



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**EFFECTO IN-VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO DE ALLIUM
SATIVUM – “AJO” SOBRE CULTIVOS DE BACTERIAS
PATÓGENAS PRODUCTORES DE β -LACTAMASAS DE
ESPECTRO EXTENDIDO (*BLEE*)**

PRESENTADA POR

RAUL OMAR TORRES GUERRERO

ASESORES

**LIZZIE BECERRA GUTIÉRREZ
JORGE LUIS FERNÁNDEZ MOGOLLÓN**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

CHICLAYO – PERÚ

2018



**Reconocimiento - Compartir igual
CC BY-SA**

El autor permite a otros re-mezclar, modificar y desarrollar sobre esta obra incluso para propósitos comerciales, siempre que se reconozca la autoría y licencien las nuevas obras bajo idénticos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

EFFECTO *IN-VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *ALLIUM SATIVUM* – “AJO” SOBRE CULTIVOS DE BACTERIAS PATÓGENAS PRODUCTORES DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (*BLEE*)

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

PRESENTADA POR

RAUL OMAR TORRES GUERRERO

ASESORES

Dra. LIZZIE BECERRA GUTIÉRREZ

Dr. JORGE FERNÁNDEZ MOGOLLÓN

CHICLAYO, PERÚ

2018

DEDICATORIA

A Dios por brindarme salud y fortaleza. A mis padres Víctor Raúl y Ruby del Socorro que juntos me apoyan a diario para alcanzar mis objetivos y convertirme en una gran persona y profesional. A una persona especial que se fue sin antes decirle lo logré mamá Anita.

A mis queridos hermanos: Jaime y Joyce porque siempre estuvieron y estarán a mi lado cuando necesite de su apoyo.

A mi novia Consuelo por ser uno de los motores de mi vida y por la que a diario me esfuerzo para cada día ser mejor persona, mejor profesional.

A mis compañeros y amigos, que compartimos conocimientos, alegrías y tristezas, a todas esas personas que durante estos 7 años estuvieron a mi lado acompañándome y alentándome a no rendirme y lograr que este sueño se hiciera realidad.

AGRADECIMIENTO

Agradezco ante todo a Dios por haberme guiado y ayudado a superar diversos obstáculos y así poder culminar satisfactoriamente este trabajo de investigación.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Fernández Mogollón y Mg. Lizzie Becerrera Gutiérrez por su asesoramiento desinteresado y apoyo para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Lic. Rubens Llontop Clavo mi más sincero agradecimiento no solo por su amistad sino también por el apoyo prestado en el desarrollo de la presente investigación.

A todas las personas que de alguna u otra manera colaboraron para llevar a cabo el presente trabajo. Especialmente a mis amigos: Blgo. Wimber Díaz Hoyos, Blgo. Juan Idrogo Villalobos, Blga. Fiorella López Edquen, Blgo. Francisco Manayay Pomachari, Lic. Enf. Denys Vásquez Bazán e Ing. John Morante Rojas.

ÍNDICE

	Páginas
PORTADA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	3
III. RESULTADOS	7
IV. DISCUSIÓN	10
V. CONCLUSIONES	13
VI. RECOMENDACIONES	14
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
VIII. ANEXOS	21

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto *in-vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* - “ajo” sobre cultivos de bacterias patógenas productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). **Material y métodos:** Estudio cuantitativo con enfoque experimental. La población estuvo conformada por cepas *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* BLEE proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Martín de Porres. El extracto acuoso fue obtenido del *Allium sativum*, identificada por biólogo botánico; se prepararon concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% conservándose en viales oscuros hasta su posterior uso. La determinación del efecto *in-vitro*, se da mediante el promedio del diámetro de los halos de inhibición por cada patógeno en estudio. Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS versión 23 y Megastat 2007, considerando un valor $p < 0.05$. **Resultados:** el extracto acuoso de *A. sativum* presenta efecto inhibitorio al 100% de concentración para *Escherichia coli* control 19,4 mm y BLEE 22,6 mm; *Klebsiella pneumoniae* control 26.9 mm y BLEE 24.2 mm. **Conclusiones:** El extracto acuoso de *A. sativum* presentó actividad inhibitoria sobre cultivos de *E. coli* y *K. pneumoniae* BLEE, dependiendo de la concentración utilizada.

