

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE DOS ESPECIES
VEGETALES SOBRE *Escherichia coli* Y *Klebsiella pneumoniae***

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

**DIEGO FERNANDO PALMA CATALAN
LUIS ERNESTO HERNANDEZ MENENDEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

OCTUBRE 2016

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR INTERINO

LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERINA

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA DE:

**CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y
COSMETICOS**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edth Herrera Salazar

DOCENTES ASESORES

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de El Salvador, especialmente a la Facultad de Química y Farmacia y a todos sus docentes por haber contribuido, a través de sus conocimientos y consejos, a mi formación académica y profesional durante estos cinco años.

Al personal de CENSALUD, por habernos facilitado todo el material y equipo necesario, incluyendo sus instalaciones, para llevar a cabo la parte experimental de nuestro trabajo de graduación.

A nuestros docentes asesores; por su apoyo, empeño y dedicación durante la realización de nuestro trabajo de graduación.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, por facilitarnos sus instalaciones y equipo para realizar los procesos de extracción del ajo chino y la cebolla morada.

A mi familia, y, con especial gratitud y afecto, a mis padres por sus constantes cuidados, consejos, dedicación y sacrificios durante todo el periodo de mi formación académica e intelectual. Les estoy profundamente agradecido.

A mi compañero de tesis y amigo, Fernando Palma, por horas de trabajo extenuante en la realización de este trabajo de graduación, horas de estudio y, principalmente, por su apoyo y amistad inalienable. Muchísimas gracias, campeón.

Luis Hernández.

Les agradezco en primer lugar a Dios y a su madre la virgen María por haberme permitido culminar mi carrera exitosamente, a mis padres, hermana y abuelo por estar conmigo en cada una de las etapas de mi formación profesional, brindándome su apoyo, consejos, y palabras de aliento. Sin duda fueron el pilar fundamental de mi formación por haber luchado sin límites para lograr alcanzar tan anhelada meta.

Agradezco a mi novia por ser ese apoyo incondicional en la etapa final de mi formación profesional. Por su paciencia, amistad y entrega.

Agradezco a nuestras asesoras MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez y MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz por la paciencia que tuvieron, por su apoyo y por dedicar parte de su tiempo para culminar nuestro trabajo de graduación. A quien fue parte nuestro jurado calificador de inicio a fin, Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez por haber dado su tiempo y conocimientos sin mayor interés que el de ayudarnos en nuestra formación y desempeño.

Agradecimientos especiales a cada uno de los maestros, maestras, laboratoristas que nos ayudaron en diferentes momentos de la carrera.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) y al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, ambos de la facultad de Química y Farmacia por prestarnos sus instalaciones y materiales para realizar los diferentes análisis.

Gracias a mi amigo y compañero de tesis, Luis Hernández, por su esfuerzo y apoyo, no solo en el presente trabajo, sino también durante estos años de amistad en donde aprovechamos a formarnos como profesionales. Lo logramos amigo.

Diego Fernando Palma.

DEDICATORIA

A mis padres: Ana Adilia y Luis Hernández, por ser un apoyo incalculable durante mi desarrollo académico.

A mi familia y amigos que, de alguna forma, son el asidero más prolijo e incorruptible de mi vida.

A mis rutilantes y plácidas horas de lectura, por haberme otorgado una suspicacia y curiosidad obsesivas.

«El objeto de la educación es formar seres aptos para gobernarse a sí mismos, y no para ser gobernados por los demás»

—Herbert Spencer

Luis Hernández.

A mis padres: Miguel Ángel Palma y Norma Aracely Catalán de Palma, por ser mi fuerza, sostén y apoyo en cada momento de mi vida.

A mi novia: Mirna Yesenia Martínez por acompañarme en cada momento y ser en mi vida la fuerza y presencia Dios hecha mujer

A mi hermana: María Gabriela Palma, por ser el motivo que Dios me regaló para superarme día a día.

A mi familia y amigos, que sin duda han intervenido directa e indirectamente en mi proceso de formación académica.

“Nuestra generación tiene necesidad de hombres que sepan repetir con santa “obstinación”: “Ad Maiora Natus Sum: He nacido para cosas más grandes”.

–San Juan Pablo II

Diego Fernando Palma.

INDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	26
3.1 Plantas Medicinales	26
3.1.1 Propiedades y características de <i>Allium tuberosum</i>	26
3.1.2 Propiedades y características de <i>Allium cepa</i> L.	30
3.2 Métodos de Extracción	31
3.2.1 Extracción con disolventes	32
3.2.2 Método de Maceración	33
3.3 Microorganismos Resistentes	33
3.3.1 La resistencia a los antimicrobianos	33
3.3.2 Diferencia entre la resistencia a antibióticos y a antimicrobianos	35
3.3.3 Las resistencias transferibles	35
3.3.4 Mecanismos de resistencia	38
3.4 Pruebas para verificar la sensibilidad a antimicrobianos	39
3.4.1 Estudios de sensibilidad	39
3.4.2 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	39
3.4.3 Concentración Bactericida Mínima (CBM)	40
3.4.4 Método de disco difusión	40

3.4.5 Método de Kirby Bauer Modificado	41
3.4.6 Prueba de sensibilidad por Macrodilución en caldo	42
3.5 Bacterias Gram negativas	43
3.5.1 Características	43
3.5.2 Bacterias aerobias facultativas	43
3.5.3 Patogenicidad	44
3.5.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
3.5.5 <i>Escherichia coli</i>	45
 Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	49
4.1 Tipo de estudio	49
4.2 Investigación bibliográfica	49
4.3 Investigación de campo	50
4.3.1 Universo	50
4.3.2 Muestra	50
4.3.3 Tamaño de muestra	50
4.3.4 Tipo de muestreo	50
4.4 Parte experimental	50
4.4.1 Obtención de las muestras vegetales	50
4.4.2 Identificación taxonómica y certificación del material vegetal	51
4.4.3 Procesamiento de las muestras vegetales frescas	51
4.4.4 Obtención de los extractos etanólicos secos	52
4.4.5 Reactivación de las cepas de referencia	53
4.4.6 Identificación de las cepas de referencia	53
4.4.6.1 Identificación macroscópica mediante agares selectivos	54
4.4.6.2 Identificación microscópica por Tinción de	

Gram	55
4.4.6.3 Pruebas Bioquímicas	56
4.4.7 Preparación de la suspensión estandarizada de las cepas de referencia	58
4.4.8 Determinación de la actividad antibacteriana	59
4.4.8.1 Prueba de solubilidad para los extractos	59
4.4.8.2 Preparación de las concentraciones a ensayar	60
4.4.8.3 Inoculación de las placas	62
4.4.9 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	63
4.4.9.1 Método de Macrodilución en caldo Mueller Hinton (MH)	63
4.4.10 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	65
4.5 Análisis Estadístico	65
 Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	68
 Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	89
 Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	92
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Traslado y segmentación de la materia vegetal
- 2 Obtención de los extractos etanólicos secos de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L.
- 3 Reactivación de las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- 4 Identificación de los microorganismos *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*
- 5 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. utilizando el método de Kirby Bauer Modificado
- 6 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las especies vegetales *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. utilizando el Método de Macrodilución en caldo
- 7 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las especies vegetales *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L.
- 8 Certificado de identificación taxonómica de la materia vegetal

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°		Pág.
1	Resultado de pruebas bioquímicas para cepas de referencia	69
2	Prueba de solubilidad de los extractos	71
3	Criterios de interpretación del antibiograma	72
4	Halos de inhibición de los controles	72
5	Concentraciones iniciales y finales evaluadas para los extractos de <i>Allium tuberosum</i> y <i>Allium cepa</i> L.	76

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág.
1	Aspecto de <i>Allium tuberosum</i> (Ajo chino)	26
2	Aspecto de <i>Allium cepa</i> L. (Cebolla morada)	30

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		Pág.
1	Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>Allium tuberosum</i> (Ajo chino) y <i>Allium cepa</i> L. (Cebolla morada)	69
2	Verificación del método de estandarización microbiológica	70
3	Halos de inhibición de <i>Allium tuberosum</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	73
4	Halos de inhibición de <i>Allium tuberosum</i> sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	74
5	Halos de inhibición de <i>Allium cepa</i> L. sobre <i>Escherichia coli</i>	75
6	Halos de inhibición de <i>Allium cepa</i> L. sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
7	Resultados de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de <i>Allium cepa</i> L. y <i>Allium tuberosum</i> sobre las cepas de referencia	77
8	Resultados de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de <i>Allium cepa</i> L. y <i>Allium tuberosum</i> sobre las cepas de referencia	78
9	Resumen de resultados de la CIM y CBM para ambos extractos	79
10	Análisis de varianza para Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	81
11	Resultados de prueba LSD para Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) obtenida para <i>Allium tuberosum</i> por cepa de referencia	82
12	Resultados de prueba LSD para Concentración Inhibitoria obtenida para <i>Allium cepa</i> L. por Microorganismo	83

13	Resultados de prueba LSD para Concentración Inhibitoria obtenida por extracto sobre <i>Escherichia coli</i>	83
14	Resultados de prueba LSD para Concentración Inhibitoria obtenida por extracto sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	84
15	Análisis de varianza para Concentración Bactericida Mínima (CBM)	84
16	Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima (CBM) para <i>Allium tuberosum</i> por Microorganismo	85
17	Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima (CBM) para <i>Allium cepa</i> L. por Microorganismo	86
18	Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima (CBM) por Extracto sobre <i>Escherichia coli</i>	86
19	Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima (CBM) por Extracto sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	87

ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection, Colección de Cultivos de Tipo Americano.

CBM, CMB: Concentración Bactericida Mínima

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

EMB: Eosina-Azul de Metileno

LSD: Least Significant Difference, mínima diferencia significativa.

MH: Mueller Hinton

RESUMEN

En la actualidad se ha establecido clínicamente que la resistencia adquirida por las bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, no solo provoca deterioro en la salud de la población por su dificultad al tratarlo, sino que también implica problemas socio-económicos. Esto ha despertado en el gremio farmacéutico inquietudes con respecto al uso de productos de origen vegetal, con el fin de aprovechar el uso de metabolitos secundarios que contrarresten la proliferación de ambas bacterias.

En el presente trabajo, se evaluó la actividad antibacteriana que poseen las especies vegetales Ajo Chino (*Allium tuberosum*) y Cebolla Morada (*Allium cepa* L.) sobre las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 proporcionadas por el Laboratorio Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador. El objetivo principal de esta investigación es determinar el efecto antibacteriano que presentan ambas especies vegetales sobre las dos cepas de referencia a través de antibiogramas utilizando el Método de Kirby Bauer Modificado en donde se incluyeron ocho concentraciones diferentes de cada uno de los extractos y además se verificó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) para cada extracto.

Los resultados del antibiograma mostraron que la cepa de *Escherichia coli* es sensible a concentraciones de 200 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL de *Allium tuberosum*, mientras que la cepa de *Klebsiella pneumoniae* presentó sensibilidad a concentraciones de 200 mg/mL y 100 mg/mL del mismo extracto. Con respecto al extracto de *Allium cepa* L. los resultados reflejaron una resistencia marcada por parte de ambas cepas ante concentraciones del extracto que fueron desde 200 mg/mL a 1.56 mg/mL, por lo que para realizar la

verificación de la Concentración Inhibitoria Mínima de esta especie vegetal se evaluaron concentraciones a partir de los 1000 mg/mL de extracto.

Los resultados de Concentración Inhibitoria Mínima de los extractos muestran que el *Allium tuberosum* presenta las Concentraciones Inhibitorias Mínimas más bajas para la cepa de *Escherichia coli*: obteniéndose a 25 mg/mL; a diferencia de la cepa de *Klebsiella pneumonia*, que se obtuvo a una concentración de 100 mg/mL. Para *Allium cepa* L. la Concentración Inhibitoria Mínima necesaria sobre *Escherichia coli* fue de 500 mg/mL, mientras que para la cepa de *Klebsiella pneumonia* fue de 1000 mg/mL. Para lograr la inhibición de ambas cepas, se necesita una mayor concentración de extracto de *Allium cepa* L. (cebolla morada) en comparación a la requerida por *Allium tuberosum* (ajo chino)

Ambas especies vegetales presentaron una acción bactericida sobre las dos cepas de referencia. Al igual que en la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima, el extracto de *Allium tuberosum* presenta las Concentraciones Bactericidas Mínimas más bajas para la cepa de *Escherichia coli*, siendo esta de 25 mg/mL; en contraste con la cepa de *Klebsiella pneumonia*, que necesitó una concentración de 200 mg/mL para lograr el mismo efecto. Los valores de Concentración Bactericida Mínima reportados para el extracto de *Allium cepa* L. coinciden a una concentración de 1000 mg/mL sobre ambas cepas.

A través de un análisis multifactorial realizado en el programa estadístico Statgraphics Centurion, se verificó que existe diferencia significativa entre la eficacia antibacteriana mostrada por el extracto de *Allium tuberosum* (ajo chino) en comparación a la mostrada por el extracto de *Allium cepa* L. (cebolla morada) sobre ambas cepas de referencia.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Escherichia coli y *Klebsiella pneumoniae* son de las bacterias más importantes y con mayor relevancia a nivel hospitalario debido a la factibilidad con la que pueden provocar enfermedades altamente infecciosas. Según la Organización Mundial para la Salud (OMS) es la principal causa individual de mortalidad infantil en todo el mundo. Se calcula que la neumonía mató a unos 922,000 niños menores de 5 años en 2015; otro padecimiento muy común son las infecciones en las vías urinarias, que de acuerdo al estudio realizado por médicos del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS) la bacteria *Escherichia coli* es el agente más usual de esta infección, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad; mostrando una frecuencia que oscila del 50 al 70%, además de ser la principal causante de enfermedades gástricas graves (25).

La necesidad de encontrar alternativas farmacéuticas ante enfermedades de origen bacteriano han llevado a las personas a utilizar especies vegetales que la etnobotánica categoriza como medicinales, como por ejemplo algunas de las especies pertenecientes al género *Allium*; siendo el ajo y la cebolla las especies más utilizadas, por sus propiedades curativas. Los beneficios del género *Allium* se deben a sus componentes azufrados Aliina y Alicina, a los cuales se les atribuye el carácter antibacteriano (16).

En el presente trabajo, se determinó el efecto antibacteriano que poseen las especies vegetales Ajo Chino (*Allium tuberosum*) y Cebolla Morada (*Allium cepa* L.) sobre las cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante la elaboración de extractos obtenidos por maceración ultrasónica.

Se realizaron antibiogramas utilizando el Método de Kirby Bauer Modificado con ocho concentraciones diferentes de cada uno de los extractos. Con el fin de respaldar los resultados obtenidos se verificó la Concentración Inhibitoria

Mínima (CIM) mediante el método de Macrodilución en Caldo Mueller Hinton y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por vertido en placa.

Los resultados de CIM de los extractos muestra que el Ajo Chino (*Allium tuberosum*) presenta las CIM más bajas para la cepa de *Escherichia coli*; siendo esta, de 25 mg/mL. que sobre la cepa de *Klebsiella pneumonia* con una CIM de 100 mg/mL, por lo que se puede decir que la cepa de *Escherichia coli* es más sensible a concentraciones menores de *Allium tuberosum* en comparación con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Con respecto a la Cebolla Morada (*Allium cepa* L.) confirman que los componentes antibacterianos se encuentran en menor proporción que en el extracto de *Allium tuberosum*, evaluados a iguales concentraciones. Para lograr la inhibición de ambas cepas, se necesita una mayor concentración de extracto de *Allium cepa* L. La CIM necesaria sobre *Escherichia coli* fue de 500 mg/mL, mientras que la CIM necesaria sobre *Klebsiella pneumonia* fue de 1000 mg/mL.

Al determinar la capacidad antibacteriana de cada especie vegetal, se puede considerar ampliar la investigación, con el fin de conocer su espectro de acción, la dosis toxica, su estandarización química y su acción farmacológica complementaria, con la cual se logren mejoras en los tratamientos.

La investigación fue realizada en el Laboratorio Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, en los meses de Mayo a Agosto del 2016.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano de dos especies vegetales sobre *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Preparar extractos etanólicos a partir de *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada)

2.2.2 Identificar las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante morfología macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas.

2.2.3 Determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada) utilizando el método microbiológico Kirby Bauer Modificado, sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

2.2.4 Verificar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos etanólicos seleccionados mediante el Método de Macrodilución en tubos sobre las cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

2.2.5 Comparar estadísticamente los resultados obtenidos a través del análisis de varianza multifactorial ejecutando el software Statgraphics Centurion.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Plantas medicinales ^(6, 14)

A lo largo del tiempo las plantas medicinales han jugado un papel importante en el tratamiento de diversas enfermedades, inclusive algunos investigadores estipulan que los mamíferos mayores saben de sus propiedades curativas.

El estudio de estas plantas es importante, Libellus de medicinalibus indorum herbis (Librito sobre las hierbas medicinales de los indios) publicado en 1552, fue el primer libro de la herbolaria medicinal mexicana que describe los remedios que usaban los mexicas con sus enfermos. Actualmente el estudio de las plantas medicinales sigue vigente y busca resolver problemas como la resistencia que han desarrollado diversos microorganismos ante los antibióticos; es de mencionarse que no tienen efectos secundarios notable.

Se conocen como sustancias activas a los metabolitos secundarios de las plantas que ejercen una acción generalizada contra microorganismos patógenos. Las sustancias activas más importantes en los bulbos de ajo y cebolla son compuestos sulfurados.

3.1.1 Propiedades y características de *Allium tuberosum* (Ajo chino) ^(9, 4)



Figura N° 1. Bulbos de *Allium tuberosum*

Nombre científico: *Allium tuberosum*

Familia: Liliaceae

Allium tuberosum es el nombre botánico de esta especie perteneciente a la familia Alliaceae y es conocida de forma común como: *cebollino chino* y *ajo chino*. Sus sinonimias son las siguientes: *Allium argyi*, *Allium clarkei*, *Allium roxburghii*, *Allium sulvia*, *Allium tricoccum*, *Allium tuberosum f. yezoense*, *Allium uliginosum*, *Allium yezoense*, *Allium yezoense* y *Nothoscordum sulvia*.

Descripción general:

Este Bulbo original de Asia del Este puede llegar a alcanzar treinta centímetros de altura y treinta centímetros de anchura. *Allium tuberosum* se vale de antófilos e insectos para polinizar sus flores de color blanco dotadas de unidades reproductivas hermafroditas.

La especie *Allium tuberosum* se desarrollará mejor en suelos con pH ácido, neutro, alcalino muy alcalino. Su parte subterránea crecerá con vigor en soportes con textura arenosa, franca o arcillosa, éstos se pueden mantener generalmente secos o húmedos.

Composición química:

El bulbo contiene aceite esencial volátil sulfurado (33 compuestos di, tri y tetrasulfuros), esteroides (aliína, alicina), glucósidos (fructosanos), minerales (cinc, cobre, germanio, magnesio, selenio), fosfolípidos, vitaminas (A, B₁, C), nicotilamida, 17 aminoácidos (derivados de cisteina, cisteinglicina y antocianinas).

El bulbo contiene el alcaloide adenosina, los compuestos sulfurados alicina, capaeno-1, y otros derivados cíclicos del hexano, del butano, del

etiltritiahexano, etiltritiaoctano; aliína, 2-carboxipropil-glutati3n (sustancias proteicas); compuestos alic3clicos derivados de la ciclopentadiona, quercetina, benzoide arbutina, oxalato de calcio y 3cido trihidroxioctadecenoico. El aceite esencial contiene metilalil-trisulfato.

Usos populares:

Se usa para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, estreñimiento, inapetencia, parasitosis), respiratorias (asma, bronquitis, tos, tuberculosis) y nerviosas (insomnio), hipertensi3n. T3picamente se usa en compresas y cataplasmas para tratar afecciones de la piel, reumatismo, vaginitis, verrugas y tumores; se aplica en ung3ntos para eliminar callosidades.

Oralmente se le atribuye propiedades antihelm3ntica, antis3ptica, espasmol3tica, estimulante, expectorante, hipoglic3mica, hipotensora, vasodilatadora, vermífuga y virucida. T3picamente se le atribuye propiedad analg3sica, antis3ptica y desinfectante.

Usos terap3uticos:

Estudios antimicrobianos demuestran actividad desde tiempos de pasteur; la tintura y decocci3n del bulbo tienen amplio espectro de actividad antimicrobiana (gran-positivo y gran-negativo), antiviral (Herpes simple, influenza B, estomatitis), Antif3ngica, y antiprotozoario (*Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*). Los extractos etan3licos y acuosos inhiben el crecimiento y respiraci3n de *Candida albicans*.

El jugo inhibe el crecimiento in vitro de tumores de la piel inducidos por benzopireno y 12-metilbenzantraceno e in vivo previene la carcinog3nesis por 3-metilcolantreno en c3rvix uterino de rat3n, actividad tambi3n detectada en la alicina sint3tica.

Estudios farmacológicos demuestran propiedad analgésica, antibiótica, antihelmíntica, antihepatotóxica, diurética, espasmolítica e hipoglicémica en conejos normales y diabéticos, estimula la producción biliar, disminuye el colesterol, glucosa y triglicéridos sanguíneos, acelera la cicatrización e inhibe la agregación plaquetaria.

El aceite es relajante del músculo gastrointestinal de ratón, tiene actividad antihepatotóxica inducida in vitro e in vivo en ratón e inhiben la formación de radicales libres. El extracto metanólico inhibe el edema en oreja de ratón inducido por acetato de tetradecanoilforbol.

Los estudios clínico de Marcovici confirmados por otros investigadores en el tratamiento de desórdenes digestivos e hipertensivos, condujeron la introducción al mercado de Allisatin. El aceite esencial ha demostrado ser efectivo en el control sanguíneo del colesterol y lipoproteínas de baja densidad, lo que contribuye a disminuir los riesgos de enfermedad cardíaca. En 77 pacientes de 40-82 años se demostraron resultados excelentes o buenos en 90% de los pacientes.

Se ha demostrado actividad antitrombótica con propiedades contra la agregación plaquetaria.

Un estudio piloto de 10 semanas con diez pacientes con SIDA a los que se le administró un extracto añejado demostró la mejoría de la relación de linfocitos y de las condiciones asociadas con la enfermedad, como diarrea y herpes genital.

