto de ajo en la concentración de 250 mg/mL, sometido a 35°C, puesto que fue este extracto el que presentó mayor actividad antibiótica.

**Tabla N°41**

**Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas frente al antibiótico ampicilina**

CEPA BACTERIANA	PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	PERFIL DE SENSIBILIDAD	PROMEDIO HALOS DE INHIBICIÓN EXTRACTO DE AJO (mm) (Concentración 250 mg/mL)	PERFIL DE SENSIBILIDAD
<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente	10,1	RESISTENTE	22,5	SENSIBLE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25,4	SENSIBLE	24,5	SENSIBLE
<i>Escherichia coli</i> Productora de BLEE	6,0	RESISTENTE	14,0	INTERMEDIO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	23,3	SENSIBLE	15,5	SENSIBLE
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i>	37,4	SENSIBLE	11,0	RESISTENTE
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> ATCC 14028	28,8	SENSIBLE	10,5	RESISTENTE

- En la tabla se puede observar que el extracto de ajo tuvo una actividad antibiótica superior a la del antibiótico ampicilina frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, mientras que para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25935, la actividad del mismo es equiparable a la del antibiótico comercial.
- Se observa además que el extracto de ajo tiene mayor efectividad que el antibiótico ampicilina frente a la cepa de *Escherichia coli* BLEE. Mientras que la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 se muestra sensible tanto al antibiótico comercial como al extracto de ajo, aunque en menor medida.

#### **4.4 RESULTADOS DE LA SEGUNDA PARTE DEL ESTUDIO: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PREVIA Y POST EXPOSICIÓN AL EXTRACTO DE AJO**

Como ya se mencionó en la metodología, luego de las pruebas de sensibilidad con las cepas bacterianas, se escogió al extracto de ajo para ser aplicado a muestras de alimentos, por un período determinado de tiempo. Posteriormente las muestras fueron sembradas en Placas Petrifilm TM por 24 horas para el recuento de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Una vez obtenidos los recuentos para cada microorganismo, los datos fueron contrastados con aquellos obtenidos de los análisis de las muestras de alimentos que fueron designadas como controles. A continuación se detallan cada uno de los resultados obtenidos.

##### **4.4.1 Análisis microbiológico de la primera muestra de alimento: Ensalada 1**

En la **tabla N°42** se detallan los recuentos obtenidos del análisis de la muestra de alimento:

**Tabla N°42**  
**Análisis microbiológico para la Ensalada 1**

Microorganismo	Recuento 1 UFC/g	Recuento 2 UFC/g	Promedio UFC/g
Mesófilos aerobios	27	17	22
Coliformes totales	22	19	20
Enterobacterias	18	19	18
Mohos	0	0	0
Levaduras	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>S. aureus</i>	4	4	4

En el **Anexo N°7** se muestran los recuentos obtenidos del análisis de la muestra de alimento posterior al contacto con el extracto de ajo, en tiempos de 1, 2 y 5 minutos. En la **tabla N°43** se resumen los recuentos antes y después del contacto de la muestra de alimento con el extracto de ajo estéril.

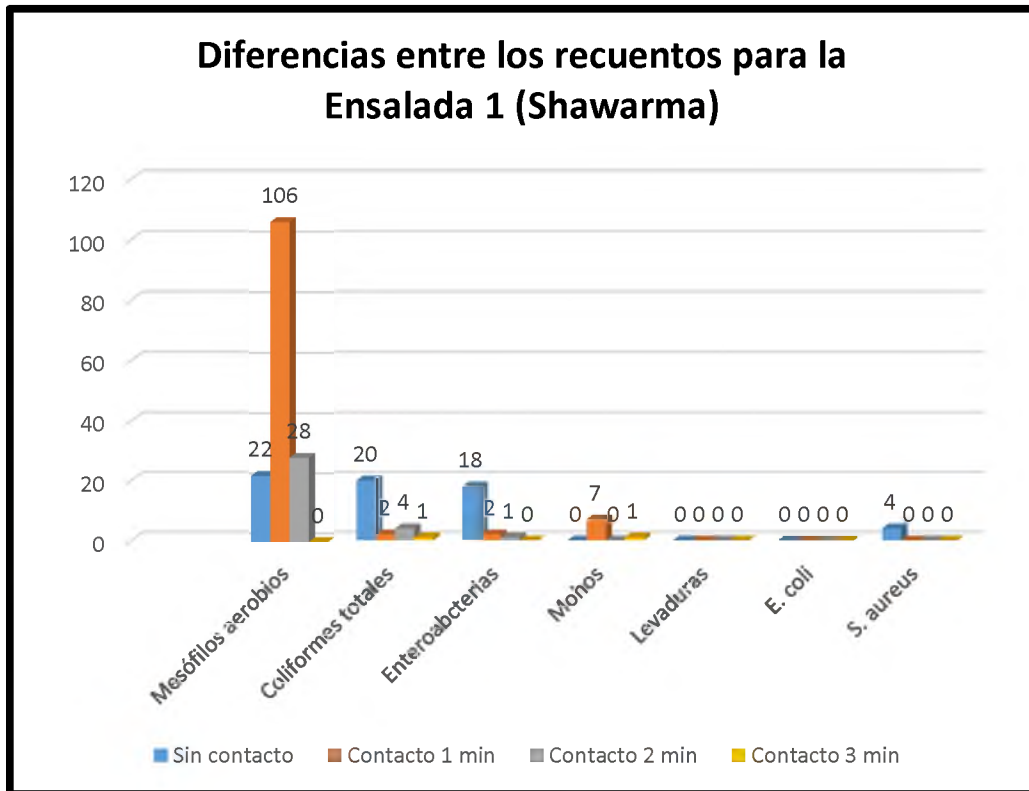
**Tabla N° 43**

**Recuentos para la Ensalada 1, antes y después del contacto con el extracto de ajo estéril**

Microorganismo	Sin contacto	Contacto 1 min	Contacto 2 min	Contacto 5 min
Mesófilos aerobios	22	106	28	0
Coliformes totales	20	2	4	1
Enteroabcterias	18	2	1	0
Mohos	0	7	0	1
Levaduras	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	4	0	0	0

- Gráficamente se puede observar que existe una clara diferencia entre el recuento inicial y los recuentos subsecuentes donde la muestra fue expuesta al extracto en diferentes períodos de tiempo (Gráfico N°21).

Gráfico N°21



- Observando la gráfica se concluye entonces que mientras mayor es el tiempo de contacto con el extracto, mayor es la actividad antibiótica del mismo, determinando entonces que el tiempo ideal de contacto, y donde se observa mayor actividad antibiótica es al minuto 5 de contacto.
- Se observa además que los microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales y enterobacterias son sensibles al extracto de ajo en concentración de 100 mg/dL.