Palabras clave: β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *Allium sativum*, ajo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Fuente: DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Objective: To evaluate the in vitro effect of the aqueous extract of *Allium sativum* - "garlic" on cultures of bacterial pathogens producing extended spectrum β -lactamases (ESBL). **Material and methods:** Quantitative study with experimental approach. The population consisted of strains *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* BLEE provided by the Laboratory of Microbiology of the University San Martin de Porres. The aqueous extract was obtained from *Allium sativum*, identified by botanical biologist; Concentrations were prepared at 25%, 50%, 75% and 100% being stored in dark vials until their subsequent use. The determination of the in-vitro effect is given by the average diameter of the inhibition halos for each pathogen under study. For the statistical analysis, the SPSS version 23 and Megastat 2007 programs were used, considering a value of $p < 0.05$. **Results:** the aqueous extract of *A. sativum* shows inhibitory effect at 100% concentration for *Escherichia coli* control 19.4 mm and BLEE 22.6 mm; *Klebsiella pneumoniae* control 26.9 mm and BLEE 24.2 mm. **Conclusions:** The aqueous extract of *A. sativum* presented inhibitory activity on cultures of *E. coli* and *K. pneumoniae* BLEE, depending on the concentration used.

Key words: Extended-spectrum β -lactamases (ESBL), *Allium sativum*, garlic, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*

(Source: DeCS-BIREME)

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antibacteriana es un problema de salud pública mundial, que provoca aumento del fracaso terapéutico, incremento de la morbilidad y mortalidad, por lo tanto incrementa los costos de salud; en especial, en los países en desarrollo (1-4). Dentro de este grupo de bacterias resistentes, se encuentran las productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que fenotípicamente se caracterizan por dar resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam; excepto los carbapenems y las cefamicinas. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulámico u otros inhibidores de β -lactamasas (5-10). Estas enzimas BLEE son producidas por bacilos Gram negativos siendo las principales las Enterobacterias, entre ellas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, también se puede encontrar en *Pseudomonas aeruginosa* (5,7). La hiperproducción cromosomal de β -lactamasas, producción de β -lactamasas de espectro extendido, o en combinación, son causa importante del incremento de morbilidad y mortalidad no solo intrahospitalarias sino también comunitaria como *E. coli*-BLEE, donde estudios muestran que más del 50% de *E. coli*-BLEE son de origen comunitario (1-4,11,12).

Cepas *K. pneumoniae*-BLEE en América Latina 45%, Región del Pacífico Este 25%, Europa 20%, Estados Unidos y Canadá entre 3-4%. (13) En Europa la prevalencia de *E. coli*-BLEE fue de 4.3% entre las cepas de *E. coli*. (3) En Lima se notifica *E. coli*-BLEE 2,9% y *K. pneumoniae*-BLEE 44,4% de dos hospitales (4); en Trujillo, en gineco-obstetricia y cirugía se encontró 3,6% de *E. coli*-BLEE y; en Cajamarca en servicio de neonatología se reportó 21% de aislamientos para *P. aeruginosa* de ellos, el 10% fueron BLEE. (14) En

Chiclayo en el 2013, cultivos positivos para *E. coli*-BLEE 61% y *K. pneumoniae*-BLEE 39% (15) y en el 2014, el 67,3% de *E. coli*, fueron BLEE (+) y el 71,7% de *K. pneumoniae* fueron BLEE (+) (16).

Shayan S et-al realizaron la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto alcohólico del ajo contra *E. coli* AmpC y BLEE en el 2014. Por el método de difusión en disco, obteniéndose eficacia contra la producción de AmpC aislados de *E. coli*. (17). Wali I, Awad A. evaluaron la actividad in vitro de extracto etanolico del ajo contra aislamientos urinarios de *E. coli* en el 2014, por el método de tablero de ajedrez. El ajo mostró un efecto inhibitor sobre *E. coli* productores BLEE a diferentes concentraciones. (18)

Los productos obtenidos de las plantas medicinales, se encuentran con menos efectos secundarios comparados con los antibióticos comerciales y es por eso que se utilizan como alternativa para el tratamiento de diversas infecciones. (19,20) En el uso de *Allium sativum*, los científicos han publicado más de 2000 trabajos sobre todo en el ámbito terapéutico, que presentan características desde, aplicación culinaria hasta sus efectos en la medicina natural (dietéticas y medicinales) como: acción antioxidante, hipolipemiente, antiinflamatoria, antiterogénica, anticancerígeno, hipotensora y antimicrobiana. Los componentes biológicos activos son innumerables, se han identificado aproximadamente unos 30 compuestos que benefician a la salud, entre ellos los: No azufrados y Azufrados, donde se creen que residen sus beneficios en salud (21-25).