Estudios realizados demuestran la efectividad del ajo en diabetes mellitus, actividad terapéutica contra el plomo. Además es diurético y antioxidante.

Toxicidad:

El jugo y el aceite pueden ser irritantes de las mucosas y la conjuntiva. La DL₅₀ de la alicina en ratón es 60 mg/mL por vía intravenosa y 120 mg/kg por vía

subcutánea; la DL_{50} del aceite es 50-78 mg/kg vía intravenosa y 600 mg/kg por vía oral.

3.1.2 Propiedades y características de *Allium cepa* L. (Cebolla morada) ^(8, 9)



Figura N° 2. Bulbos de *Allium cepa* L.

Nombre científico: *Allium cepa* L.

Familia: Liliaceae

Planta bianual, bulbo con penacho de hojas, tallo erecto, lampiño. Hojas carnosas, huecas, cilíndricas, puntiagudas, 15-50 cm de largo. Bulbo jugoso con capas membranosas, llamadas catafilos, compuestas de finas telitas transparentes. Flores numerosas, pequeñas, en esferas al final del tallo.

Composición química:

El bulbo contiene aceite esencial ricos en compuestos de azufre (bisulfuro de alilpropilo y alicina), fructosanos (10-40%), flavonoides (quercetina, kampferol), aminoácidos saponinas (aliofurósido A, aliospirósido A), azúcar, glucósidos cardiotónicos, taninos, ácido glicólico y difenilamina.

Usos populares:

El bulbo fresco o cocido se usa para hipertensión. La tintura o jugo se usa para afecciones renales, intestinales (cólico, indigestión, inflamación, estreñimiento,

hemorroides, lombrices) y respiratorias (constipado, fiebre, pulmonía, resfriado, tos, tuberculosis), trombosis coronaria, edema. El bulbo fresco o tostado se aplica en cataplasma o emplasto para tratar artritis, abscesos, quemaduras, inflamación, mezquinos y úlceras. Se le atribuye propiedad antihelmíntica, digestiva, diurética, emoliente, espasmolítica, y sedante.

Usos terapéuticos:

Estudios antibacterianos demuestran que el extracto acuoso y etanólico es inactivo contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; el jugo tiene actividad bacteriostática y algunos componentes aislados son bactericida.

Estudios farmacológicos demuestran que extractos crudos y purificados del bulbo son hipoglucémicos en conejos y ratones; En modelos animales se demuestra que aumenta la presión sistólica y el flujo coronario, estimula el músculo uterino e intestinal. El extracto alcohólico es diurético en ratas pero no es antihipertensor en ratas hipertensas. El extracto metanólico no inhibe el edema de la oreja de ratón inducido por acetato de tetradecanoilforbol.

En estudios clínicos existen evidencias que demuestran sus bondades para tratar afecciones respiratorias (gripe, pulmonía, tuberculosis, cáncer). La administración oral de preparados de alicina disminuyen los niveles de glucosa en voluntarios diabéticos.

Toxicidad:

El consumo excesivo de cebolla cocida o cruda puede producir anemia.

3.2 Métodos de Extracción ⁽¹⁶⁾

La extracción es una operación que tiene por objeto separar una sustancia del material sólido o líquido que la contienen por medio de un disolvente. Los disolventes más comunes son: agua, éter de petróleo, etanol, benceno, hexano,

entre otros. Con el fin de mejorar el rendimiento de la extracción y la reproducibilidad de la misma hay que someter el material vegetal en estudio a una serie de operaciones preliminares como son:

- a) Identificación botánica del material: género, especies, origen, etc.
- b) Selección de la parte vegetal a extraer: hojas, flores, semillas, etc.
- c) Inactivación de los sistemas enzimáticos del vegetal cuando se trabaja con material fresco (hoja y flores), es decir recién recolectados. Así se asegura su integridad evitando procesos de degradación que conlleve a la alteración de los principios activos.
- d) Decantación de las plantas bajo las condiciones controladas para evitar la transformación química de los componentes.

En el método de extracción se realiza un proceso de extracción de la droga, con el fin de obtener los principios activos, los cuales son extraídos dependiendo de sus propiedades físicas y químicas.

3.2.1 Extracción con disolventes ⁽¹⁶⁾

Consiste en poner en contacto la droga con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben pasar de la droga al disolvente de manera que obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad de disolvente. La extracción con disolvente es uno de los métodos que se emplea con más frecuencia para la obtención de principios activos. Para que la extracción con disolvente se lleve a cabo correctamente hay que tener en cuenta diversos factores:

1. Característica de la droga.
2. Naturaleza del disolvente.
3. Temperatura.
4. Tiempo de contacto entre la droga y el disolvente.
5. Control de difusión celular.

3.2.2 Método de Maceración ⁽²⁹⁾

Para lograr el proceso de maceración se coloca el material vegetal en forma de trozos o polvo, según sea la conveniencia, en un recipiente lleno del mensturo y se deja reposar por tres o más días, con agitación frecuente hasta completar la extracción del material vegetal.

Al final de este período se cuela y el resto sólido se exprime hasta lograr quitar el líquido remanente. El líquido así obtenido se clarifica por decantación o filtración. La maceración se realiza a temperatura ambiente y los líquidos que con más frecuencia se utilizan son el agua y el alcohol ó combinación de ambos, aunque también pueden emplearse vinos tintos o blancos.

La maceración en agua no debe alargarse por mucho tiempo pues puede presentar contaminación por hongos, lo cual no sucede en las soluciones de alcohol o hidroalcohólicas. El tiempo total de maceración está en dependencia del tipo de planta, parte de la misma o del principio activo a extraer. La proporción más usada es de 1:20 vegetal/líquido

3.3 Microorganismos resistentes ⁽¹¹⁾

3.3.1 La resistencia a los antimicrobianos

La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que producen ciertas concentraciones de antibiótico. El

antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona. Donde antes se seleccionaban las bacterias más aptas para la supervivencia en el sitio del organismo de que se trate, en presencia del antibacteriano, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones de antibiótico presentes en ese lugar. El antibiótico se convierte en el primer factor de selección. El uso de los antibacterianos ha cambiado no solamente los clásicos cuadros sintomatológicos que habían sido excelentemente descritos en siglos anteriores de buena clínica, sino las bacterias mismas, sus susceptibilidades y, consecuentemente, las posibilidades de tratamiento y curación.

Luego de la introducción en la clínica de cada nueva droga, es un proceso probablemente inevitable, que en un plazo variable de tiempo, aparezcan variantes resistentes de la bacteria contra la que se pretende luchar. Esto se ha ido cumpliendo inexorablemente con la mayoría de los agentes antimicrobianos. Esto no implica que, con el uso criterioso y racional de los antimicrobianos, no se pueda limitar al máximo la emergencia de resistencias.

La resistencia de una bacteria no es la misma para todos los miembros de la población. Para individuos indiferenciables morfológica o bioquímicamente, puede haber variedades con susceptibilidades totalmente diferentes, muy susceptibles, es decir que son eliminadas por bajas concentraciones del antibiótico, o muy resistentes, que son muy difíciles de erradicar, aun administrando el antibacteriano en concentraciones elevadas. Pero cuando se hace un aislamiento de una determinada infección, se supone que se trata de una cepa bastante pura.

Esto es lo que ocurre con las resistencias adquiridas, aquellas en que el antibacteriano actúa, como se ha explicado, seleccionando entre microorganismo resistentes y susceptibles. Pero hay otro tipo de resistencias,

las denominadas resistencias intrínsecas, aquellas que son parte constitutiva de la bacteria. Por ejemplo las diferencias, de membrana entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, hacen que los antibióticos beta lactámicos no encuentren el receptor adecuado para fijarse y ejercer su efecto en las últimas.

Lo inicial en la resistencia es una mutación que permite que algún mecanismo bacteriano cambie lo suficiente para que los sistemas que la droga normalmente modifica, no existan más o sean suficientemente distintos como para que el antimicrobiano no pueda actuar. Sobre esta mutación actúa luego la selección ejercida por el antibiótico. Mayor importancia aún tiene el mecanismo de la transferencia de material genético. En términos generales, las resistencias no parecieran tan difundidas en bacterias Gram positivas, ya que no son capaces de incorporar plásmidos. Aunque este no es el caso de los estafilococos, en los que las resistencias a los antimicrobianos se han transformado en un serio problema. En el caso de los Gram negativos, esto sí que es grave. La resistencia está diseminada en organismos Gram negativos y se transfiere con facilidad.

3.3.2 Diferencia entre la resistencia a antibióticos y a antimicrobianos

Por «resistencia a los antibióticos» se entiende específicamente la resistencia a los antibióticos que desarrollan las bacterias comunes causantes de infecciones. El término «resistencia a los antimicrobianos» es más amplio y comprende la resistencia a los fármacos utilizados para tratar infecciones causadas por otros microorganismos, como parásitos (por ejemplo, el que causa el paludismo), virus (por ejemplo, el VIH) y hongos (por ejemplo, la cándida).

3.3.3 Las resistencias transferibles

La transmisibilidad de los factores de resistencia puede dar lugar a un problema aún mayor: la multi-resistencia. Estos microorganismos no solamente son resistentes a una serie de drogas, sino que esa multi-resistencia sigue siendo transferible, por lo que se transforman en reservorios de resistencia. Otro factor de riesgo es la capacidad de sobrevivir en ausencia del antibiótico protector.

El conocimiento de este fenómeno, ignorado en su magnitud hasta hace pocos años, ha revolucionado el ambiente médico. La posibilidad de que las bacterias intercambien material genético y con el mismo, resistencias, puede incrementar enormemente la diseminación de los microorganismos resistentes. La resistencia está codificada en ADN extracromosómico que se autoduplica dentro de la bacteria y es transferido a otras por mecanismos varios.

El tracto gastrointestinal animal y humano ha sido considerado como el lugar de elección de las transferencias de resistencias. Otros nichos, sin embargo, comienzan a ser considerados como de gran importancia. Así, el intestino de animales salvajes (especialmente roedores), animales de compañía, y, esencialmente peces, en especial considerando explotaciones comerciales para producción de éstos, representan lugares en que el fenómeno se produciría en gran escala.

El medio ambiente representa, en ciertas circunstancias especiales, un lugar de intensa actividad microbiana, donde los intercambios podrían tener lugar en forma extensa. Así, ciertos lugares como la tierra, especialmente en zonas en que se produzcan descargas de materia fecal, producto, por ejemplo de limpieza de corrales, podría funcionar de esta manera. Por cierto que los cursos de agua, especialmente si se los vincula al vertido de desechos cloacales

(especialmente si éstos no han sido tratados previamente a su descarga), serían lugares ideales de intercambio.

Como fue presentado en el Documento de Base de la Consulta de Expertos en Uso No-humano de Antimicrobianos y Resistencia Antimicrobiana organizada en conjunto por Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud Animal (FAO/OIE/WHO, 2003) ⁽²¹⁾, hay un conjunto de factores que deben ser considerados en la diseminación exitosa de clones resistentes en humanos y animales, estos factores incluirían:

- Capacidad de la bacteria de sobrevivir y competir con otros clones en el mismo nicho u otros.
- El potencial de adaptarse a nuevos ambientes.
- La resistencia a las condiciones del medio, incluyendo factores físicos y químicos.
- La capacidad de colonizar hospedadores animales y humanos y reproducirse luego de colonizar.
- La habilidad para superar la respuesta inmune del hospedador.
- La estructura de la industria animal: Infecciones arriba en la pirámide, en animales de élite genética pueden generar diseminación hacia abajo en la descendencia.
- El manejo de las explotaciones, esto incluye disposición de materia fecal y movimientos de animales.
- La resistencia (esencial) a otros antimicrobianos usados para otros propósitos.

3.3.4 Mecanismos de resistencia

Las bacterias pueden volverse resistentes a los antimicrobianos, pero ¿por qué mecanismos? Así como el primer mecanismo de acción de un agente infeccioso conocido fue el de las sulfamidas, el primer mecanismo de resistencia conocido también fue el de los microorganismos a estas drogas. Si bien son varios los mecanismos de resistencia a las sulfas que actualmente se conocen, se puede decir que la hiperproducción de PABA (para-aminobenzoico) fue el primero en determinarse, siendo el más conocido. Además de la hiperproducción metabólica, otros mecanismos incluyen:

- Inactivación enzimática de los antibióticos, como es el caso de las enzimas beta lactamasas. En este caso la enzima, elaborada por la bacteria, inactiva a la molécula de la droga volviéndola incapaz de actuar. Hay que tener presente que este mecanismo es el único capaz de inactivar a la molécula de antimicrobiano.
- Impermeabilidad de la membrana o pared celular.
- Expulsión por mecanismos activos del antibiótico. Las resistencias a las tetraciclinas pueden ser debidas a este tipo de mecanismos.
- Modificación del sitio blanco del antibiótico en la bacteria. En algunos casos hay una reducción de la afinidad del receptor por la molécula de antimicrobiano. Una mutación del ADN, por ejemplo, puede dar lugar a una menor afinidad de las quinolonas por la citada enzima. Otro ejemplo es el cambio de las enzimas involucradas en la síntesis de ácido paraaminobenzoico, lo que da lugar a resistencias a sulfas y trimetoprima, mecanismo que se suma al mencionado en primer lugar.

3.4 Pruebas para verificar la sensibilidad a antibióticos ⁽¹⁵⁾

3.4.1 Estudios de sensibilidad

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Dentro de los beneficios que presenta se encuentran:

- Dirigir la terapéutica una vez que el germen es conocido.
- Generar una base de datos que permita seleccionar los antibióticos a utilizar en un tratamiento empírico (aquel en que no se conoce el agente causal).
- Desarrollar políticas de uso de antimicrobianos.
- Vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.
- Detectar precozmente la diseminación epidémica de una cepa, tanto a nivel hospitalario como comunitario.

Pero la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos no implica solo realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados. Es necesario saber interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen. Entre el médico clínico que tiene en sus manos un paciente, y el microbiólogo que entre las suyas tiene las placas con el microorganismo responsable de una infección, debe haber buena comunicación, lo cual implica hablar el mismo idioma. Los parámetros que determinan los resultados de sensibilidad o resistencia, cada vez más involucran información proveniente de ambos lados: el paciente y el microorganismo

3.4.2 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Existen diversos métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana. Estos métodos se dividen en cuantitativos y cualitativos. Los métodos

cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).

Se define concentración inhibitoria mínima (CIM) como la mínima concentración de antibiótico que en un periodo de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes).

La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial).

3.4.3 Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Se define como concentración bactericida mínima (CBM) a la mínima concentración de un antibiótico que en un periodo de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada.

3.4.4 Método de disco difusión

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa).

El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que se recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

3.4.5 Método de Kirby Bauer Modificado ⁽³⁰⁾

Probablemente la técnica de ensayo más ampliamente utilizada, aunque no necesariamente la mejor, es el método de difusión en agar, también conocido como método de Kirby-Bauer, aquí se usan discos de papel filtro en envase poroso, que contiene cantidades medidas del fármaco, no así en el método de Kirby-Bauer Modificado donde se da la utilización de cilindros de acero inoxidable sin fondo donde es colocada la solución de prueba; luego se coloca ya sea el disco o el cilindro sobre un medio sólido sembrado con abundantes microorganismos de prueba. Después de incubación, el diámetro de la zona clara de inhibición que rodea el fármaco depositado se toma como medida de la potencia inhibidora del fármaco contra el microorganismo en particular de prueba.

Este método está sujeto a la influencia de muchos factores físicos y químicos además de la simple interacción entre el fármaco y el microorganismo (por ejemplo, la naturaleza del medio y la del fármaco). No obstante, la

estandarización de las condiciones permite efectuar una prueba cuantitativa de la potencia del fármaco o de la susceptibilidad del microorganismo.

El empleo de un solo disco para cada antibiótico y la estandarización cuidadosa de las condiciones de la prueba permiten conocer la susceptibilidad o la resistencia de un microorganismo al comparar la magnitud de la zona de inhibición contra un estándar del mismo fármaco (método de Kirby-Bauer). La inhibición alrededor de un disco que contiene una cierta cantidad de antimicrobiano no implica la susceptibilidad a esa misma concentración del fármaco por mililitro de medio, sangre u orina.

3.4.6 Prueba de sensibilidad por Macrodilución en caldo ⁽¹⁵⁾

La prueba de sensibilidad por macrodilución en caldo fue una de las primeras en desarrollarse y aún sirve como método de referencia. Se realizan diluciones seriadas del agente antimicrobiano en caldo o en agar, después de lo cual se agrega una suspensión bacteriana estandarizada. Las cantidades de antibióticos son diluidas en forma seriada desde 100 µg/mL hasta 0,4 µg/mL. Un tubo utilizado en el proceso, no posee antibiótico y sirve como control de crecimiento. Cada uno de los tubos se inocula con una suspensión calibrada del microorganismo a ser probado y se incuba a 35°C durante 18 horas. Al término del periodo de incubación, los tubos son examinados a simple vista a fin de observar la turbidez. La turbidez indica que el crecimiento bacteriano no ha sido inhibido por la concentración de antibiótico contenida en el medio.

En los resultados obtenidos, se presenta un punto límite de inhibición. Este punto límite representa la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima), definida como la menor concentración de antibiótico en microgramos por mililitro que impide el crecimiento *in vitro* de las bacterias. Sin embargo, por convención, la CIM es interpretada como la concentración de antibiótico, contenida en el primer tubo de la serie, que inhibe el crecimiento visible.

3.5 Bacterias Gram negativas ⁽⁸⁾

3.5.1 Características

La característica clave que diferencia una bacteria Gram negativa de una bacteria Gram positiva es la composición y estructura de la pared celular. La pared celular de las bacterias Gram negativas está formada por dos membranas lipídicas, una interna (citoplasmática) y otra externa, con un espacio entre ellas denominado espacio periplasmático en el que se dispone una capa de una sustancia llamada peptidoglicano. Las Gram positivas no cuentan con membrana externa y la capa de peptidoglicano es generalmente mucho más gruesa.

Las bacterias Gram negativas no retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración porque presentan una capa muy delgada de peptidoglucano en su pared celular y su capa más externa está cubierta por una membrana de lipoproteínas.

Hay muchas especies de bacterias Gram negativas, agrupadas en varias familias y existen diferentes formas de clasificarlas según su: forma, óptimo de temperatura, pH en el que se desarrollan, requerimiento de oxígeno para poder permanecer con vida, ésta última clasifica a estos microorganismos en: bacterias aerobias estrictas, bacterias anaerobias estrictas y bacterias anaerobias facultativas.

3.5.2 Bacterias anaerobias facultativas

Las que pertenecen a esta división son las bacterias de la familia de *Enterobacteriaceae*: estas fermentan los carbohidratos en ausencia de oxígeno y forman ácido y gas. Los principales géneros y especies que pertenecen a esta familia son: *Escherichia*, con su especie *E. coli* que es capaz de formar el

antígeno O y K, generando resistencia a sustancias bactericidas, son responsables de cuadros febriles y diarreicos, también podrían desencadenar infecciones urinarias y biliares, etc.; *Salmonellas*, cuyas especies más relevantes son: la *S. typhi* (causante de la fiebre tifoidea) y la *S. enteritidis* (que produce la gastroenteritis); el género *Serratia* (*S. marcescens*) es patógeno oportunista, generalmente produce infecciones nosocomiales; entre las *Shigellas* están a: *S. dysenteriae* y *S. sonnei* que desencadenan la disentería bacilar; la *Klebsiella* más destacada es la *K. pneumoniae* que da lugar a varias infecciones, sobre todo neumonía.

3.5.3 Patogenicidad

Se determinó que varias especies de bacterias Gram negativas producen enfermedades. Los lipopolisacáridos están ubicados en la parte exterior de la membrana celular y es responsable de la capacidad patógena de estos microorganismos. Dichas moléculas también se denominan endotoxinas y desencadenan una respuesta inmune innata, con la producción de citocinas, que se manifiesta con una inflamación, en caso de que la endotoxina ingrese en el sistema circulatorio, producirá una reacción tóxica, entonces la temperatura corporal y la frecuencia respiratoria se elevarán, a diferencia de la presión arterial que desciende, dando lugar a un shock endotóxico, que puede terminar con la vida del individuo.

3.5.4 *Klebsiella pneumoniae* ⁽¹⁾

Es un tipo de bacterias Gram-negativas que pueden causar diferentes tipos de infecciones, incluyendo neumonía, infecciones de la sangre, heridas o infecciones del sitio quirúrgico y meningitis. Cada vez más, esta bacteria ha desarrollado resistencia a los antimicrobianos, más recientemente a la clase de antibióticos conocidos como los carbapenemes.

Las bacterias de *Klebsiella* se encuentran normalmente en el intestino humano (que no causan enfermedad). También se encuentran en el excremento humano (heces). En entornos de cuidado de la salud, infecciones por *Klebsiella* ocurren comúnmente entre pacientes enfermos que están recibiendo tratamiento para otras condiciones.

Pacientes cuya atención requiere que los dispositivos como ventiladores (máquinas de respiración) o catéteres por vía intravenosa (vena) y pacientes que están tomando cursos largos de ciertos antibióticos son mayor riesgo de infecciones por *Klebsiella*. Personas sanas no consiguen generalmente infecciones por *Klebsiella*.

Algunas bacterias de *Klebsiella* son altamente resistentes a los antibióticos. Cuando las bacterias como *Klebsiella pneumoniae* producen una enzima conocida como carbapenemase. A continuación, la clase de antibióticos llamados carbapenemes no funcionará para matar las bacterias y curar la infección. Por desgracia, antibióticos derivados del carbapenem a menudo son la última línea de defensa contra las infecciones gram-negativas que son resistentes a otros antibióticos.

La infección por *Klebsiella pneumoniae* es más común en aquellos que tienen predisposición a las infecciones como los ancianos, las personas con enfermedades respiratorias crónicas, diabéticos y alcohólicos. Los pacientes hospitalizados con sonda vesical permanente tienen mayor riesgo de desarrollar una infección del tracto urinario (ITU).

3.5.5 *Escherichia coli* (2, 9, 12)

Durante muchos años, el género *Escherichia* había sido representado por una sola especie *Escherichia coli*. Sin embargo, con las reorganizaciones

taxonómicos de los dos últimos décadas, se han añadido cuatro nuevas especies del género: *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia fergusonii*, y *Escherichia blattae*.