#### 4.4.2 Análisis microbiológico de la segunda muestra de alimento: Ensalada 2

En la **tabla N°38** se detallan los recuentos obtenidos del análisis de la muestra de alimento:

**Tabla N°44**

#### **Análisis microbiológico para la Ensalada 2**

<b>Microorganismo</b>	<b>Recuento 1 UFC/g</b>	<b>Recuento 2 UFC/g</b>	<b>Promedio UFC/g</b>
<b>Mesófilos aerobios</b>	0	0	<b>0</b>
<b>Coliformes totales</b>	MNPC	MNPC	<b>MNPC</b>
<b>Enterobacterias</b>	MNPC	MNPC	<b>MNPC</b>
<b>Mohos</b>	10	13	<b>0</b>
<b>Levaduras</b>	0	0	<b>0</b>
<b><i>E. coli</i></b>	0	0	<b>0</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	15	13	<b>14</b>

En el **Anexo N°8** se muestran los recuentos obtenidos del análisis de la muestra de alimento posterior al contacto con el extracto de ajo, en tiempos de 1, 2 y 5 minutos. En la **tabla N°45** se resumen los recuentos antes y después del contacto de la muestra de alimento con el extracto de ajo estéril.

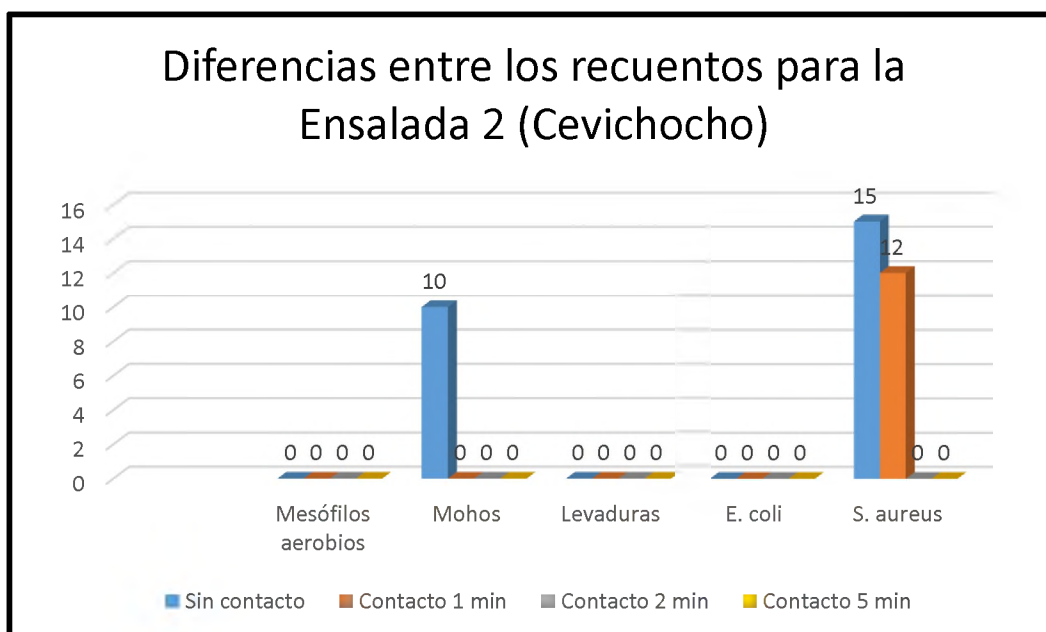
Tabla N°45

Recuentos para la Ensalada 2, antes y después del contacto con el extracto de ajo estéril

Microorganismo	Sin contacto	Contacto 1 min	Contacto 2 min	Contacto 5 min
Mesófilos aerobios	0	0	0	0
Coliformes totales	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
Enterobacterias	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
Mohos	10	0	0	0
Levaduras	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	15	12	0	0

- Gráficamente se puede observar que existe una clara diferencia entre el recuento inicial y los recuentos subsecuentes donde la muestra fue expuesta al extracto en diferentes períodos de tiempo (Gráfico N°22).

Gráfico N°22



- En los recuentos correspondientes a mesófilos aerobios y enterobacterias se observa que en todos los tiempos de contacto los recuentos fueron muy numerosos para contar (MNPC), sin embargo como se observa en el **Anexo N°9**, se puede notar que la carga microbiana para enterobacterias sí disminuyó ligeramente.
- Se observa también que hubo una disminución en los recuentos para mohos y *S. aureus*, en los cuales se observó una ausencia total del microorganismo a los minutos 2 y 5 de contacto. Por tanto estos microorganismos son también sensibles al extracto de ajo.

#### **4.4.3 Análisis microbiológico de los controles**

También se llevaron controles de los solventes y de los extractos, donde se determinaron los mismos parámetros que para las muestras de alimentos. Los controles fueron los siguientes:

- Control para Agua peptonada estéril al 0,1% utilizada para realizar las diluciones de las muestras.
- Control para Agua purificada Tipo II utilizada para la obtención de extractos.
- Control para Extracto de ajo sin esterilizar.
- Control para Extracto de ajo esterilizado.

Los resultados obtenidos demostraron ausencia de crecimiento microbiano. Los resultados se detallan en el **Anexo N°10**.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Con los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que:

- Las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* BLEE y *Escherichia coli* ATCC 25922 resultan ser sensibles al extracto de ajo.
- La efectividad antibiótica del extracto de ajo es superior a la del antibiótico ampicilina frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente.
- La efectividad antibiótica del extracto de ajo es equiparable a la del antibiótico gentamicina frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente y ATCC 25923.
- La efectividad antibiótica del extracto de ajo es inferior a la mostrada por los antibióticos gentamicina y ampicilina frente Las cepas de *Salmonella enterica* serovar *typhi* y *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* ATCC 14028.
- El extracto de ajo alcanza su mayor actividad antibiótica al ser sometido a 35°C por 10 minutos.
- Bajo las condiciones por las cuales se realizaron los ensayos, el extracto acuoso de *Coriandrum sativum* (culantro) no presenta efecto antibiótico alguno frente a las cepas bacterianas empleadas en el estudio.
- El análisis microbiológico de las muestras de alimentos demostró que, en uno de ellos, existe una alta contaminación con microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales y enterobacterias, esto indica que no se aplican correctamente buenas prácticas de manufactura.

- Se demuestra que el extracto de ajo fue capaz de disminuir, casi en su totalidad, la carga bacteriana de una de las muestras de alimentos, al ser puesto en contacto con la misma durante un período de 5 minutos.

## 5.2 Recomendaciones

- Se recomienda repetir el experimento realizando mayores repeticiones de los ensayos para de esta forma recopilar una mayor cantidad de datos y así evitar fallos en los análisis estadísticos, específicamente en lo que concierne a coeficientes de variación y normalidad de los datos.
- Sería importante desarrollar un estudio que permita aislar los principios activos del ajo y con ellos proponer la elaboración de un antibiótico que pueda ser usado como una alternativa en el tratamiento de infecciones causadas por la bacteria *Staphylococcus aureus*.
- Es importante que los locales de expendio de alimentos apliquen las normas de buenas prácticas de manufactura con el fin de disminuir la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).
- Se considera pertinente compartir los resultados de este estudio con la población para informar a la misma sobre los beneficios del ajo y su potencial uso como una posible alternativa antibiótica.