Por lo expuesto, se evaluó el efecto *in-vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* - "ajo" sobre cultivos de bacterias patógenas productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo es un estudio cuantitativo con un enfoque pre-experimental. La población estuvo compuesta por cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* todas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). La muestra fue representada por, tres cepas BLEE y un control no BLEE de cada especie patógena, todas expuestas a diferentes concentraciones de extracto acuoso de *Allium sativum* – “ajo” cultivadas en placas Petri con un número de repeticiones calculada

mediante fórmula estadística (26): $n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})\sigma}{\epsilon} \right]^2$, ϵ/σ : 1, Z_{α} : 1,96, Z_{β} : 0,842,

n: número de repeticiones fue de 16 para cada variable.

Confirmación de las cepas BLEE

Las cepas fueron donadas por el área de laboratorios de microbiología de la Universidad San Martín de Porres. Para la confirmación se usó el test confirmatorio de presencia de β -lactamasas de espectro extendido según el comité de Antibiograma de la sociedad francesa de Microbiología (27). El test requirió el uso de discos de Amoxicilina/Acido Clavulánico (20/10 μ g), Ceftazidima (30 μ g) y/o Cefotaxima (30 μ g) y/o Aztreonam (30 μ g) y/o Ceftriaxona, con los que se realizó prueba de disco difusión sin ninguna variante. A partir de un cultivo de 18 a 24 horas, se hizo una suspensión bacteriana, ajustada al tubo N^o 0.5 de McFarland, que tenía una suspensión de 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml, de la cual se sembró 20 μ L en una placa Petri de Müller Hinton. Luego se colocaron discos con carga estándar de 30 μ g de cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima y aztreonam, dispuestos a una distancia de 25-30 mm del disco de Amoxicilina/Acido clavulámico (20/10 μ g), colocado en el centro de la placa (de prueba). En otra placa (control) también se colocó

discos de cefotaxima, ceftazidima, cefuroxime y aztreonam, con las mismas cargas estándar, pero sin el disco de Amoxicilina/Acido clavulámico. Ambas placas se incubaron a 35°C durante 16 a 20 horas, luego se procedió a medir los halos de inhibición comparando la placa de prueba con la placa control. Se consideró como cultivo productor de β -lactamasas de espectro extendido a aquel que en la placa de prueba presento aumento en el diámetro del halo de inhibición mayor o igual a 5 mm, en alguna de las cefalosporinas o del aztreonam con relación a la placa control.

Mantenimiento de las cepas patógenas

El Mantenimiento de cepas BLEE se llevó a cabo según Instituto Nacional de Salud en el manual de normas técnicas N° 30 (28). Todas las cepas fueron conservadas en agar tripticosa soya y conservadas a 4°C-8°C. En la recuperación de las cepas se usó caldo tripticosa soya, incubadas a 35-37°C durante 18-24 horas.

Preparación de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* - “ajo”

Los especímenes de ajo, se obtuvieron de manera comercial. Se identificó y confirmo la especie de *Allium sativum* - “ajo” por biólogo botánico (anexo N°01),

Se obtuvo el extracto acuoso por el método descrito de García y Herrera en el 2007. (29) que consistió en pelar y lavar los bulbos de *Allium sativum* con agua destilada, seguido de una desinfección utilizando hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm durante 5 minutos, posteriormente se realizó un enjuague de los bulbos en suficiente agua destilada estéril, para retirar el hipoclorito residual, seguido se procedió a realizar un triturado (200 g),

utilizando para ello una licuadora, con recipientes de vidrio estériles y oscuros, este contenido se filtró dos veces: primero a través de gasas plegadas, varias veces, para retirar los residuos más groseros y segundo se empleó papel Whatman N° 41, esto última se repitió tres veces. El extracto final estéril es considerado como la concentración de 100 % y se conservó en viales oscuros de 2 ml a 4 °C durante 72 horas hasta su posterior uso. La preparación del extracto de ajo al 100% se sembró en agar nutritivo con una incubación de 37°C, para comprobar la esterilidad del extracto.

Se estandariza las concentraciones a 25%, 50%, 75% a partir de extracto del 100%, con agua destilada estéril. Todas las soluciones se colocaron en viales estéril, y conservadas a 4°C para evitar el crecimiento de otras bacterias que pudieran influir en los resultados.

