



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

**EFFECTO INHIBITORIO *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Allium sativum* L.
“AJO” FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*
MULTIRRESISTENTES AISLADAS DEL HOSPITAL REGIONAL DE LAMBAYEQUE**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

Presentado por:

**CAMPOS MONTEZA CHRISTIAN JUNNIOR
LÓPEZ UGARTE LLUNY CREYNEY**

LAMBAYEQUE – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

EFFECTO INHIBITORIO *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Allium sativum* L.
“AJO” FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*
MULTIRRESISTENTES AISLADAS DEL HOSPITAL REGIONAL DE LAMBAYEQUE

CAMPOS MONTEZA CHRISTIAN JUNNIOR
LÓPEZ UGARTE LLUNY CREYNEY

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

APROBADO POR:

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

PRESIDENTA

Mblga. Teresa Silva García

SECRETARIA

Dra. Martha Vergara Espinoza

VOCAL

Lic. Mario Moreno Mantilla

PATROCINADOR

Dedicatoria

A Dios.

*Por haberme dado el hermoso
regalo de la vida, para estudiar
la vida.*

A mis padres.

***Walter Campos Silva y
Teresa Monteza Alarcón*** por
el apoyo y cariño que me
brindan en todo momento.

A mis hermanos.

***Sara, Cinthya, Jimmy y
Kiara*** por ser parte
imprescindible en mi vida.

A la memoria.

De mi tío ***Wilian francisco
Monteza Alarcón*** docente de
Química y Biología.

Christian Junnior

A Dios.

Por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento de mi formación.

A mi madre.

Virginia por ser el pilar más importante y brindarme siempre su cariño, apoyo y motivación incondicional.

A mi padre.

Segundo Ranulfo por su ejemplo de perseverancia, constancia y por el valor mostrado para salir adelante.

A mis hermanos.

Lenin y James por su apoyo y comprensión.

A Kimberly y Kiara por ser el motivo de mis alegrías.

Lluny Creyney

Agradecimientos

A Dios por guiarnos en todo momento

Al laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, que me brindo todas las facilidades para el desarrollo de esta investigación.

A nuestro patrocinador Mario Moreno Mantilla por sus valiosos consejos, aportes y recomendaciones.

Al Licenciado Jorge Chanamé Céspedes por su colaboración en la parte estadística de la investigación.

Al distinguido jurado

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

Mbga. Teresa Silva Garcia

Dra. Martha Vergara Espinoza

Que con sus observaciones y sugerencias nos ayudaron a mejorar y culminar el presente trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2.1 Principios activos de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	4
2.2 Cepas bacterianas: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>	5
2.3 <i>Allium sativum</i> L. “ajo” y su efecto antimicrobiano.....	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Población y muestra de estudio.....	12
3.2. Material.....	12
3.2.1. Material biológico.....	12
3.3. Métodos.....	12
3.3.1 Técnica para la obtención del extracto acuoso y preparación de las concentraciones de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	12
A. Obtención del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	12
B. Solución madre de extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	13
C. Preparación de extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a diferentes concentraciones.....	13
3.3.2. Efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	14
A. Estandarización del inóculo bacteriano.....	14
B. Preparación de discos de susceptibilidad.....	14
C. Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer.....	14
3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	15

3.3.4. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	16
3.3.5. Diseño de contrastación.....	19
3.3.6. Análisis estadístico.....	19
IV. RESULTADOS.....	20
4.1. Efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes.....	20
4.2. Determinación de la Concentración mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” sobre cepas bacterianas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes.....	29
4.3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” sobre cepas bacterianas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes.....	32
V. DISCUSIÓN.....	35
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. RECOMENDACIONES.....	39
VIII. RESUMEN.....	40
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
X. ANEXOS.....	46

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1: Concentraciones de la solución del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. obtenidas de la solución madre.....	13
Tabla 2: Resumen del procedimiento para realizar la macrodilución en Caldo.....	16
Tabla 3: Promedio del tamaño de halo de inhibición (mm) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>A. sativum</i> L. “ajo” fresco.....	20
Tabla 4: Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición (mm) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes por efecto del extracto acuoso de <i>A. sativum</i> L. “ajo”.....	21
Tabla 5: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición de las especies <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>A. sativum</i> L. “ajo”.....	22
Tabla 6: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición para cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>A. sativum</i> L. “ajo”.....	24
Tabla 7: Prueba de significancia de Tukey (0.05) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> en relación a las concentraciones del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	25
Tabla 8: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>A. sativum</i> L. “ajo” fresco.....	29
Tabla 9: Concentración mínima bactericida (CMB) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>A. sativum</i> L. “ajo” fresco.....	32

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Obtención del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a y b. Bulbos de ajo c. Desinfección con bicloruro de mercurio d. Trituración.....	17
Figura 2: Efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo” a. Solución madre y concentraciones de 500, 400, 300, 200 y 100 mg/ml b. Suspensiones bacterianas al tubo NMF N° 05 c. Discos de susceptibilidad d. Estriado del inóculo bacteriano.....	18
Figura 3: Promedios de los halos de inhibición (mm) de las especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> en el efecto inhibitorio de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	22
Figura 4: Promedios de los halos de inhibición (mm) de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	24
Figura 5: Promedio de los halos de inhibición (mm) de las concentraciones (100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml y 500mg/ml), en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	25
Figura 6: Halos de inhibición (mm) de <i>Acinetobacter baumannii</i> por efecto del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. a concentraciones de 500, 400, 300, 200, 100 mg/ml y blanco de control a. Cepa 1 repetición 1 b. Cepa 2 repetición 1 c. Cepa 3 repetición 2.....	27
Figura 7: Halos de inhibición (mm) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. a concentraciones de 500, 400, 300, 200, 100 mg/ml y blanco de control a. Cepa 1 repetición 1 b. Cepa 2 repetición 2 c. Cepa 3 repetición 3.....	28
Figura 8: Concentración mínima inhibitoria de <i>Acinetobacter baumannii</i> por efecto del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. a. Cepa 1 b. Cepa 2 c. Cepa 3.....	30
Figura 9: Concentración mínima inhibitoria de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. a. Cepa 1 b. Cepa 2 c. Cepa 3.....	31
Figura 10: Concentración mínima bactericida de <i>Acinetobacter baumannii</i> cepa 2 por efecto del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. a. Control del inóculo b. cc de 6.25 mg /ml c. cc de 3.12 mg /ml d. cc de 1.56 mg /ml.....	33
Figura 11: Concentración mínima bactericida de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 2 por efecto del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. a. Control del inóculo b. cc de 50 mg /ml c. cc de 25 mg /ml d. cc de 12.5 mg /ml.....	34

LISTA DE ANEXOS

Anexos	Pág.
Anexo 1: Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistentes aisladas de esputo en pacientes con neumonía	44
Anexo 2: Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes aisladas de esputo en pacientes con neumonía.....	44
Anexo 3: Antibiograma de <i>Acinetobacter baumannii</i> cepa 1.....	45
Anexo 4: Antibiograma de <i>Acinetobacter baumannii</i> cepa 2.....	45
Anexo 5: Antibiograma de <i>Acinetobacter baumannii</i> cepa 3.....	46
Anexo 6: Antibiograma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 1.....	46
Anexo 7: Antibiograma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 2.....	47
Anexo 8: Antibiograma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 3.....	47
Anexo 9: Taxonomía y descripción de la planta <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	48
Anexo 10: Componentes mayoritarios del bulbo de ajo según tipo de procesado.....	48
Anexo 11: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición para <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para la interacción especie-concentración del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. "ajo"	49
Anexo 12: Prueba de significancia de Tukey (0.05) para los promedios de halo de inhibición para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes en relación a la interacción cepa – concentración (CxK) del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	50
Anexo 13: Promedios de los halos de inhibición (mm) de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes en relación a la interacción cepa – concentración (CxK) en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. “ajo”.....	51

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de plantas medicinales experimenta un auge cada vez más creciente, debido a sus propiedades terapéuticas frente a diversas enfermedades que afectan al hombre, ya que de ellas son obtenidas diversas sustancias químicas, la investigación en este sentido brinda la oportunidad de encontrar nuevos principios activos desde el punto de vista farmacológico que no generen resistencia microbiana.

Entre las plantas de gran interés en la medicina tradicional se encuentra el *Allium sativum* L. "ajo". Los bulbos de este se emplean en el arte culinario, pero también en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gramnegativas y grampositivas, así como también infecciones fúngicas y parasitarias, entre otras propiedades nutraceuticas. El ajo presenta principios activos como la alicina, el ajoene, sulfuros de alilo y vinildetiinas; siendo la alicina la responsable de las propiedades antibacterianas más importantes. (Córdova., 2010). La composición cualitativa y cuantitativa de los derivados azufrados se encuentra sujeta a importantes variaciones según el proceso al que sean sometidos los bulbos de ajo, lo cual incide a su vez en su actividad. El proceso por el cual se obtiene mayor concentración de alicina es la molturación y extracción acuosa. (Navarro., 2007).

