

# DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DEL AJO (*Allium sativum*) CONTRA *Streptococcus pyogenes* MEDIANTE EL MÉTODO POR DILUCIÓN<sup>1</sup>

ROJAS CAMACHO PATRICIA<sup>2</sup>; VILCA VEGA RONALD<sup>3</sup>

## RESUMEN

El presente trabajo de tipo prospectivo y descriptivo fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Clínica Universitaria UCEBOL con el fin de determinar la actividad antibacteriana del ajo contra el *Streptococcus Pyogenes*. Para obtener el macerado de ajo (*Allium sativum*) se utilizaron 3 tipos de solventes de distinta polaridad como son: agua destilada estéril, éter de petróleo 60-80 °C y etanol 96°C. Se utilizó ajo (*Allium sativum*) de la variedad colorada y el antibiótico bacitracina para la verificación del *Streptococcus pyogenes* y su respectiva comparación con los extractos de ajo en los diferentes solventes. La actividad antibacteriana *In vitro* del ajo (*Allium sativum*) se realizó sobre la cepa ATCC 19615 de *Streptococcus pyogenes*. Se obtuvo óptimos resultados con el extracto etílico lo que demuestra que la concentración mínima inhibitoria que tiene el extracto etílico es de 12 mg/ml ya que a concentraciones menores existe desarrollo del *Streptococcus pyogenes*.

## ABSTRACT

The present prospective and descriptive study was conducted in the Microbiology laboratory of the UCEBOL University Hospital to determine the antibacterial activity of garlic against *Streptococcus pyogenes*. In order to get the marinated garlic (*Allium sativum*) 3 types of solvents of different polarities were used such as: sterile distilled water, petroleum ether 60-80 °C and ethanol 96 °C. Garlic of the red variety (*Allium sativum*) was used and the antibiotic bacitracin for verification of *Streptococcus pyogenes* and its respective comparison with the garlic extracts in different solvents. The *in vitro* antibacterial activity of garlic (*Allium sativum*) was performed on the ATCC 19615 strain of *Streptococcus pyogenes*. The best results were obtained with the ethyl extract showing that the minimum inhibitory concentration that the ethyl extract has is 12 mg / ml and that at lower concentrations there is development of *Streptococcus pyogenes*.

**PALABRAS CLAVE:** Actividad antibacteriana.- Ajo.- *Streptococcus pyogenes*.-Método de dilución

**KEY WORDS:** Antibacterial activity. - *Streptococcus pyogenes*. Garlic-dilution method

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El empleo de las plantas medicinales con fines terapéuticos ha estado siempre presente en la vida del hombre, y mantiene una amplia validez a pesar del poderío y de la competencia de la química farmacéutica, basada fundamentalmente en principios activos de síntesis.

Pasteur, considerado uno de los científicos más reconocido dentro de la Medicina convencional, en el año 1858 estudió los efectos antibióticos del *Allium sativum* y quiso comprobar el efecto antibacteriano en infecciones respiratorias del tracto superior logrando excelentes resultados en su investigación (Saavedra, 2000). El Padre de la Medicina Hipócrates, prescribía bulbos de ajo para el tratamiento de un considerable número de síntomas y/o enfermedades. Además los chinos también utilizan el bulbo de ajo ingiriendo en ayunas para desintoxicar el organismo desde hace 3 mil años (Hidalgo, 2007).

También se ha podido comprobar el efecto antimicrobiano del *Allium sativum* (ajo) a través de diversos estudios *in vitro* llegando a determinar su componente antimicrobiano efectivo

contra bacterias Gram positivas y Gram negativas llamado alicina, muy útil para el sistema respiratorio, digestivo y afecciones de la piel (Pelayo, 2007). Debido al problema de resistencia bacteriana por el uso indebido de antibióticos como resultado de la automedicación, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento con la menor cantidad de reacciones adversas posibles. Para ello se deberán realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* demostrando sus propiedades terapéuticas y su eficacia ante los distintos tipos de microorganismos patógenos -los cuales son causantes de infecciones a nivel de las vías respiratorias del tracto superior- determinando la (CIM) concentración mínima inhibitoria del antibacteriano de origen vegetal para comprobar su eficacia (Pérez, 1998).

***Allium sativum* (ajo):** Se trata de una hierba anual perenne, caracterizada por crecer formando bulbos de hasta veinte dientes o más (Rubén, 1998). Su nombre botánico es *Allium sativum*. El término *Allium* procede de la palabra celta *all*, que significa ardiente o caliente, mientras que *sativum* es un término latino que significa cultivado (García *et al.*, 2000). Se conoce desde tiempos remotos, habiéndose utilizado por la ma-

1 Tesis de grado de Carrera de Bioquímica y Farmacia 2008-2009 UCEBOL

2 Estudiante Tesista de Carrera de Bioquímica y Farmacia.-UCEBOL

3 Docente Asesor. Lic. En Bioquímica y Farmacia.-UCEBOL

yoría de las culturas, desde los antiguos egipcios, romanos, griegos, hasta en la misma India u Oriente. Su origen se ubica en Asia central, donde se extendió ampliamente y se encuentra naturalizado en muchas partes del Mundo (Gómez, 2004).