Es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria.

La infección por *Escherichia coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda.

Las cepas inocuas y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos periféricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biología molecular.

Escherichia coli es un patógeno oportunista, y algunas cepas producen enterotoxinas que pueden causar reacciones de fiebre. *Escherichia coli* se ha asociado con un número grande de enfermedades, incluyendo cistitis, apendicitis, infecciones de la vesícula biliar, la septicemia, meningitis, endocarditis, y la diarrea epidémica.

Agares selectivos utilizados para la detección de *Escherichia coli* por lo general contienen productos químicos tales como tetracionato, desoxicolato, y sales biliares para inhibir el crecimiento de organismos no entéricos. Sin embargo, un medio de uso múltiple, tal como TSA o agar sangre, puede también ser utilizado para el aislamiento de estos organismos; la mayoría de las cepas son no

hemolíticas. Algunos de los medios mayormente utilizados para el tratamiento de *Escherichia coli* son los siguientes:

- MacConkey (MAC) agar: Este medio es inhibidor para bacterias Gram-positivas. Bacterias coliformes, que son fermentadores de lactosa, producen colonias de color rojo; y organismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras. La concentración del agar se puede aumentar a 5% para inhibir la propagación de organismos del género *Proteus*.
- Eosina-azul de metileno agar (EMB): En este medio, la *Escherichia coli* presenta colonias con un brillo metálico característico bajo luz reflejada y una apariencia azul bajo una luz transmitida.

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

El presente trabajo es un estudio:

Prospectivo: Debido a que la investigación realizada puede ser utilizada como un insumo para realizar futuras investigaciones en las cuales se vea implicado el efecto antibacteriano de las especies vegetales *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada)

Exploratorio: Se ensayó la efectividad antibacteriana de dos especies vegetales *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada) sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Experimental: Se realizaron ensayos microbiológicos para determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada) sobre dos cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, utilizando ocho concentraciones diferentes.

4.2 Investigación bibliográfica

La revisión bibliográfica se realizó en las siguientes bibliotecas:

- “Dr Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- “Miguel de Cervantes” de la Universidad Católica de El Salvador.
- “P. Florentino Idoate, S.J” Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas”.
- Central de la Universidad Evangélica de El Salvador
- Internet.

4.3 Investigación de campo

4.3.1 Universo

Las especies vegetales que se han utilizado como alternativa médica por presentar un efecto antibacteriano.

4.3.2 Muestra

El estudio fue dirigido a las especies vegetales *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada) por presentar un carácter antibacteriano.

4.3.3 Tamaño de muestra

Para cada ensayo de la combinación Extracto-Bacteria, se utilizaron ocho concentraciones diferentes, las cuales fueron ensayadas utilizando el método de Kirby Bauer Modificado. Posteriormente se verificó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) mediante el Método de Macrodilución en tubos.

4.3.4 Tipo de muestreo

Dirigido y puntual a las especies vegetales *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada).

4.4 Parte experimental

4.4.1 Obtención de las muestras vegetales

Se utilizó 1 libra de cada una de las especies vegetales y se transportaron a temperatura ambiente hacia el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia en donde se seleccionaron los bulbos para la elaboración de los extractos etanólicos secos.

Se efectuaron ensayos de efectividad antibacteriana mediante los métodos de Kirby Bauer y Macrodilución en tubos sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Para este fin, los extractos etanólicos fueron trasladados en un vial de vidrio hacia el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.4.2 Identificación taxonómica y certificación del material vegetal

El material vegetal fue identificado por la MSc. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno, profesora, investigadora y curadora del Herbario de la Universidad de EL Salvador, quien extendió y entregó un certificado haciendo constar que el material vegetal utilizado corresponden a *Allium tuberosum* (ajo chino) y *Allium cepa* L. (cebolla morada). (Ver anexo N°8, figura N° 35)

4.4.3 Procesamiento de las muestras vegetales frescas (Ver anexo N° 1)

Ajo Chino (*Allium tuberosum*):

- Se separaron los bulbos de forma individual.
- Se retiró la cáscara de cada uno de los bulbos haciendo presión con mortero y pistilo.

Cebolla Morada (*Allium cepa* L.):

- Se retiró el tallo y la capa más externa del bulbo de forma manual.
- Se lavó el bulbo con abundante agua destilada.
- Se realizaron cortes con un cuchillo para obtener trozos pequeños.

4.4.4 Obtención de los extractos etanólicos secos (Ver anexo N° 2)

Los extractos se obtuvieron por el método de maceración ultrasónica. Para la realización del extracto etanólico seco de *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada) se utilizó etanol al 95% v/v como solvente.

El procedimiento para la obtención de los extractos se describe a continuación:

- Pesar 150.0 g de ajo o cebolla (bulbo fresco previamente procesado).
- Colocar la muestra en un Erlenmeyer con capacidad para 500 mL
- Medir en una probeta de vidrio 150 mL de etanol al 95% v/v y adicionarla al Erlenmeyer que contiene la muestra vegetal. Cantidad necesaria para cubrir la muestra en ambos casos.
- Colocar el Erlenmeyer en el equipo de Ultrasonido durante 2 horas. (Ver figura N° 4).
- Posterior al tiempo de maceración en ultrasonido, filtrar el extracto, recibir en un vaso de precipitado de 600 mL e identificarlos. (Ver figura N° 5).
- Tapar los recipientes utilizando papel aluminio para evitar contaminación por agentes externos. (Ver figura N° 6)
- Realizar agujeros en la tapa de papel aluminio para favorecer la evaporación del solvente.
- Dejar secar el extracto a temperatura ambiente durante tres semanas para evitar que el calor degrade el extracto obtenido.
- Pasadas las primeras tres semanas, trasegar cada extracto a viales de vidrio previamente pesados, y dejar secar a temperatura ambiente dos semanas más. (Ver figura N° 6).
- Pesar y calcular el porcentaje de rendimiento obtenido para ambos extractos.

- Disponer los extractos obtenidos en un desecador a temperatura ambiente para su posterior análisis.

4.4.5 Reactivación de las cepas de referencia (Ver anexo N° 3, figura N° 7 y 8)

Las cepas provistas por CENSALUD fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

- Tomar con un asa estéril la cepa de referencia *Escherichia coli* conservada en placas de petri.
- Inocular con el microorganismo mediante el método de estriado a dos placas de petri estériles conteniendo Agar Tripticasa Soya (TSA) solidificado.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- Repetir el mismo proceso con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

4.4.6 Identificación de las cepas de referencia

La identificación se hizo antes del ensayo para verificar que los microorganismos utilizados eran los requeridos. Se realizaron pruebas en los agares selectivos Eosina-Azul de Metileno (EMB) y MacConkey en donde se verificaron las características macroscópicas de pureza. Además, para obtener una identidad presunta de las cepas de referencia, se incluyeron seis pruebas bioquímicas comunes entre el género Enterobacteria, las pruebas bioquímicas incluidas fueron: reacción de Indol, Voges Proskauer, Rojo de Metilo, Agar Citrato, Agar Hierro-Triple Azúcar (TSI) y Motilidad.

Para realizar la identificación microscópica, se realizó tinción al Gram.

4.4.6.1 Identificación macroscópica mediante agares selectivos

Para esta identificación se utilizaron los medios selectivos agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) y agar MacConkey. (Ver Anexo N° 4, figura N° 9)

Siembra en Agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB) (Ver anexo N° 4, figura N° 11)

Para la cepa de *Escherichia coli*:

- Tomar con un asa estéril una de las colonias obtenidas en las placas con TSA. Transferir mediante el método de estriado a una placa conteniendo Agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB) solidificado.
- Incubar a 37 °C por 24 horas
- Realizar la verificación de la morfología macroscópica de las colonias obtenidas, observando colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado.

Para la cepa de *Klebsiella pneumoniae*:

- Tomar con un asa estéril una de las colonias obtenidas en las placas con TSA. Transferir mediante el método de estriado a una placa conteniendo Agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB) solidificado.
- Incubar a 37 °C por 24 horas
- Realizar la verificación de la morfología macroscópica de las colonias obtenidas, observando colonias mucosas de color rosa púrpura.

Siembra en agar MacConkey (Ver Anexo N° 4, figura N° 11)

Para la cepa de *Escherichia coli*:

- Tomar con un asa estéril una de las colonias obtenidas en las placas con TSA. Transferir mediante el método de estriado a una placa conteniendo Agar MacConkey solidificado.
- Incubar a 37 °C por 24 horas
- Realizar la verificación de la morfología macroscópica de las colonias obtenidas, observando colonias rojas con halo turbio.

Para *Klebsiella pneumoniae*:

- Tomar con un asa estéril una de las colonias obtenidas en las placas con TSA. Transferir mediante el método de estriado a una placa conteniendo Agar MacConkey solidificado.
- Incubar a 37 °C por 24 horas
- Realizar la verificación de la morfología macroscópica de las colonias obtenidas, observando colonias rosadas mucosas.

4.4.6.2 Identificación microscópica por Tinción de Gram (Ver Anexo N° 4, figura N° 10)

- Colocar una pequeña gota de solución salina en el centro de un portaobjetos limpio.
- Flamear el asa de siembra y dejar enfriar. Tomar en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferir a la gota de solución salina. Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.

- Teñir con cristal violeta agregando suficiente colorante y dejar que actúe durante 1 minuto. Lavar suavemente con agua.
- Aplicar el mordiente, yodo de Gram, y dejar actuar durante 1 minuto. Lavar suavemente con agua.
- Decolorar aplicando alcohol etílico al 95%. Lavar suavemente con agua.
- Aplicar safranina para la tinción de contraste, dejando actuar por 1 minuto. Lavar suavemente con agua.
- Dejar secar la preparación y examinar en el microscopio. (Ver Anexo N° 4, figura N° 12).

4.4.6.3 Pruebas Bioquímicas (Ver Anexo N° 4, de la figura N° 13 a la N° 20)

Reacción de Indol

- Sobre 1 mL de medio de caldo triptófano, inocular con las colonias del microorganismo patógeno de prueba
- Incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. Luego de la incubación, añadir 5 gotas de reactivo de Erlich por la pared inferior del tubo.

Voger proskauer

- Inocular el caldo con las colonias del microorganismo patógeno de prueba.
- Incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.
- Luego de finalizado el tiempo de incubación, adicionar al tubo de ensayo 3 gotas de Alfa-naftol + 2 gotas de hidróxido de potasio.
- Agitar cuidadosamente el tubo.
- Dejar reposar el tubo durante 10 a 15 minutos. El desarrollo de un color rojo luego de 15 minutos indica la presencia de diacetilo y la prueba es positiva.

Rojo de metilo

- Inocular el caldo rojo de metilo con las colonias del microorganismo patógeno.
- Incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.
- Agregar 2 gotas del reactivo rojo de metilo.
- La prueba es positiva si se desarrolla un color rojo en el tubo. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir un viraje del indicador debido a que el microorganismo fermento la glucosa.

Prueba de movilidad

- Inocular la colonia del microorganismo patógeno de prueba por punzada por el agar MIO (Movilidad-Indol-Ornitina).
- Incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- Luego de la incubación observar la movilidad de la bacteria en el medio de cultivo inclusive más allá de la punzada de siembra.

Prueba en agar TSI

- Inocular los tubos de TSI con asa de punta, introduciendo la punta entre 3 y 5 mm del fondo del tubo, luego de retirar el alambre del fondo, estriar sobre la superficie.
- Incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas
- Observar el crecimiento en el medio de cultivo y la coloración, además, si hay formación de gas SH_2

Prueba en agar citrato

- Inocular por estría el microorganismo patógeno de prueba sobre el agar inclinado de citrato.
- Incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4 días.
- La prueba es positiva cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría acompañado o no, de un viraje del indicador color azul.

4.4.7 Preparación de la suspensión estandarizada de las cepas de referencia (Ver anexo N° 5, figura N° 21)

- Preparar el estándar Mc Farland de 0.5%, midiendo 0.05 ml de BaCl_2 + 9.95 mL de H_2SO_4 . Este estándar tiene una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias por cada mililitro (UFC/mL).
- Agitar vigorosamente con un vortex mecánico.
- Comprobar la densidad del estándar Mc Farland 0.5%, mediante lecturas de absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV. La absorbancia del estándar a una longitud de onda de 625 nm debe estar entre 0.08 y 0.10.
- Preparar tubos conteniendo 10 mL de solución salina estéril.
- Del cultivo de *Escherichia coli* mantenido en la placa de agar TSA, transferir cierto número de colonias a un tubo de ensayo utilizando un asa bacteriológica.
- Repetir el procedimiento anterior hasta obtener lecturas de absorbancia entre 0.08 y 0.10 a una longitud de onda de 625 nm equivalente al estándar de Mc Farland 0.5%.
- Realizar diluciones seriadas hasta obtener una concentración bacteriana de 10^2 UFC/mL

- Verificar la densidad celular real contenida en cada dilución mediante el método de vertido en placa utilizando agar TSA.

Realizar el mismo proceso con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. (Ver Anexo N° 5, figura N° 22).

4.4.8 Determinación de la actividad antibacteriana ⁽²⁸⁾

Se utilizó el método de Kirby Bauer Modificado. El fundamento de este método es la difusión de la sustancia en investigación, colocada en un cilindro vertical sobre una capa de agar Mueller-Hinton (MH) solidificado, que contiene en la superficie el microorganismo de prueba, de tal manera que si es susceptible, se comprueba observando la formación de un halo de inhibición alrededor del cilindro.

4.4.8.1 Prueba de solubilidad para los extractos

Para *Allium tuberosum* (Ajo chino):

- Pesar 0.1g de extracto seco de ajo.
- Transferir la cantidad de extracto pesada a un tubo de ensayo
- Medir 0.1mL de agua destilada con una pipeta volumétrica o con probeta.
- Adicionar el agua destilada al tubo conteniendo el extracto seco
- Agitar vigorosamente con un agitador de vidrio.
- Observar la solución obtenida.
- De no observar completa disolución, adicionar 0.1 mL de agua destilada agitando vigorosamente con un agitador de vidrio. Repetir este proceso hasta obtener completa disolución
- Reportar el volumen de solvente utilizado.

Repetir el mismo proceso utilizando etanol al 70% v/v

Para *Allium cepa* L. (Cebolla morada):

- Pesar 0.1g de extracto seco de ajo.
- Transferir la cantidad de extracto pesada a un tubo de ensayo
- Medir 0.1mL de agua destilada con una pipeta volumétrica.
- Adicionar el agua destilada al tubo conteniendo el extracto seco
- Agitar vigorosamente con un agitador de vidrio.
- Observar la solución obtenida.
- De no observar completa disolución, adicionar 0.1 mL de agua destilada agitando vigorosamente con un agitador de vidrio. Repetir este proceso hasta obtener completa disolución
- Reportar el volumen de solvente utilizado.

Repetir el mismo proceso utilizando etanol al 70% v/v.

4.4.8.2 Preparación de las concentraciones a ensayar (Ver Anexo N° 5, figura N° 23)

Se pesaron en una balanza analítica de manera individual 5.0 g de cada uno de los extractos de *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada) y se realizaron diluciones que permitieron obtener concentraciones de 200.0 mg/mL, 100.0 mg/mL, 50.0 mg/mL, 25.0 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL, 1.562 mg/mL.

A continuación se describe la cascada de dilución a seguir, tomando en cuenta que el solvente utilizado fue agua destilada estéril.

- Pesar los 5.0 g del extracto vegetal (ajo y cebolla) en un vaso de precipitado de 25 mL.
- Disolver los 5.0 g de extracto vegetal seco en 15.0 mL de agua destilada estéril.

- Filtrar la solución utilizando papel filtro poro grueso para eliminar cualquier tipo de residuo.
- Recibir el filtrado en un recipiente limpio y seco.
- Transferir la solución resultante a un balón volumétrico de 25.0 mL y llevar a volumen, obteniendo una concentración de 200.0 mg/mL.
- Homogenizar la solución agitando por 5 min.
- Tomar 5.0 mL de la solución anterior utilizando una pipeta volumétrica estéril.
- Tomar una alícuota de 5 mL y trasladar a un balón volumétrico de 10.0 mL, obteniendo una concentración de 100.0 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 50.0 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 25.0 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 12.5 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 6.25 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 3.125 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 1.562 mg/mL. (Ver Anexo N° 5, figura N° 24)

4.4.8.3 Inoculación de las placas (Ver Anexo N° 5, figuras N° 25 y 26)

Se prepararon placas inoculadas para cada cepa de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en forma separada:

- Por el método de extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalente a 1.5×10^8 MO/mL, inocular uniformemente la superficie del medio Agar Mueller Hinton.
- Dejar secar el medio con la suspensión de microorganismos durante 10 minutos a temperatura ambiente en condiciones estériles.

El proceso de inoculación se ejecutó utilizando dos cilindros de acero inoxidable por placa, los cuales fueron identificados como “E-A” para aquellos que contenían las diluciones preparadas a partir del extracto de *Allium tuberosum* (Ajo Chino), y como “E-Ce” para aquellos que contenían las diluciones preparadas a partir del extracto de *Allium cepa* L. (Cebolla morada); con el fin de evaluar la actividad antibacteriana de ambas especies vegetales.

Procedimiento:

- Colocar sobre la superficie del medio inoculado con *Escherichia coli* un cilindro de acero inoxidable. Identificar la placa como “E-A”.
- Proceder a llenar con una micropipeta estéril el cilindro de acero inoxidable con la dilución cuya concentración corresponde a 200.0 mg/mL de Ajo Chino (*Allium tuberosum*). Nota: repetir el proceso anterior para cada una de las concentraciones preparadas.
- Incubar a 37 °C por 24.
- Medir los diámetros de inhibición con un pie de rey. (Ver Anexo N° 5, figura N° 27)

Se realizó el mismo procedimiento utilizando el medio inoculado con la suspensión de *Klebsiella pneumoniae*. Además, se repitió todo el proceso con

las concentraciones de *Allium cepa* L. preparadas. Las pruebas se realizaron por duplicado para cada una de las cepas de referencia y para cada concentración de extracto a ensayar. Además de los parámetros antes mencionados, se llevaron dos placas como blanco: una conteniendo en los cilindros únicamente agua destilada estéril y otra conteniendo una solución de Yodo al 2%; ambas en presencia del microorganismo inoculado.

4.4.9 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ⁽¹⁵⁾

Se parte de la concentración en donde el extracto de *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada) hayan presentado una mayor inhibición bacteriana obtenida a partir del método de Kirby Bauer Modificado.

Para el caso de *Allium cepa* L., al no presentar inhibición en las concentraciones inicialmente establecidas, se preparó una solución Stock de 1000 mg/mL; la cual fue utilizada como la concentración de partida para el ensayo de CIM sobre ambas cepas de referencia.

Para la preparación de la solución Stock se pesaron 10.0 g de extracto de *Allium cepa* L.; utilizando un balón volumétrico de 10 mL, se llevó a volumen con agua destilada estéril.

4.4.9.1 Método de Macrodilución en caldo Mueller Hinton (MH)

Fundamento: consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Para el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos; por lo que se preparará el juego de tubos con 1ml de caldo MH.

Para efectuar las pruebas se prepararon diluciones por duplicado directamente en los tubos: (Ver Anexo N° 6, figura N° 28)

- Colocar 2.0 ml del extracto de Ajo Chino (*Allium tuberosum*) cuya concentración resulta con más carácter antimicrobiano en el primer tubo de la serie de diluciones. Identificar como “tubo 1”
- En cada uno de los tubos restantes añadir 1 ml de caldo Mueller Hinton.
- Con una pipeta estéril, transferir 1.0 ml del “tubo 1” al segundo e identificar como “tubo 2”.
- Después de mezclar el contenido del “tubo 2”, transferir 1.0 ml con una pipeta estéril diferente (utilizar una pipeta diferente en todas las transferencias sucesivas) al tercer tubo. Continuar el proceso hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1.0 ml que se descarta. En total se evalúan 10 diluciones sin incluir tubo control.
- El último tubo no recibe solución de extracto y sirve como control de crecimiento. Identificar como “tubo T”.
- Las concentraciones finales del extracto de Ajo Chino (*Allium tuberosum*) en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en el caldo. (Ver Anexo N° 6, figura N° 31)

Repetir el proceso para la concentración a evaluar del extracto de Cebolla Morada (*Allium cepa* L.). (Ver Anexo N° 6, figura N° 30)

Este proceso de inoculación se realizó para ambas cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* por separado, y de manera individual para cada concentración de extracto.

- Tomar de la serie de suspensiones estandarizadas la que presenta un recuento de 10^5 UFC/mL.

- Añadir a cada tubo 1.0 ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35°C durante 18 horas. (Ver Anexo N° 6, figura N° 29)

La CIM corresponde a la mínima concentración de extracto en donde no se observa desarrollo de crecimiento (turbidez). La CIM se expresa en mg/mL.

4.4.10 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) ⁽¹⁵⁾

Se refiere a la concentración del extracto necesaria para producir una disminución del tamaño original del inóculo bacteriano en un porcentaje mayor o igual al 99.9%. Muchas veces la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) es equivalente a la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

La determinación se desarrolló de la siguiente manera: (Ver Anexo N° 7, figura N° 32)

- Partiendo del tubo que presente la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), resembrar utilizando el método de vertido en placa, añadiendo 0.1 mL del tubo inoculado y vertiendo 20.0 mL de agar Mueller Hinton a 45°C. Realizar este proceso por duplicado.
- Repetir el paso anterior con todos aquellos tubos en donde la concentración de extracto es mayor que la CIM determinada.
- Incubar las placas durante 20 horas a 37 °C.
- Realizar las lecturas y reportar la concentración en la cual hubo una reducción del 99.9% del inóculo. (Ver Anexo N° 7, figuras N° 33 y 34)

4.5 Análisis Estadístico

Luego de realizar los ensayos de macrodilución en caldo MH por duplicado y determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se tabularon los datos obtenidos tomando en cuenta

los siguientes factores: extractos de ajo y cebolla, cepas utilizadas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*).

Para obtener las diferencias significativas entre los extractos utilizados, y, al mismo tiempo, observar las diferencias significativas de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos, se utilizó el método estadístico de análisis multifactorial.