Actualmente los hospitales están realizando esfuerzos para combatir las infecciones nosocomiales causadas por bacterias gramnegativas no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* caracterizados por presentar multirresistencia a fármacos de primera línea como el Imipenem, Meropenem, Ceftriaxona, etc. debido a diferentes mecanismos de resistencia como son la producción de betalactamasas de espectro ampliado que inhiben a los betalactámicos y que pueden ser de origen cromosómico o plasmídico, también por mutaciones en el sitio diana

o por bombas de expulsión. (Giske *et al.*, 2008). El Hospital Regional Lambayeque no escapa de este problema, presentando a las bacterias antes mencionadas como las principales causantes de infecciones intrahospitalarias en cuanto a bacterias gramnegativas no fermentadoras se refiere y presentando altos índices de resistencia. (Coaguila *et al.*, 2014)

Por tanto, la actividad antibacteriana del *Allium sativum* L, destacándose al sulfóxido de alilo (alicina) como principal principio activo para la inhibición de desarrollo de gérmenes, así como las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* y el gran problema de su generación de resistencia a los antibióticos en hospitales como el Hospital Regional de Lambayeque motivaron el siguiente planteamiento ¿Tiene efecto inhibitorio *in vitro* el extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque?; considerándose como hipótesis: El extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque.

Por todo lo antes mencionado se realizó el presente trabajo que tiene como objetivo general determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto acuoso *Allium sativum* L. “ajo” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque y como objetivos específicos:

- Determinar el efecto inhibitorio *in vitro*, del extracto acuoso *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 mg/ml frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque.

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque.
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (C.M.B) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1 Principios activos de *Allium sativum* L. “ajo”.

López, (2007), consideró a *Allium sativum* L. “ajo” un bulbo subterráneo que contiene numerosos componentes activos como los compuestos azufrados, entre los que destaca mayoritariamente la aliína o sulfóxido de S-alil-cisteína (aminoácido azufrado), es una sustancia inodora e inestable que se mantiene inalterable a bajas temperaturas, pero al ser triturada se transforma a alicina y otros compuestos azufrados por acción de la enzima alinasa. Estos últimos son solubles en medios oleosos y muy inestables que se transforman con mucha rapidez en compuestos organosulfurados (sulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo y ajoenos). En el bulbo intacto además de la aliína se encuentran otros compuestos azufrados solubles en medios acuosos como los sulfóxidos: S-metil-L-cisteína y S-propenil S-cisteína, S-glutatión, g-glutamyl-S- alil cisteína, y g-glutamyl-S-alil-mercapto-L-cisteína.

Gotya, (2008), mencionó que la alicina reacciona con tiol libre contenido en moléculas como glutatión y posee alta reactividad con uniones S-H, presenta gran difusión y penetración a través de membranas celulares, no induce fusión o agregación de membranas. Su fuerte difusión incrementa considerablemente la interacción intracelular con grupos tiol. Por lo tanto, la alicina bloquea paquetes enzimáticos de hongos y bacterias dañinas, inhibiendo cualquier actividad. Cuando las bacterias se hacen resistentes a antibióticos, la alicina puede ser una alternativa importante y efectiva, ya que los microorganismos no pueden cambiar su bacteria enzimática esencial para volverse resistentes.

Munayco y Moromi, (2013), mencionaron que el principal efecto antimicrobiano de la alicina se debe a su reacción química con los grupos tiol de las diferentes enzimas, por ejemplo, papaína, calpasa, alcohol deshidrogenasa, acetil-CoA la tiorredoxina reductasa, y la ARN polimerasa vía

una reacción de intercambio de tioles en los enlaces disulfuro. La susceptibilidad al ajo depende de diferencias estructurales en las cepas bacterianas. Los polisacáridos y lípidos contenidos en la pared celular tienen un efecto sobre la permeabilidad de la alicina y otros constituyentes de ajo lo que puede ser responsable de la diferencia en la susceptibilidad al ajo, entre las bacterias.

2.2 Cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*

Driscoll *et al*, (2007), indicaron que *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria aerobia gramnegativa que constituye una causa importante de infecciones extrahospitalarias e intrahospitalarias; mencionaron también que aislamientos de *P. aeruginosa* superproducen el polisacárido extracelular alginato con una morfología mucóide en los cultivos. En general, los aislamientos mucoides expresan mutaciones en el gen mucA. El alginato tiene diversos efectos que obstaculizan la depuración bacteriana por el huésped infectado, como la antioxidación de los radicales libres liberados por los macrófagos, el actuar como una barrera física que impide la fagocitosis y la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos y la activación del complemento. Además, los alginatos parecen ser importantes para la formación de las biopelículas. También limita la difusión de sustancias y la unión del antimicrobiano proporcionando una efectiva resistencia a las células en su interior.

Hernández *et al*, (2010), consideraron a *Acinetobacter baumannii* un patógeno nosocomial multirresistente cada vez más frecuente en pacientes hospitalizados afectando a pacientes con enfermedades subyacentes, sometido a cirugía, manipulaciones, procedimientos invasivos, uso previo de antibióticos de amplio espectro e ingresos prolongados. Determinaron que la capacidad de *Acinetobacter baumannii* para adquirir resistencia a múltiples antimicrobianos puede deberse a la relativa impermeabilidad de su membrana externa y la exposición ambiental a un gran reservorio de genes de resistencia.

Carmen y Martínez, (2013), dieron a conocer que las bacterias gramnegativas son un grave problema de salud en todo el mundo esto relacionado con la gravedad de las infecciones que pueden causar, las dificultades para establecer un tratamiento empírico correcto, la facilidad para la dispersión de la multirresistencia y la ausencia de nuevos antimicrobianos activos frente a estos patógenos. Dentro de los bacilos gramnegativos no fermentadores multirresistentes destacan a *Pseudomonas aeruginosa*, con elevada resistencia intrínseca y facilidad para adquirir resistencias adicionales y *Acinetobacter baumannii*, con crecientes tasas de resistencia a los antimicrobianos.

Vanegas *et al*, (2014), consideraron a *Acinetobacter baumannii* una bacteria de gran importancia clínica con alta capacidad para diseminarse en el ambiente hospitalario relacionado con altos porcentajes de mortalidad que con el paso del tiempo ha ido adquiriendo diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos (carbapenémicos, aminoglucosidos, quinolonas y polimixinas). Dentro de los mecanismos de resistencia desarrollados incluyen la producción de β -lactamasas, dentro de ellas una cefalosporinasa tipo AmpC no inducible, también presenta la oxacilinasasa OXA-51, cuyas expresiones están mediadas por la presencia de secuencias de inserción. Otro mecanismo es la sobreexpresión de bombas de expulsión, dentro de ellos el más estudiado el sistema ABC que puede expulsar β -lactámicos. El siguiente mecanismo referido a la pérdida de porinas y la modificación del blanco de acción de los antibióticos.

Lujan, (2014), consideró a *Pseudomonas aeruginosa* uno de los patógenos nosocomiales globalmente dominantes causante de una amplia gama de infecciones que se complican aún más debido a su resistencia intrínseca a diversos antibióticos y su capacidad de adquirir nuevos

mecanismos de resistencia asociándola a elevados índices de mortalidad y convirtiéndola en un serio problema de salud pública. Estos mecanismos de resistencia son: la membrana externa que limita la penetración de pequeños antibióticos hidrofílicos tales como los β -lactámicos y las quinolonas que sólo pueden atravesar la membrana externa pasando a través de canales acuosos constituidos en el interior de unas proteínas designadas porinas cuya ausencia es asociada con la resistencia; las bombas de eflujo forman un sistema eficiente de expulsión de los antibióticos, la producción de β -lactamasa AmpC inducible. Entre los mecanismos de resistencia adquiridos se encuentran a las carbapenemasas y betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Coaguila *et al*, (2014), en el Hospital Regional Lambayeque realizaron un estudio sobre las infecciones intrahospitalarias por bacterias gramnegativas no fermentadoras donde se encontró como agente etiológico a la especie *Pseudomonas aeruginosa* en el 51.97 % de pacientes seguido de la especie *Acinetobacter baumannii* con un 32,35%. La Neumonía fue el foco más frecuente de sepsis causada por estas bacterias con un 88,89%. El 86,27% y 63,73% de los pacientes presentaron resistencia a Cefepime e Imipenem, mientras que la menor resistencia la tuvo la Tygeciclina con un 19,6%.