## REFERENCIAS

1. Anónimo. (2008). Cepas patógenas de *Escherichia coli*. Biblioteca Virtual en Salud OPS/OMS Uruguay. [http://www.bvsde.paho.org/CDGDWQ/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Escherichia%20coli.pdf](http://www.bvsde.paho.org/CDGDWQ/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Escherichia%20coli.pdf). Acceso: 13 diciembre 2010.
2. Anónimo. (2010). Enfermedades infecciosas causadas por Estafilococos (*Staphylococcus aureus*). <http://www.venelogia.com/archivos/4360/>. Acceso: 27 de septiembre del 2010.
3. Anónimo. (2002). *Escherichia coli* patógeno entérico como agente de ETA. Biblioteca Virtual en Salud - OPS/OMS Uruguay. <http://www.bvsops.org.uy/pdf/coli.pdf>. Acceso: 20 de octubre del 2010.
4. Anónimo. (n.d.). Hojas de información microbiológica. Página web: [www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_11.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_11.pdf). Acceso: 14 de enero de 2011.
5. Araujo, J., Salas R. (2008). Actividad antimicrobiana de las plantas. Revista científica. Universidad Científica del Sur, Lima-Perú. Página web: <http://www.apicoladelalba.cl/actividad-antimicrobiana-de-plantas-sci/>. Acceso 05-01-2011.

6. Beloin E., Roux A., & Ghigo J. (2010). *Escherichia coli* biofilms. US National Library of Medicine, Journal List. Págs. 249–289.
  
7. Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, Volume 37, Issue 2, Pgs 263-268.
  
8. Calvo J., Martínez L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España. Vol. 27. Núm. 01.
  
9. Camarena, J. J., Sánchez, R. (n.d.). Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a Metilicina. Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia. [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/sarm.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/sarm.htm). Acceso: 2 de octubre del 2010.
  
10. Centers for Disease Control and Prevention. (2010). Enfermedades Transmitidas por Alimentos. (2005). [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections\\_g\\_sp.htm#8](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g_sp.htm#8). Acceso: 4 de septiembre de 2010.
  
11. Cocca, E. (2007). Beneficios del ajo. Ejercicio y Administración farmacéutica. <http://danielmacri.blogspot.com/2007/05/beneficios-del-ajo.html>. Acceso: 20 de agosto del 2010.

12. Codex Alimentarius Comision. (2000). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del CODEX sobre la Higiene de los Alimentos. Trigésimo tercera reunión. Washington D. C. E.U.A.
  
13. Cornejo, G.M. (n.d.). La Selección del Antibiótico. Hospital Nacional del Sur de Arequipa (HNSA) - Instituto Peruano de Seguridad Social. La revista médica del C.I.E.M. <http://www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/larev/selan.htm>. Acceso: 29 de octubre del 2010.
  
14. Damjanović-Vratnica<sup>1</sup>, B., Đakov, T. (2010). Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus*. Labill. from Montenegro. Czech J. Food Sci. Vol. 29, 2011, No. 3: 277–284.
  
15. Dankert J, Tromp TF, de Vries H, Klasen HJ (1979). Antimicrobial activity of crude juices of *Allium ascalonicum*, *Allium cepa* and *Allium sativum*. Zentralbl Bakteriol [Orig A] ;245:Págs. 229-239.
  
16. Davis LE, Shen J. (1994). In vitro synergism of concentrated *Allium sativum* extract and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. Planta Med. Dec;60(6):546-9. Página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809209>. Acceso: 22 de enero de 2011.
  
17. Drug-resistant Salmonella. (2005)., Food Safety Department, World Health Organization WHO/Geneva. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acceso: 25 de octubre del 2010.
  
18. Duran, J. (2011). Métodos Lineales Generalizados. Departamento de Estadística y Departamento de Administración ITAM Seminario ITAM-CONAC I Auditorio Raúl Baillères, ITAM 3 de Noviembre.

<http://www.conac.org.mx/novedades/MetodosEstadisticosActuarial/03.Modelos.Lineales.pdf>. Acceso: Enero 2012.

19. Eldon, E., Cindy, H. & Richard, J. (2003). Home gardening: Cilantro., Iowa State University, Reative Services and Instructional Technology Center.<http://www.extension.iastate.edu/publications/pm1893s.pdf>. Acceso: 17 de enero de 2010.

20. Ewing W. (1985). Identification of Enterobacteriaceae. 4th. Edition, Elsevier,

21. Enfermedades Transmitidas por Alimentos: *Staphylococcus aureus*. (2002). PANALIMENTOS OPS/OMS. Página web: <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?cd=179&id=67>. Acceso: 17 de septiembre del 2010.

22. Filomena Silva, Susana Ferreira, João A. Queiroz & Fernanda C. Domingues, (2011). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Avenida Infante D. Henrique, 6200-506 Covilha, Portugal. *Journal of Medical Microbiology* (2011), 60, 1479–1486.

23. Flores Q., Velasco A. & Figueroa S. N. (1999). Aceites Esenciales con propiedades antimicrobianas. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas-IIFB Area Temática de Química Farmacéutica. <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa99070701.pdf>. Acceso: 23 de septiembre del 2010.

24. García, R., Herrera, A. (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 de la Universidad de Pamplona, Bucaramanga-Colombia, julio-diciembre de 2007, vol. 5, número 002, pág. 68-79. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/903/90350207.pdf>. Acceso: 23 de septiembre del 2010.
25. González-Zorn, B. (2010). Salmonella super-resistente a antibióticos. <http://www.madrimasd.org/informacionidi/noticias/noticia.asp?id=43364>. Acceso: 27 de octubre del 2010.
26. González S., Rivera L. (2009). Análisis de compuestos volátiles en cilantro (*Coriandrum sativum*). Universidad de Guadalajara. Ciencias biológicas, agropecuarias y medio ambiente. Vol. 20 no. 1.
27. Gupta, S., Ravishankar, S. (2005). A comparison of the antimicrobial activity of garlic, ginger, carrot, and turmeric pastes against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory buffer and ground beef. Foodborne Pathogens and Disease 2005.2:330-340, volume 2, number 4.
28. Harish B., Menezes G. (2011). Antimicrobial Resistance in typhoidal salmonellae. Indian journal of medical microbiology 29(3):223-229.

29. Hopkins, K. L., Escudero, J. A., Hidalgo, L. & Gonzalez-Zorn B. (n.d.). 16S rRNA Methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* ser. Virchow. *Emerg Infect Dis*, 16(4):712-5. [www.cdc.gov/ncidod/EID/index.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/index.htm). Acceso: 22 de octubre del 2010.
30. Josling, P. (2005). New natural extract for treating MRSA. <http://www.medicalnewstoday.com/articles/25704.php>. Acceso: 21 de marzo del 2010.
31. Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T. (2004). Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. *Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California, Berkeley*. 2;52 (11): 3329-32.
32. Mary E Hensler<sup>1</sup>, Kyoung Hwa Jang<sup>2</sup>, (2014). Anthracimycin activity against contemporary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics*, págs.:1–5.
33. Morales, R. I. (2003). Terapia de bacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido. *Revista chilena de infectología. Rev Chil Infect* 2003; 20 (Supl 1): S24 - S27. Página:web:<http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182003020100003&script=siarttext>. Acceso: 27 de octubre del 2010.
34. Organización Mundial de la Salud (OMS). (Mayo, 2013). Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N°194. Página web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. Acceso: 12 de Junio del 2013.