Evaluación del efecto in vitro de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido

Mediante el método de dilución en pozo descrito por Torres (30) usando agar Müller Hinton. En 25 ml de agar Müller Hinton fluido (45°C) se inoculó 1 ml de suspensión de inóculo (tubo 0.5 de la escala de Mc Farland) de cultivo de 24 horas de las cepas, luego se homogenizó y se sirvieron en placas. Después de solidificado el agar se hizo pocillos de 5 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados estéril en los cuales se colocó 30 μ l del extracto acuoso de *Allium sativum* (ajo) de las diferentes concentraciones (0%, 25%, 50%, 75% y 100%). Las placas se incubaron a 37° C por 18 - 24 horas. Cumplido el tiempo se observó halos de inhibición producidos por la actividad del extracto acuoso. Para cada cepa se realizó 16 repeticiones.

La actividad antibacteriana se cuantificó a través de las medidas de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas indicadoras BLEE con sus respectivos controles de cepas no BLEE, dichas medidas se expresaron en milímetros (mm).

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se empleó el método descrito por el Instituto Nacional de Salud en el manual de normas técnicas N° 30 (28), se obtuvo una solución madre del extracto acuoso de *Allium sativum* (Ajo).

Concentración mínima bactericida (CMB)

Se empleó el método descrito por Abadie (31). Los pasos realizados fueron: de los tubos sembrados en la concentración mínima inhibitoria (CMI), se tomó los tubos sin crecimiento, no el de control de esterilidad. Se depositaron 100µl (0.1ml) de cada tubo sobre Agar Müeller Hinton y extendidos con una asa bacteriológica en toda la superficie del agar en tres direcciones. De esta forma se diluye la concentración del antimicrobiano vehiculado, se neutraliza su efecto y se favorece el recuento. Incubaron a 37°C y se procedió a la lectura después de las 24horas.

Técnicas para el procesamiento de la información

Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico SPSS versión 23, usándose la prueba de Shapiro-Wilk para el análisis de normalidad, con ello se decidió el uso de pruebas no paramétricas. Para la valoración de los promedio de los halos de inhibición se llevó a cabo en MegaStat 2007 con el Test de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza de 95% y el nivel de significancia estadística es de $p < 0.05$.

III. RESULTADOS

El extracto acuoso de *Allium sativum* “ajo” se demostró en 16 repeticiones por cepa bacteriana, que presenta efecto inhibitorio no solo en patógenos silvestres que se le considera control, sino también en cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como es el caso de *Escherichia coli* – BLEE con un halo de inhibición de 13 mm al 25% (180mg/ml) y 22,6 mm al 100%(720mg/ml), para el caso de *Klebsiella pneumoniae* se presenta halos de inhibición 15,4 mm al 25% (180mg/ml) de y 24,2 mm al 100% (720mg/ml). Este efecto inhibitorio no se observa en cepas de *Pseudomona aeruginosa* tanto en cepas BLEE como en su control.

A través de la prueba de Kruskal-Wallis, quien nos permite compara de 3 a más variables, se demuestra que hay diferencia del efecto inhibitorio in-vitro entre las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* sobre las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae* tanto en las control como las BLEE (tabla 1 y tabla 2)

Tabla 1. Promedio de diámetros inhibitorios en mm del extracto acuoso de *Allium sativum* - “ajo” a las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre cultivos in-vitro de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

CONCENTRACION	CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ACUOSO ALLIUM SATIVUM "AJO"								P
	- HALOS DE INHIBICION (mm)								
	25%		50%		75%		100%		
	mm	σ	mm	σ	Mm	σ	mm	σ	
<i>Escherichia coli</i> - Control	11,6 mm	0.5	13,6 mm	0.5	15,6 mm	0.5	19,4 mm	0.6	<0,05
<i>Escherichia coli</i> - C1	12,1 mm	0.3	14,6 mm	0.5	17,4 mm	0.5	22,3 mm	0.4	<0,05
<i>Escherichia coli</i> - C2	12,3 mm	0.4	15,7 mm	0.7	18,4 mm	0.5	22,1 mm	0.6	<0,05
<i>Escherichia coli</i> - C3	14,5 mm	0.5	16,4 mm	0.5	19,6 mm	0.5	23,4 mm	0.5	<0,05

C1, C2, C3 cepas BLEE; σ =desviación estándar; valor p calculado con la prueba de Kruskal-Wallis

En la tabla 1 nos muestra el promedio de todas las cepas usadas en la investigación donde se expresa que a mayor concentración de extracto acuoso de *A. sativum*, mayor será el diámetro de inhibición, también nos

muestra que existe diferencia significativa entre el efecto in-vitro inhibitorio con las diferentes concentraciones, dado que el valor de $p < 0,05$.