2.3 *Allium sativum* L. “ajo” y su efecto antimicrobiano

García y herrera, (2007), realizaron un trabajo donde evaluaron el efecto inhibitorio *in vitro* de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cinco cepas bacterianas patógenas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* El extracto de *Allium cepa* mostró mayor poder inhibitorio sobre *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Bacillus cereus*; *Allium fistulosum* mostró un bajo efecto antibacteriano excepto cuando se enfrentó a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con los cuales mostró el mayor efecto inhibitorio. Los extractos de *Allium cepa* y *Allium fistulosum* mostraron un mayor poder antimicrobiano con respecto a *Allium sativum*.

Vidarte y Villareal, (2008), realizaron un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* ajo fresco y ajo industrializado “Toña” sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), en este estudio se concluyó que el “ajo” fresco tiene mayor efecto inhibitorio sobre las cepas empleadas que el “ajo” industrializado en polvo “Toña”. En lo correspondiente a la CMI₁₀₀ se determinó que *S. aureus* (cepas 1 y 2), *S. flexneri* (cepas 1 y 2) fueron las más sensibles para el extracto acuoso de *A. sativum* L. “ajo” fresco, pues se inhibieron a una concentración mínima de 3.36 mg/ml, mientras que *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (cepas 1 y 2) se inhibieron a la concentración mínima de 4.48 mg/ml. Sin embargo *S. flexneri* cepa 1 y 2 fueron las cepas más sensibles para el extracto de *A. sativum* L. “ajo” industrializado en polvo “Toña”, pues se inhibieron a la concentración mínima de 5.6 mg/ml, mientras que *S. aureus* (cepas 1 y 2), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (cepas 1 y 2) se inhibieron a la concentración mínima de 8.4 mg/ml.

Álvarez, (2008), realizó un estudio para medir el efecto inhibitorio de *Allium sativum* L “ajo” en solución hidroalcohólica frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a la oxaciclina y *Escherichia coli* y evaluación de su toxicidad sobre *Artemia salina* “camarón de salmuera”.

En este estudio se demostró la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por la solución hidroalcohólica de *Allium sativum*, así mismo hubo mayor halo de inhibición conforme se incrementaban las concentraciones, además se demostró que la especie más sensible fue *Staphylococcus aureus* con halos de 11.6 mm a 22.26 mm (concentración 20%v/v y 50%v/v respectivamente), la especie más resistente fue *E. coli* presentando halos de inhibición de 11.50 mm y 20.8 mm a concentraciones de 20 y 50% v/v respectivamente. Con respecto a la evaluación de la toxicidad con *Artemia salina* se observó mayor toxicidad a mayor concentración.

Mamani y Mercado, (2009), realizaron un trabajo de investigación del efecto *in vitro* de *Allium sativum* liofilizado sobre *Candida albicans*; se utilizaron 15 muestras aisladas de pacientes del hospital “Carlos Monge Medrano” Juliaca; se utilizó ajo liofilizado (alicina 9 mg); posteriormente se realizó diluciones para encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML), por medio de la escala de Mc Farland.

Se encontró que la CMI produjo un halo de inhibición promedio de 7.3 mm siendo la concentración del ajo 25mg/ml; la CML produjo un halo de inhibición promedio de 11.6 mm y una concentración de 50mg/ml de solución de ajo; además se demostró la concentración óptima (CO) 200mg/ml y un halo promedio de 31.3 mm. Concluyendo así que el ajo liofilizado posee una actividad anti fúngica *in vitro* frente a *Candida albicans*.

Lora *et al*, (2010), realizaron un trabajo orientado al efecto antimicótico *in vitro* de *Allium sativum* sobre dermatofitos y *Candida albicans*. Para ello se utilizaron treinta cultivos puros de los cuales correspondieron: 7 a *Trichophyton mentagrophytes*, 4 a *Trichophyton rubrum*, 4 a *Microsporum canis* y 15 a *Candida albicans*; se utilizaron 100 g de *Allium sativum*.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron usando el método de difusión en agar (MDA) y el método de dilución en agar. Para el caso de los dermatofitos por el MDA se logró una inhibición de 300-400 µg/ml de ajo liofilizado; una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 µg/ml y un efecto fungicida de 1000µg/ml. en el caso de *Cándida albicans*, por el MDA se obtuvo mayor diámetro de inhibición entre 4000 y 5000 µg/ml una CMI de 250 µg/ml y un efecto fungicida de 5000 µg/ml. con estos resultados se corrobora las propiedades medicinales que se le atribuyen al ajo y se podrían utilizar en estudios *in vivo*.

Karuppiah y Rajaran, (2012), evaluaron la propiedad antibacteriana de dientes de *Allium sativum* y rizomas de *Zingiber officinale* contra patógenos clínicos resistentes a múltiples fármacos. Las propiedades de los dientes de ajo y rizomas de jengibre se extrajeron con 95% (v/v) de etanol el cual enfrentaron contra dos bacterias grampositivas (*S. aureus*, *Bacillus sp*) y cinco gramnegativas (*Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus sp*). La actividad antibacteriana se evaluó por discos de difusión y CMI. Obteniendo como resultado la susceptibilidad en todos los aislamientos bacterianos excepto *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*, encontrando además que hubo mejor inhibición con ajo, encontrando en *P. aeruginosa* una CMI igual a 67.00 mg/ml. Concluyeron que especies naturales de ajo y jengibre poseen actividad antibacteriana eficaz contra patógenos clínicos a múltiples fármacos y se pueden utilizar en la prevención de enfermedades microbiana resistentes a los medicamentos.

Munayko y Moromi (2013) realizaron un estudio para determinar el efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de *Allium sativum* a diversas concentraciones frente a cepas estándares de la cavidad bucal: *Streptococcus mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Lactobacillus casei* y *Candida albicans*. El extracto se obtuvo por el proceso de maceración y para la prueba experimental se usó el método de difusión mediante discos: ciprofloxacina y fluconazol como control positivo de las bacterias y hongo respectivamente y el alcohol de 70° como control negativo.

La concentración antimicrobiana frente a *Capnocytophaga sputigena*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* fue de 120mg/ml, teniendo como referencia estándar al ciprofloxacina a una concentración de 4mg/ml y al fluconazol a una concentración de 2mg/ml. concluyendo que el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* presentó efecto antimicrobiano frente a las cepas estándares de la cavidad bucal con excepción de *Lactobacillus casei* que presentó resistencia.

Chalar *et al.*, (2014) realizaron un estudio para demostrar la capacidad antimicrobiana de la alicina (compuesto activo) de *Allium sativum* en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Se obtuvo la alicina del ajo mediante un proceso de trituración, para luego exponer las tres cepas con tres diferentes concentraciones (0.5, 1.5 y 3 ml) en orden creciente en placas Petri con agar sangre y agar nutritivo. Los resultados evidenciaron que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se inhibían completamente a una concentración de 3 ml, mientras que *Escherichia coli* no se inhibió ante ninguna concentración. Concluyendo que el campo de estudio de la función antimicrobiana del ajo es amplio y debe profundizarse.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO

La población la conformaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas de pacientes con neumonía. La muestra estuvo representada por 6 cepas bacterianas, 3 por cada especie. (Anexos 1 - 8).

3.2 MATERIAL

3.2.1 Material biológico

El material botánico estuvo constituido por bulbos de *Allium sativum* L. “ajo” comprado en el Mercado Mayorista Moshoqueque. (Anexo 9).

El material microbiológico estuvo constituido por tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y tres de *Acinetobacter baumannii* aisladas de esputo de pacientes con Neumonía, obtenidas del Hospital Regional Lambayeque.

3.3 MÉTODOS

3.3.1. Técnica para la obtención del extracto acuoso y preparación de las concentraciones de *Allium sativum* L. “ajo”. (Cobeñas y Ramos 1998)

A. Obtención del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” (figura 1)

- El bulbo de ajo fresco se peló usando guantes y morteros esterilizados.
- De los bulbos descascarados se pesó 100 g en una balanza analítica.
- Después de ser pesados se procedió a la desinfección para ello se utiliza bicloruro de mercurio al 1 % en la cual fueron lavados, luego se procede a la eliminación del exceso de desinfectante, lavando los bulbos con abundante agua destilada estéril.
- Los ajos desinfectados fueron llevados a un extractor aséptico para la obtención de los componentes del bulbo de ajo, esto haciendo uso de

guantes estériles durante su manipulación y proporcionando un ambiente adecuado de esterilidad. (Anexo 10).

- El extracto obtenido se colocó en un frasco esterilizado para su uso inmediato.

B. Solución madre de extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”

- La concentración se obtuvo midiendo la densidad del extracto, obteniendo una concentración de 1120 mg/ml.