El análisis multifactorial consiste en describir el impacto que presentan dos o más factores frente a una variable dependiente. Dicho análisis estadístico fue elaborado en el programa Statgraphics Centurion. En el mismo programa se utilizó la prueba LSD de Fisher para calcular la menor diferencia significativa entre las variables independientes. Se utilizó un nivel de confianza de 95% para todos los análisis.

El análisis multifactorial fue aplicado debido a que todos los factores que fueron analizados (extractos, cepas y concentración), influyen en el crecimiento microbiano. Se evaluó el efecto que provocan estos factores en los resultados obtenidos, ésto se detalla en el numeral 5.9 del siguiente capítulo.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Obtención e identificación del material vegetal

Se utilizó 1 libra de cada una de las especies y se transportaron a temperatura ambiente hacia el Laboratorio de investigación de productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia en donde se seleccionaron los bulbos para la elaboración de los extractos etanólicos secos.

El material vegetal fue identificado por la MSc. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno, profesora, investigadora y curadora del Herbario de la Universidad de EL Salvador, quien extendió y entregó un certificado haciendo constar que el material vegetal utilizado corresponden a *Allium tuberosum* (ajo chino) y *Allium cepa* L. (cebolla morada).

5.2 Rendimiento obtenido en la preparación de los extractos

Se obtuvo el porcentaje de rendimiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso de extracto seco en gramos}}{\text{peso de material vegetal fresco en gramos}} \times 100 \%$$

El proceso de evaporación del etanol fue relativamente lento, debido a que se decidió no utilizar calor para no exponer a alguna alteración los extractos; esto con el fin de asegurar que los datos finales fuesen más confiables. Ambos extractos presentaron apariencia y consistencia resinosa, debido posiblemente a la interacción del solvente de extracción (etanol) y del contenido (en apariencia aceite) de la materia vegetal. El porcentaje de rendimiento de cada extracto se refleja en la tabla N° 1.

Tabla N° 1. Porcentaje de rendimiento de los extractos de *Allium tuberosum* (Ajo Chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada)

Tipo de extracto	Especie vegetal	Parte de la planta utilizada	Peso de material vegetal fresco (g)	Volumen de solvente (mL)	Peso del extracto seco (g)	Rendimiento (%)
Etanólico seco	<i>Allium tuberosum</i>	Bulbo fresco	150.0	150.0 mL	13.0895	8.72
	<i>Allium cepa</i> L.	Bulbo fresco	150.0	150.0 mL	17.6270	11.75

Los resultados obtenidos reflejan que el contenido extraído de cada una de las muestras vegetales es distinto. Esto debido a que, posiblemente, los compuestos estructurales se encuentran en diversas proporciones dentro de cada muestra vegetal.

5.3 Resultados de pruebas bioquímicas

Los resultados se presentan en el cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Resultado de pruebas bioquímicas para las cepas de referencia

Prueba bioquímica	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Resultado esperado	Resultado obtenido	Resultado esperado	Resultado obtenido
Reacción de Indol	(+)	(+)	(-)	(-)
Voger Proskauer	(-)	(-)	(-)	(-)
Rojo de metilo	(+)	(+)	(+)	(+)
Prueba de movilidad	(+)	(+)	(-)	(-)
Prueba de agar citrato	(-)	(-)	(+)	(+)
Prueba de agar TSI	A/A más presencia de gas	A/A más presencia de gas	A/A más presencia de gas	A/A más presencia de gas

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo;

(A/A): reacción ácido sobre ácido o fermentador de lactosa

Los resultados de las pruebas bioquímicas indican que ambas cepas corresponden a los microorganismos propuestos para realizar el análisis. Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 provistas por CENSALUD poseen un alto grado de pureza.

5.4 Verificación del método de estandarización

La estandarización de las cepas de referencia se llevó a cabo mediante las lecturas de absorbancia dadas por el espectrofotómetro UV-Vis, tomando como referencia el estándar Mc Farland 0.5% en donde se establece que las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 625 nm deben estar entre 0.08 y 0.10 para obtener una concentración microbiológica de 1.5×10^8 . Las diluciones seriadas fueron realizadas con solución salina estéril.

Para la verificación del método de estandarización, se realizó un recuento de la suspensión estandarizada por duplicado utilizando el método de vertido en placa con agar TSA. Los resultados de las diluciones seriadas se muestran en la tabla N° 2. El resultado en UFC/mL es el promedio de las dos placas.

Tabla N° 2. Verificación del método de estandarización microbiológica

Cepa	Medio de dilución	Dilución	Resultados en (UFC/mL)		
			Recuento		Promedio
			1	2	
<i>Escherichia Coli</i>	Solución salina estéril	10^{-2}	DNPC	DNPC	DNPC
		10^{-4}	1.3×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5
		10^{-5}	2.1×10^6	1.8×10^6	1.9×10^6
		10^{-6}	5.3×10^7	7.3×10^7	6.3×10^7
		10^{-7}	1.0×10^8	1.4×10^8	1.2×10^8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Solución salina estéril	10^{-2}	DNPC	DNPC	DNPC
		10^{-4}	1.5×10^5	1.9×10^5	1.7×10^5
		10^{-5}	1.3×10^6	1.5×10^6	1.4×10^6
		10^{-6}	7.0×10^7	7.8×10^7	7.4×10^7
		10^{-7}	1.9×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8

DNPC: Demasiado Numerosas Para Contar

Para la estandarización de las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* se reportó una absorbancia de 0.092 y 0.085 respectivamente, ambas correspondientes a la dilución 10^{-2} , la cual es equivalente al estándar Mc Farland al 0.5% donde teóricamente se esperaba una densidad celular de 1.5×10^8 UFC/mL. Los resultados de la tabla N°2 reflejan que las densidades celulares reales se alejan de lo esperado teóricamente, debido a que las UFC/mL necesarias para realizar el ensayo de Kirby Bauer Modificado se encuentran en la dilución 10^{-7} .

5.5 Prueba de solubilidad de los extractos

Las pruebas de solubilidad se realizaron utilizando etanol al 70% v/v y agua destilada estéril como solventes. Esta prueba se hizo con el fin de buscar la alternativa más confiable al momento de reactivar los extractos. Para ello, se realizó en tubos de ensayo estériles, en donde se pesaron 0.1 g de cada extracto y se verificó la solubilidad con volúmenes que fueron desde 0.1 mL a 1.0 mL para cada solvente. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Prueba de solubilidad de los extractos

Extractos etanólicos	Resultado de solubilidad en Etanol al 70%	Resultado de solubilidad en agua destilada estéril
<i>Allium cepa</i> L	1 en 10	Totalmente soluble
<i>Allium tuberosum</i>	1 en 10	Totalmente soluble

Tomando en cuenta los resultados expresados en el cuadro N° 2, se utilizó agua destilada estéril como solvente para reactivar los extractos y llevar a cabo las concentraciones a ensayar. El uso del agua destilada estéril favoreció la realización del ensayo, porque éste no intervino como un factor adulterante en los resultados finales al no poseer un carácter antibacteriano.

5.6 Prueba de antibiograma por el método de Kirby Bauer Modificado

Para la prueba de sensibilidad de los antimicrobianos contenidos en los extractos, se utilizó el método de Kirby Bauer Modificado; esta metodología ha sido aplicada durante años para la verificación de la Concentración Inhibitoria mínima (CIM), lo que favoreció para tener un panorama previo del comportamiento de los extractos sobre los microorganismos de referencia. Se inoculó mediante un hisopo estéril las placas conteniendo agar MH solidificado con las suspensiones de microorganismo estandarizadas, cuyas concentraciones fueron de 1.2×10^8 UFC/mL para *Escherichia coli* y 1.8×10^8 UFC/mL para *Klebsiella pneumoniae* respectivamente.

La interpretación del antibiograma se refleja en el cuadro N° 3.

Cuadro N° 3. Criterios de interpretación del antibiograma

Criterio	Dictamen
Halos de inhibición mayores a 20 mm	Sensible
Halos de inhibición entre 12 mm y 20	Intermedio
Halos de inhibición menores a 12 mm	Resistente

Además, se incluyeron al ensayo controles positivos de cilindros que contenían 1.0 mL de solución de yodo al 2% y cilindros con un blanco, que en nuestro caso, dados los resultados de solubilidad, contenían 1.0 mL de agua destilada estéril. Los datos obtenidos para ambas sustancias se muestran en el cuadro N°4.

Cuadro N° 4. Halos de inhibición de los controles

Sustancia	Halo de inhibición promedio (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Solución de yodo al 2% (control)	29.5 mm	27.0 mm
Agua destilada estéril (blanco)	Sin halo	Sin halo

Los datos obtenidos en el Cuadro N° 4 sirvieron como referencia para los resultados finales dados por los extractos. La solución de yodo al 2% está categorizada como un antibacteriano, por lo que los datos esperados para los extractos deberán ser similares a éste. Por otro lado, los resultados mostrados para el agua destilada estéril (blanco), evidencian que el solvente no es un factor que influye en los datos reportados para las muestras vegetales. Los resultados obtenidos para cada combinación extracto-microorganismo se describen en las tablas N° 3, 4, 5 y 6.

Tabla N° 3. Halos de inhibición de *Allium tuberosum* sobre *Escherichia coli*

Extracto	Ensayo	Concentración de extracto (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)		Promedio (mm)	Dictamen
			Placas			
			1	2		
<i>Allium tuberosum</i>	1	200.00	28.4	29.1	28.7	Sensible
		100.00	25.4	25.7	25.6	Sensible
		50.00	21.0	22.4	21.7	Sensible
		25.00	17.0	15.6	16.3	Intermedio
		12.50	10.1	10.0	10.1	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		3.12	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
	1.56	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	
	2	200.00	29.4	28.0	28.7	Sensible
		100.00	26.2	26.0	26.1	Sensible
		50.00	21.0	21.0	21.0	Sensible
		25.00	18.4	18.6	18.5	Intermedio
		12.50	11.2	10.0	10.6	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
3.12		Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	
1.56	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente		

Los datos de la tabla N° 3 muestran cómo la *Escherichia coli* presenta resistencia ante *Allium tuberosum* a concentraciones inferiores de 25 mg/mL, mostrando en ambos ensayos, halos de inhibición menores a 12 mm.

Es evidente que la concentración de extracto es inversamente proporcional al crecimiento microbiano, es decir, que a mayor concentración de extracto de *Allium tuberosum*, menor será el crecimiento de *Escherichia coli* resultante. Lo

antes dicho se respalda en los halos de inhibición reportados para las concentraciones de 200 mg/mL y 100 mg/mL, en ambos ensayos las lecturas son bastante cercanas a las lecturas registradas para la solución de Yodo al 2% sobre *Escherichia coli*. Lo que evidencia que la capacidad antibacteriana de *Allium tuberosum* es bastante eficaz sobre la cepa de *Escherichia coli* a concentraciones relativamente bajas.

Tabla N° 4. Halos de inhibición de *Allium tuberosum* sobre *Klebsiella pneumoniae*

Extracto	Ensayo	Concentración de extracto (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)		Promedio (mm)	Dictamen
			Placas			
			1	2		
<i>Allium tuberosum</i>	1	200.00	25.5	25.0	25.3	Sensible
		100.00	19.8	19.0	19.4	intermedio
		50.00	16.4	17.0	16.7	intermedio
		25.00	12.5	13.0	12.8	intermedio
		12.50	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		3.12	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		1.56	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
	2	200.00	26.1	25.7	25.9	Sensible
		100.00	20.5	19.9	20.2	Sensible
		50.00	18.7	18.0	18.4	intermedio
		25.00	13.7	14.4	14.1	intermedio
		12.50	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
3.12		Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	
1.56		Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	

Lo reportado en la tabla N° 4 para el extracto de *Allium tuberosum* sobre cepa de *Klebsiella pneumoniae* posee bastante similitud con lo reportado para la interacción de este mismo extracto sobre la cepa de *Escherichia coli*. Puede verse claramente que ambas bacterias presentan resistencia a concentraciones inferiores a 25 mg/mL. Sin embargo, para este caso, se puede decir que solo la concentración de 200 mg/mL de *Allium tuberosum* refleja una sensibilidad verídica sobre *Klebsiella pneumoniae*, al ser constante el resultado de sus halos de inhibición en ambos ensayos.

Tabla N° 5. Halos de inhibición de *Allium cepa* L. sobre *Escherichia coli*

Extracto	Ensayo	Concentración de extracto (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)		Promedio (mm)	Dictamen
			Placas			
			1	2		
<i>Allium cepa</i> L.	1	200.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		100.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		50.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		25.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		12.50	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		3.12	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
	1.56	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	
	2	200.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		100.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		50.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		25.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		12.50	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
3.12		Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	
1.56	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente		

Tabla N° 6. Halos de inhibición de *Allium cepa* L. sobre *Klebsiella pneumoniae*

Extracto	Ensayo	Concentración de extracto (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)		Promedio (mm)	Dictamen
			Placas			
			1	2		
<i>Allium cepa</i> L.	1	200.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		100.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		50.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		25.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		12.50	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		3.12	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
	1.56	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	
	2	200.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		100.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		50.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		25.00	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		12.50	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
		6.25	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
3.12		Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente	
1.56	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente		

Los resultados que muestra la tabla N° 5 y 6, en donde se ensayaron concentraciones de *Allium cepa* L. iguales a las de *Allium tuberosum* sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* respectivamente, demuestran que el efecto antibacteriano del extracto de *Allium cepa* L. es nulo en comparación al presentado por el extracto de *Allium tuberosum*.

5.7 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de macrodilución en caldo

Luego del ensayo realizado con el método de Kirby Bauer Modificado, y basándonos en los resultados obtenidos, se procedió a verificar la CIM para ambos extractos partiendo de las concentraciones menores en donde éstos presentaron sensibilidad ante las cepas de referencia. Las macrodiluciones fueron hechas con volúmenes de 1.0 mL de caldo MH.

Para el caso de *Allium cepa* L., al no presentar inhibición en las concentraciones inicialmente establecidas, se preparó una solución Stock de 1000 mg/mL, la cual será la concentración de partida para el ensayo de CIM sobre ambas cepas de referencia. Para la preparación de la solución Stock se pesaron 10.0 g de extracto de *Allium cepa* L. y utilizando un balón volumétrico de 10 mL, se llevó a volumen con agua destilada estéril. Las concentraciones de partida se presentan en el cuadro N° 5.

Cuadro N° 5. Concentraciones iniciales y finales evaluadas para los extractos de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L.

Extracto	Microorganismo	Concentración inicial de extracto (mg/mL)	Concentración final evaluada (mg/mL)
<i>Allium tuberosum</i>	<i>Escherichia coli</i>	50	0.097
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	200	0.390
<i>Allium cepa</i> L.	<i>Escherichia coli</i>	1000	1,953
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1000	1,953

Los resultados que se muestran en el cuadro N°5 expresan las concentraciones iniciales en las que presentaron sensibilidad ambas cepas de referencia; además, se muestra la concentración final a la que se evaluó para esta determinación cada uno de los extractos. En total se ensayaron diez concentraciones diferentes. Partiendo de la concentración inicial, ésta se redujo a la mitad en cada uno de los tubos de la serie. Cada tubo fue inoculado con 1.0 mL de la cepa de referencia a una concentración de 1.2×10^5 UFC/mL para *Escherichia coli* y 1.7×10^5 UFC/mL para *Klebsiella pneumoniae*

En la tabla N° 7 se describen las CIM obtenidas en los ensayos de los extractos. Se debe tener en cuenta que el resultado mostrado, no varió en las cuatro veces en que se realizó el análisis.

Tabla N° 7. Resultados de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de *Allium cepa* L. y *Allium tuberosum* sobre las cepas de referencia

Cepa	Ensayo	Concentración de microorganismo (UFC/mL)	Extracto analizado	CIM del extracto analizado (mg/mL)	
				Tubo N°1	Tubo N°2
<i>Escherichia coli</i>	1	1.2×10^5	<i>A. tuberosum</i>	25	25
		1.2×10^5	<i>A. cepa</i> L.	500	500
	2	1.2×10^5	<i>A. tuberosum</i>	25	25
		1.2×10^5	<i>A. cepa</i> L.	500	500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1.7×10^5	<i>A. tuberosum</i>	100	100
		1.7×10^5	<i>A. cepa</i> L.	1000	1000
	2	1.7×10^5	<i>A. tuberosum</i>	100	100
		1.7×10^5	<i>A. cepa</i> L.	1000	1000

Al realizar la prueba de determinación de CIM para los extractos, se puede observar que el extracto de *Allium tuberosum* presenta las CIM más bajas para la cepa de *Escherichia coli*; siendo esta, de 25 mg/mL en ambos ensayos. El extracto de *Allium tuberosum* sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae* presentó una CIM de 100 mg/mL en ambos ensayos, por lo que se puede decir que la cepa de *Escherichia coli* es más sensible a concentraciones menores en comparación con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados de CIM

para el extracto de *Allium cepa* L. confirman que los componentes antibacterianos se encuentran en menor proporción que en el extracto de *Allium tuberosum*. Es claro que se necesita una mayor concentración de extracto de *Allium cepa* L. para lograr la inhibición de ambas cepas.

5.8 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de *Allium cepa* L. y *Allium tuberosum* sobre las cepas de referencia

Para verificar la CIM se procedió a hacer el recuento en placa, no solo partiendo de los tubos donde se obtuvo la CIM para ambos extractos, sino también para todas las concentraciones ensayadas. De esta manera se logró, al mismo tiempo, determinar la CBM en donde el 99.9% de ambas cepas es erradicada por los extractos de *Allium cepa* L. y *Allium tuberosum*. Para ello, se tomaron alícuotas de 0.1 mL de cada uno de los tubos, mediante el método de vertido en placa utilizando agar MH. Todo el análisis se hizo por duplicado y se incubaron las placas a 37°C por 20 horas.

Los resultados obtenidos de CBM para cada uno de los extractos se presentan en la tabla N° 8.

Tabla N° 8. Resultados de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de *Allium cepa* L. y *Allium tuberosum* sobre las cepas de referencia

Cepa	Ensayo	Concentración de microorganismo (UFC/mL)	Extracto analizado	CBM del extracto analizado (mg/mL)	
				Placa 1	Placa 2
<i>Escherichia coli</i>	1	1.2x10 ⁵	<i>Allium tuberosum</i>	25	25
		1.2x10 ⁵	<i>Allium cepa</i> L.	1000	1000
	2	1.2x10 ⁵	<i>Allium tuberosum</i>	25	25
		1.2x10 ⁵	<i>Allium cepa</i> L.	1000	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1.7x10 ⁵	<i>Allium tuberosum</i>	200	200
		1.7x10 ⁵	<i>Allium cepa</i> L.	1000	1000
	2	1.7x10 ⁵	<i>Allium tuberosum</i>	200	200
		1.7x10 ⁵	<i>Allium cepa</i> L.	1000	1000

En los resultados obtenidos para la determinación de la CBM para los extractos, se observa que el de *Allium tuberosum*, al igual que en la determinación de la CIM, presenta las CBM más bajas para la cepa de *Escherichia coli*; siendo esta, de 25 mg/mL en ambos ensayos. El extracto de *Allium tuberosum* sobre la cepa de *Klebsiella pneumonia* presentó una CBM de 200 mg/mL en ambos ensayos, por lo que la tendencia de los datos refleja que la cepa de *Escherichia coli* puede llegar a ser erradicada a concentraciones menores de *Allium tuberosum* en comparación con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Los valores de CBM para el extracto de *Allium cepa* L. sobre *Escherichia coli* fueron de 1000 mg/mL en ambos ensayos. De igual manera la CBM necesaria sobre *Klebsiella pneumonia* fue de 1000 mg/mL.

Para lograr ver con mayor claridad los resultados de CIM y CBM se presenta el conjunto de datos de forma resumida en la tabla N° 9.

Tabla N° 9. Resumen de resultados de la CIM y CBM para ambos extractos

Cepa	Concentración de microorganismo (UFC/mL)	Extracto analizado	CIM del extracto analizado (mg/mL)	CBM del extracto analizado (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	1.2x10 ⁵	<i>Allium tuberosum</i>	25	25
	1.2x10 ⁵	<i>Allium cepa</i> L.	500	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.7x10 ⁵	<i>Allium tuberosum</i>	100	200
	1.7x10 ⁵	<i>Allium cepa</i> L.	1000	1000

Los datos de la tabla N° 9 reflejan que a una concentración de 25 mg/mL extracto de *Allium tuberosum* resultó ser la CIM y la CBM en el ensayo sobre la cepa de *Escherichia coli*. Se observa que existe una diferencia en los resultados

obtenidos para los ensayos sobre *Klebsiella pneumoniae*, en donde la CIM fue de 100 mg/mL y la CBM de 200 mg/mL; lo cual permite inferir que la cepa que tiene mayor resistencia, y, en consecuencia, necesita que se le apliquen mayores concentraciones del extracto de *Allium tuberosum*, es la *Klebsiella pneumoniae*.

De igual manera los resultados para el extracto de *Allium cepa* L. presenta la misma CIM y la CBM a 1000 mg/mL sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. En cuanto al ensayo realizado sobre la cepa de *Escherichia coli*, los datos muestran que la CIM difiere de la CBM, con una CIM correspondiente a 500 mg/mL y la CBM a 1000 mg/mL, lo cual deja en evidencia que para eliminar el 99.9% de ambas cepas se necesita una concentración de 1000 mg/mL del extracto de *Allium cepa* L.

5.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se trabajó con las CIM y las CBM (Variables dependientes) que se obtuvieron en cada análisis. Utilizando el programa Statgraphics Centurion se realizó un análisis de varianza multifactorial en donde se evaluaron las variables independientes que influyeron en el proceso.

El programa hace diferentes pruebas y operaciones matemáticas internas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre ambas variables dependientes. Los factores que se incluyen en el análisis son el tipo de extracto y la cepa de referencia sobre la cual fueron ensayados.

Para obtener los resultados del análisis de varianza correspondiente a la CIM de los extractos, el programa Statgraphics Centurion realizó las siguientes operaciones:

- La suma de cuadrados, el total de los cuadrados ayuda a expresar la variación total que se puede atribuir a diferentes factores.