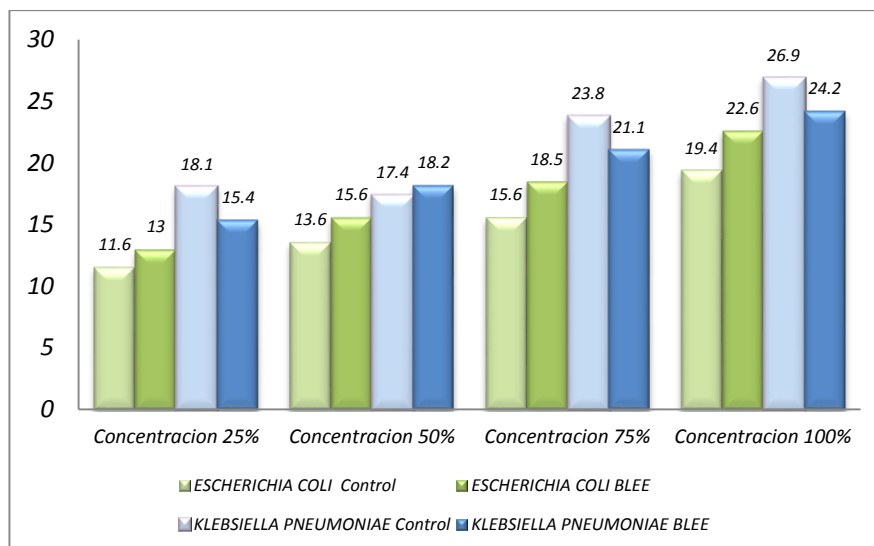
Tabla 2. Promedio de diámetros inhibitorios en mm del extracto acuoso de *Allium sativum* - "ajo" a las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre cultivos in-vitro de *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

CONCENTRACION	CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ACUOSO <i>ALLIUM SATIVUM</i> "AJO" - HALOS DE INHIBICION (mm)								p
	25%		50%		75%		100%		
	mm	σ	mm	σ	mm	σ	mm	σ	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – Control	18,1 mm	0,8	20.6 mm	0,7	23.8 mm	0,7	26.9 mm	0,7	<0,05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - C1	11,0 mm	0,0	13.6 mm	0,6	15.6 mm	0,6	19.6 mm	0,7	<0,05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - C2	15,1 mm	0,9	18.4 mm	1.1	21.2 mm	0,8	24.1 mm	0,8	<0,05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - C3	13,1 mm	0,9	15.7 mm	0,9	18.4 mm	0,7	21.6 mm	0,7	<0,05

C1, C2, C3 cepas BLEE; σ =desviación estándar; valor p calculado con la prueba de Kruskal-Wallis

En la tabla 2 nos muestra el promedio de todas las cepas usadas en la investigación donde se expresa que a mayor concentración de extracto acuoso de *A. sativum*, mayor será el diámetro de inhibición, también nos muestra que existe diferencia significativa entre el efecto in-vitro inhibitorio con las diferentes concentraciones, dado que el valor de $p < 0.05$.

Grafico 1. Comparación de diámetros inhibitorios en mm del extracto acuoso de *Allium sativum* - "ajo" sobre cultivos in-vitro de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y sus cepas control a las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%.



El gráfico 1 nos muestra que tanto las cepas BLEE como las cepas de control de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* tienen función inhibitoria creciente conforme se aumenta las concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum*.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto acuoso de *Allium sativum* – “ajo” sobre cultivos in-vitro de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y sus cepas control.

DETERMINANTES	ESCHERICHIA COLI		KLEBSIELLA PNEUMONIAE	
	Control	BLEE	Control	BLEE
CMI	45 mg/ml	45 mg/ml	45 mg/ml	45 mg/ml
CMB	90 mg/ml	90 mg/ml	180 mg/ml	180 mg/ml

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
CMB: Concentración Mínima Bactericida

IV. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en la investigación confirmar lo dicho por diversos autores sobre el *Allium sativum* y su efecto antibacteriano, esto se basa en la presencia de compuestos azufrados como la aliína que cuando al ser liberados por la trituration se transforma en alicina que es el componente activo. (32)

Existen varios estudios controversiales con respecto al efecto inhibitorio, de las bacterias usadas en el presente estudio, como es el caso de Moya J. et al (21), que demuestran que el *A. sativum* inhibe a *Pseudomona aeruginosa* pero no a *Escherichia coli*, en cambio Gaherwal S. et al (33), si demostraron que el extracto de *Allium sativum* tanto el crudo como extracto de metanol proporcionan una zona de inhibición muy marcada para *E. coli*.