C. Preparación de extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” a diferentes concentraciones (Figura 2: a)

- A partir de la solución madre se procedió a realizar diluciones para obtener concentraciones de 500, 400, 300, 200, 100 mg/ml. Se tomó un volumen de la solución stock y completo con agua destilada estéril. (tabla 1)

Tabla 1. Concentraciones de la solución del extracto acuoso de *Allium sativum* L. obtenidas de la solución madre

Sol. Madre ml.	Diluyente ml.	Concentración mg/ml
1	2.24	500
1	2.8	400
1	3.7	300
1	5.6	200
1	11.2	100

3.3.2. Efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”.

A. Estandarización del inóculo bacteriano. (Sacsquispe y Velásquez 2002) (Figura 2: b, c y d)

- Las cepas bacterianas a utilizar se sembraron en una placa con agar nutritivo y se incubaron por 24 horas, se seleccionó colonias aisladas y se procedió a preparar una suspensión en solución salina.
- La suspensión se ajustó a la escala del nefelómetro de Mc Farland (tubo N° 0.5), cuya densidad poblacional es de 1.5×10^8 UFC/mL.

B. Preparación de discos de susceptibilidad

- Se empleó papel filtro Watman N° 01 para obtener los discos de 6 mm de diámetro, para ello se hizo uso de un perforador.
- Los discos se colocaron en un frasco de vidrio, luego se esterilizó en horno a 180 °C/ 24 horas.
- Posteriormente con la ayuda de una pinza esterilizada, los discos se embebieron con 10 µl de las diferentes concentraciones (100, 200 mg/ml, 300, 400 y 500 mg/ml), se dejaron secar por cinco minutos en reposo para luego realizar la prueba de susceptibilidad.
- Se utilizó un disco embebido en agua destilada estéril como control negativo.

C. Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer (kinsbruy *et al.*, 1991)

- En placas Petri previamente esterilizadas se sirvió 10 ml de agar Müller Hinton, se dejó solidificar y realizó el control de esterilización llevándolas a incubación a 37 °C por 24 horas.
- Se introdujo el hisopo esterilizado dentro del inóculo estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo.
- El inóculo se sembró superficialmente por estría en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar, luego se dejó

secar durante cinco minutos y se colocó los discos impregnados con el extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” a una distancia de 20 mm.

- Posteriormente se llevó las placas a incubación a 37°C/24 horas. Transcurrido el tiempo se midió los halos de inhibición (mm), registrando la medida para cada una de las cepas.
- Se realizó 3 repeticiones por cada cepa, lo que constituye 90 unidades experimentales (45 unidades por cada especie bacteriana).

3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del INS

- En cuanto a la población bacteriana, las cepas se sembraron e incubaron en agar Müller Hinton por un tiempo de 24 horas y a una temperatura de 37 °C, luego se procedió a la cosecha, se compararon con el tubo número 0.5 del nefelómetro de Mc Farland que indica una densidad poblacional de 1.5×10^8 UFC/mL. Una vez ajustado el inóculo y dentro de los quince minutos de preparada la misma, diluir en caldo para lograr una dilución 1/100 (inóculo de trabajo = 1.5×10^6 UFC/mL).

Procedimiento (Tabla 2)

- Se colocó 0,5 ml de Caldo Müller Hinton desde el tubo N° 2 al N° 12.
- Se colocó 0,5 ml de solución del extracto acuoso de trabajo con una concentración de 100 mg/ml al tubo N°1 y N°2. Se mezcló el tubo N°2 y transfirió 0,5 ml del tubo N°2 al tubo N°3.
- Se mezcló el tubo N°3 y transfirió 0,5 ml de este tubo al tubo N°4. Se continuó con el mismo procedimiento hasta el tubo N°10.
- Se descartó 0,5 ml de la dilución del tubo N°10.
- Se colocó 0,5 ml del inóculo desde el tubo N°1 al N°11.
- El tubo N°11 fue el control del inóculo y el N°12 el control de esterilidad.
- Se incubó a 35°C, en un tiempo de 16 – 20 horas.
- El punto final se definió a simple vista, por la falta de turbidez del caldo, para ello se comparó cada tubo con el tubo de control de crecimiento.

Tabla 2. Resumen del procedimiento para realizar la macrodilución en Caldo

Tubo N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
											C.I	C.E
Caldo Müller Hinton (ml)	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> L. (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	–
Inoculo (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–
Volumen final (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5

3.3.4. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB). (Abadie *et al.*, 2014)

- A partir de cada uno de los tubos sin desarrollo bacteriano, se inoculó 0.1 ml en placas con Müller Hinton y con un asa bacteriológica se estrió en toda la superficie del agar en tres direcciones, las que se incubó a 37 °C durante 18 horas.
- Finalmente, para determinar la CMB se contó el número de colonias en las placas, considerándose dicha CMB como la menor concentración del extracto cuyo subcultivo produjo un número de colonias menor al 0.1% del inóculo original (7.5×10^5 UFC/ml), es decir, un número menor a 750 UFC/ml, y como se inoculó la décima parte de 1 ml (0.1 ml), entonces se consideró la CMB al subcultivo que produjo menos de 75 colonias

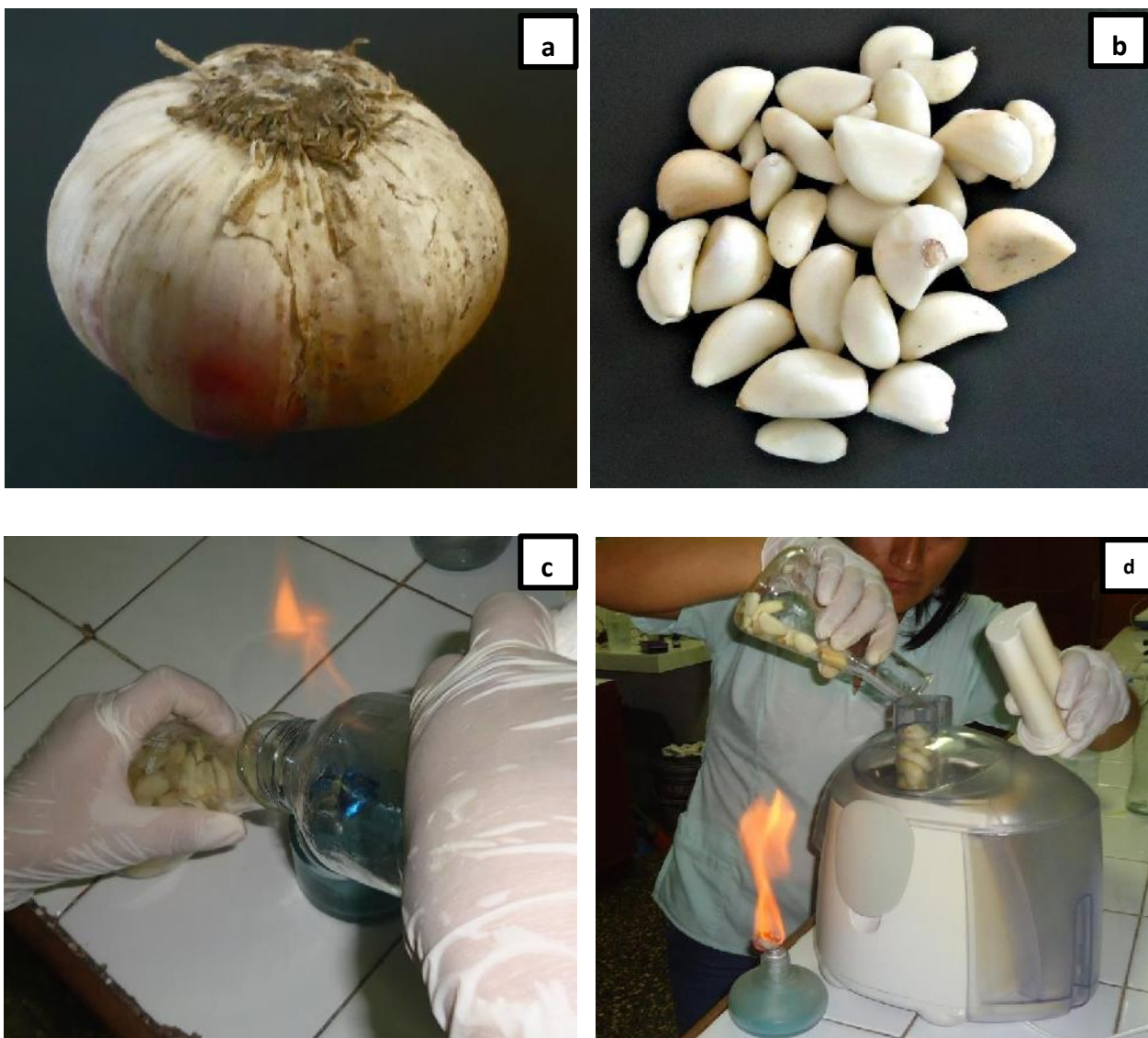


Figura 1. Obtención del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” a y b. Bulbos de ajo
c. Desinfección con bicloruro de mercurio d. Trituración



Figura 2. Efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” a. Solución madre y concentraciones de 500, 400, 300, 200 y 100 mg/ml b. Suspensiones bacterianas al tubo N° 05 del NMF c. Discos de susceptibilidad d. Estriado del inóculo bacteriano

3.3.5. Diseño de contrastación

El Diseño que se utilizó corresponde al Diseño clásico y de estímulo creciente (Alvitres, 1997).