- Los grados de libertad (GI) son una cantidad que permite introducir una corrección matemática en los cálculos estadísticos para restricciones impuestas en los datos.
- El cuadrado medio del tratamiento se obtiene dividiendo la suma de los cuadrados del tratamiento entre los grados de libertad, por lo que el cuadrado medio del tratamiento representa la variación entre las medias de las muestras.
- Razón de Fisher (Razón-F) establece que el valor estadístico de prueba resultante se debe comparar con un valor tabular de F, que indicará el valor máximo del valor estadístico de prueba que ocurriría si el planteamiento esperado fuese verdadero, a un nivel de significación seleccionado.
- Los Valores-P suelen utilizarse en las pruebas de hipótesis, por tanto, para nuestro caso, el Valor-P determina si los resultados son estadísticamente significativos.

Tabla N° 10 Análisis de Varianza para Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Extracto	1,89063E6	1	1,89063E6	136,07	0,0000
B:Microorganismo	330625,	1	330625,	23,80	0,0003
RESIDUOS	180625,	13	13894,2		
TOTAL (CORREGIDO)	2,40188E6	15			

En la tabla N° 10 se presentan los datos, en donde, sabiendo que se ha utilizado un nivel de confianza de 95%, todos aquellos valores-P que son menores a 0.05, son estadísticamente significativos a la hora de obtener los datos de CIM para cada uno de los extractos, es decir tienen un efecto significativo sobre el crecimiento del microorganismo. De esta manera, se observa que la interacción extracto-microorganismo es significativa sobre los datos de CIM. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de

los factores, puesto que 2 valores-P son menores que 0,05. Estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la Concentración Inhibitoria Mínima con un 95,0% de nivel de confianza, y, por tanto, es necesario tener en cuenta dichos factores para poder obtener resultados similares en posteriores ensayos.

En las tablas N° 11, 12, 13, y 14 se analizan los resultados de la prueba LSD (Método de diferencia significativa mínima de Fisher), obtenidos de las CIM presentadas por los extractos. Las pruebas establecen cuales medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla N° 11. Resultado de prueba LSD para Concentración Inhibitoria Mínima obtenida para *Allium tuberosum* por cepa de referencia

Microorganismo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<i>Escherichia coli</i>	4	25,0	0	X
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	100,0	0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	-75,0	0

* indica una diferencia significativa.

Dados los resultados en la tabla N°11, se observa la mínima diferencia significativa entre la CIM obtenida para el extracto de *Allium tuberosum* en relación a las cepas de referencia. La posición de las “X” en la columna de grupos homogéneos indica que quienes comparten la misma columna de las “X” no poseen diferencia significativa, en este caso existe diferencia significativa la cual es de -75,0 lo que indica que los valores de CIM obtenidos sobre la cepa de *Escherichia coli* son menores que los obtenidos sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*; es decir, que el extracto *Allium tuberosum* presenta una mayor eficacia sobre la cepa de *Escherichia coli* que sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla N° 12. Resultado de prueba LSD para Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) obtenida para *Allium cepa* L. por Microorganismo

Microorganismo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Escherichia coli</i>	4	500,0	X
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	1000,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	-500,0	0

* indica una diferencia significativa.

El análisis LSD de los resultados de CIM obtenidos por el extracto de *Allium cepa* L. sobre las dos cepas de referencia, señaló que fueron significativamente diferentes, y a su vez, indicó que los valores menores fueron los obtenidos sobre la cepa de *Escherichia coli*; lo cual sugiere que dicha cepa presenta una mayor sensibilidad ante el extracto de *Allium cepa* L. en comparación con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Este resultado es consistente con los resultados de las CIM determinadas visualmente, que se encontraron 500 mg/mL para la cepa *Escherichia coli* y 1000 mg/mL para la cepa *Klebsiella pneumoniae*

Tabla N° 13. Resultado de prueba LSD para Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por Extracto sobre *Escherichia coli*

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Allium tuberosum</i>	4	25,0	X
<i>Allium cepa</i> L.	4	500,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Allium tuberosum</i> - <i>Allium cepa</i> L.	*	-475,0	0

* indica una diferencia significativa.

La tabla N° 13 muestra el análisis LSD de la CIM obtenida por ambos extractos sobre la cepa de *Escherichia coli*. Los resultados reflejan que existe una diferencia significativa de -475.0 entre los datos de CIM de ambos extractos sobre la cepa *Escherichia coli*. En otras palabras se puede afirmar que se necesitan concentraciones menores del extracto de *Allium tuberosum* con una

CIM de 25 mg/mL para lograr un efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* en comparación al extracto de *Allium cepa* L. con una CIM de 500mg/mL

Tabla N° 14. Resultado de prueba LSD para Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por extracto sobre *Klebsiella pneumoniae*

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Allium tuberosum</i>	4	100,0	X
<i>Allium cepa</i> L.	4	1000,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Allium tuberosum</i> - <i>Allium cepa</i> L.	*	-900,0	0

El análisis LSD reflejado en la tabla N° 14 con respecto a la CIM obtenida por ambos extractos sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, expresa que se necesitan concentraciones menores del extracto de *Allium tuberosum* con una CIM de 100 mg/mL sobre *Klebsiella pneumoniae* en comparación al extracto de *Allium cepa* L., que necesitó una CIM de 500 mg/mL para lograr el mismo efecto; en el cual, sí existe una diferencia significativa de -900.0 entre los datos de CIM de ambos extractos sobre dicha cepa.

En la tabla N° 15, se expresan los resultados obtenidos para el análisis de varianza de las CBM de los extractos. En el cuadro se analizan combinaciones de factores para determinar si dicha combinación es significativa a la hora de obtener las CBM para cada extracto en relación con las cepas de referencia.

Tabla N° 15. Análisis de Varianza para Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:Extracto	3,15063E6	1	3,15063E6	1337,41	0,0000
B:Microorganismo	30625,0	1	30625,0	13,00	0,0032
RESIDUOS	30625,0	13	2355,77		
TOTAL (CORREGIDO)	3,21188E6	15			

Al igual que en el análisis de varianza realizado para los resultados de CIM se ha utilizado un nivel de confianza de 95%; por ende, todos aquellos valores-P que sean menores a 0.05 son estadísticamente significativos al momento de obtener los datos de CBM para cada uno de los extractos, es decir, que tienen un efecto significativo sobre el crecimiento del microorganismo. De esta manera, se observa que la interacción extracto-microorganismo es significativa sobre los datos de CBM debido a que el valor-P obtenido es menor que 0.05, y por tanto, es necesario tener en cuenta dichos factores para poder obtener resultados similares en posteriores ensayos.

Tabla N° 16. Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima (CBM) para *Allium tuberosum* por Microorganismo

Microorganismo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Escherichia coli</i>	4	25,0	X
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	200,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	-175,0	0

* indica una diferencia significativa.

Analizando la posición de las “X” en la columna grupos homogéneos indica que quienes comparten la misma columna de las “X” no poseen diferencia significativa, en este caso existe diferencia significativa la cual es de -175,0 lo que indica que los valores de CBM obtenidos sobre la cepa de *Escherichia coli* son menores que los obtenidos sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, es decir, que el extracto *Allium tuberosum* presenta una acción bactericida del 99.9% a menores concentraciones sobre las cepa de *Escherichia coli* que sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Con una CBM de 25 y 200 mg/mL respectivamente

Tabla N^a 17. Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima (CBM) para *Allium cepa* L. por Microorganismo

Microorganismo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Escherichia coli</i>	4	1000,0	X
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	1000,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella pneumoniae</i>		0	0

* indica una diferencia significativa.

Para el caso del extracto de *Allium cepa* L. no existe diferencia significativa al poseer una diferencia real igual a cero. Además, se puede observar que la posición de las “X” se encuentran alineadas en la columna de los grupos homogéneos, indicando que los valores de CBM obtenidos por el extracto *Allium cepa* L. sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son iguales.

El extracto *Allium tuberosum* presenta la acción bactericida del 99.9% a la misma concentración tanto para la cepa de *Escherichia coli* como para la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Con una CBM de 1000 mg/mL en ambos casos.

Tabla N^o 18. Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima (CBM) por Extracto sobre *Escherichia coli*

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Allium tuberosum</i>	4	25,0	X
<i>Allium cepa</i> L.	4	1000,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Allium tuberosum</i> - <i>Allium cepa</i> L.	*	-975,0	0

* indica una diferencia significativa.

En la tabla N^o 18 se muestra el análisis LSD de la CBM obtenida por ambos extractos sobre la cepa de *Escherichia coli*. Los resultados expresan que existe una diferencia significativa de -975.0 entre los datos de CBM de ambos extractos sobre la cepa *Escherichia coli*. Por tanto, se puede afirmar que se necesitan concentraciones menores del extracto de *Allium tuberosum* debido a que presentó una CBM de 25 mg/mL para lograr una disminución del 99.9% en

el crecimiento de *Escherichia coli* en comparación al extracto de *Allium cepa* L. que mostró una CBM en 1000 mg/mL.

Tabla N° 19. Resultados de prueba LSD para Concentración Bactericida Mínima por Extracto sobre *Klebsiella pneumoniae*

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Allium tuberosum</i>	4	200,0	X
<i>Allium cepa</i> L.	4	1000,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Allium tuberosum</i> - <i>Allium cepa</i> L.	*	-800,0	0

* indica una diferencia significativa.

El análisis LSD resultante en la tabla N° 19 con respecto a la CBM obtenida por ambos extractos sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, expresa que al necesitar concentraciones inferiores de extracto de *Allium tuberosum*, lo cual se observa al haber reportado una CBM de 200 mg/mL en comparación al extracto de *Allium cepa* L. en donde se observó una CBM de 1000 mg/mL para lograr una reducción del 99.9% del crecimiento microbiano, sí existe una diferencia significativa de -900.0 entre los datos de CBM de ambos extractos sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*; aunque las diferencias entre los resultados de ambos extractos sea marcadamente significativa, se ha conseguido verificar que ambas especies vegetales poseen un efecto antibacteriano a concentraciones relativamente bajas.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos confirman que los extractos de las especies vegetales *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. poseen en su estructura compuestos químicos que tienen un efecto antibacteriano sobre las cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.
2. Los componentes químicos que le dan el carácter antibacteriano a ambas especies vegetales *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. se encuentra en diferente proporción, lo cual se verifica con los resultados obtenidos en el antibiograma, en donde, ambas cepas de referencia mostraron sensibilidad ante concentraciones menores de *Allium tuberosum*.
3. El extracto de *Allium tuberosum* presenta una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 25 mg/mL, menor a la presentada por el extracto de *Allium cepa* L., que fue de 500 mg/mL; ambas sobre la cepa de *Escherichia coli*.
4. El extracto de *Allium tuberosum* presenta una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 100 mg/mL, que es menor a la presentada por el extracto de *Allium cepa* L., que fue de 1000 mg/mL para inhibir el crecimiento de la cepa *Klebsiella pneumoniae*.
5. El extracto de *Allium tuberosum* tiene mayor efecto bactericida a menor concentración sobre la cepa *Escherichia coli* que sobre la cepa *Klebsiella pneumoniae*, ya que los resultados expresan que el extracto de *Allium tuberosum* elimina el crecimiento del 99.9% de la cepa *Escherichia coli* a una CBM de 25 mg/mL, en comparación a la concentración necesitada por el mismo extracto sobre la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, la cual presentó una CBM de 200 mg/mL.

6. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) puede coincidir con la Concentración Bactericida Mínima (CBM), lo que se refleja en el ensayo del extracto de *Allium tuberosum* sobre la cepa *Escherichia coli*, la cual presentó una CIM y CBM en la concentración de 25 mg/mL. De igual manera para el ensayo del extracto de *Allium cepa* L. sobre la cepa *Klebsiella pneumoniae*, que se obtuvo una CIM y CBM a los 1000 mg/mL.
7. Basados en los ensayos realizados, se evidencia que el extracto de *Allium tuberosum* posee un mayor efecto antibacteriano sobre ambas cepas de referencia, en comparación al presentado por el extracto de *Allium cepa* L.; lo cual se respalda en los resultados obtenidos a través del análisis estadístico.
8. Existe una diferencia significativa entre ambos extractos al comparar estadísticamente los resultados obtenidos en las determinaciones de CIM y CBM.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Ejecutar procesos que permitan la identificación de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana en ambas especies vegetales. Además, una estandarización química de ambos extractos, como base para la posterior determinación de su toxicidad, concentración inhibitoria mínima (CIM) y la dosis letal al 50% (LD₅₀).
2. Ampliar los estudios de las especies vegetales *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. que permitan establecer datos en donde las concentraciones posean no sólo acción antibacteriana, sino también alguna acción farmacológica. Identificar, asimismo, cuáles podrían ser los límites de toxicidad en la utilización de ambas especies vegetales.
3. Ensayar diferentes métodos extractivos, en función de futuras investigaciones, con las especies *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. en la cual se tome muy en cuenta la utilización de otros solventes. Esto con el objetivo de determinar con cuál método y con cuál solvente es posible obtener la misma cantidad de componentes con actividad antibacteriana.
4. Comprobar las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de los extractos de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. utilizando el método de microdilución en caldo, tomando en cuenta las características que este método presenta.
5. Realizar ensayos de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de ambos extractos sobre diversos microorganismos, donde se incluyan bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, hongos y levaduras, en virtud de determinar el espectro de acción de los extractos de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L.

6. Con el objetivo de desarrollar una alternativa farmacéutica natural que sea accesible y de similar eficacia, establecer estudios que permitan comparar el efecto antibacteriano de las especies vegetales *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. con el de antibióticos de mayor uso clínico.

BIBLIOGRAFIA

1. Center for Disease Control and Prevention. (2012). *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings. [acceso 23 de marzo de 2016]. Recuperado de <http://www.cdc.gov/HAI/organisms/klebsiella/klebsiella.html>
2. Clontz, L. (2009). Microbial Limit and Bioburden Test. New York: Taylor y Francis Group.
3. Confederación de Sociedades Científicas de España. (2012). Etnobotánica, una ciencia de personas y plantas [acceso el 27 de Abril de 2016] Recuperado de <http://www.conec.es/2012/01/etnobot%C3%A1nica-una-ciencia-de-personas-y-plantas/>
4. Corrales Reyes, E. I. y Dr. Reyes Pérez, J. J. (2014). Actividad antimicrobiana y antifúngica de *Allium tuberosum* en estomatología. Revista 16 de Abril. Universidad de Ciencia Médicas de Granma, Cuba.
5. D. Lourdes y J. Karla (2008). Validación de un Método de Extracción de Alicina en Ajo y su Cuantificación por HPLC. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México.
6. Font (1996). Ajo y sus beneficios. Enciclopedia de Plantas Medicinales.
7. García Martos, P.; Fernández del Barrio, M. T. y Paredes Salido, F. (1994). Microbiología práctica clínica. 2ª Edición. Servicio Publicaciones UCA. España. Pag: 114-115
8. García, R. (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosas de *Allium tuberosum*, *Allium fistulosum*, *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. Bistua. 5:69-79.
9. Germosén, L. (2015). Farmacopea Vegetal Caribeña. República Dominicana: enda-caribe.

10. Ghosh, A. (2011). *Zingiber officinale*: a natural gold. International Journal of Pharma and Bio Sciences. New Jersey. 2: 2938-2944
11. Gonzáles, Cynthia. y Mollinedo, Patzy. (2014). Bacterias Gram Negativas. Revista de actualización clínica, (49), [acceso el 20 de Marzo de 2016] Recuperado de http://www.revistasbolivianas.org.bo/s cielo.php?pid=S2304&script=sci_arttext
12. Guzmán Díaz, Imelda M. y Henríquez Ardón, Joaquín A. (2007). Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la Cromatografía de columna (n-Hexano:Acetato de etilo 70%, Acetato de etilo puro y Metanol puro) procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto). Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
13. <http://www.statgraphics.net/wpcontent/uploads/2011/12/tutoriales/AN OVA%20multifactorial.pdf>. Visto el día 13/09/2016
14. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. (2001). Manual de Procedimientos para la Determinación de la Sensibilidad de los Antimicrobianos en Bacterias Aisladas en Humanos. Buenos Aires, Argentina. Pag: 32-34
15. Koneman, E.W. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 5ª edición. Pag: 795-825
16. Kuklinski, C. Farmacognosia Estudios de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Ed. Ediciones Omega, S.A. 2000. p. 32- 37.
17. MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana, 3º edición. Capítulos: 5, 6 y 33.
18. Méndez. A. (2011, 4 de Junio). Enfermedades Bacterias [Web log post]. [acceso el 22 de Marzo de 2016] Recuperado de <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>
19. Organización de los Estados Americanos (OEA), Universidad de El Salvador (UES), Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

- (MSPAS). Planter.1994. Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. 2ªed. San Salvador. Editorial Universitaria. Pág. 354-355.
20. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2004). Uso de antimicrobianos. [acceso el 18 de marzo de 2016] Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s0d.htm>
 21. Organización Mundial de la Salud. (2014). Resistencia a los antimicrobianos. [acceso el 18 de Marzo de 2016] Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
 22. Organización Mundial de la Salud. (2016). Temas de salud *Escherichia coli*. [Acceso el 21 de Marzo de 2016] Recuperado de http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/
 23. Organización Mundial de la Salud. (2013). Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N°194.
 24. Organización Mundial de la Salud. (2014). Antimicrobial Resistance, Global Report on Surveillance. Páginas: 1-2, 19-21, 37.
 25. Pineda Cornejo, C. A, y Pinto Cisneros, A.Y. (2013). Recopilación de información científica de treinta y una plantas medicinales utilizadas en la fabricación de productos naturales y elaboración de herbario. Tesis de pregrado. Universidad de El Salvador. El Salvador
 26. Rodríguez, C, y Vila, J. (2001). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. España: Picazo J.J. 36: 663-669
 27. Sánchez, M, y Suarez, G. (2015) Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium tuberosum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Revista Biólogo Agropecuaria Tuxpan. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana.
 28. Scientific Committees http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/triclosan/es/glosario/pqrs/resistenciabacteriana.htm, Visto el día 13/09/2016

29. Temas de Farmacognosia, Plantas medicinales. [acceso 20 de junio de 2016] Recuperado de: <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-extracci%C3%B3n/maceraci%C3%B3n/>
30. Wiegand, I.; Hilpert, K. y Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.

GLOSARIO

Antibiograma ⁽²⁷⁾: Prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad de una bacteria a un antibiótico o grupo de antibióticos.

Bactericida ⁽¹⁶⁾: Sustancia que causa, en su totalidad, la muerte de bacterias.

Bacteriostático ⁽¹⁶⁾: A diferencia de un bactericida, una sustancia que es bacteriostática no produce la muerte de las bacterias pero sí dificulta, en mayor medida, su reproducción.

Halo de inhibición ⁽¹⁶⁾: Resultado cualitativo que permite conocer si un microorganismo es susceptible, medianamente susceptible o resistente ante una sustancia antimicrobiana.

Mínima diferencia significativa ⁽¹⁴⁾: Conocida como prueba LSD, muestra la magnitud de diferencias que se presentan entre cada factor, es decir, indica la menor diferencia entre dos medias que representen una diferencia estadísticamente significativa.

Resistencia ⁽²⁹⁾: En microbiología, la resistencia presentada por una bacteria, se refiere a la capacidad que exhiben las bacterias para soportar los efectos de los antibióticos destinados a eliminarlas o controlarlas.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Traslado y segmentación de materia vegetal

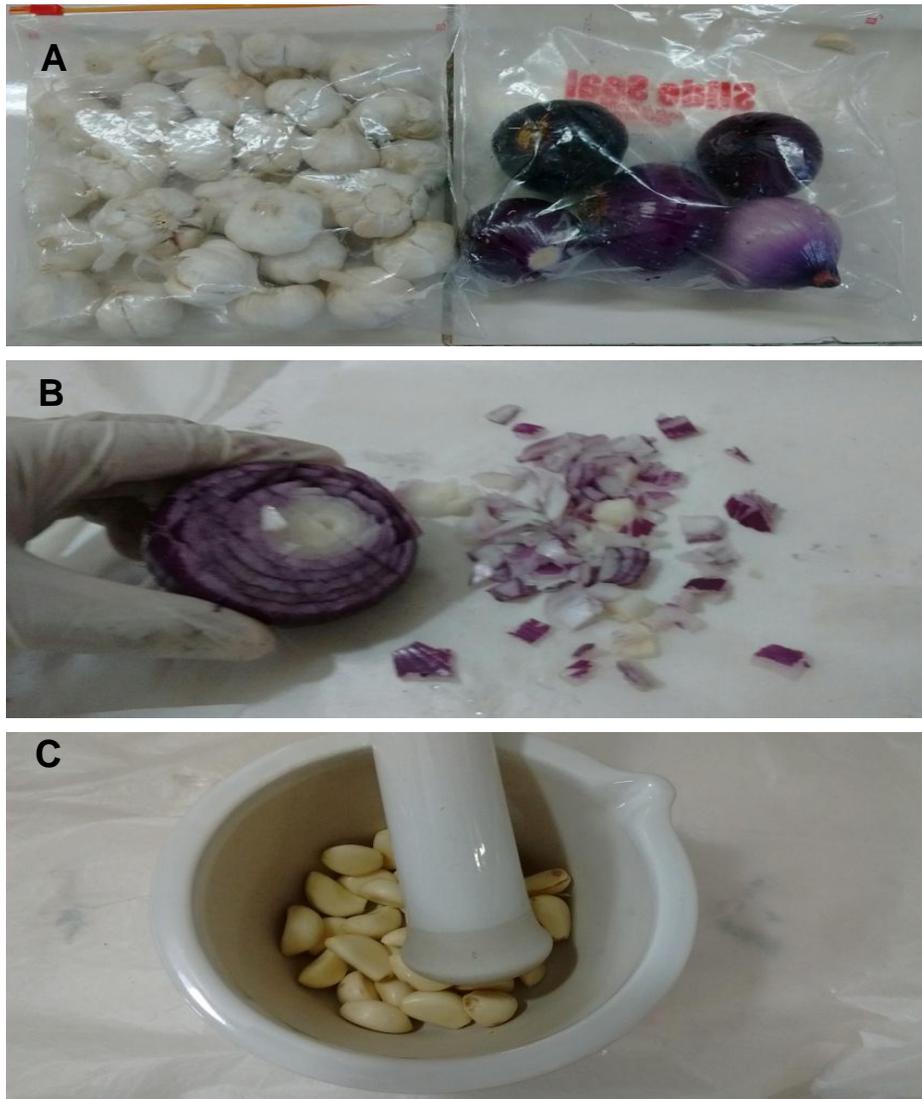


Figura N° 3. A-) Traslado de la materia vegetal al laboratorio de Investigación en productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. B) y C) Segmentación y la muestra vegetal (*Allium cepa* L. y *Allium tuberosum*).