35. Organización Panamericana de la salud (1997). Vigilancia y prevención de las enfermedades transmitidas por alimentos. Subcomite de planificación y programación del comité ejecutivo. 29<sup>da</sup> sesión, SPP29/5 (Esp.). Página web: <http://www.paho.org/spanish/GOV/CE/SPP/doc232.pdf>. Acceso: 12 de noviembre del 2010.
36. Ozçelik S, Sümer Z, Değerli S, Ozan F, Sökmen A. (2007). Can garlic (*Allium sativum*) extract be used as scolocidal agent?. *Turkiye Parazitol Derg.* 2007;31(4):318-21.
37. Paterson DL, Bonomo RA (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (4): 657–86. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005. PMID 16223952.
38. Perez, E., Salvatella, P., Ribetto, R., Castro, A.. (2007). Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA): su importancia en la caracterización de riesgos. [http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/ETA\\_revisadomayo301.pdf](http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/ETA_revisadomayo301.pdf). Acceso: 6 de septiembre del 2010.
39. Petrifilm TM. Placa para Recuento de *E. coli* y Coliformes Cat. 6404, 6414, Ficha Técnica. (n.d.). Página web: [http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSu7zK1fslxtUmx\\_v58\\_9ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS--](http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSu7zK1fslxtUmx_v58_9ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS--). Acceso: 20 de octubre del 2010.
40. Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana Ecuador (REDNARBEC), 2008. Reporte de Resistencias Bacterianas para el año 2008. [www.rednarbec.org](http://www.rednarbec.org). Acceso: 4 de diciembre del 2010.

41. Rodríguez, L. (n.d.). Antibióticos naturales, grandes aliados. <http://www.saludymedicinas.com.mx/articulos/672/antibioticos-naturales-grandes-aliados/5>. Acceso: 2 de octubre del 2010.
42. Ross SA, Megalla SE, Bishay DW, et al. (1980). Studies for determining antibiotic substances in some Egyptian plants. Part 1 - screening for antimicrobial activity. *Fitoterapia*. 51: Págs.: 303 – 308.
43. Salazar, S. (2006). El cilantro (*Coriandrum sativum*) como planta medicinal emergente. Publicación electrónica bimestral del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de las Américas Puebla, México. [http://www.infarmate.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=18&Itemid=1](http://www.infarmate.org/index.php?option=com_content&task=view&id=18&Itemid=1)  
4. Acceso: 13 de febrero del 2010.
44. Saravia J. (2014). Salmonelosis. Sección de Enfermedades Infecciosas Hospital San Juan de Dios. Página web: <http://www.aibarra.org/Guias/7-25.htm>. Acceso 27 de marzo de 2014.
45. Silva, F., Ferreira S. (2011). Coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*. Página web: <http://jmm.sgmjournals.org/content/60/10/1479.full>  
<http://jmm.sgmjournals.org/content/60/10/1479.full>. Acceso: 5 de agosto de 2011.

46. Serge A., Mirelman D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. Department of Biological Chemistry, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel. *Microbes and Infection*, 2, 1999, 125–129.
47. Sussmann, O., Mattos, L., Restrepo, A. (2013). Resistencia bacteriana. Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio. Página web: [med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/.../0026%20Resistencia.PDF](http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/.../0026%20Resistencia.PDF). Acceso: 2 de agosto de 2013.
48. Todar, K. PhD. (2008). *Salmonella* and Salmonellosis. <http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html>. Acceso: 28 de octubre del 2010.
49. Todar, K. PhD. (2008). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>. Acceso: 4 de octubre del 2010.
50. Torres C. (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Academia de farmacia “Reino de Aragón”, Zaragoza. Páginas 22-24. Página web: [www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/.../Documento48.pdf](http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/.../Documento48.pdf). Acceso: 3 de noviembre de 2012.

51. Velázquez, M. ME. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente. Salud Publica Mex;47:381-387. <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v47n5/28384.pdf>. Acceso: 10 de octubre del 2010.
52. Zulfkar, L., Qadrie, J., Beena, A. & Raj Kapoor, B. (2009). Anti-bacterial activity of ethanolic extract of *Indoneesiella echioides* (L) Nees. evaluated by the filter paper disc method. Department of Pharmacy, College of Pharmacy, 7th April University, Az-Zawia, Tripoli, Libya. Department of Pharmacology, Vinayaka Mission's College of Pharmacy, Salem, Tamil Nadu. Pak. J. Pharm. Sci., Vol.22, No.2, April 2009.
53. Zakaria Y. Al-Astal, 2003. Effect of storage and temperature of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria. Journal of Al Azhar University-Gaza. Vol. 6, 2 P.11-20.
54. Zurita, J.. (2009). Uso racional de los antibióticos; Epidemiología de la resistencia bacteriana en el Ecuador. [www.ura-merck.com/public/index.php?option...id](http://www.ura-merck.com/public/index.php?option...id). Acceso: 20 de diciembre del 2010.

# **ANEXO N°1**

**EXTRACTO DEL MANUAL DE  
ACTUALIZACION EN  
RESISTENCIA BACTERIANA Y  
NORMAS CLSI M100 – S20 2010.**

## **Reactivos para la prueba de difusión con disco**

### **1. Agar de Mueller-Hinton**

Entre los numerosos medios disponibles, el subcomité considera que el agar Mueller-Hinton es el mejor para los antibiogramas corrientes de las bacterias no exigentes debido a que:

- La reproducibilidad de las pruebas de sensibilidad es aceptable entre los diferentes lotes.
- La concentración de los inhibidores de la sulfonamida, trimetoprima y tetraciclina es baja.
- El crecimiento de la mayor parte de agentes patógenos no exigentes es satisfactorio.
- Se dispone de un gran número de datos y experiencia acumulada en relación a las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Aunque el medio de Mueller-Hinton es generalmente fiable para realizar el antibiograma, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, a veces, variar significativamente. Si en uno de los lotes el microorganismo no crece adecuadamente, los halos de inhibición de la prueba de difusión por disco generalmente serán más grandes de lo previsto y pueden exceder los límites aceptados en el control de calidad. Solo se usarán las formulaciones de agar de Mueller-Hinton que se hayan probado y cumplan los requisitos descritos en el documento M0616 del CLSI.

### **2. pH**

Verifique el pH del agar de Mueller-Hinton de cada lote cuando se prepara el medio. El agar debe tener un pH de 7,2 a 7,4 a temperatura ambiente.

### **3. Humedad**

Si en el momento de usar las placas hay humedad superficial excesiva deben colocarse en una estufa (35 °C) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos). La superficie de las placas deben estar húmedas, pero sin gotitas de humedad visibles en la superficie del medio ni en las tapas de la placa de Petri cuando se van a inocular.

### **4. Discos de antimicrobianos**

#### **4.1 Origen e información acerca de los discos**

Los discos deberían comprarse a vendedores comerciales fiables. Asimismo, deben estar acompañados como mínimo de un certificado de análisis con información sobre la carga de los discos, el número de lote y el hecho de que cumplen los requerimientos de los parámetros establecidos frente a los microorganismos de control de calidad recomendados.