En los datos obtenidos se demostró que el extracto acuoso de *A. sativum* – ajo no posee efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* tanto para las productoras de β -lactamasas de espectro extendido (*BLEE*) como las no productoras β -lactamasas de espectro extendido (no *BLEE*) a diferencias de los resultados obtenidos por Mercado P., donde el extracto de *A. sativum* presentó efecto inhibitorio, lo cual cabe la posibilidad que por tratarse de un extracto con solvente modifique su inhibición, potenciando los componentes activos o siendo este el que actué como inhibidor antibacteriano, también puede teorizar de que por tratarse de cepas no patógena no tenga resistencia a los componentes del ajo; este efecto que posee el *A. sativum* sobre *P. aeruginosa* también lo demuestra Jabeen A. pero el efecto es poco visible, que nos brinda la posibilidad, que por el uso de cepas patógenas (silvestres) a diferencia de otros estudios donde usan cepas estándar (ATCC) puede presentar algún

factor de resistencias dentro sus capas que reaccionarían con los componentes activos del *A. sativum* alterando así los resultados obtenidos con respecto al poder inhibidor de extracto. (25,34)

En la investigación se muestra el gran tamaño de halo de inhibición a su máxima concentración de 100% de extracto acuoso de *A. sativum* en comparación con las otras concentraciones, con $p < 0,05$ calculado con prueba de Kruskal-Wallis, esto nos expresa que existe una diferencias significativa entre las concentraciones, por lo tanto se puede expresar de que el efecto inhibitorio depende de su concentración y el mejor tratamiento tanto para las *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como las no productoras β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es el 100%, también nos muestra que no importa si *E. coli* y *K. pneumoniae* es BLEE o no igual el *Allium sativum* va a tener efecto inhibitorio. En estos resultados se muestran el efecto inhibitorio, sobre bacterias patógenas silvestres no BLEE de *E. coli* y *K. pneumoniae* con halos de inhibición a concentración de 100% de 19.4 mm y 26.9 mm respectivamente, a diferencia de Saravana et al, en su estudio de efecto inhibitorio de extracto acuoso y extracto de metanol de *Allium sativum* – ajo contra *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, en donde en su extracto acuoso se presenta 6 mm para *E. coli* y 8 mm para *K. pneumoniae*, esto se puede deber a que las bacterias usadas en su estudio que presentan diferentes puntos de resistencia a diferencia de las cepa usada en esta investigación, lo cual impide que se reduzca su efecto inhibitorio. (35)

La *E. coli* BLEE muestra un efecto inhibitorio cuando se enfrenta con el extracto acuoso de *A. sativum* – ajo, este efecto se ve en las investigaciones

realizadas por Shayan et al y Wali I, donde ellos usaron el extracto etanolico de *Allium sativum* – ajo con lo cual inhibieron el crecimiento de sus cepas, por lo tanto nos lleva a mencionar de que el solvente empleado que es el etanol, no es considerado una variable interviniente en su estudio por lo que demostramos en este estudio que no afecta sus componentes activos. (17,18) Se observa que la Concentración Mínima Inhibitoria tanto para las cepas control y las cepas BLEE de *Escherichia coli* es de 45 mg/ml, comparado con el estudio realizado por Sánchez M. et al, donde se requiere al menos 12.5 mg/ml de ajo para su inhibición, se puede deber a que las bacterias usadas en su investigación son cepas control ATCC que no presentan resistencia alguna, por lo tanto las bacterias patógenas requerirán más concentración para poder vencer su propia resistencia. (36)

V. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Allium sativum* - “ajo” presenta efecto *in-vitro* sobre cultivos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) al igual presentan las cepas control no BLEE.

El efecto *in-vitro* sobre cultivos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) depende las concentraciones usadas, a mayor concentración mayor efecto.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Allium sativum* - “ajo” sobre cultivos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es de 45 mg/ml al igual que para su control.

La concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de *Allium sativum* - “ajo” sobre cultivos de *Escherichia coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es de 90 mg/ml al igual que para su control.

La concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de *Allium sativum* - “ajo” sobre cultivos de *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es de 180 mg/ml al igual que para su control.

VI. RECOMENDACIONES

El estudio lleva varias interrogantes una de ellas, es que el efecto obtenido es in-vitro por lo que deberían investigarse en trabajos posteriores el efecto in-vivo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sandra L, Paz A, Piña E, Perozo A. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela. Rev. Kasmera. 2007; 35 (1): 15-25.
2. Acuña M, Benadof D, Rodriguez P, Herrera P. Antibióticos y expresión de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en agentes bacterémico. Rev. Chilena pediátrica. 2011; 82 (3): 198-203.
3. E. Cercenado. Impacto pronóstico de las betalactamasas de espectro extendido. Rev. Clínica española. 2011; 211 (3): 139-141.
4. Morales J, Reyes K, Monteghirfo M, Roque M, Irey J. Presencia de β -lactamasa de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. Rev. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2005; 66 (1): 24 - 32.
5. Escalante J, Sime A, Díaz C. Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Rev. Peruana de Epidemiología. 2013; 17 (1): 01 - 06.
6. Navarro D. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de Beta-lactamasas de espectro extendido: epidemiología clínica y molecular. [Tesis Doctoral]. España: Universidad de Sevilla. 2009. 167 p. Disponible en: http://fondosdigitales.us.es/media/thesis/1233/S_TD_PROV46.pdf

7. Hernández E. *Escherichia coli* productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. [Tesis Doctoral]. España: Universidad Complutense de Madrid. 2009. 172 p. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/10442/1/T31499.pdf>
8. León P, Vásquez G. Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de orina de pacientes ambulatorios de los centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca. [Tesis de Grado]. Ecuador: Universidad de Cuenca. 2013. 167 p. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4631/1/TESIS.pdf>
9. Paredes R, García R. Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en la clínica Good Hope durante el periodo marzo – agosto del 2012. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2013. 71 p. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3497/1/Paredes_gr.pdf
10. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Rev. Asociación colombiana de infectología. 2008; 12 (3): 223 - 233.
11. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. Rev. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 2003; 21 (2): 69 - 71.
12. Echeverri L, Cataño J. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: Epidemiología y resistencia. Rev. IATREIA. 2010; 23 (3): 240 - 249.

13. Fernández O, Grau S, Lluque P, Berenguer N, Mateu J. Tratamiento de las infecciones por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido: un nuevo reto terapéutico. *Rev. Farmacia Hospitalaria*. 2005; 29 (6): 351 - 353.
14. Rivera M, Rodriguez C, Huayan G. *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un servicio de neonatología. *Rev. Peruana de medicina experimental y salud publica*. 2008; 25 (2): 250 - 252.
15. Arce Z, Llontop J, Flores R, Fernandez D. Detección del gen CTX-M en cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional De Lambayeque Chiclayo –Perú. *Rev. Cuerpo Medico HNAAA*. 2013; 6 (4): 13 - 16.
16. Fernández J, Tello S, Pizarro F. Perfil Microbiológico de un Hospital del Seguro Social Nivel III, Chiclayo-Perú 2014. *Rev. Cuerpo Médico HNAAA*. 2016; 9 (1): 6 - 13.
17. Shayan S, Bokaeian M, Shahraki S, Saeidi S. Prevalence of AmpC and ESBL Producing *E. coli* and Antibacterial Effect of *Allium sativum* on Clinical Isolates Collected from Zahedan Hospitals. *Rev. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2014; 16 (4): 6 -10.
18. Wali I, Awad A. Combined activity of garlic and nitrofurantoin against *Escherichia coli* and *Enterococcus* species recovered from urinary tract infections. *Rev. African Journal of Microbiology Research*. 2014; 8 (7): 644 -651.
19. Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam S, Samra Z, Athar A. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important