Es una planta con hojas planas alargadas y una capa que envuelve alrededor de las flores, las cuales son de un color blanco verdoso o rosadas y se encuentran agrupadas en el extremo de un largo tallo, el cual surge directamente del bulbo de la flor. El bulbo es bien conocido, de color blanco cremoso, compuesto de dientes cubiertos con bractes membranosas (Fulder & Blackwood, 1997). La posición taxonómica e identificación del ajo según Rubén (1998) es la siguiente: **División:** Magnoliophyta; **Clase:** Liliopsida; **Subclase:** Alliioideae; **Orden:** Asparagales; **Familia:** Alliaceae; **Género:** *Allium*; **Especie:** *sativum*; **Nombre binomial:** *Allium sativum* L.



**Nombres comunes (en otros idiomas):** ajo (español), garlic (english), Knoblauch (alemán), ail (francés), aglio (italiano).

El ajo aumenta la actividad de las células defensivas del organismo como antibiótico natural (Pamplona, 1997). Actualmente están documentadas muchas de sus propiedades, entre las que destacan su acción: antioxidante, hipolipemiente, antiaterogénica, antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica, anticarcinogénica, antitumorogénica e inmunomoduladora. Todas estas propiedades farmacológicas se atribuyen principalmente a sus componentes azufrados (López, 2007).

**Cuadro 1. Composición química del ajo (*Allium sativum*) por cada 100 gramos**

Componentes	Medida	Promedio	Componentes	Medida	Promedio
Agua	g	6.05	Yodo	μg	440
Proteínas	g	0.12	Boro	μg	5.69
Lípidos	g	28.41	Vitamina E	μg	100
Carbohidratos	g	1.42	Alfa-tocoferol	μg	90
Calcio	μg	460	Vitamina B1	μg	200
Manganeso	mg	1.40	Vitamina B2	μg	80
Hierro	μg	149	Nicotinamida	μg	600
Cobre	μg	575	Vitamina C	mg	14
Zinc	μg	10	Acido salicílico	μg	100
Molibdeno	μg	1.80	Acido láurico	mg	24
Aluminio	mg	134	Acido esteárico	mg	3
Fósforo	mg	30	Acido oleico	mg	62
Cloro	μg	2.70	Acido linoleico	mg	5.50

Fuente: (García et al., 2000).

**Cuadro 2. Compuestos azufrados del ajo**

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

Fuente: (Souci et al., 1994).

**Cuadro 3. Compuestos no azufrados del ajo.**

Compuesto	Actividad biológica
Adenosina	Hipotensora, vasodilatadora, miorelajante. Estimula la síntesis de hormonas esteroídicas.
	Estimula la liberación de glucagón
Fructanos	Efectos cardioprotectores
Fracción proteica F-4	Estimula el sistema inmune por medio de macrófagos y células esplénicas.
Quercitina	Estabiliza los mastocitos. Ejerce por tanto efectos beneficiosos en el asma y la alergia.
Saponinas (Gitonina F, Eurobosico B) Escordina	Hipotensoras. La Gitonina F es antivírica, el Eurobosico B es antifúngico.
Selenio	Antioxidantes, antiinflamatorios
Ácidos fenólicos	Antivíricos, antibacteriano.

Fuente: (Drago et al., 2006).

**Familia Streptococcacea:** Esta familia de bacterias constituye la causa de las enfermedades más difundidas de mayor morbilidad en los seres humanos, abarca un gran número de especies saprófitas, así como patógenas y no patógenas, algunas forman parte de la flora normal de la boca y el intestino humano (Koneman et al., 1999).

Rodríguez (2000), señala que estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden hallarse en la leche, productos lácteos, el agua, polvo, vegetales y tracto respiratorio e intestinal normales de varios animales, inclusive en el hombre. Son bacterias grampositivas catalasas negativas, que tienden a desarrollarse en pares y cadenas, no poseen esporas, son inmóviles, anaerobias facultativas y

algunas especies son estrictas requieren para su crecimiento dióxido de carbono es necesario el uso de medios enriquecidos con sangre o suero para su aislamiento, fermentan los hidratos de carbono con producción de ácido láctico, son separadas de manera arbitraria en alfa-hemolíticas, beta-hemolíticas y no hemolíticas (Murray *et al.*, 1997).

### ***Streptococcus pyogenes***

Estos microorganismos son cocos grampositivos que normalmente se disponen en parejas o en cadenas, la mayoría de estas especies son anaerobios facultativos, y algunos crecen solo en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono. *Streptococcus pyogenes* se encuentra clasificado en el grupo A de los *Streptococcus*, son la causa más frecuente de faringitis bacteriana (Myrvik & Weiser, 1991). Es el patógeno humano principal relacionado con invasión local, generalizada y trastornos inmunitarios posestreptocócicos. En forma típica producen zonas grandes de hemólisis de 1cm de diámetro y alrededor de las colonias mayores de 0.5 mm de diámetro, son positivos a PYR (hidrólisis de L-pirrolidionil-2-naftilamida) y en general son susceptibles a la bacitracina (Jawetz *et al.*, 1992).