#### **4.2 Conservación de los discos de antimicrobianos**

Los cartuchos que contienen discos de papel comerciales preparados específicamente para las pruebas de sensibilidad están generalmente envasados para asegurar las condiciones anhidras apropiadas. Los discos deben conservarse de la siguiente manera:

- Refrigerar los cartuchos a una temperatura  $\leq 8^{\circ}$  C o congelarlos a  $\leq -14^{\circ}$  C hasta el momento de usarlos.
- No deben conservarse en congeladores con descongelación automática. Los envases sellados de discos que contengan antibióticos betalactámicos deben conservarse congelados, excepto para pequeñas provisiones de trabajo que pueden refrigerarse hasta un máximo de una semana. Algunos agentes lábiles (ej., imipenem, cefaclor, y

las combinaciones de ácido clavulánico) pueden tener mayor estabilidad si se conservan congeladas hasta el día de su uso.

- Sacar del refrigerador o congelador los envases sellados que contienen los cartuchos con los discos una o dos horas antes usarlos, para que se equilibren a la temperatura ambiente antes de abrirlos. Esto reduce al mínimo la condensación que se produce cuando los discos fríos entran en contacto con el aire caliente.
- Una vez abierto el envase sellado, cartuchos con los discos deben almacenarse en un contenedor con desecante firmemente sellado. En caso de usarse un dispensador de discos, este debe tener una tapa ajustada y un desecante adecuado. Se debe dejar que el dispensador alcance la temperatura ambiente antes de abrirlo. Hay que evitar el exceso de humedad reemplazando el desecante cuando el indicador cambie de color.
- Cuando no se esté utilizando el dispensador que contiene los discos se debe refrigerar.
- Los discos deben usarse antes de la fecha de caducidad establecida en la etiqueta por el fabricante. Desechar los discos que hayan caducado.

## **5. Preparación del inóculo para las pruebas de difusión por disco**

### **5.1 Turbidez estándar para la preparación del inóculo**

Para estandarizar la densidad del inóculo del antibiograma, debe usarse un patrón de turbidez de BaSO<sub>4</sub> equivalente al 0,5 de la escala de McFarland o su equivalente óptico (por ejemplo, una suspensión de partículas de látex).

Preparar un estándar 0,5 de McFarland de BaSO<sub>4</sub> según se describe en el Apéndice B. Alternativamente, puede utilizarse un equipo fotométrico.

#### **5.1.1 Preparación del inóculo**

## **Agar de Mueller-Hinton**

Entre los numerosos medios disponibles, el subcomité considera que el agar Mueller-Hinton es el mejor para los antibiogramas corrientes de las bacterias no exigentes debido a que:

- La reproducibilidad de las pruebas de sensibilidad es aceptable entre los diferentes lotes.
- La concentración de los inhibidores de la sulfonamida, trimetoprima y tetraciclina es baja.
- El crecimiento de la mayor parte de agentes patógenos no exigentes es satisfactorio.
- Se dispone de un gran número de datos y experiencia acumulada en relación a las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Aunque el medio de Mueller-Hinton es generalmente fiable para realizar el antibiograma, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, a veces, variar significativamente. Si en uno de los lotes el microorganismo no crece adecuadamente, los halos de inhibición de la prueba de difusión por disco generalmente serán más grandes de lo previsto y pueden exceder los límites aceptados en el control de calidad. Solo se usarán las formulaciones de agar de Mueller-Hinton que se hayan probado y cumplan los requisitos descritos en el documento M0616 del CLSI.

### **5.1.2 Método de suspensión directa de colonias**

El método de suspensión directa de colonias es el más adecuado para la preparación del inóculo. Este método puede usarse para la mayoría de los microorganismos; es el método recomendado para las pruebas de microorganismos fastidiosos, como *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y estreptococos y para las de estafilococos con resistencia potencial a la meticilina u oxacilina.

- (1) Preparar el inóculo haciendo un caldo directo o suspensión salina de las colonias aisladas seleccionadas de una placa de agar después de 18 a 24 horas de incubación (debe utilizarse un medio no selectivo, como el agar sangre).

- (2) Ajustar la turbidez de la suspensión hasta que sea equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Se obtiene así una suspensión que contiene aproximadamente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml para *Escherichia coli* ATCC® 25922. Para realizar este paso con exactitud, se debe utilizar un equipo fotométrico o, si se realiza visualmente, una luz adecuada para comparar el tubo del inóculo con el estándar 0,5 de McFarland frente a una tarjeta de fondo blanco y líneas negras.

### 5.1.3 Método de crecimiento

El método de crecimiento puede ser usarse como alternativa y a veces es preferible cuando las colonias son difíciles de suspender directamente y no se logra una suspensión homogénea. También puede utilizarse para microorganismos no fastidiosos (excepto estafilococos) cuando no se disponga de colonias frescas (24 horas), que son las que se necesitan para el método de suspensión directa de colonias.

- (1) Seleccionar como mínimo de tres a cinco colonias bien aisladas con un mismo tipo morfológico de un cultivo en placa de agar. Tocar la parte superior de cada colonia con un asa o hisopo estéril y transferir el crecimiento a un tubo que contenga de 4 ml a 5 ml de un medio de cultivo apropiado, como el caldo de tripticasa soja.
- (2) Incubar el caldo de cultivo a 35 °C hasta alcanzar o exceder la turbidez del estándar 0,5 de McFarland (generalmente de dos a seis horas).
- (3) Ajustar la turbidez del caldo de cultivo en crecimiento con solución salina estéril o caldo hasta lograr una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Se obtiene así una suspensión que contiene aproximadamente de 1 a 2 x10<sup>8</sup> UFC/ml para *E. coli* ATCC® 25922. Para realizar este paso con exactitud, se debe utilizar un equipo fotométrico o, si se realizar visualmente, una luz adecuada para comparar el tubo del inóculo con el estándar 0,5 de McFarland frente a una tarjeta de fondo blanco con líneas negras.

## **6. Procedimiento para la realizar la prueba de difusión con discos**

### **6.1 Inoculación de las placas**

- (1) Lo ideal es que dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido. Este procedimiento elimina el exceso de líquido del hisopo.
- (2) Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.
- (3) La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antibiótico.

**NOTA:** Evitar densidades extremas de los inóculos. Nunca se deberá usar caldos de cultivos incubados toda la noche sin diluir ni otros inóculos no estandarizados para estriar las placas.

### **6.2 Dispensación de los discos en las placas de agar inoculadas**

- (1) Depositar la batería predeterminada de los discos de antimicrobiano sobre la superficie inoculada del agar.
- (2) Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24 mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm ni más de cinco en una placa de 100 mm. Sin embargo, con el fin


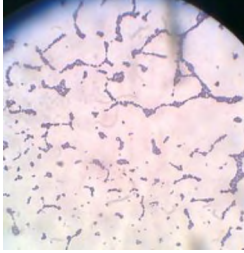


de evitar la superposición de halos, siempre es mejor colocar los discos que se espera que den halos pequeños (por ejemplo, gentamicina y vancomicina) al lado de los que dan halos más grandes (como los de cefalosporinas). También es importante prestar atención a la proximidad de los discos al borde de las placas, independientemente del número de discos colocados. Si los discos están muy cerca del borde de las placas, algunos antimicrobianos podrían dar halos que no sean totalmente circulares. Debido a que algunos fármacos difunden casi instantáneamente, el disco no debe cambiarse de lugar después de haber entrado en contacto con la superficie del agar. En caso necesario, debe colocarse un nuevo disco en otro lugar del agar. Para realizar la prueba del halo-D para detectar resistencia inducible a clindamicina, véase la sección 12 y las Tablas 2C, 2H-1, y 2H-2 del documento M1009 que indica cómo colocar los discos.