Los grupos experimentales son las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* cada una por triplicado a las cuales se les aplicó como estímulo los extractos acuosos de *Allium sativum* L. "ajo" a concentraciones crecientes.

3.3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico los datos obtenidos en la investigación correspondiente al efecto inhibitorio *in vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* L. "ajo" frente a cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANOVA), con arreglo factorial 5 x 6 x 3 siendo el primer factor las concentraciones *Allium sativum* L "ajo" (100, 200, 300, 400, 500 mg/ml), y el segundo factor las 6 cepas bacterianas (3 por cada especie), con tres repeticiones por cada tipo de concentración. Este análisis se complementa con la prueba de significancia de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Para ello se utilizó el software STATISTICA versión 8.0 y Microsoft office Word 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes

Los resultados obtenidos en el desarrollo experimental del presente trabajo demostraron que el crecimiento de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque fue inhibido por la solución acuosa de *Allium sativum* L. “ajo”. Se observó que hubo mayor halo de inhibición del crecimiento conforme se incrementaba la concentración del producto. Así los promedios de halo de inhibición demuestran que *Acinetobacter baumannii* fue la especie más sensible ya que presenta halos de 16.3 mm a una concentración de 100 mg/ml y 26.8 mm a una concentración de 500 mg/ml; en cambio la especie más resistente fue la de *Pseudomonas aeruginosa*, presentando halos de inhibición de 6 mm y 9.5 mm a las concentraciones de 100 y 500 mg/ml. (Tabla 3)

Tabla 3. Promedio del tamaño de halo de inhibición (mm) de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *A. sativum* L “ajo”

Concentración del Extracto (mg/ml)	Halos de inhibición por especies	<i>Acinetobacter baumannii</i> mm	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mm
100 mg/ml		16.33	6
200 mg/ml		19.56	6.22
300 mg/ml		22.56	6.78
400 mg/ml		24.78	7.89
500 mg/ml		26.89	9.56

El análisis de varianza (ANAVA), mostro que existe diferencias estadísticas significativas entre los promedios de halos de inhibición (mm) obtenidos según cepas y concentraciones al igual que para la interacción entre dichos factores (CxK). Estos resultados permiten observar que las cepas no presentan el mismo comportamiento frente al extracto acuoso de *A. sativum* L. “ajo”, así mismo las concentraciones del producto influye en el efecto inhibitorio. (Tabla 4)

Tabla 4. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición (mm) de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes por efecto del extracto acuoso de *A. sativum* L. “ajo”

Hipótesis:

Cepas:

Ho: *P. aeruginosa* 1 = *P. aeruginosa* 2 = *P. aeruginosa* 3 = *A. baumannii* 1 = *A. baumannii* 2 = *A. baumannii* 3

Concentraciones:

Ho: K100 = K200 = K300 = K400 = K500

Interacciones:

Ho: no hay efecto de interacciones entre CxK.

FV	SC	GL	CM	F	P	Ft 0.05	Decisión
Cepas (C)	5297.26	5	138.73	451.899	0.0000	2.368	Rechazar Ho
Concentración (K)	554.93	4	4884.10	59.175	0.0000	2.525	Rechazar Ho
CxK	193.47	20	38.04	4.126	0.00001	1.748	Rechazar Ho
Error	140.67	60	7.44				
Total							

FV= Fuente de variación

SC= Suma de cuadrados

GL= Grados de libertad

CM= Cuadrados medios

P= Probabilidad

La prueba de significancia de Tukey para los promedios de halos de inhibición en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* obtenidos después de la prueba de sensibilidad bacteriana al extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”, demostró que cada especie es independiente, así *P. aeruginosa* tuvo un promedio de halo de inhibición de 7.28 mm mientras que *A. baumannii* produjo un halo de inhibición de 22.02 mm (Tabla 5, figura 3).

Tabla 5. Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición de las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *A. sativum* L. “ajo”

Especie	Promedio del halo (mm)	Significancia
<i>P. aeruginosa</i>	7.288	A
<i>A. baumannii</i>	22.022	B

Letras diferentes = diferencia significativa

Letras iguales = no hay diferencias significativas

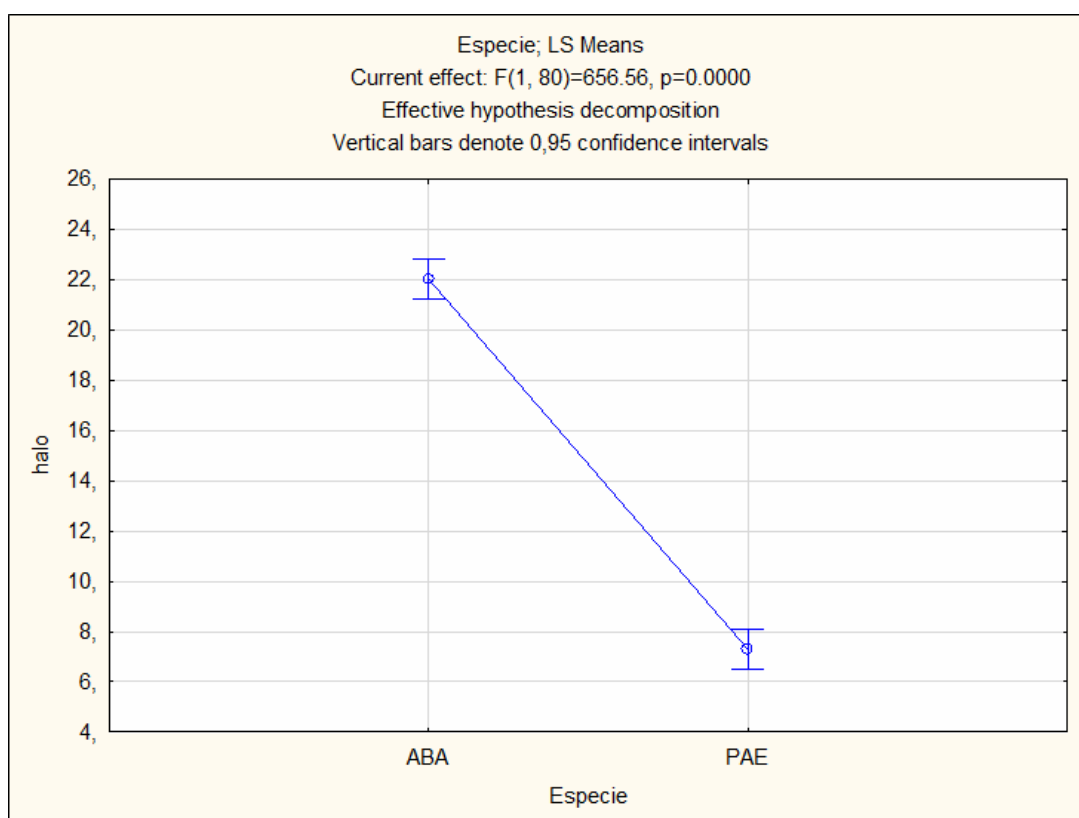


Figura 3. Promedios de los halos de inhibición (mm) de las especies de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en el efecto inhibitorio de *Allium sativum* L. “ajo”

La prueba de significancia de Tukey para los promedios de halos de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* obtenidos después de la prueba de sensibilidad bacteriana al extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” fresco, demostró que cada cepa es independiente (Figura 4), así *P. aeruginosa* cepa 2 tuvo un promedio de halo de inhibición de 6.73 mm. En tanto que *A. baumannii* cepa1 produjo un halo de inhibición de 26.06 mm. (Tabla 6)

Tabla 6. Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *A. sativum* L. “ajo”

Cepas	Tamaño de halo (mm)	Significancia
<i>P. aeruginosa</i> 2	6.73	A
<i>P. aeruginosa</i> 3	7.2	A
<i>P. aeruginosa</i> 1	7.93	A
<i>A. baumannii</i> 2	18.93	B
<i>A. baumannii</i> 3	21.06	C
<i>A. baumannii</i> 1	26.06	D