Los estreptococos del grupo hemolítico producen enzimas las cuales son: estreptocina llamada fibrinolisisina, capaz de activar una proenzima, existente en el plasma normal, y producir una enzima fibrinolítica; es decir pueden destruir la fibrina el cual es un componente esencial del coágulo sanguíneo. La estreptodornasa, con acción lítica sobre exudados que se forman en procesos infecciosos. La acción de la hialuronidasa permite un aumento de la permeabilidad de los tejidos al paso del microorganismo. Otras enzimas que se encuentran dentro del grupo hemolítico son: nucleasa, nucleotidasa, proteinasa, y beta-glucuronidasa (Huapaya, 2007).

### **Sustancias derivadas del ajo**

En años recientes se ha logrado obtener una sustancia derivada del *Allium sativum* (ajo) a la que se ha denominado ajoeno. Su acción abarca un amplio espectro. Han sido demostrados sus efectos antiviral, antimicrobiano, antiprotzoario, antimutagénico y modulador de las funciones dependientes de membrana en las células del sistema inmune (González *et al.*, 1998). En estudios realizados en diferentes laboratorios del mundo, se ha visto que el ajo (*Allium sativum*) contiene compuestos como la alicina y la alistatina de comprobada acción antibacteriana y ejerce una acción inhibitoria sobre el crecimiento de géneros bacterianos tan diversos como: *Aerobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Citrella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Clostridium sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Micrococcus sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, y *Vibrio sp* (Sivam, 2001 citado por García & Herrera, 2007)

En el Laboratorio de Micología, Instituto de Biomedicina, San Nicolás a Providencia, San José, Caracas, Venezuela se evaluó la sensibilidad *in vitro* de un aislamiento de *Trichophyton rubrum* y un aislamiento de *Trichophyton mentagrophytes* frente al ajoeno, encontrándose que este compuesto logró inhibir el crecimiento de ambos aislados mostrando una con-

centración mínima inhibitoria de 60 µg/mL y una concentración mínima fungicida de 75 µg/mL (González *et al.*, 1998).

### **MATERIALES Y METODOS**

El trabajo fue efectuado en la ciudad de Santa Cruz de la Sierrra en el laboratorio de Microbiología de la Clínica Universitaria (UCEBOL) situada al norte en el km 5½. La duración de esta investigación fue de ocho meses desde Octubre del 2008 hasta Junio del 2009.

La población objetivo está comprendida por las plantas de ajo de la especie de *Allium sativum L.* de la familia Alliaceae procedentes del mercado Abasto.

El presente trabajo es de tipo: Prospectivo y Descriptivo.

Para realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria del ajo, se realizaron ensayos por dilución para determinar la concentración adecuada de principio activo extraído del ajo.

La cepa de *Streptococcus pyogenes* que corresponde a la ATCC 19615 utilizada fue obtenida y certificada por el Laboratorio de Referencia en Bacteriología clínica INLASA (Instituto de Laboratorios de Salud) de La Paz.

Se recolectó el bulbo de ajo (*Allium sativum*) de la variedad colorada en el Mercado Abasto de la ciudad de Santa Cruz. El estudio taxonómico del bulbo se realizó en el Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado, certificando la familia, especie de la planta en estudio.

### **Descripción del procedimiento**

Se utilizó 3 tipos de solventes de diferente polaridad: agua destilada estéril (elevada polaridad), etanol 96 °C (intermedia polaridad), éter de petróleo 60-80 °C (baja polaridad).

### **1° Fase**

#### **Preparación del medio cultivo**

- Se preparó 40 g de TSA (agar tripticasa soja) y se reconstituyó el medio en 100 mL de agua destilada mezclando bien sin formar grumos y se procedió al enriquecimiento del medio agregando 5 mL de sangre de carnero por cada 100 mL de medio TSA manteniendo la temperatura menor a 40 °C se realizó el fraccionamiento del medio en tubos de vidrio.

### **2° Fase**

#### **Siembra de la bacteria**

- Se realizó la siembra de la cepa de *Streptococcus pyogenes* que corresponde a la ATCC 19615 sobre el medio sólido TSA estéril enriquecido con sangre de carnero al 5% depositándolo en un área pequeña de la superficie de la placa próxima al borde. Extendiendo el inóculo formando estrías muy juntas sobre la superficie de la placa.
- Luego se procedió llevar a incubación de forma invertida en la estufa durante 18 horas en condiciones de anaerobiosis; a una temperatura de 35° C.