- (3) Invertir las placas y colocarlas en una incubadora a  $35 \pm 2$  °C (las temperaturas de  $> 35$  °C pueden impedir la detección de estafilococos resistentes a meticilina) antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos. Las placas no deben incubarse en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>, excepto en el caso de *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y estreptococos (véase la Sección 10), ya que los normas de interpretación se desarrollaron en atmósfera normal y el CO<sub>2</sub> altera significativamente el tamaño de los halos de inhibición de algunos agentes.

## **ANEXO N°2**


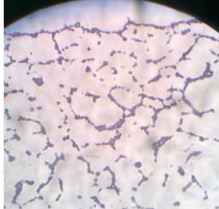



# **IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS**

**-Staphylococcus aureus (ATCC 25923).**

DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA	GRAM	CATALASA	COAGULASA
 <p>Colonias redondas, bordes regulares, cremosas, presentan beta hemólisis.</p>	 <p>Cocos Gram (+) agrupándose en forma de racimos</p>	 <p>Prueba Positiva (Formación de burbujas al agregar peróxido de hidrógeno).</p>	 <p>Prueba Positiva (Formación de coágulo)</p>

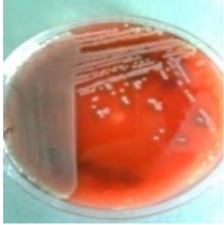
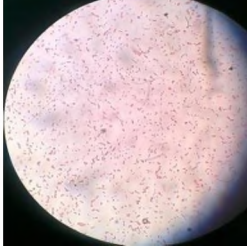
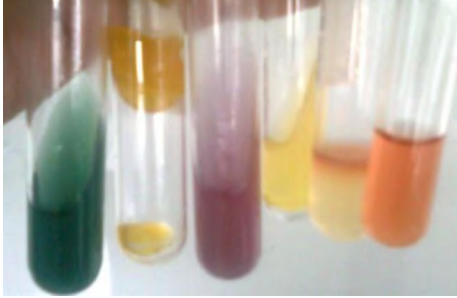
Creado por: C. Yaguana

**-Staphylococcus aureus Meticilino-Resistente (MRSA), cepa nativa**

DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA	GRAM	CATALASA	COAGULASA	RESISTENCIA A OXACILINA
 <p>Colonias redondas, bordes regulares, cremosas, presentan beta hemólisis.</p>	 <p>Cocos Gram (+) agrupándose en forma de racimos</p>	 <p>Prueba Positiva (Formación de burbujas al agregar peróxido de hidrógeno).</p>	 <p>Prueba Positiva (Formación de coágulo)</p>	 <p>La bacteria es resistente al antibiótico Oxacilina</p>

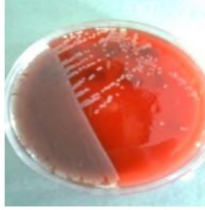
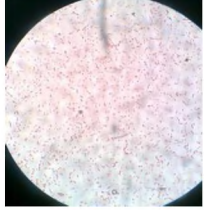


Creado por: C. Yaguana

**-Escherichia coli (ATTC 25922)**

DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA	GRAM	PRUEBAS BIOQUÍMICAS
 <p>Colonias medianas a grandes, brillantes, bordes irregulares, presentan beta-hemólisis.</p>	 <p>Bacilos o cocobacilos Gram Negativos</p>	 <p>1 2 3 4 5 6</p> <p>1.-Citrato= Negativo.                  2.-TSI= A/A + gas.                  3.-Lisina (LIA)= Decarboxilación (+).                  4.-Urea= Negativa.                  5.-SIM= Motilidad (-). Indol (+).                  6.-Rojo de Metilo= Positivo.</p>


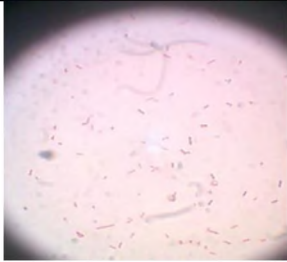
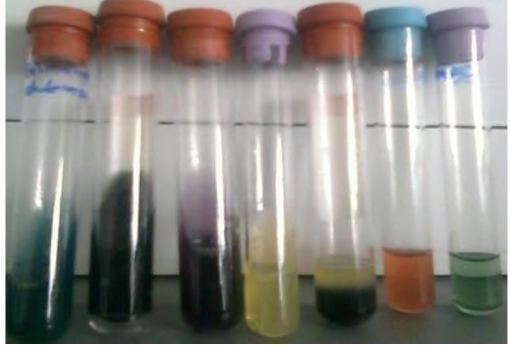
Creado por: C. Yaguana

**-Escherichia coli productora de BLEE, cepa nativa**

DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA	GRAM	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	RESISTENCIA A CEFTAZIDIME
 <p>Colonias medianas a grandes, brillantes, bordes irregulares, presentan beta-hemólisis.</p>	 <p>Bacilos o cocobacilos Gram Negativos</p>	 <p>1 2 3 4 5 6</p> <p>1.-Citrato= Negativo.                  2.-TSI= A/A + gas.                  3.-Lisina (LIA)= Decarboxilación (+).                  4.-Urea= Negativa.                  5.-SIM= Motilidad (-). Indol (+).                  6.-Rojo de Metilo= Positivo.</p>	 <p>La bacteria es resistente al antibiótico Cefotazidime</p>




Creado por: C. Yaguana

***-Salmonella entérica serovar choleraesuis (ATCC 14028)***

DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA	GRAM	PRUEBAS BIOQUÍMICAS
 <p>Colonias de 2 – 4 mm de diámetro, opacas, blanquecinas, no hemolíticas.</p>	 <p>Bacilos Gram (-)</p>	 <ol style="list-style-type: none"> <li>1.-Citrato= Positivo.</li> <li>2.-TSI= Gas sulfhídrico.</li> <li>3.-Lisina (LIA)= H<sub>2</sub>S (+).</li> <li>4.-Urea= Negativa.</li> <li>5.-SIM= Motilidad (+). Indol (-), H<sub>2</sub>S.</li> <li>6.-Rojo de Metilo= Positivo.</li> <li>7.-Voges-Proskauer= Negativo.</li> </ol>

Creado por: C. Yaguana

***-Salmonella entérica serovar. typhi***

DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA	GRAM	PRUEBAS BIOQUÍMICAS
 <p>Colonias de 2 – 4 mm de diámetro, opacas, blanquecinas, no hemolíticas.</p>	 <p>Bacilos Gram (-)</p>	 <ol style="list-style-type: none"> <li>1.-Citrato= Negativo.</li> <li>2.-TSI= K/A + gas sulfhídrico.</li> <li>3.-Lisina (LIA)= H<sub>2</sub>S (+).</li> <li>4.-Urea= Negativa.</li> <li>5.-SIM= Motilidad (+). Indol (-), H<sub>2</sub>S.</li> <li>6.-Rojo de Metilo= Positivo.</li> <li>7.-Voges-Proskauer= Negativo.</li> </ol>