- drug resistant pathogenic bacteria. Rev. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2012; 11 (8): 6-11.
20. Mukhtas S, Ghorri I. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamon and turmeric against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* DSM 3256. Rev. International Journal of applied biology and pharmaceutical technology. 2012; 3 (2): 131-136.
 21. Moya J, Chalar L, Vargas E, Sejas M, Romero B. Función Antimicrobiana de la Alicina de Ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Rev. Científica Ciencia Médica. 2014; 17 (3): 26-28.
 22. Alli J, Boboye B, Okonko I, Kolade A, Nwanze J. *In-vitro* assessments of the effects of garlic (*Allium sativum*) extract on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Rev. Advances in Applied Science Research. 2011; 2 (4): 25-36.
 23. Khadri S, Boutefnouchet N, Dekhil M. Antibacterial activity evaluation of *Allium sativum* essential oil compared to different *Pseudomonas aeruginosa* strains in eastern algeria. Rev. Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 2010; 11 (4): 421-428.
 24. García L, Sánchez F. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). Rev. ALAN. 2000; 50 (3): 219-229.
 25. Mercado P, Arévalo L. Sensibilidad de cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a la acción antibacteriana del extracto de *Allium sativum* "Ajo". Rev. de Investigación Científica (REBIOL). 2013; 33 (1): 1-13.

26. Pérez L, Mejía E. Efecto antimicrobiano *in vitro* de tres concentraciones de la corteza de *Copaifera officinalis* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. 2013. 75 p. Disponible en: http://dspace.unitru.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/123456789/302/PerezArteaga_L.pdf?sequence=1&isAllowed=y
27. Manayay J, Mercado P. Sensibilidad antibacteriana y detección de betalactamasas clásica y de espectro extendido en *Escherichia coli* aislados de infecciones del tracto urinario en gestantes atendidas en el laboratorio de análisis clínicos del C.S. Pueblo Nuevo – Ferreñafe, Julio 2012 – Julio 2013. . [Tesis de Maestría]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. 2014. 65 p.
28. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión en Disco. Serie de Normas Técnicas N° 30. Perú: Ministerio de Salud. 2002
29. García R, Herrera F. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Colombia 2007; 05 (2): 68 - 79.
30. Torres J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luna chequen* (molina) a. gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima – Perú. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2014. 130 p. Disponible en:

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3605/1/Torres_cj.pdf

31. Abadie R, Medina R, Ruiz L, Tresierra A. Actividad antibacteriana de extractos vegetales sobre cepas aisladas del Hardware de computadoras del Hospital Cesar Garayar - Iquitos. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. 2014. 117 p. Disponible en: <http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/272/1/Actividad%20Antibacteriana%20de%20extractos%20Vegetales%20sobre%20Cepas%20aisladas%20del%20Hardware%20de%20Computadoras.pdf>
32. Ponce A, Millones P. Efectividad Antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora. Rev. In Crescendo. Ciencias de la Salud. 2015; 2 (2): 314-321.
33. Gaherwal S, Johar F, Wast N, Prakash M. Anti-Bacterial Activities of *Allium sativum* Against *Escherichia coli*, *Salmonella* Ser. Typhi and *Staphylococcus aureus*. Rev. International Journal of Microbiological Research. 2014; 5 (1): 19-22.
34. Jabeen A, Hanif O, Bano S, Riaz M, Ahmen A. Effect of Ethanolic Extracts of Spices Named *Nigella sativa*, *Allium sativum* and *Syzygium aromaticum* Against *Pseudomonas aeruginosa in Vitro*. Rev. International Journal of Microbiological Research. 2014; 5 (3): 179-184.
35. Saravanan P, Ramya V, Sridhar H, Balamurugan V, Umamaheswari. Antibacterial activity of *Allium sativum* L. on Pathogenic Bacterial Strains. Rev. Global Veterinaria. 2010; 4(5): 519-522.

36. Sanchez M, Arrollo A, Landin L, Alonso A, Suarez G. Actividad inhibitorio de *allium cepa* y *allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* Y *Salmonella enteritidis*. Rev. Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan.. 2015; 3 (5): 1045-1052.

VIII. ANEXOS

CONSTANCIA


La que suscribe, Biólogo - Botánico con colegiatura CBP N° 7778,

HACE CONSTAR

Que la especie botánica que tengo a la vista le corresponde el nombre científico: **Allium sativum** L., especie conocida comúnmente con el nombre de "ajo".

Se expide la presente como constancia a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Chiclayo, 19 setiembre 2016.



MSc. Dunalía Llatas Cancino
Biólogo – Botánico

**ORGANIGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DEL EXTRACTO
ACUOSO DE *ALLIUM SATIVUM* – “AJO” CON EFECTO IN VITRO
SOBRE CULTIVOS DE BACTERIAS PATÓGENAS PRODUCTORES DE
B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (*BLEE*)**