ANEXO N° 2

Obtención de los extractos etanólicos secos de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L.



Figura N° 4. Materia vegetal fragmentada colocada en Erlenmeyer de 500mL con etanol al 95% y dispuesta en aparato para realizar la extracción por maceración con ultrasonido.

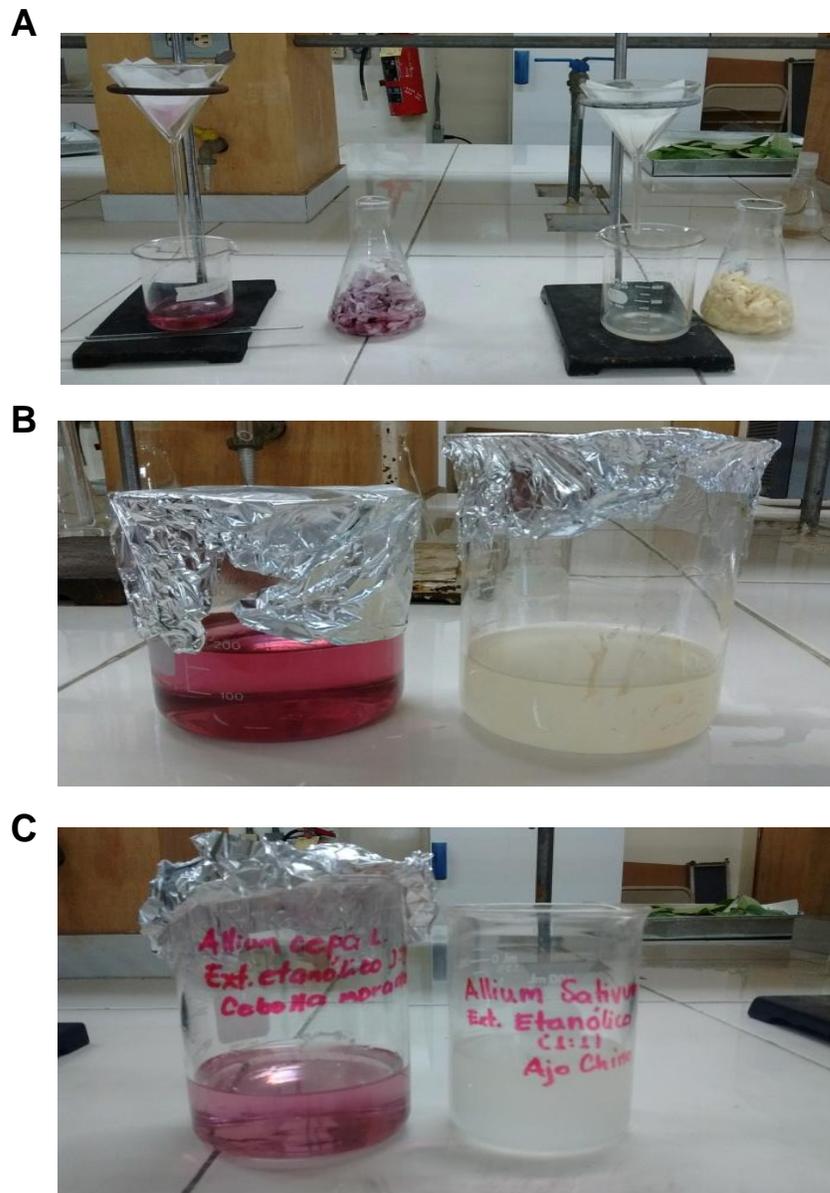


Figura N° 5. A-) Filtración y recepción en beaker de vidrio de extractos etanólicos obtenidos de *Allium tuberosum* (Ajo chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada). B) y C) Extractos etanólicos de *Allium tuberosum* (Ajo chino) y *Allium cepa* L. (Cebolla morada).

A



B



Figura N° 6. A-) Evaporación de solvente en beaker hasta obtener volumen reducido de extracto. B-) Traslado de extractos a viales de vidrio para finalizar etapa de secado. Obtención de residuo seco y determinación de porcentaje de rendimiento.

ANEXO N° 3

**Reactivación de las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 y
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883**

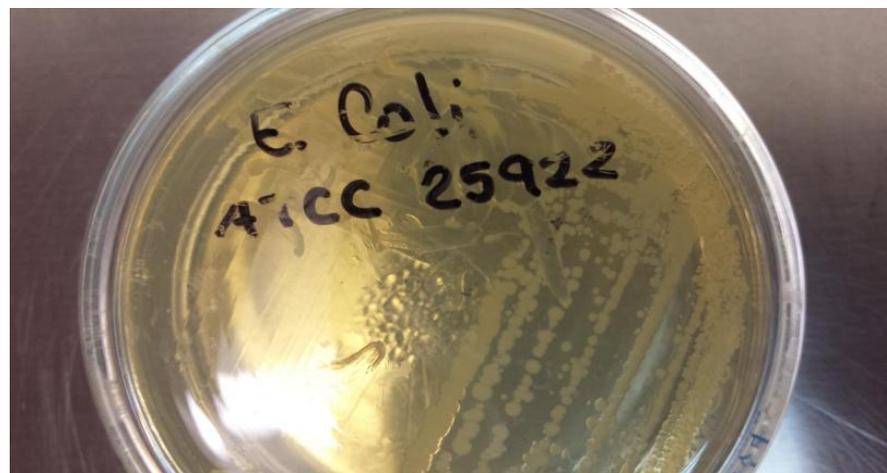


Figura N° 7. Cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) para la realización del análisis.

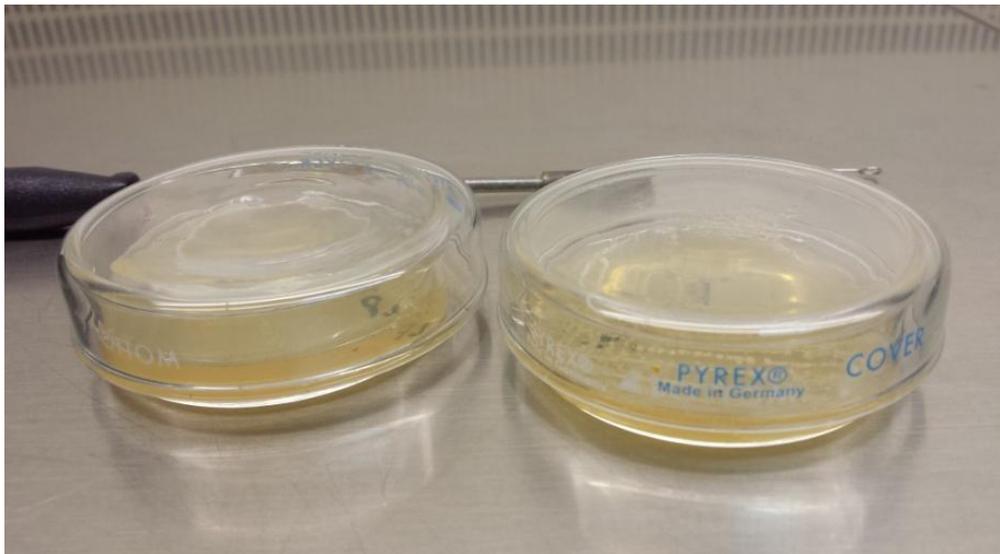
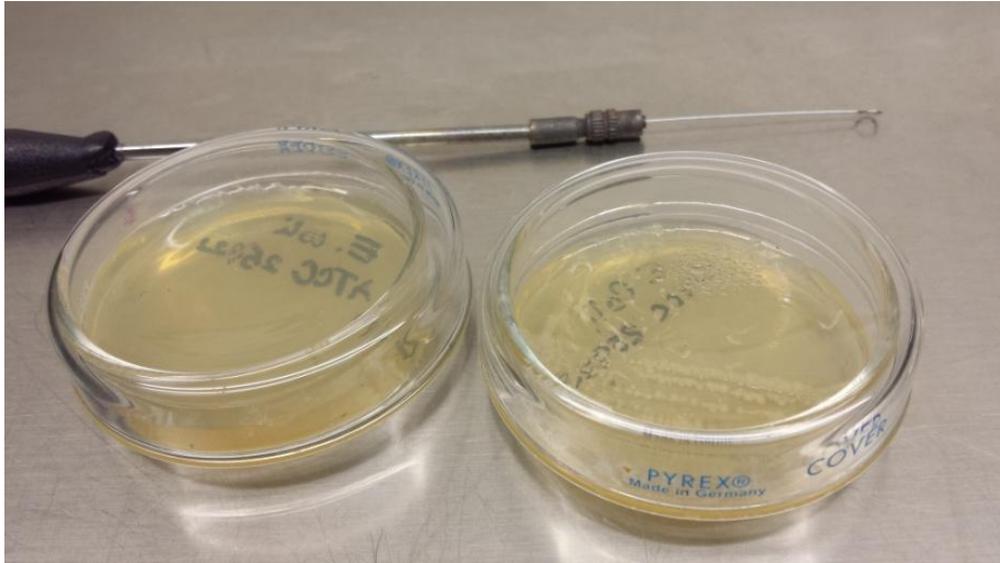


Figura N° 8. Reactivación de las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en agar TSA

ANEXO N° 4

Identificación de los microorganismos *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

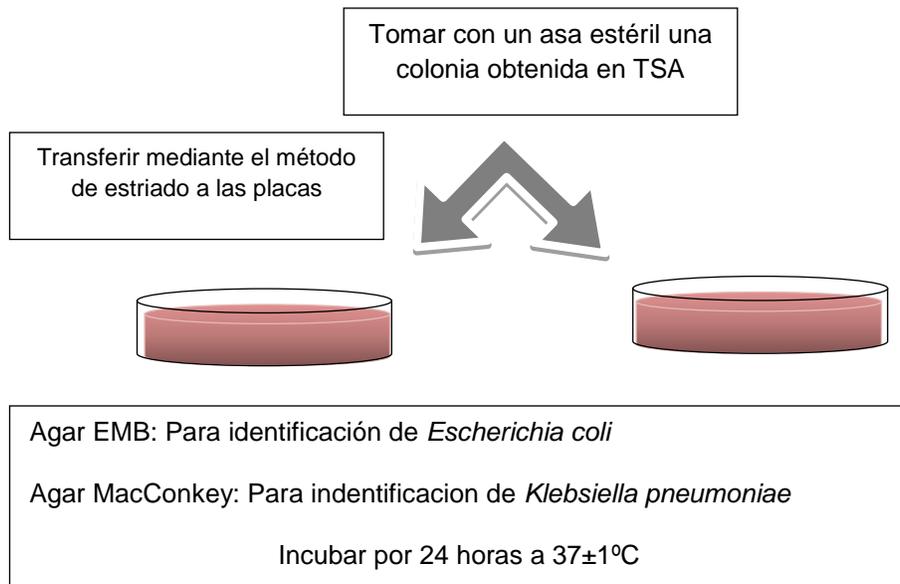


Figura N° 9. Identificación de los microorganismos de prueba por medio de agares selectivos

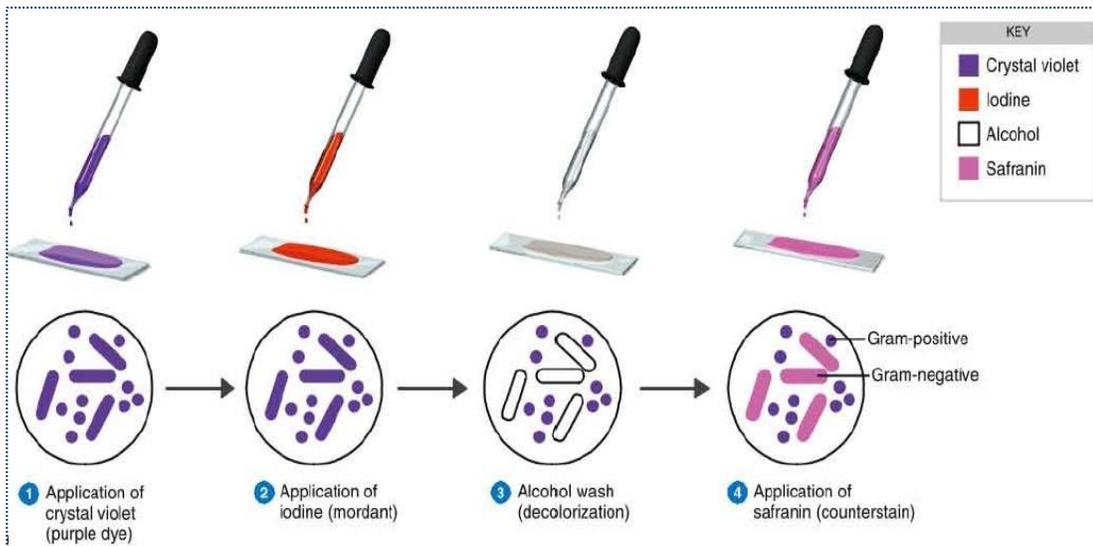


Figura N° 10. Esquema de realización de Tinción al Gram

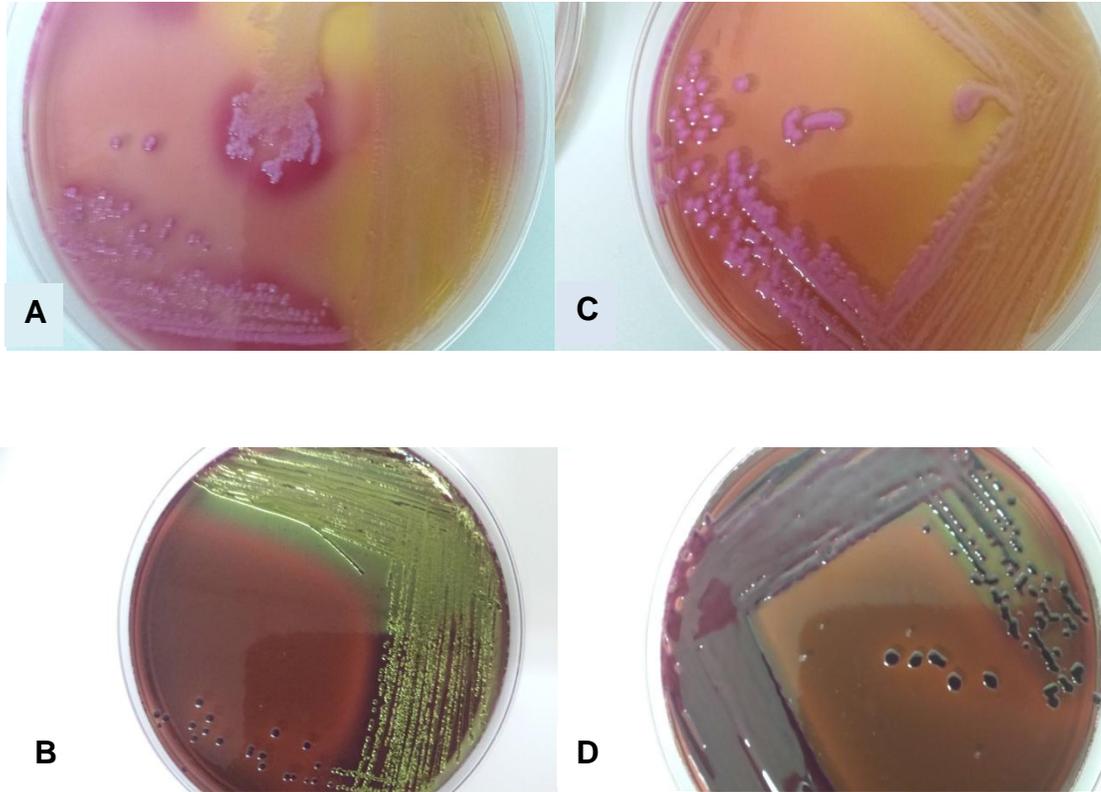


Figura N° 11. Identificación de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en agar EMB y MacConkey. A) y B) Cepa de *Escherichia coli* en agar MacConkey y EMB respectivamente. C) y D) Cepa de *Klebsiella pneumoniae* en agar MacConkey y EMB respectivamente.

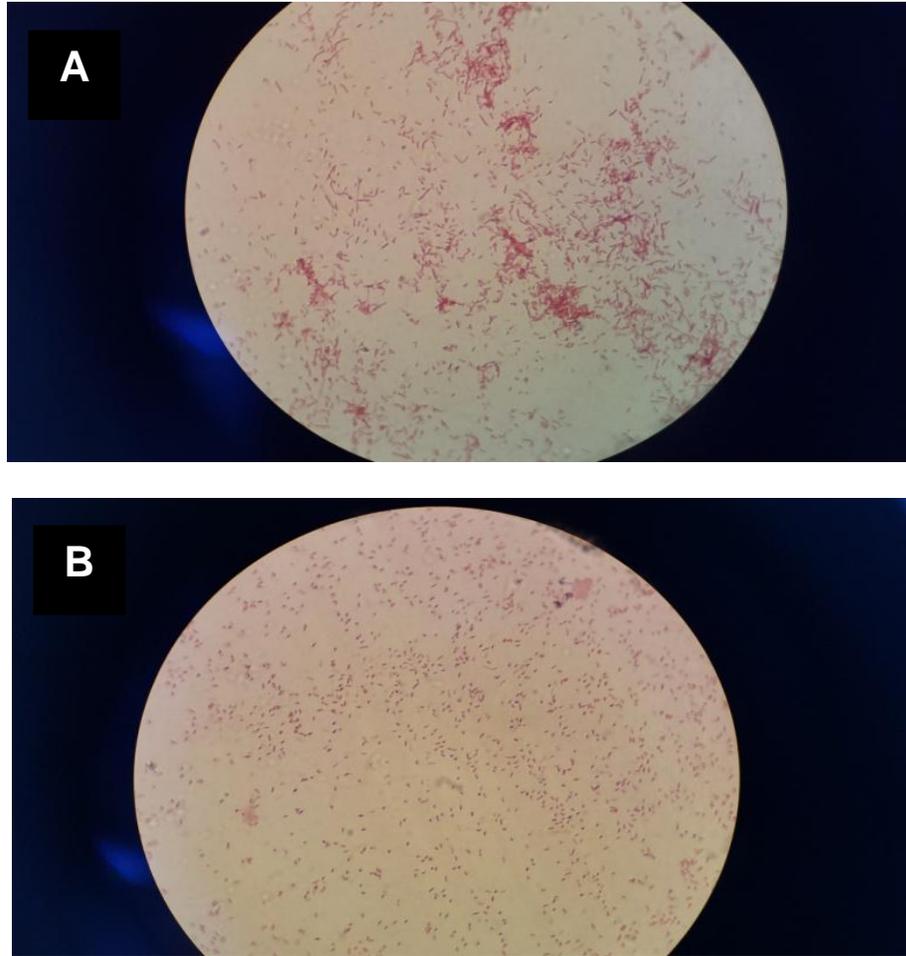


Figura N° 12. Tinción de Gram para cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. A-) *Klebsiella pneumoniae*: bacilos cortos gram-negativos. B-) *Escherichia coli*: bacilos cortos gram-negativos.

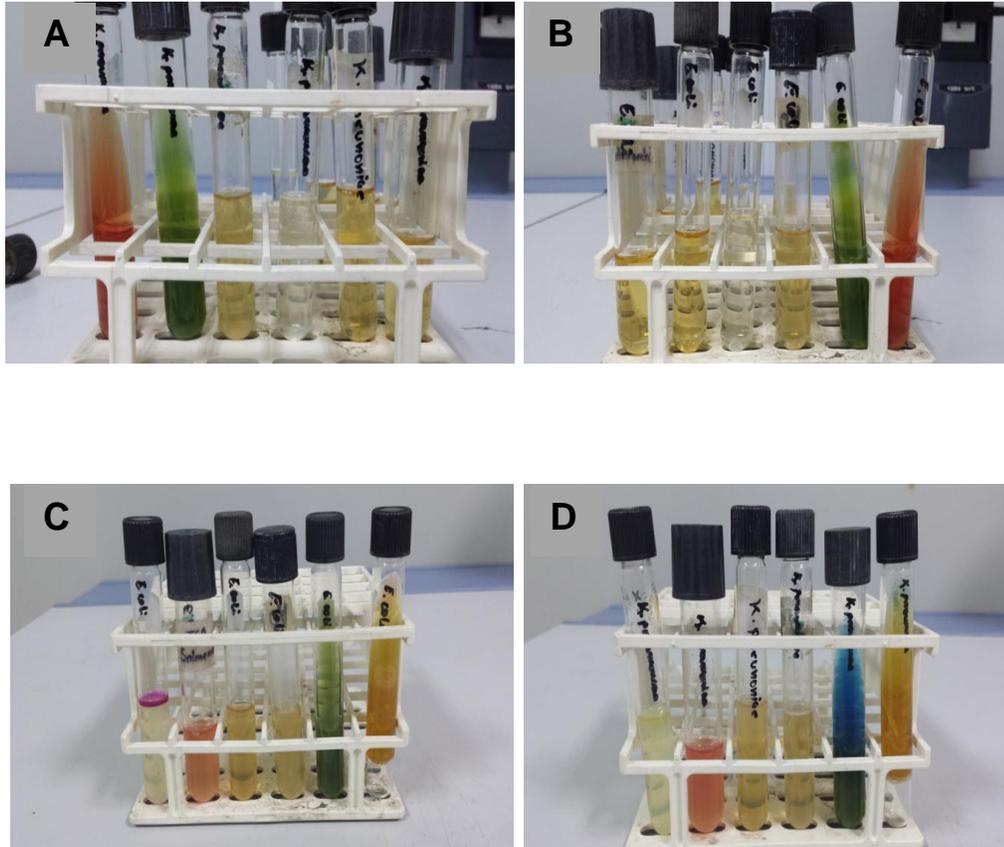


Figura N° 13. Pruebas bioquímicas para cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. A) y B) Tubos iniciales (RM, Indol, Motilidad, TSI, VP y Citrato) sin cepas de prueba. C) *Klebsiella pneumoniae*: TSI: A/A (+), Citrato: (+), VP: (-), RM: (+), Indol: (-), Motilidad: (-). D) *Escherichia coli*: TSI: A/A (+), Citrato: (-), VP: (-), RM: (+), Indol: (+), Motilidad: (+).