### **3° Fase**

#### **Preparación de la suspensión bacteriana**

- En un tubo estéril se agregó 1ml de solución fisiológica estéril y a temperatura ambiente.

- Se procedió a tomar una parte de colonias aisladas de la siembra con un hisopo estéril humedecido con solución fisiológica.
- Se comparó la suspensión con la escala a la 0.5 de Mc Farland.

#### 4° Fase

##### Preparación de los macerados

- Se utilizó 3 ml de cada tipo de solventes: agua destilada estéril, etanol 96 °C, éter de petróleo 60-80 °C.
- En un tubo estéril se preparó 3 ml de solvente y 2 g de ajo pelado y triturado. Dejando macerar durante 5 días al resguardo de la luz.

#### 5° Fase

##### Dilución en tubo de los macerados

- Se preparó las diluciones en tubos de vidrio con los 3 tipos de macerados obtenidos en la 4° fase. Los 3 solventes utilizados fueron: agua destilada estéril, etanol 96 °C, éter de petróleo 60-80 °C.

##### • Tubo 1

- Se colocó 700 µl de solvente y 300 µl del macerado de la 4° fase y posteriormente se procedió al mezclado.

##### • Tubo 2

- Se agregó 500 µl de solvente y se tomó una alícuota de 500 µl del macerado del tubo 1 y posteriormente se procedió al mezclado.

##### • Tubo 3

- Se añadió 500 µl de solvente y se tomó una alícuota de 500 µl del macerado del tubo 2 y posteriormente se procedió al mezclado.

##### • Tubo 4

- Se midió 500 µl de solvente y se tomó una alícuota de 500 µl del macerado del tubo 3 y posteriormente se procedió al mezclado.

##### • Tubo 5

- Se procedió a medir 500 µl de solvente y se tomó una alícuota de 500 µl del macerado del tubo 4 y posteriormente se procedió al mezclado (Anexo 8).

#### 6° Fase

##### Preparación de los macerados en medio sólido por duplicado

- Se preparó en medio sólido por duplicado con los macerados obtenidos con diferentes solventes (agua destilada estéril, etanol 96 °C, éter de petróleo 60-80 °C) que fueron sometidos a diluciones.

##### • Tubo 1

- Se agregó 100 µl del macerado obtenido del tubo 1 de la 5° fase junto con 20 µl de suspensión bacteriana y a esto se agregó 900 µl de agar sangre no solidificado, se mezcló y se dejó solidificando.

##### • Tubo 2

- Se colocó 100 µl del macerado obtenido del tubo 2 de la 5° fase junto con 20 µl de suspensión bacteriana y a esto se agregó 900 µl de agar sangre no solidificado, se mezcló y se dejó solidificando.

##### • Tubo 3

- Se midió 100 µl del macerado obtenido del tubo 3 de la 5° fase junto con 20 µl de suspensión bacteriana y a esto se adjuntó 900 µl de agar sangre no solidificado, se mezcló y se dejó solidificando.

##### • Tubo 4

- Se añadió 100 µl del macerado obtenido del tubo 4 de la 5° fase junto con 20 µl de suspensión bacteriana y a esto se agregó 900 µl de agar sangre no solidificado, se mezcló y se dejó solidificando.

##### • Tubo 5

- Se preparó 100 µl del macerado obtenido del tubo 5 de la 5° fase junto con 20 µl de suspensión bacteriana y a esto se agregó 900 µl de agar sangre no solidificado, se mezcló y se dejó solidificando.

- Se llevó los 3 tipos de macerados en medio sólidos a incubación en la estufa durante las 18 horas a 35 °C en condiciones de anaerobiosis.

#### 7ma Fase

##### Dilución del macerado etílico

##### • Tubo 1

- Se midió 1400 µl de etanol 96 °C y se agregó 600 µl del macerado de ajo posteriormente se mezcló.

##### • Tubo 2

- Se agregó 2000 µl de etanol 96 °C y se sacó 2000 µl de macerado del tubo 1 se mezcló.

##### • Tubo 3

- Se colocó 2000 µl de etanol 96 °C y se sacó 2000 µl de macerado del tubo 2 se mezcló.

##### • Tubo 4

- Se tomó 2000 µl de etanol 96 °C y se sacó 2000 µl de macerado del tubo 3 se mezcló.

##### • Tubo 5

- Se preparó 2000 µl de etanol 96 °C y se tomó 2000 µl de macerado del tubo 4 procediendo al mezclado.

##### • Tubo 6

- Se midió 160 µl de etanol 96 °C y se sacó 3840 µl de macerado del tubo 5 y luego se mezcló.

##### • Tubo 6.1.

- Se preparó con 1000 µl de etanol 96 °C y se tomó 1000 µl de macerado del tubo 6 y se homogeneizó.

##### • Tubo 7

- Se midió 500 µl de etanol 96 °C y luego se adjuntó 1500 µl de macerado del tubo 6 y luego se mezcló.