Letras diferentes = diferencia significativa

Letras iguales = no hay diferencias significativas

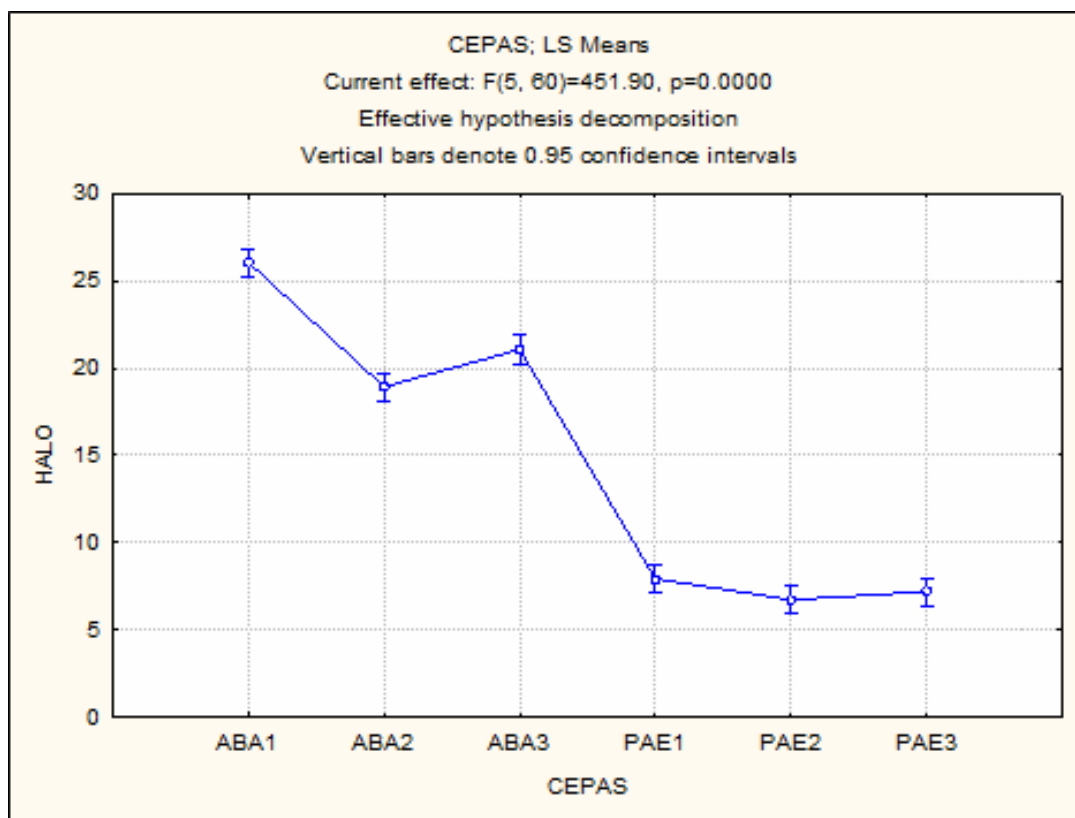


Figura 4. Promedios de los halos de inhibición (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”

Estadísticamente se demostró, a través de la prueba de Tukey que los promedios de halo de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* expuestas a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” (100, 200, 300, 400, 500 mg/ml), aumentaban a medida que se incrementaban las concentraciones (Figura 5), así a la concentración de 100 mg/ml se observó un halo de inhibición de 11.16 mm mientras que la concentración de 500 mg/ml obtuvo un halo de inhibición de 18.22 mm. (Tabla 7)

Tabla 7. Prueba de significancia de Tukey (0.05) para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en relación a las concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”

Concentraciones (mg/ml)	Tamaño de halo (mm)	Significancia
100	11.16	A
200	12.88	B
300	14.66	C
400	16.33	D
500	18.22	E

Letras diferentes = diferencia significativa

Letras iguales = no hay diferencias significativas

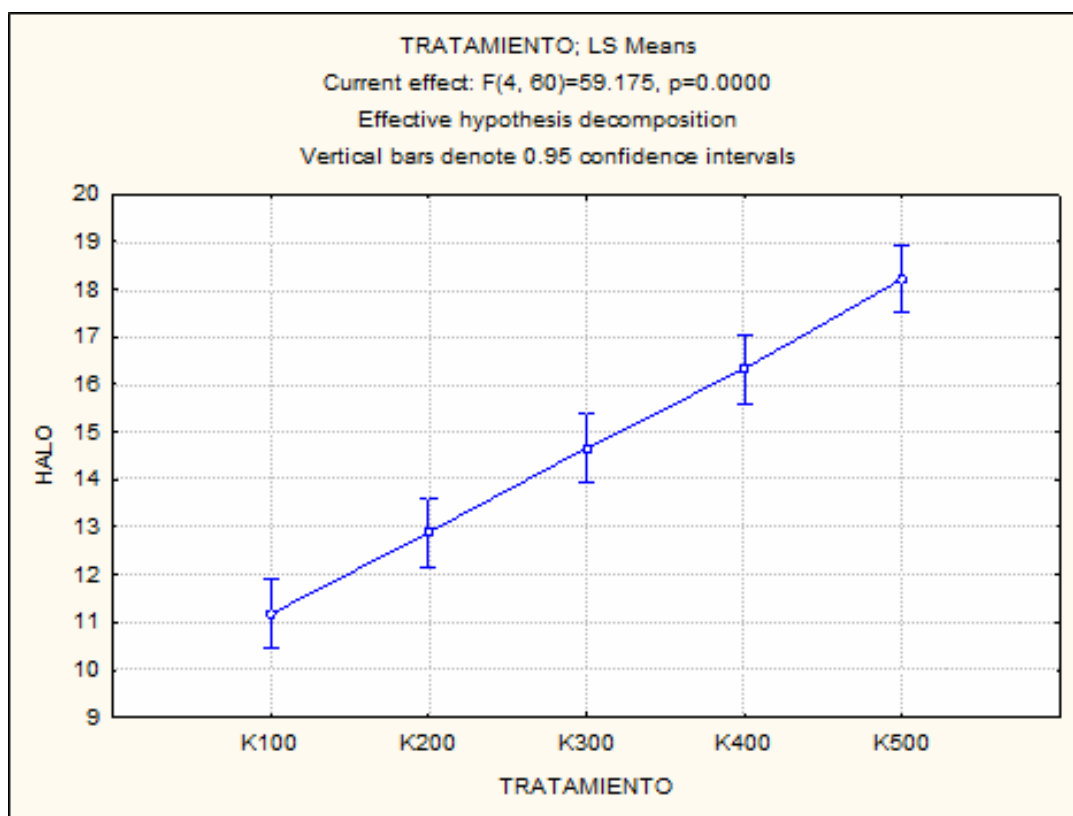


Figura 5. Promedio de los halos de inhibición (mm) de las concentraciones (100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml y 500mg/ml), en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”

De acuerdo a la prueba de Tukey para los promedios de halos de inhibición de especies de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* en relación a las concentraciones del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” (interacción especie – concentración) permitió observar que la especie de *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración de 100 mg/ml mostraron un promedio de halo de inhibición de 6 mm mientras que las de *Acinetobacter baumannii* un promedio de 16.3 mm a la misma concentración. (Anexo 11)

La prueba de Tukey para los promedios de halo de inhibición de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes en relación a la interacción cepa – concentración (CxK) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”; permitió observar que las cepas de *P. aeruginosa* 1, 2 y 3 a la concentración de 100 mg/ml obtuvo un halo de 6 mm, mientras que las cepas de *A. baumannii* 2, 3 y 1 obtuvieron un halo de 13.3, 17 y 18.6 mm respectivamente. Todas las cepas de *A. baumannii* mostraron mayor halo de inhibición que las de *P. aeruginosa* a las diferentes concentraciones. (Anexo 12 y 13)