Creado por: C. Yaguana

**ANEXO N° 3**

**TABLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBIÓTICO DE LOS EXTRACTOS DE AJO Y CULANTRO**

		<b>NOMBRE DEL EXTRACTO</b>											
<b>Nombre del Microorganismo</b>	<b>TRATAMIENTO DEL EXTRACTO CON CALOR (TEMPERATURA)</b>												
	<b>Sin Tratamiento (ST)</b>	<b>35°C</b>				<b>50°C</b>				<b>90°C</b>			
	<b>Concentraciones de los extractos (mg/mL)</b>												
		<b>DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)</b>											
<b>1 Ensayo</b>													
<b>2 Ensayo</b>													

Elaborado por C. Yaguana

**ANEXO N° 4**

**TABLA DE REGISTRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN CORRESPONDIENTES A LOS ANTIBIÓTICOS GENTAMICINA Y AMPICILINA**

	<b>GENTAMICINA</b>				<b>AMPICILINA</b>			
<i>Nombre del Microorganismo</i>	<b>DÍAMETRO DEL HALO EN MILÍMETROS</b>							
<b>1 ENSAYO</b>								
<b>2 ENSAYO</b>								

# **ANEXO N° 5**

## **MANUAL DE USO DE LAS PLACAS PETRIFILM™**

# 3M™ Petrifilm™

## Placas para Recuento de Coliformes

Para Advertencias, Precauciones, Responsabilidad del Usuario, Garantía Limitada, Almacenamiento y Eliminación, e Instrucciones de Uso, ver el folleto del producto.

Instrucciones  
de uso



### Almacenamiento



**1** Conservar las bolsas cerradas a  $\leq 8^{\circ}\text{C}$ . Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. En zonas con alta humedad donde puede haber condensación, es mejor dejar que las bolsas alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas.



**2** Para cerrar las bolsas que se están utilizando, doblar los extremos y cerrarlos con celo.



**3** Mantener las bolsas una vez cerradas a  $\leq 25^{\circ}\text{C}$ , a HR < 50%. **No refrigerar las bolsas abiertas.** Usar las placas Petrifilm en un mes desde su apertura.

### Preparación de la muestra



**4** Pesar o pipetear el producto alimenticio en un contenedor estéril adecuado, como una bolsa tipo Stomacher, frasco de dilución, bolsa Whirl-Pak®, o cualquier otro contenedor estéril.



**5** Si es necesario, utilizar diluyentes estériles apropiados: agua peptonada sal (método ISO 6887) (Diluyente de Máxima Recuperación), tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDF,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.0425g/l, ajustar pH a 7.2), agua peptonada al 0.1%, agua peptonada tamponada (método ISO 6579), solución salina (0.85 - 0.90%), caldo lechén sin bisulfito, o agua destilada.

No usar tampones que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato, ya que pueden inhibir el crecimiento.



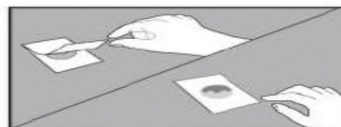
**6** Mezclar u homogeneizar la muestra según el procedimiento habitual.

Ajustar el pH de la muestra diluida entre 6.5 y 7.2  
 • para productos ácidos, usar NaOH 1N,  
 • para productos alcalinos, usar HCl 1N.

### Inoculación



**7** Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior. Con una pipeta colocada de forma perpendicular a la placa Petrifilm, colocar 1 ml. de la muestra en el centro del film inferior.



**8** Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.



**9** Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo. Con cuidado, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular antes de que se forme el gel. No girar ni deslizar el aplicador. Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.

### Incubación

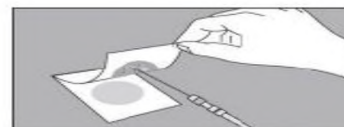


**10** Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas. El tiempo e incubación varía según el método.

### Interpretación



**11** Las placas Petrifilm pueden leerse con un contador de colonias standard u otra lente de aumento iluminada. Para leer los resultados, consultar la Guía de Interpretación.



**12** Las colonias pueden aislarse para una posterior identificación. Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel.

## **ANEXO N° 6**

# **DIAMETROS DE SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS BACTERIANAS PARA LOS ANTIBIOTICOS GENTAMICINA Y AMPICILINA**

**SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE**  
***Staphylococcus aureus* A LOS ANTIBIÓTICOS**  
**GENTAMICINA Y AMPICILINA**

**ENSAYO CON EL EXTRACTO DE AJO**

	GENTAMICINA				AMPICILINA			
	TRATAMIENTO CON CALOR							
	ST	35°C	50 °C	90 °C	ST	35 °C	50 °C	90 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino Resistente (MRSA)	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)							
1 ENSAYO	24	27	23	25	10	11	10	6
2 ENSAYO	28	25	24	25	11	12	10	6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
1 ENSAYO	26	27	27	26	27	27	27	24
2 ENSAYO	26	27	22	26	25	27	26	22

**ENSAYO CON EL EXTRACTO DE CULANTRO**

	GENTAMICINA				AMPICILINA			
	TRATAMIENTO CON CALOR							
	ST	35 °C	50 °C	90 °C	ST	35 °C	50 °C	90 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> Metilino Resistente (MRSA)	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)							
1 ENSAYO	25	25	19	22	11	11	9	10
2 ENSAYO	26	25	25	26	11	11	11	11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
1 ENSAYO	25	26	26	26	26	26	25	25
2 ENSAYO	24	26	25	25	24	26	24	25

**SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE**  
*Escherichia coli* **A LOS ANTIBIÓTICOS**  
**GENTAMICINA Y AMPICILINA**

**ENSAYO CON EL EXTRACTO DE AJO**

	<b>GENTAMICINA</b>				<b>AMPICILINA</b>			
	<b>TRATAMIENTO CON CALOR</b>							
	<b>ST</b>	<b>35 °C</b>	<b>50 °C</b>	<b>90 °C</b>	<b>ST</b>	<b>35 °C</b>	<b>50 °C</b>	<b>90 °C</b>
<i>Escherichia coli</i> Productora de BLEE	<b>HALOS DE INHIBICIÓN (mm)</b>							
<b>1 ENSAYO</b>	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>2 ENSAYO</b>	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922								
<b>1 ENSAYO</b>	25	26	23	24	23	24	22	21
<b>2 ENSAYO</b>	25	24	24	23	23	23	22	20

**ENSAYO CON EL EXTRACTO DE CULANTRO**

	GENTAMICINA				AMPICILINA			
	TRATAMIENTO CON CALOR							
	ST	35°C	50 °C	90 °C	ST	35 °C	50 °C	90 °C
<i>Escherichia coli</i> Productora de BLEE	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)							
1 ENSAYO	9	8	9	6	6	6	6	6
2 ENSAYO	10	11	9	6	6	6	6	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922								
1 ENSAYO	26	27	26	26	24	26	24	24
2 ENSAYO	26	26	27	25	24	24	25	24

**SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE**  
***Salmonella* A LOS ANTIBIÓTICOS GENTAMICINA Y**  
**AMPICILINA**

**ENSAYO CON EL EXTRACTO DE AJO**

	GENTAMICINA				AMPICILINA			
	TRATAMIENTO CON CALOR							
	ST	35°C	50 °C	90 °C	ST	35 °C	50 °C	90 °C
<i>Salmonella entérica serovar. typhi</i>	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)							
1 ENSAYO	32	30	30	30	39	38	39	37
2 ENSAYO	33	32	29	27	41	39	37	36
<i>Salmonella entérica serovar choleraesuis</i> ATCC 14028								
1 ENSAYO	24	25	26	25	30	31	28	29
2 ENSAYO	26	25	26	26	21	29	27	29