## 8va Fase

### Siembra en profundidad en placa por duplicado

#### Caja Petri 1

- Se colocó 500 µl del macerado del tubo 5 en la 9° fase y se agregó 100 µl de suspensión bacteriana, se adjuntó 4500 µl del agar sangre no solidificado, se homogenizó hasta que se solidificó.

#### Caja Petri 2

- Se preparó 500 µl del macerado del tubo 6 en la 9° fase y se agregó 100 µl de suspensión bacteriana. Se adjuntó 4500 µl del agar sangre no solidificado, se homogenizó hasta que se solidificó.

#### Caja Petri 2.1.

- Se midió 500 µl del macerado del tubo 6.1 en la 9° fase y se agregó 100 µl de suspensión bacteriana. Se adjuntó 4500 µl del agar sangre no solidificado, se homogenizó hasta que se solidificó.

#### Caja Petri 3

- Se preparó 500 µl del macerado del tubo 7 en la 9° fase y se agregó 100 µl de suspensión bacteriana. Se adjuntó 4500 µl del agar sangre no solidificado, se homogenizó hasta que se solidificó.
- Se llevaron a incubar las cajas Petri forma invertida. a 35 °C durante 18 horas en condiciones de anaerobiosis.

## 9na Fase

### Preparación de los controles

- Control de esterilidad**, se añadió 4500 µl (caja Petri) o 900 µl en (tubo) de agar sangre no solidificado y se dejó incubando durante 18 horas a 35 °C en condiciones de anaerobiosis.
- Control del solvente**, se añadió 4500 µl (caja Petri) o 900 µl en (tubo) de agar sangre no solidificado y 500 µl (caja Petri) o 100 µl (tubo) de los diferentes solventes (agua destilada estéril, alcohol etílico 96 °C, éter de petróleo 60-80 °C) y se dejó incubando durante 18 horas a 35 °C en condiciones de anaerobiosis.
- Control del crecimiento**, en una caja Petri estéril se añadió 4500 µl (caja Petri) o 900 µl (tubo) de agar sangre no solidificado y 100 µl (caja Petri) o 20 µl (tubo) de la suspensión bacteriana al 0.5 de Mc Farland preparada de la cepa ATCC 19615 que corresponde a la especie *Streptococcus pyogenes* y se dejó incubando durante aproximadamente 18 horas a 35 °C en condiciones de anaerobiosis.

### Variables estudiadas

- Actividad antibacteriana** porque, la actividad antibacteriana no siempre está presente en todos los extractos de plantas.
- Solventes:** agua destilada estéril, éter de petróleo 60-80 °C y etanol al 96 °C porque, los solventes cumplen la función de extraer los principios activos que se encuentre en

la muestra, por afinidad según las polaridades que estos presenten.

- La concentración mínima inhibitoria** porque, no todos los principios activos tendrán la misma capacidad inhibitoria a iguales concentraciones.

### Análisis estadístico

Para el estudio de las variables se aplicó la herramienta de estadística descriptiva, realizando la tabulación de resultados y diseño de gráficos con el programa de Microsoft Excel versión 2007.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Controles de Calidad Internos

El control de crecimiento permite evaluar la viabilidad de la bacteria sobre el medio de cultivo empleado. El control de esterilidad permite evaluar las condiciones asépticas del trabajo. El control del solvente permite demostrar que el solvente no aporta carga microbiana (Figura 3).

#### Cuadro 4. Prueba de controles internos de calidad

CONTROLES	RESULTADO
CONTROL DE CRECIMIENTO	DESARROLLO
CONTROL DE ESTERILIDAD	SIN DESARROLLO
CONTROL DE SOLVENTE	SIN DESARROLLO

### Control de crecimiento Control de solvente Control de esterilidad

Figura 3. Controles de calidad internos

Fuente: elaboración propia

El control de crecimiento, indica la viabilidad del microorganismo, en caso de no desarrollarse es un indicio que el microorganismo no es viable. En este ensayo la bacteria se desarrolló adecuadamente.

El control del solvente, se realiza para demostrar que no existe aporte microbiano. Por lo tanto no debe existir desarrollo microbiano. Para la realización del trabajo, la bacteria no se desarrolló con el solvente, demostrándose que no existió una contaminación en el solvente.

El control de esterilidad, se realiza para demostrar que no existe contaminación en las condiciones de trabajo efectuadas. En los resultados obtenidos se encontró que no existe desarrollo de microorganismo alguno, por lo tanto las condiciones de trabajo fueron realizadas en condiciones de esterilidad.