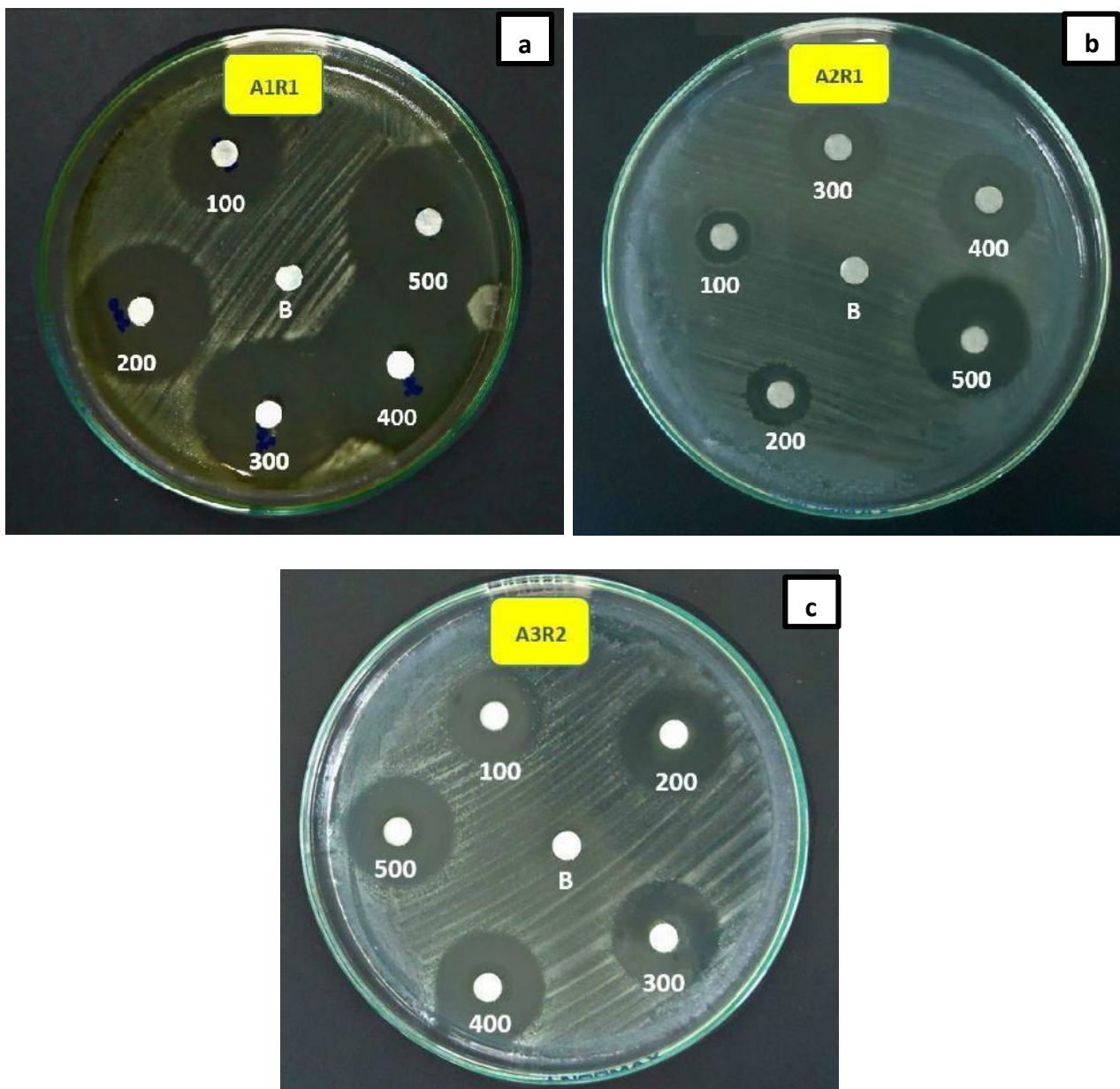


Figura 6. Halos de inhibición (mm) de *Acinetobacter baumannii* por efecto del extracto acuoso de *Allium sativum* L. a concentraciones de 500, 400, 300, 200, 100 mg/ml y blanco de control a. Cepa 1 repetición 1 b. Cepa 2 repetición 1 c. Cepa 3 repetición 2

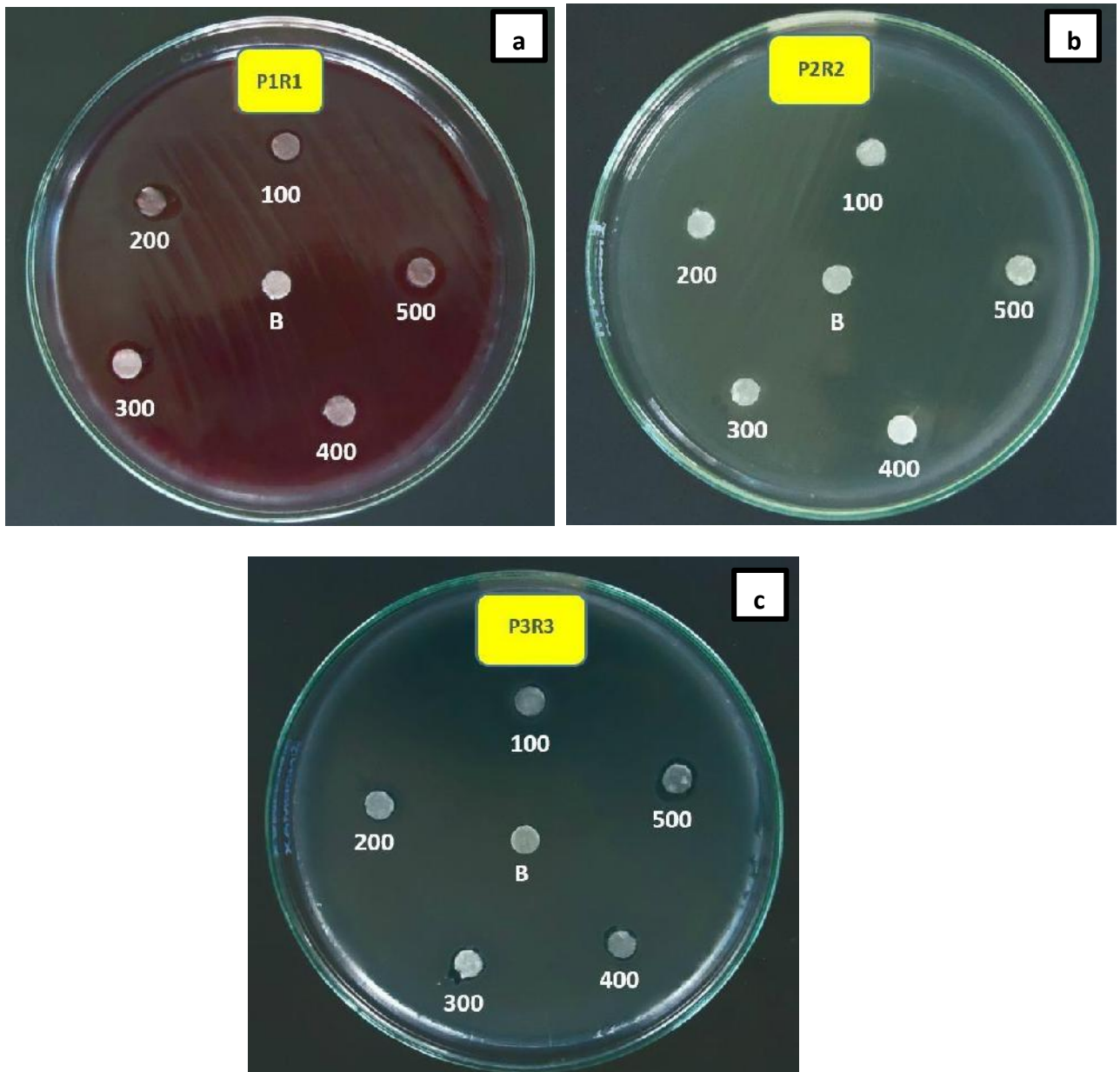


Figura 7. Halos de inhibición (mm) de *Pseudomonas aeruginosa* por efecto del extracto acuoso de *Allium sativum* L. a concentraciones de 500, 400, 300, 200, 100 mg/ml y blanco de control a. Cepa 1 repetición 1 b. Cepa 2 repetición 2 c. Cepa 3 repetición 3

4.2 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” sobre cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes

La menor concentración mínima inhibitoria (CMI) que presentó el extracto acuoso de *Allium sativum* L. fue sobre las cepas 1, 2 y 3 de *Acinetobacter baumannii* con una CMI = 1.56 mg/ml seguido de las cepas 2 y 3 de *Pseudomonas aeruginosa* con una CMI = 12.25 mg/ml. El extracto acuoso de *Allium sativum* L. tuvo una CMI = 25 mg/ml en la cepa 3 de *Pseudomonas aeruginosa*. (Tabla 8, figura 8 y 9)

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *A. sativum* L. “ajo”

Especie	Cepa	CMI	Tubos totales	Tubos sin crecimiento
<i>A. baumannii</i>	1	1.5625 mg/ml	12	6
<i>A. baumannii</i>	2	1.5625 mg/ml	12	6
<i>A. baumannii</i>	3	1.5625 mg/ml	12	6
<i>P. aeruginosa</i>	1	25 mg/ml	12	2
<i>P. aeruginosa</i>	2	12.25 mg/ml	12	3
<i>P. aeruginosa</i>	3	12.25 mg/ml	12	3



Figura 8. Concentración mínima inhibitoria de *Acinetobacter baumannii* por efecto del extracto acuoso de *Allium sativum* L. a. Ceba 1 b. Ceba 2 c. Ceba 3