**ENSAYO CON EL EXTRACTO DE CULANTRO**

	GENTAMICINA				AMPICILINA			
	TRATAMIENTO CON CALOR							
	ST	35°C	50 °C	90 °C	ST	35 °C	50 °C	90 °C
<i>Salmonella entérica serovar typhi</i>	<b>HALOS DE INHIBICIÓN (mm)</b>							
<b>1 ENSAYO</b>	27	31	30	29	38	38	36	37
<b>2 ENSAYO</b>	29	31	30	30	36	36	35	37
<i>Salmonella entérica serovar choleraesuis</i> ATCC 14028								
<b>1 ENSAYO</b>	19	24	24	24	27	30	31	30
<b>2 ENSAYO</b>	21	23	23	24	30	31	28	29

## ANEXO N°7

### Análisis microbiológico para la Ensalada 1 (Shawarma) posterior al contacto con el extracto de ajo estéril

Microorganismo	Contacto			Contacto			Contacto		
	1 min			2 min			5 min		
	Recuento 1	Recuento 2	Promedio	Recuento 1	Recuento 2	Promedio	Recuento 1	Recuento 2	Promedio
Mesófilos aerobios	116	96	106	17	40	28	0	0	0
Coliformes totales	2	3	2	5	4	4	0	1	1
Enterobacterias	2	0	2	2	1	1	0	0	0
Mohos	12	2	7	0	0	0	1	0	1
Levaduras	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0

## ANEXO N° 8

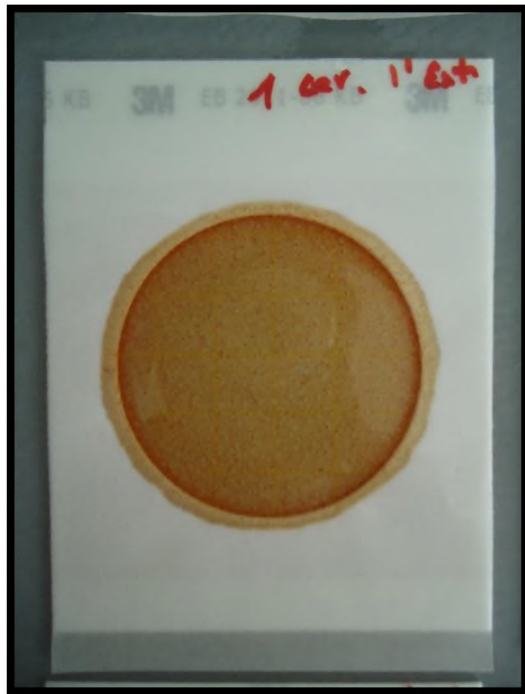
### Análisis microbiológico para la Ensalada 2 (Cevichocho) posterior al contacto con el extracto de ajo estéril

Microorganismo	Contacto			Contacto			Contacto		
	1 min			2 min			5 min		
	Recuento 1	Recuento 2	Promedio	Recuento 1	Recuento 2	Promedio	Recuento 1	Recuento 2	Promedio
Mesófilos aerobios	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coliformes totales	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
Enterobacterias	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
Mohos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Levaduras	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	13	12	12	0	0	0	0	0	0

## Anexo N°9

Recuentos correspondientes a la Ensalada 2 para Enterobacterias luego del contacto con el extracto de ajo por 1, 2 y 5 minutos.

Minuto 1



Minuto 2



Minuto 5



**Anexo N°10**

**Análisis microbiológico de controles para los análisis microbiológicos de las muestras de alimentos**

Parámetro	Agua purificada Tipo II utilizada en la preparación de extractos		Agua peptonada al 0,1%, estéril		Extracto de ajo ESTÉRIL		Extracto de ajo SIN ESTERILIZAR	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<b>Enterobacterias</b>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<b>Coliformes</b>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Escherichia coli</i>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<b>Mesófilo-Aerobios</b>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<b>Mohos y Levaduras</b>	L= < 10 M=< 10	L=<10 M=<10	L=<10 M=<10	L=< 10 M=< 10	L=<10 M=<10	L=< 10 M=< 10	L=<10 M=<10	L=< 10 M=< 10

**UFC/g=** Unidades formadoras de colonias por gramo de alimento.

**L=** Levaduras

**M=** Mohos

## ANEXO N° 11

PREDICCIÓN DE CONCENTRACIONES NECESARIAS DEL EXTRACTO DE *Allium sativum* (Ajo)  
PARA IGUALAR LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LOS ANTIBIÓTICOS GENTAMICINA Y  
AMPICILINA FRENTE A LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* MRSA y *Staphylococcus aureus*  
ATCC 25923

### *Staphylococcus aureus* MRSA

- HALO DE INHIBICIÓN FRENTE A GENTAMICINA = 24.6 mm
- TEMPERATURA DEL EXTRACTO DE AJO = 35°C

Ecuación para el modelo ajustado

Halos de inhibición = 26,3676 - 0,250859\*Temperatura del extracto + 0,0180952\*Concentración del extracto

Concentración = 
$$\frac{\text{Halos de inhibición} - 26,3676 + 0,250859 \cdot \text{Temperatura del extracto}}{0,0180952}$$

Concentración = 
$$\frac{24.6 - 26,3676 + 0,250859 \cdot 35 \text{ (}^\circ\text{C)}}{0,0180952}$$

Concentración = 
$$\frac{24.6 - 26,3676 + 8,780065}{0,0180952}$$

**Concentración = 387 mg/mL**

### ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

- HALO DE INHIBICIÓN FRENTE A GENTAMICINA = 25.6 mm
- HALO DE INHIBICIÓN FRENTE A AMPICILINA = 25.4 mm
- TEMPERATURA DEL EXTRACTO DE AJO = 35°C

Ecuación para el modelo ajustado

**Halos de inhibición = 30.7851 - 0.298969\*Temperatura + 0.0180952\*Concentración**

#### **Predicción para el antibiótico gentamicina**

Concentración =  $\frac{\text{Halos de inhibición} - 30,7851 + 0,298969 * \text{Temperatura del extracto}}{0,0180952}$

0,0180952

Concentración =  $\frac{25.6 - 30,7851 + 0,298969 * 35 (\text{°C})}{0,0180952}$

0,0180952

Concentración =  $\frac{25.6 - 30,7851 + 0,298969 * 35 (\text{°C})}{0,0180952}$

0,0180952

Concentración =  $\frac{25.6 - 30,7851 + 10.463915}{0,0180952}$

0,0180952

**Concentración = 291 mg/mL**

#### **Predicción para el antibiótico ampicilina**

Concentración =  $\frac{25.4 - 30,7851 + 0,298969 * 35 (\text{°C})}{0,0180952}$

0,0180952

Concentración =  $\frac{25.4 - 30,7851 + 0,298969 * 35 (\text{°C})}{0,0180952}$

0,0180952

Concentración =  $\frac{25.4 - 30,7851 + 10.463915}{0,0180952}$

0,0180952

**Concentración = 255 mg/mL**