### Ensayo en tubo del macerado con agua destilada estéril en medio sólido por duplicado.

La actividad del macerado acuoso frente a la bacteria *Streptococcus pyogenes* a concentración de hasta 20 mg/ml, no presentó una actividad inhibitoria en ninguna de las concentraciones realizadas (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Macerado en tubo de *Allium sativum* obtenido con agua destilada estéril, a concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/ml con medio sólido por duplicado.**

CONCENTRACIÓN	SOLVENTE AGUA DESTILADA ESTÉRIL
20 mg/ml	100
10 mg /ml	100
5 mg/ml	100
2,5 mg/ml	100
1,25 mg/ml	100

0 = Sin desarrollo bacteriano  
100 = Con desarrollo bacteriano

Investigaciones realizadas por Guimet *et al.* (2006), afirman que la ausencia de actividad en el caso específico de *Allium sativum* puede deberse a que la alicina y ajoeno, metabolitos de marcada actividad antibacteriana, son compuestos que tienen limitada actividad en los extractos obtenidos por hidrodestilación. Esto sin olvidar que los microorganismos gram positivos esporulados, como es el caso de *Bacillus*, han demostrado siempre más resistencia a los antimicrobianos.

**Ensayo en tubo del macerado con etanol 96 °C en medio sólido por duplicado.**

El macerado etílico frente al *Streptococcus pyogenes* no presentó actividad inhibitoria a concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/ml., pero a la concentración de 20 mg/ml, presentó inhibición del crecimiento bacteriano. Pudiendo tener actividad inhibitoria entre los límites de 10 a 20 mg/ml (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Macerado en tubo de *Allium sativum* obtenido con alcohol etílico a 96 °C, a concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/ml con medio sólido por duplicado.**

CONCENTRACIÓN	SOLVENTE ETANOL
20 mg/ml	0
10 mg /ml	100
5 mg/ml	100
2,5 mg/ml	100
1,25 mg/ml	100

0 = Sin desarrollo bacteriano  
100 = Con desarrollo bacteriano

De acuerdo a Brown (2001), en la Bath spa University College (UK) se realizó una investigación con un método cuantitativo, que implicaba el recuento de colonias para evaluar los efectos antibióticos de los ajos (*Allium sativum*) sobre las bacterias que originan toxiinfecciones alimentarias. Se investigó durante tres días el efecto de diferentes concentraciones de ajo, que variaban desde un 0% a un 20% sobre una base de carne de pollo que había estado inoculada con *Escherichia coli* o con *Staphylococcus aureus*. El número de bacterias se redujo a lo

largo de este periodo de incubación a medida que aumentaba la concentración de ajo. El calentamiento del ajo durante 30 minutos a 100 °C destruía su actividad antibacteriana.

**Ensayo en tubo del macerado con éter de petróleo de 60-80 °C en medio sólido por duplicado.**

La actividad del extracto etéreo frente a la bacteria de manera análoga al anterior no presentó actividad a concentración de hasta 20 mg/ml, por tanto a las concentraciones realizadas no se evidenció actividad inhibitoria (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Macerado en tubo de *Allium sativum* obtenido con éter de petróleo de 60-80 °C, a concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/ml con medio sólido por duplicado.**

CONCENTRACIÓN	SOLVENTE ÈTER DE PETRÒLEO
20 mg/ml	100
10 mg /ml	100
5 mg/ml	100
2,5 mg/ml	100
1,25 mg/ml	100

0 = Sin desarrollo bacteriano  
100 = Con desarrollo bacteriano

De acuerdo a los estudios realizados por Troncoso (2001), el ajo actúa contra las bacterias que provocan intoxicación alimentaria en el sistema digestivo humano a partir de su compuesto alicina. Refirió que la acción *in vitro* actúa contra los microorganismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Tricomonas*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Herpes simples*, *Influenza B*, así como algunas bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos (dermatofitos y levaduras). Se ha comprobado además clínicamente su eficacia en tratamientos de disentería bacilar, con un 67 por ciento de eficacia, y amebiana, con un 88 por ciento de eficacia.

**Ensayos *In vitro* en caja Petri por duplicado de los macerados etílicos de 96 °C.**

Los ensayos *In vitro* en duplicado del macerado etílico, mostraron actividad inhibitoria a concentraciones de 18, 16, 14 y 12 mg/ml, siendo inactivo a la concentración de 10mg/ml (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Macerados de *Allium sativum* obtenidos con etanol a concentraciones de 18, 16, 14, 12 y 10 mg/ml.**

	CONCENTRACIÓN				
	18 mg/ml	16 mg/ml	14 mg/ml	12 mg/ml	10 mg/ml
CRECIMIENTO 1	0	0	0	0	100
CRECIMIENTO 2	0	0	0	0	100

0 = Sin desarrollo bacteriano  
100 = Con desarrollo bacteriano

En estudios realizados por Hall *et al.* (2002), en extracto de ajo fresco, la actividad antibacteriana ha sido probada contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Brucellas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Aeromonas*.

Según Tsao & Yin (2001), las investigaciones relacionadas con la actividad antiinfecciosa del ajo son numerosas y abarcan un amplio espectro de gérmenes. En principio, la alicina le brinda a esta planta protección frente a agentes contaminantes, ya que se han comprobado *in vitro* efectos antibacterianos y antimicrobicos sobre gérmenes fitopatógenos.