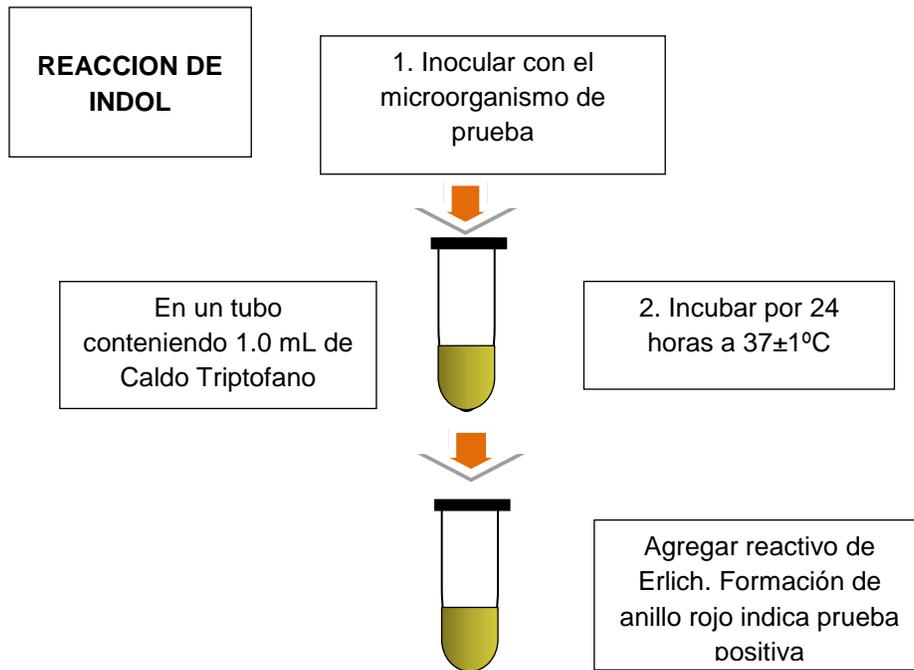


Figura N° 14. Identificación mediante la reacción de Indol.

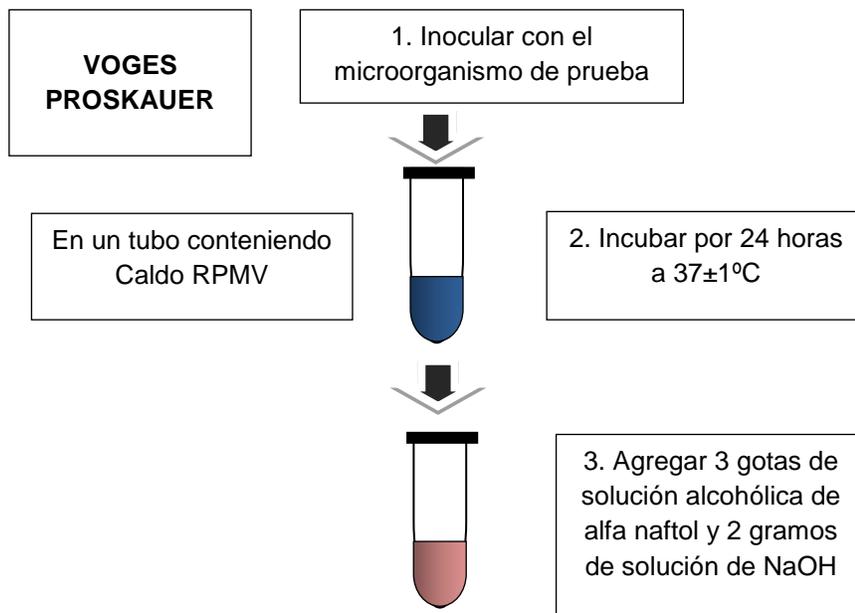


Figura N° 15. Identificación de Voges Proskauer

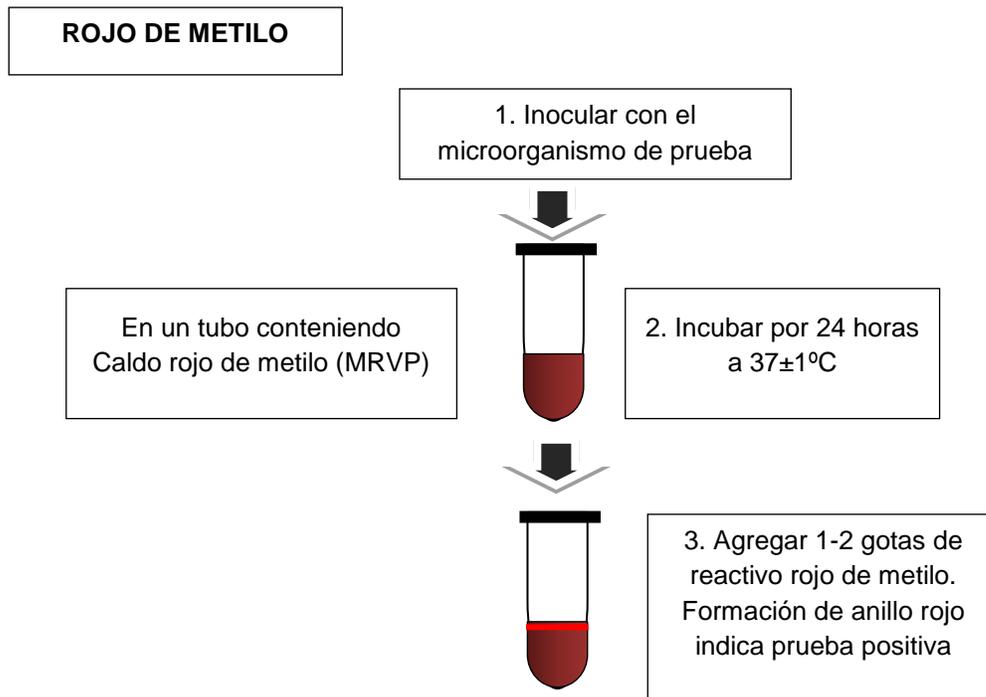


Figura N° 16. Identificación mediante reactivo Rojo de Metilo

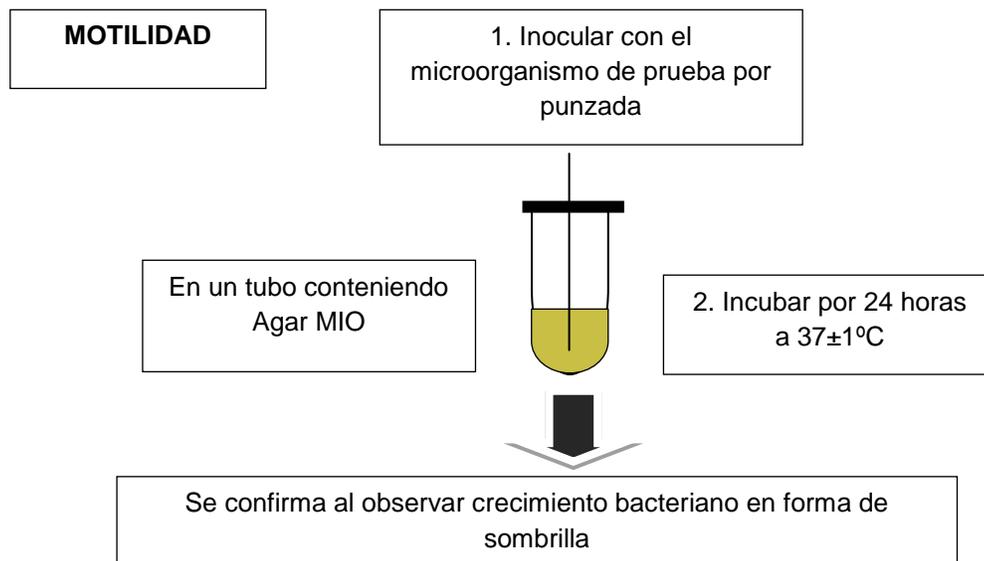


Figura N° 17. Identificación a través de la prueba de motilidad

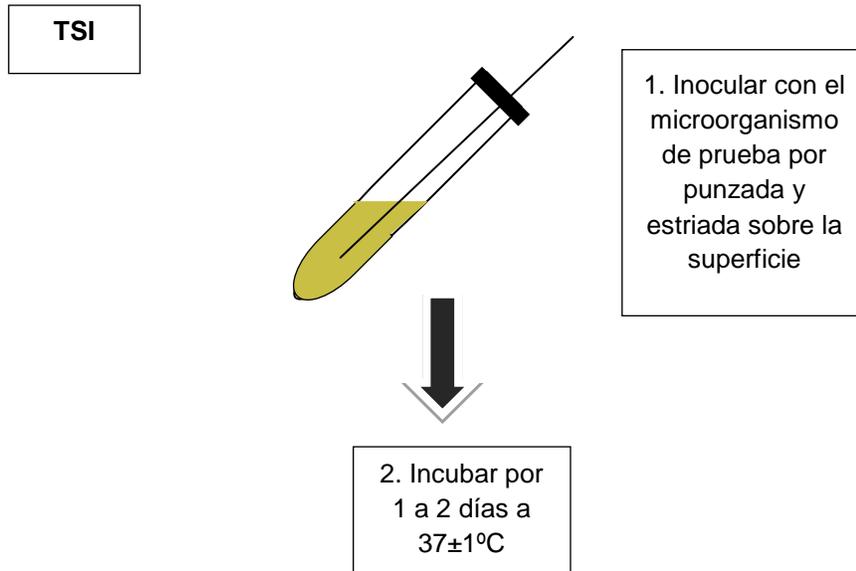


Figura N° 18. Identificación a través de la incubación en Agar TSI

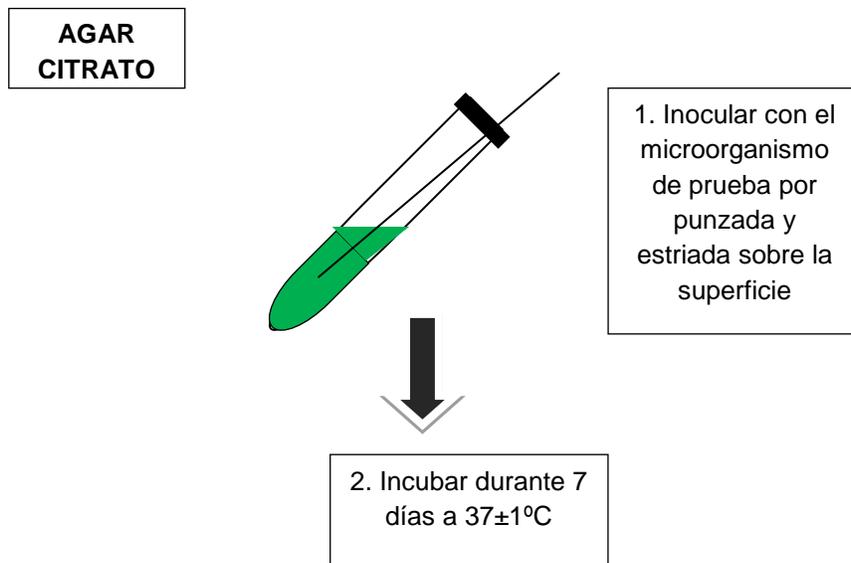


Figura N° 19. Identificación a través de la incubación en Agar Citrato

Microorganismos	Glucosa		Lactosa	Sucrosa**	Arabinosa**	Rafinosa**	Rhamnosa**	Xilosa**	Manitol**	Dulcitol**	Salicina**	Adonitol**	Inositol**	Sorbitol**	Catalasa	Gelatina	Oxidasa	Urea	Arginina	Lisina	Ornitina	Phenilalanin	Indol	Rojo metilo	VPRkauer	Malonato	Citrato	Nitrato	H2O	KCN
	G*	Ac*																												
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	+	+	-	+		+		-	-	-	+			-	+			-	-	-	+	-	-	+		+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+	+	+	+		-	-	-		+	+	-	-	-	+	+	+		-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+	-	-	+		+	-	-		+	-	-	-	-	+	+	+		-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	+	-	+		+	-	-	-	-	+		-	-	-		+	+	-	+	+	-	-	-		-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		-	-	+		+	-	-	-	+	-	+	+		-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-		+	-	+		-	-	+	+	+	-	-	-		+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-		+	+		-	-	+		+	+	-	-	+	-	-	+		+	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	+	-	-	-		+	-	+	+	+	+		+	-	-		+	+	-	-	-	+	-	+		-	+
<i>Shigella flexneri</i>		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	+	-	-	-		-	-
<i>Shigella sonnei</i>		-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-		-	-	-		-	+	-	-	+	-	-	-		-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>															+	+	+	+				-	-	-		+	+	+		
<i>Acinetobacter calcoaeticus</i>			+					+	-						+	-	-	-				-	-			+	-	-		

G: gas; Ac: ácido;+: positivo; -: negativo.
*Kligler; **oxidación/fermentación.

Figura N° 20. Cuadro de identificación para Pruebas Bioquímicas (8)

ANEXO N° 5

Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. utilizando el Método de Kirby Bauer Modificado

Estandarización de cepas de referencia *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

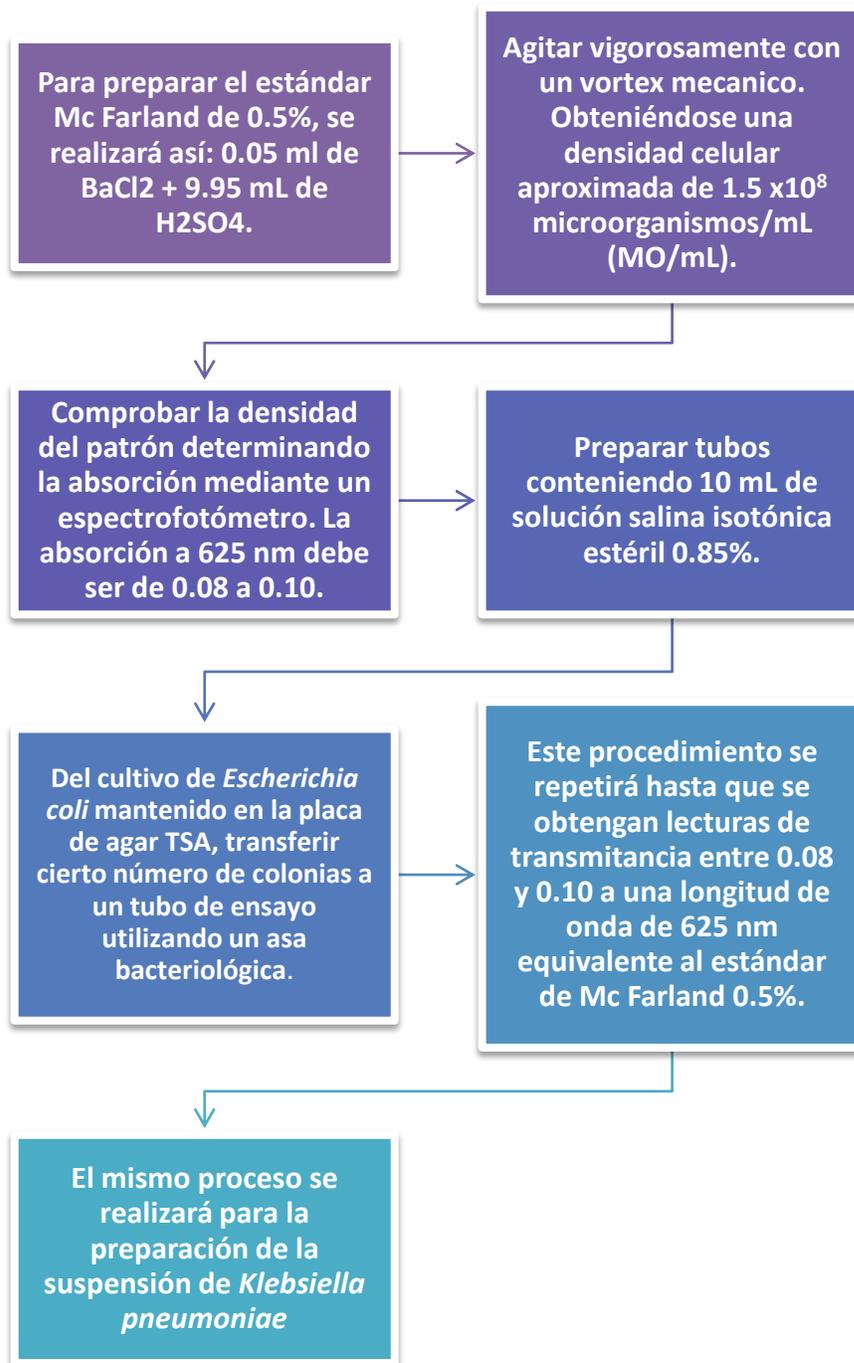


Figura Nº 21. Preparación de la suspensión de los microorganismos



Figura N° 22. A-) Cepa estandarizada de *Escherichia coli* a una absorbancia de 0.092 B-) Cepa estandarizada de *Klebsiella pneumoniae* a una absorbancia de 0.085. C) y D) Diluciones realizadas partiendo de cepa estandarizada de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* respectivamente, a una concentración de 1×10^8 .

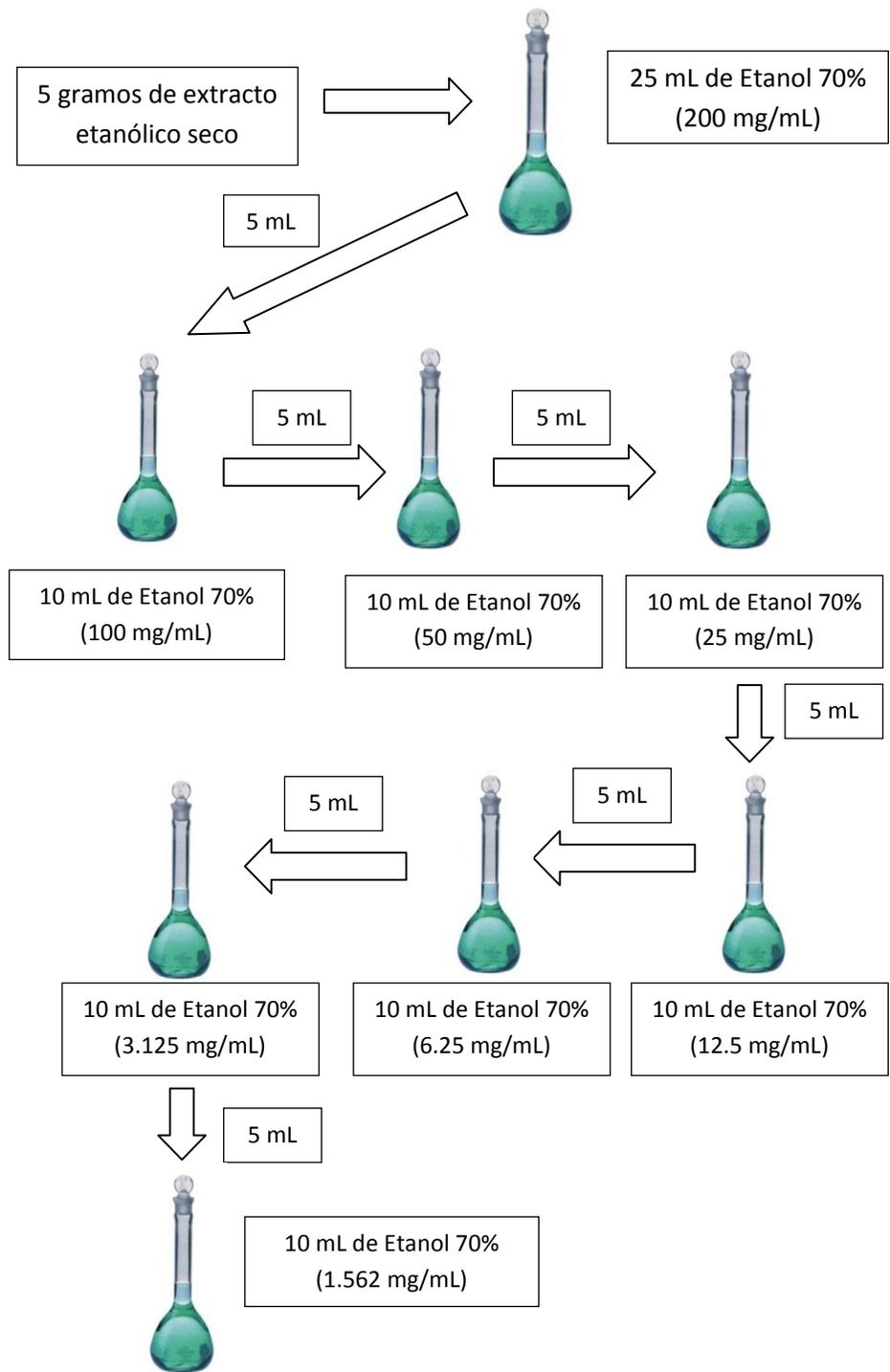


Figura N° 23. Preparación de concentraciones de prueba para cada extracto

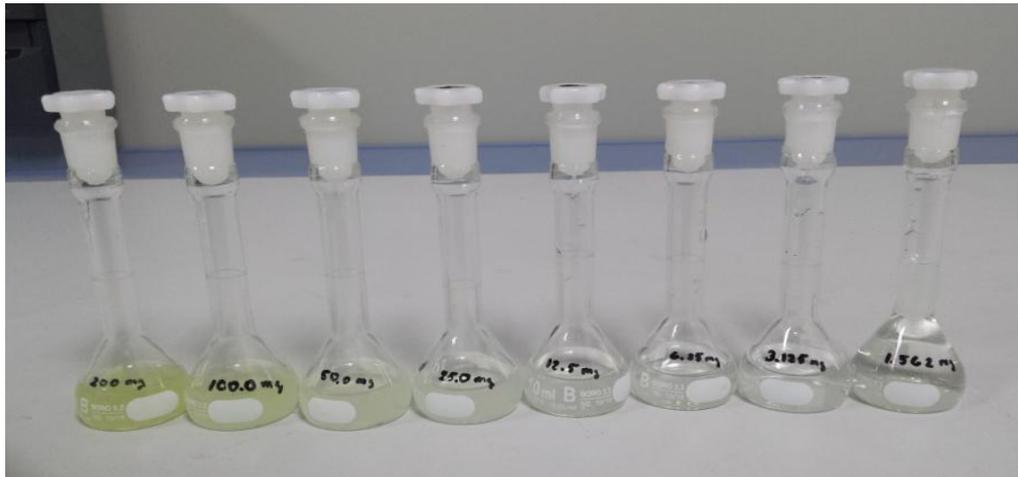


Figura N° 24. A-) Diluciones seriadas de extracto seco de *Allium cepa* L.
B-) Diluciones seriadas de extracto seco de *Allium tuberosum*.
Concentraciones obtenidas para ambos extractos: 200.0mg/mL, 100.0mg/mL, 50.0mg/mL, 25.0mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL y 1.562mg/mL.