El mecanismo de acción antimicrobiana de los extractos de ajo estaría en relación con alguno de los mecanismos involucrados en la actividad inmunomoduladora: estimulación fagocitaria de macrófagos, estimulación linfocitaria e inhibición de la síntesis del ARN.

Las bacterias más sensibles a los componentes sulfurados del ajo resultaron ser *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Providencia sp.*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia sp.*, *Aeromonas sp.*, *Vibrio cholerae* y *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*. Respecto a *Pseudomonas aeruginosa* un ensayo con extracto en polvo de ajo no reveló actividad, en cambio otro estudio realizado con el aceite obtenido por destilación rico en dialil-disulfuro, ha resultado positivo.

### Ensayo *In vitro* en caja Petri del macerado con etanol 96 °C en medio sólido por duplicado.

Los ensayos *In vitro* de los macerados etílicos de 96 °C a diferentes concentraciones indicaron una concentración mínima inhibitoria de 12.0 mg/ml contra el *Streptococcus pyogenes* (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Ensayos *In vitro* en caja Petri por duplicado de los macerados etílicos de 96 °C a concentraciones de 12, 11.5, 11.0, y 10.5 mg/ml**

CONCENTRACIÓN				
	12 mg/ml	11,5 mg/ml	11 mg/ml	10,5 mg ml
<b>CRECIMIENTO 1</b>	0	100	100	100
<b>CRECIMIENTO 2</b>	0	100	100	100

0 = Sin desarrollo bacteriano  
100 = Con desarrollo bacteriano

Según Domingo & López (2003), las propiedades antimicrobianas del ajo se deben a la alicina (dialil sulfato) una sustancia que se forma a partir de la acción de la enzima aliinasa, actuando sobre la aliina que forma parte de los dientes de ajo, al machacarlos, esta actividad se confirmó frente a: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y otros patógenos, al igual que se resalta que se puede alcanzar menores concentraciones mínimas inhibitorias cuando se obtiene vapores de ajo concentrados en aceite vegetal.

Según investigaciones realizadas por Pérez (2002), sobre la actividad antimicrobiana del ajo (*Allium sativum*) se debe a un

aceite llamado disulfuro oxido de dialilo que se obtiene por destilación al vapor dicho aceite es utilizado para el tratamiento de algunas bacterias. Por otro lado estudios recientes han demostrado que el jugo de ajo inhibe el crecimiento de bacterias del género *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus sp.* (incluyendo *B. dysenteriae* y *B. enteritidis*) y *Vibrio sp.* (*V. cholerae*) diluido a 1:125,000 y muestra un amplio espectro de actividad contra hongos y muchas cepas de levaduras (*Candida albicans*).

### CONCLUSIONES

- Se obtuvieron macerados de ajo con solventes de diferente polaridad para determinar el solvente que arrastre con facilidad los compuestos azufrados con actividad antibacteriana, el cual el solvente que tenía mayor afinidad con los principios activos del ajo es el alcohol etílico de 96 °C porque fue con el que se obtuvo la concentración mínima inhibitoria.
- Los controles internos demostraron que la cepa tenía una adecuada viabilidad además que las condiciones de trabajo fueron desarrolladas de manera estéril.
- De los solventes empleados con agua y éter de petróleo, no se presentó ninguna actividad antibacteriana frente a *Streptococcus pyogenes* a concentraciones de hasta 20,0 mg/ml. Con el solvente de etanol a 96 °C presentó una concentración mínima inhibitoria de 12,0 mg/ml, frente a la misma bacteria.
- Se verificó la actividad e interacción mediante el control del solvente que puedan tener entre el medio de cultivo y el solvente con respecto a la actividad antibacteriana. El cual se obtuvo un resultado óptimo con los tres solventes al no haber ningún cambio en el medio de cultivo.

### RECOMENDACIONES

- Se sugiere tomar en cuenta los valores de las concentraciones mínima inhibitoria para la elaboración de formas farmacéuticas destinadas al consumo humano, empleando alcohol etílico como solvente ya que otorga una concentración mínima inhibitoria reducida en comparación a los otros solventes.
- Para la aplicación de estos resultados, se necesitaría comprobar su eficacia *In vivo* en animales de experimentación. Considerando que los resultados obtenidos proporcionan información valiosa acerca de la efectividad del *Allium sativum in vitro* sobre la bacteria *Streptococcus pyogenes*.
- Al mismo tiempo se sugiere amplificar la acción del espectro antibacteriano que puede cumplir el bulbo de esta planta. Además diversos estudios atribuyen principalmente la actividad quimiopreventiva a los derivados organosulfurados del ajo, incluyendo la S-aliilcisteína, han sido capaces de retrasar el crecimiento de tumores inducidos químicamente y transplantados en diversos modelos animales.
- Por último, *in vitro* la alicina ha demostrado ser activa con-

tra bacterias grampositivas y gramnegativas, aunque en esta acción parece que también contribuyen los ajoenos y el trisulfuro de dialilo y sus principios activos, que son una fuente importante de fármacos en los que ya trabaja la industria, por tanto se sugiere que se trabaje con estos compuestos purificados para demostrar su acción antibacteriana.