Figura N° 25. Inoculación de las placas con los microorganismos de prueba



Figura N° 26. Esquema Inoculación de las placas con los microorganismos de prueba

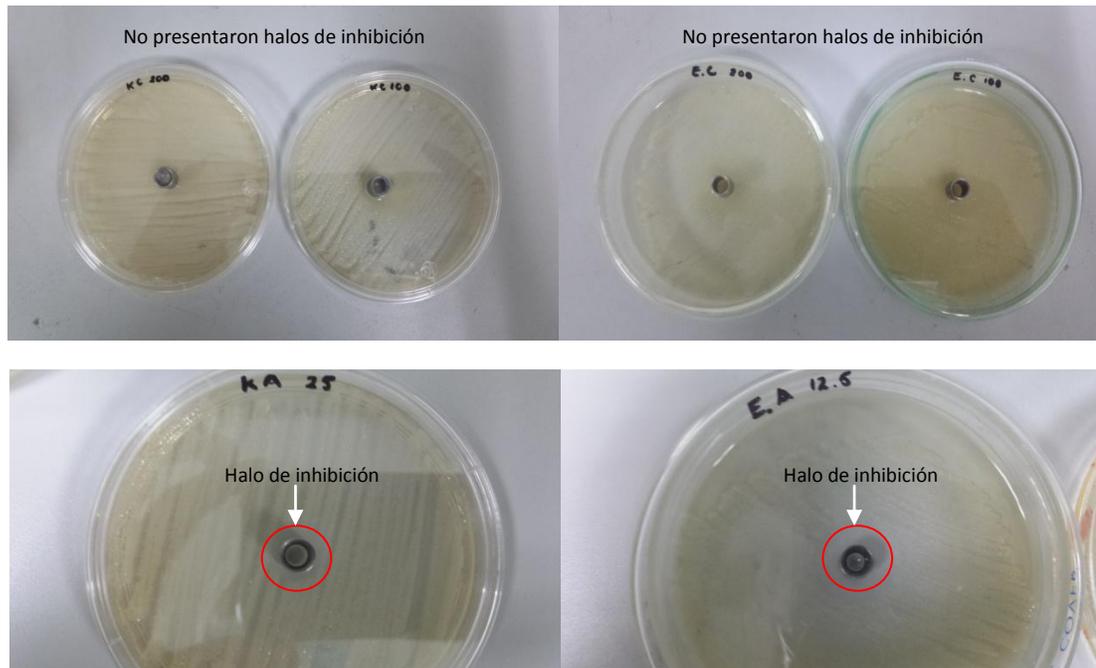


Figura N° 27. Método de Kirby Bahuer Modificado para extractos de *Allium cepa* L. y *Allium tuberosum* utilizando las cepas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

ANEXO N° 6

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las especies vegetales de *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L. utilizando el Método de Macrodilución en caldo

Adición de extracto e inoculación de microorganismos en tubos seriados

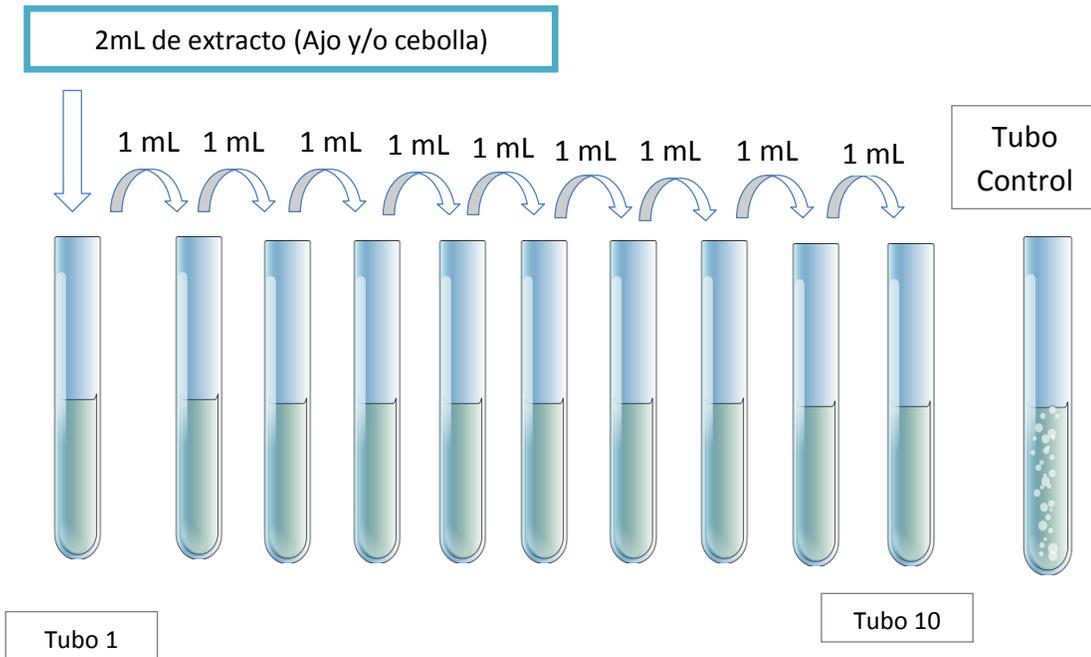


Figura N° 28. Esquema de preparación de tubos (adición del extracto)

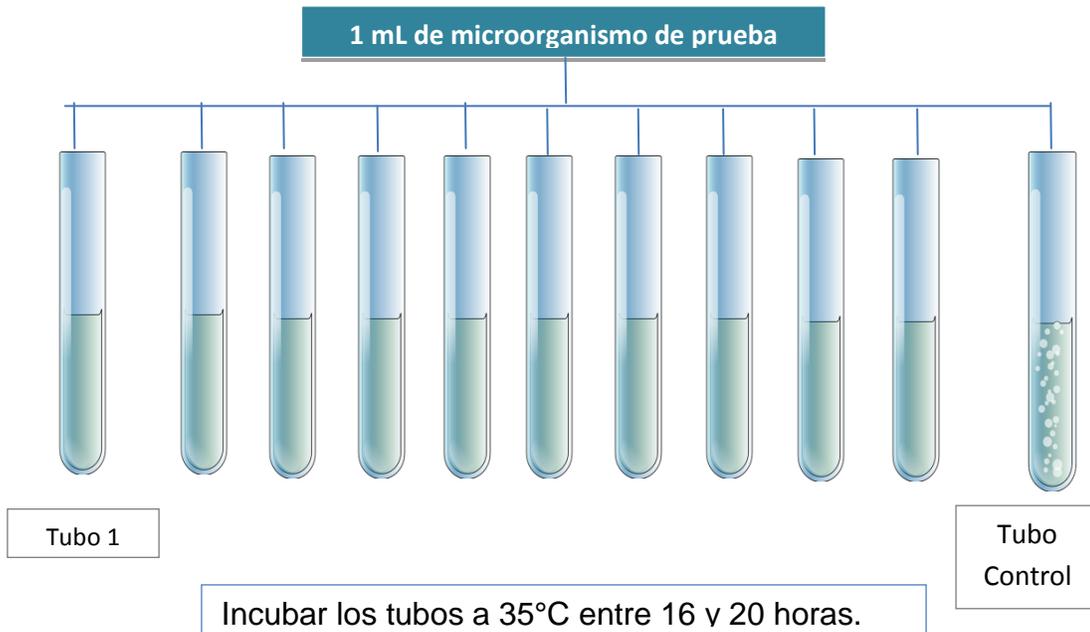


Figura N° 29. Esquema de inoculación de microorganismo de prueba

A



B

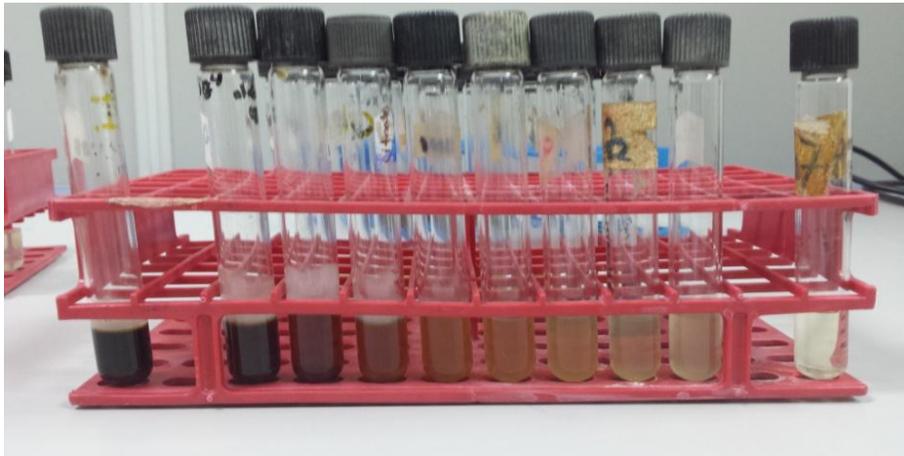


Figura N° 30. Concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto de *Allium cepa* L. (Cebolla morada) a una concentración de 1000mg/mL para cepas de *Escherichia coli* (A) y *Klebsiella pneumoniae* (B).

A



B

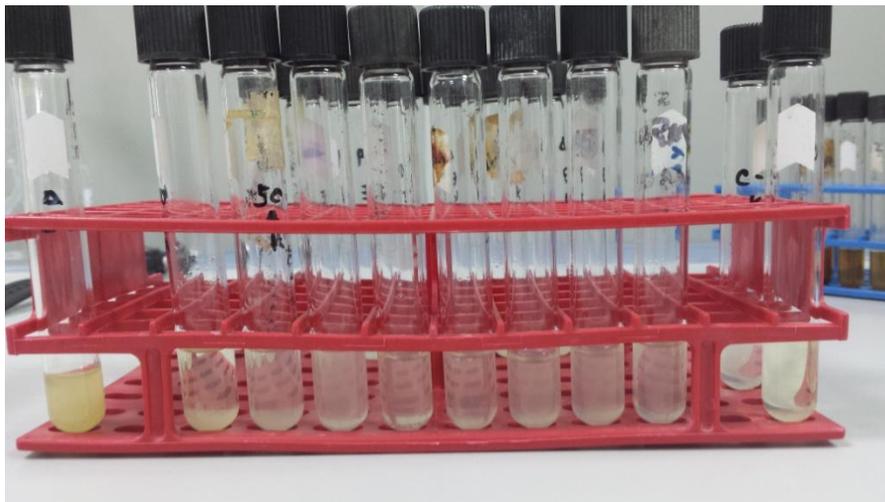
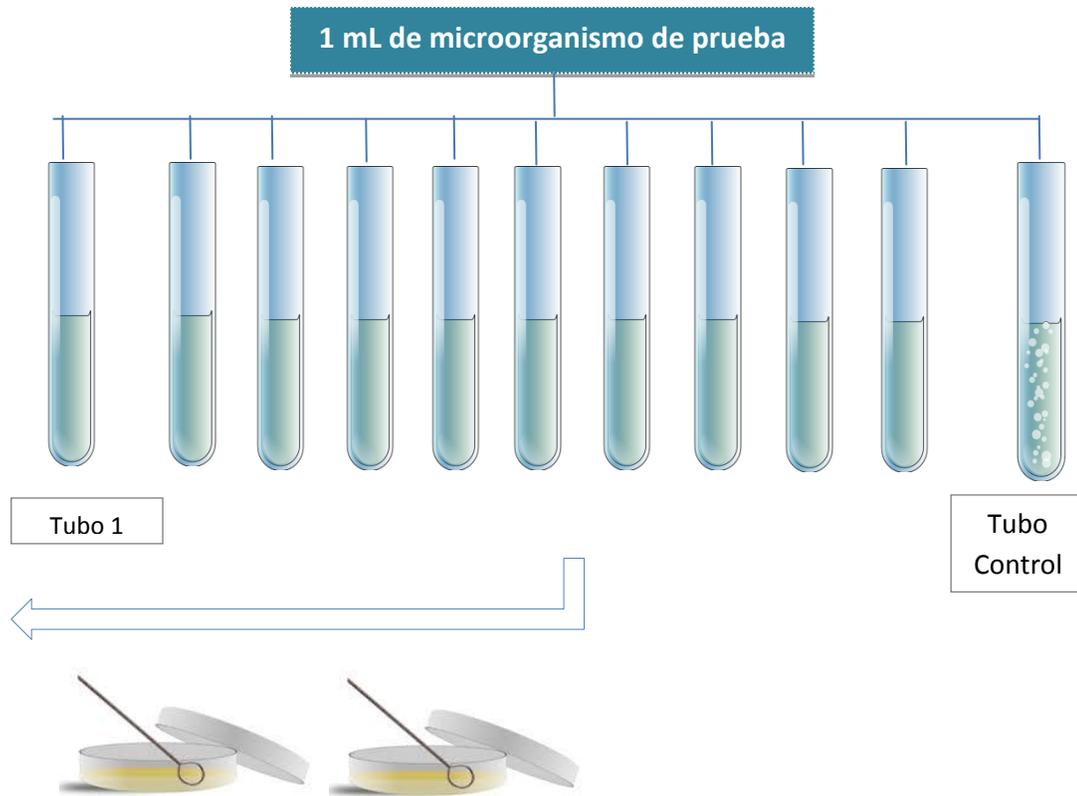


Figura N° 31. Concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto de *Allium tuberosum* (Ajo chino) a una concentración de 50mg/mL para cepa de *Escherichia coli* (A) y a una concentración de 200mg/mL para cepa de *Klebsiella pneumoniae* (B).

ANEXO N° 7

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las especies vegetales *Allium tuberosum* y *Allium cepa* L.

Serie de tubos donde se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)



Partiendo del tubo que presente la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), resembrar utilizando un asa estéril en placas conteniendo Agar MH solidificado. Realizar éste proceso por duplicado

Repetir el paso anterior con todos aquellos tubos en donde la concentración de extracto es mayor que la CIM determinada

Incubar las placas a 37°C durante 20 horas.

Figura N° 32. Esquema para la determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las especies vegetales de ajo chino (*Allium tuberosum*) y cebolla morada (*Allium cepa* L.)

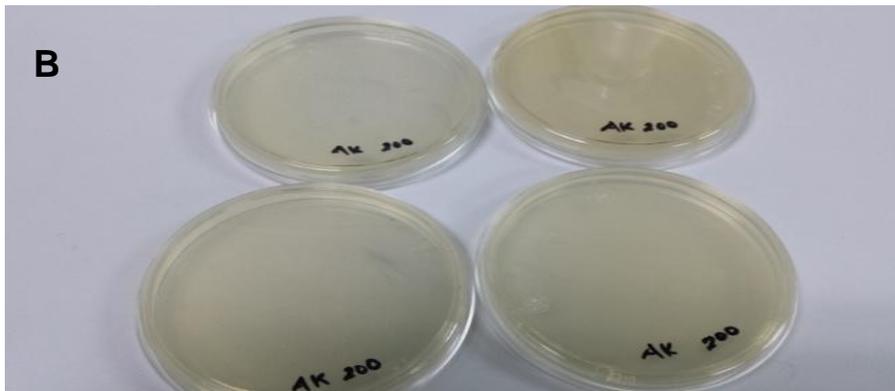
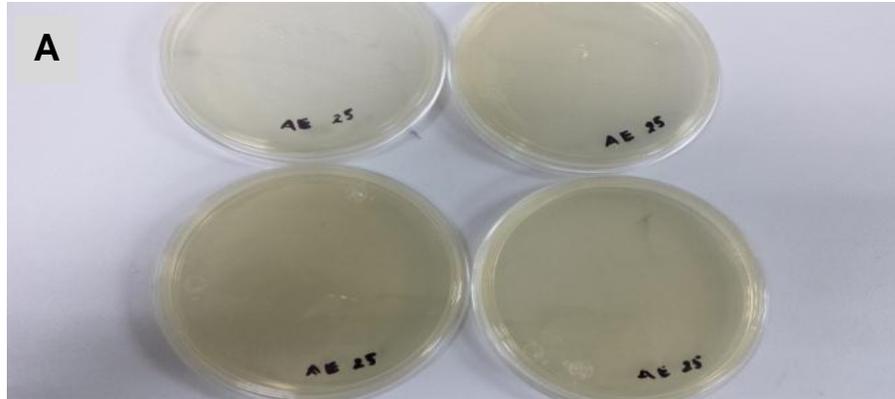


Figura N° 33. Concentración bactericida mínima (CBM) de extracto de *Allium tuberosum* para *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. A-) Concentración bactericida mínima de *Allium tuberosum* a una concentración de 25mg/mL para *Escherichia coli*. B-) Concentración bactericida mínima (CBM) de *Allium tuberosum* a una concentración de 200mg/mL para *Klebsiella pneumoniae*.

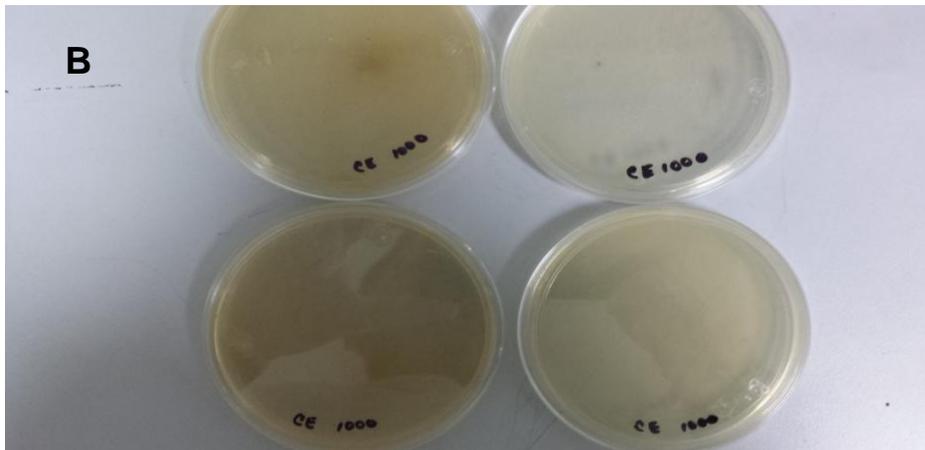
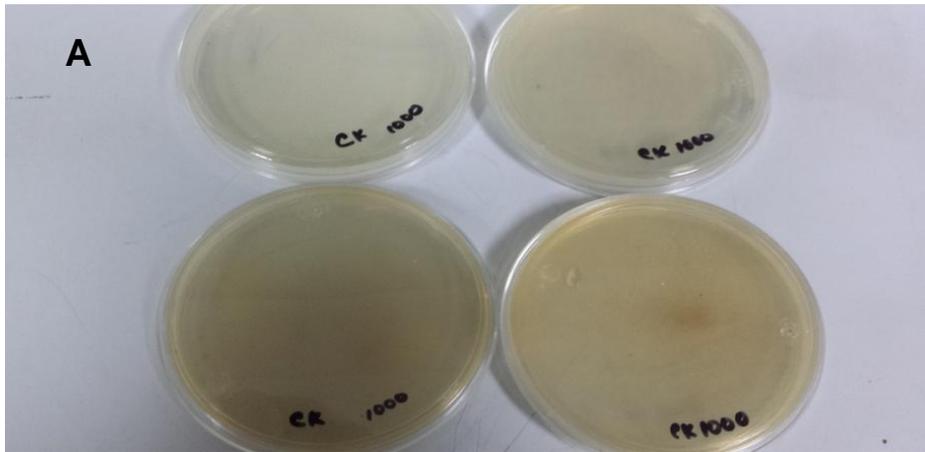


Figura N° 34. A-) Concentración bactericida mínima de *Allium cepa* L. a una concentración de 1000mg/mL para *Klebsiella pneumoniae*. B-) Concentración bactericida mínima de *Allium cepa* L. a una concentración de 1000mg/mL para *Escherichia coli*.

ANEXO N° 8

Certificado de identificación taxonómica de la materia vegetal

Identificaciones tomadas de Fuente: Ventura Centeno, N. E. 2012. Especies vegetales promisorias, en El Salvador. Libro inédito.



Universidad de El Salvador
Facultad de Ciencias Naturales y Matemática
Escuela de Biología

Ciudad Universitaria, 26 de julio de 2016

A quien Interese:

Por este medio, hago constar que los Brs. Diego Fernando Palma Catalán y Luis Ernesto Hernández Menéndez, ambos estudiantes de la Licenciatura en Química y Farmacia, se presentaron en las instalaciones del Herbario de la Universidad de El Salvador (ITIC), en fecha 26 de julio de 2016, para que se les identificara taxonómicamente una muestra botánica, de nombre común es "ajo chino" y "cebolla morada"; ambas obtenidas del Laboratorio FUCRISAN (Fundación Cristiana para la Salud y la Naturaleza). Las mismas son de amplia distribución en el territorio nacional.

La muestra de "ajo chino" se identifica como *Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel. Pl Syst. Veg. 2: 38. (1825); y "cebolla morada" como *Allium cepa* L. Sp. Pl. 300. 1753., ambas pertenecen a la familia Botánica Amaryllidaceae (antes Alliaceae).

Y, para los usos que estime conveniente, extendiendo la presente constancia.

MSC. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno
Profesora Investigadora
Curadora del Herbario de la Universidad de El Salvador (ITIC)