- En los últimos 20 años los avances en la industria farmacéutica han sido notorios en la obtención de productos antimicrobianos. Sin embargo, se continúa tratando de optimizar el espectro de acción de los medicamentos y de minimizar los efectos secundarios, siendo áreas de investigación que se pueden seguir enriqueciendo.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA (Resumen)

1. **ACAMPORA, E. 2000.** Fish guard y Alicina. Santiago-Chile. Fuente: (<http://www.raphael.com.ve/multimedia/Temas/Fitoterapia/Plantas%20Medicinales./Ajo/02%20-%20ALICINA.pdf>)
2. **BAHA, L. 2000.** Ajo, hipertensión y colesterol. Vol. 50. Madrid- España. Fuente: (<http://foros.hispavista.com/nutriforo/1264/238574/m/ajohipertensi%C3%93n-y-colesterol/pdf>).
3. **BAILEY, R & E. SCOTT. 2004.** Diagnostico microbiológico. N° 11° Edición. Buenos aires, Argentina. Editorial Panamericana. pp.160-165.
4. **BLOCK, E. 2000.** Legislación y tecnología alimentaría. Cataluña – España. Fuente: (<http://www.gencat.cat/salut/depsalut/pdf/esbut81.pdf>).
5. **BROWN, P. 2001.** Los efectos antibióticos del ajo. Vol. 81. USA. Fuente: (<http://www.gencat.cat/salut/depsalut/pdf/esbut81.pdf>).
6. **BUSTILLOS, I. 2005.** Plantas medicinales antigua y nueva alternativa de salud. Bogotá - Colombia. Fuente: (<http://www.saludparati.com/ajo.pdf>).
7. **CARMONA, O; M. GÓMEZ; T. MONTES; C. MARCANO & F. MARIÑO. 1998.** Microbiología medica de Alejandro Divo. N° 5° Edición. Caracas, Venezuela. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. pp. 125-130.
8. **CARRETERO, M. 2007.** Importancia del ajo en el mantenimiento de la salud. Madrid-España. Fuente: ([http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/F2C70208811F4046C12571630035E050/\\$File/292\\_plantas.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/F2C70208811F4046C12571630035E050/$File/292_plantas.htm))
9. **DÍAZ, R.; C. GAMAZO & I. LOPÉZ. 1999.** Manual práctico de microbiología. N° 2° Edición. Barcelona, España. Editorial Masson. pp. 129-208.
10. **DIAZ, L & K. JIMÉNEZ. 2008.** Validación de un método de extracción de alicina en ajo y su cuantificación por HPLC. Santiago de Queretaro – México. Fuente: ([http://www.cenam.mx/simp-sio2008/sm\\_2008/memorias/S2/SM2008-S2A2-1066.pdf](http://www.cenam.mx/simp-sio2008/sm_2008/memorias/S2/SM2008-S2A2-1066.pdf))
11. **DIVO, C. 2001.** Microbiología Médica. N° 6 Edic. Madrid, España. Editorial. Interamericana Mc. Graw, Hill.pp.382-385.
12. **DOMINGO, D. & B. LÓPEZ. 2003.** Plantas con acción antimicrobiana. Volumen 16. Barcelona, España. Fuente: (<http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>).
13. **DRAGO, M.E.; M. LOPEZ& T. SAINZ. 2006.** Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas. 37: 58-68 Fuente:(<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=579408>>pdf).
14. **FULDER, S & J. BLACKWOOD. 1997.** El Ajo Un Remedio Natural. Vol. I Madrid. Fuente:([http://www.boonebridgebooks.com/El\\_Ajo\\_Un\\_Remedio\\_Natural\\_PH\\_D\\_Fulder\\_John\\_Blackwood\\_Stephen\\_Fulder-i-0892815809.pdf](http://www.boonebridgebooks.com/El_Ajo_Un_Remedio_Natural_PH_D_Fulder_John_Blackwood_Stephen_Fulder-i-0892815809.pdf)).
15. **GARCÍA, G; L. JACINTO & J. SÁNCHEZ. 2000.** Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*) Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Print ISSN 0004-0622. Fuente:([http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/revisio\\_n\\_efectos\\_cardiovasculares\\_de\\_ajo.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/revisio_n_efectos_cardiovasculares_de_ajo.pdf) ).
16. **GARCÍA, R & F. HERRERA. 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*. Bucaramanga – Colombia. Fuente: (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/903/90350207/90350207.html>).
17. **GÓMEZ, R. 2004.** Origen e historia del ajo. Madrid- España. Fuente: (<http://www.saberesysabores.com.ar/ajo.pdf> ).
18. **GONZÁLES, J M. 2004.** Técnicas y métodos de laboratorio clínico. 2° Edición. Elsevier-España. Editorial MASSON. pp. 228-229.