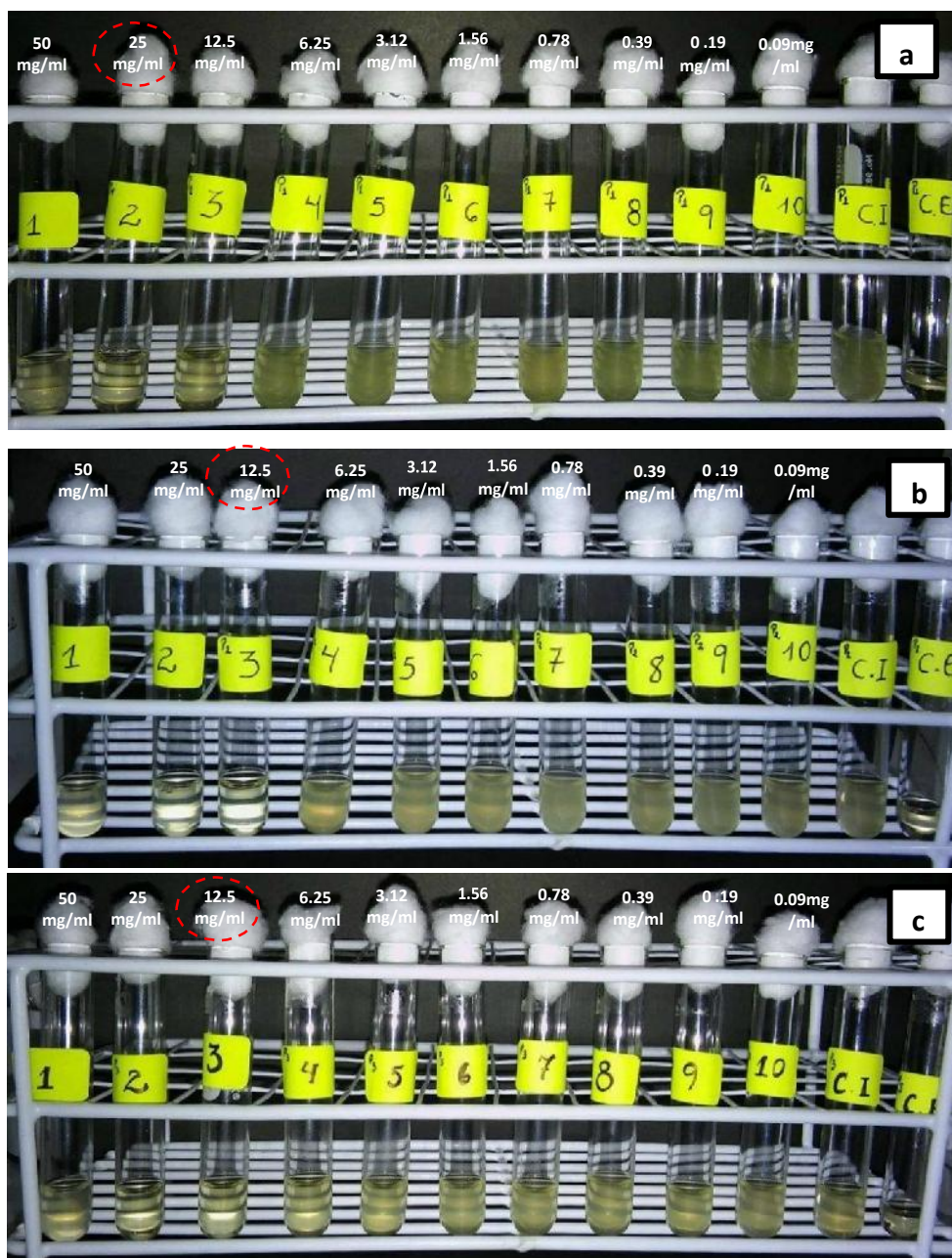


Figura 9. Concentración mínima inhibitoria de *Pseudomonas aeruginosa* por efecto del extracto acuoso de *Allium sativum* L. a. Cepa 1 b. Cepa 2 c. Cepa 3

4.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” sobre cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes

La concentración en la que existe un crecimiento bacteriano menor es a 1.56 mg/ml igual a 0 UFC/mL en la cepa 3 de *Acinetobacter baumannii* coincidiendo con su concentración mínima inhibitoria. En las cepas 1 y 2 de *Acinetobacter baumannii* la concentración en la que existe un crecimiento bacteriano menor es a 6.25 mg/ml igual a 0 UFC/mL, las sucesivas diluciones muestran un crecimiento microbiano significativo. La concentración en la que existe un crecimiento bacteriano menor en las cepas 1 y 2 de *Pseudomonas aeruginosa* es a 25 mg /ml igual a 0 = UFC/mL y a 50 mg /ml igual a 0 = UFC/mL en la cepa 3, teniendo un crecimiento microbiano significativo las diluciones sucesivas excepto en esta última en que su dilución sucesiva hubo un crecimiento de 100 UFC/mL. (Tabla 9, figura 10 y 11)

Tabla 9. Concentración mínima bactericida (CMB) de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *A. sativum* L. “ajo”

Especie	Cepa	CMB
<i>A. baumannii</i>	1	6.25 mg/ml
<i>A. baumannii</i>	2	6.25 mg/ml
<i>A. baumannii</i>	3	1.5625 mg/ml
<i>P. aeruginosa</i>	1	25 mg/ml
<i>P. aeruginosa</i>	2	25 mg/ml
<i>P. aeruginosa</i>	3	50 mg/ml

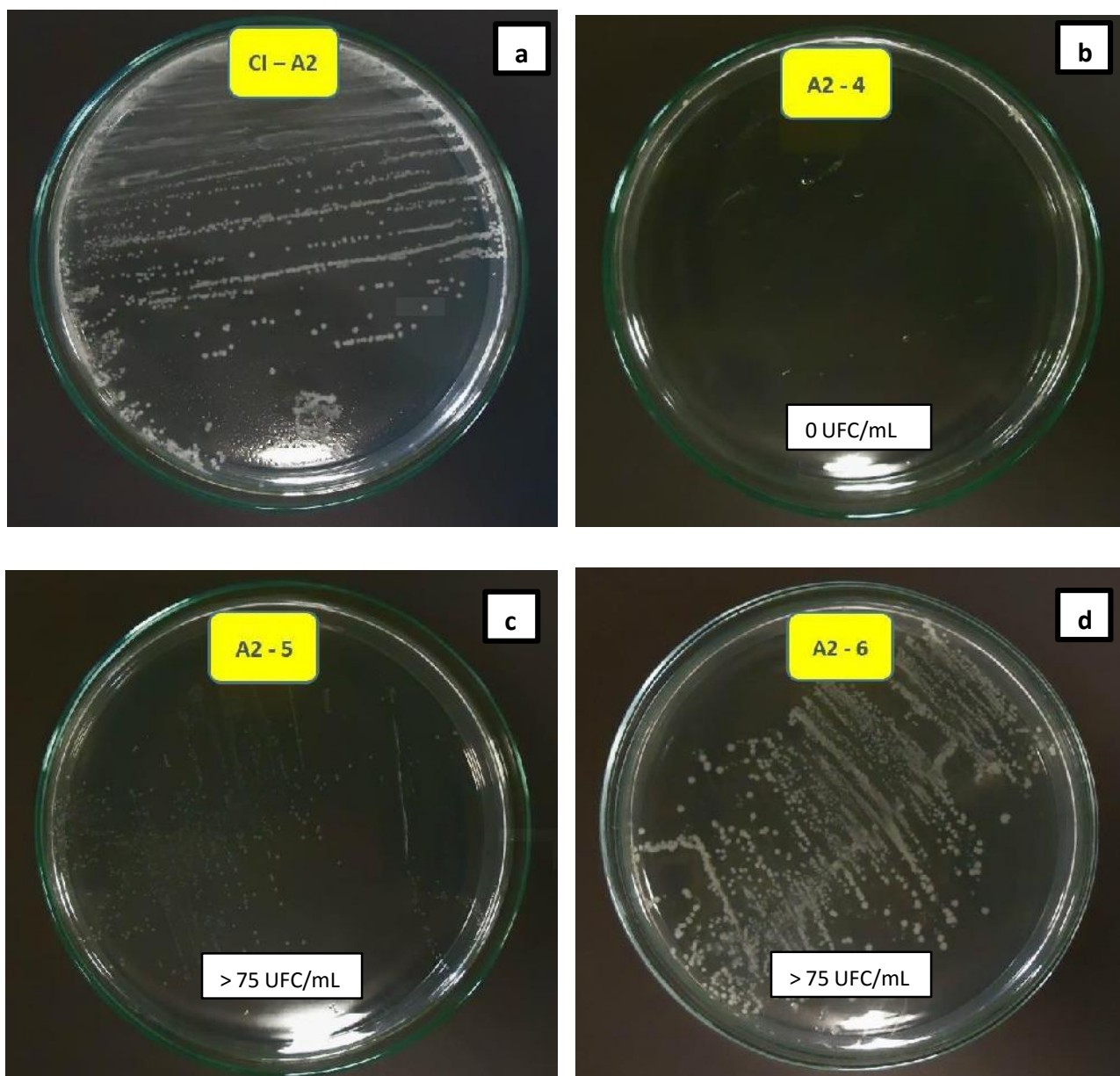


Figura 10. Concentración mínima bactericida de *Acinetobacter baumannii* cepa 2 por efecto del extracto acuoso de *Allium sativum* L. a. Control del inóculo b. cc de 6.25 mg /ml c. cc de 3.12 mg /ml d. cc de 1.56 mg /ml

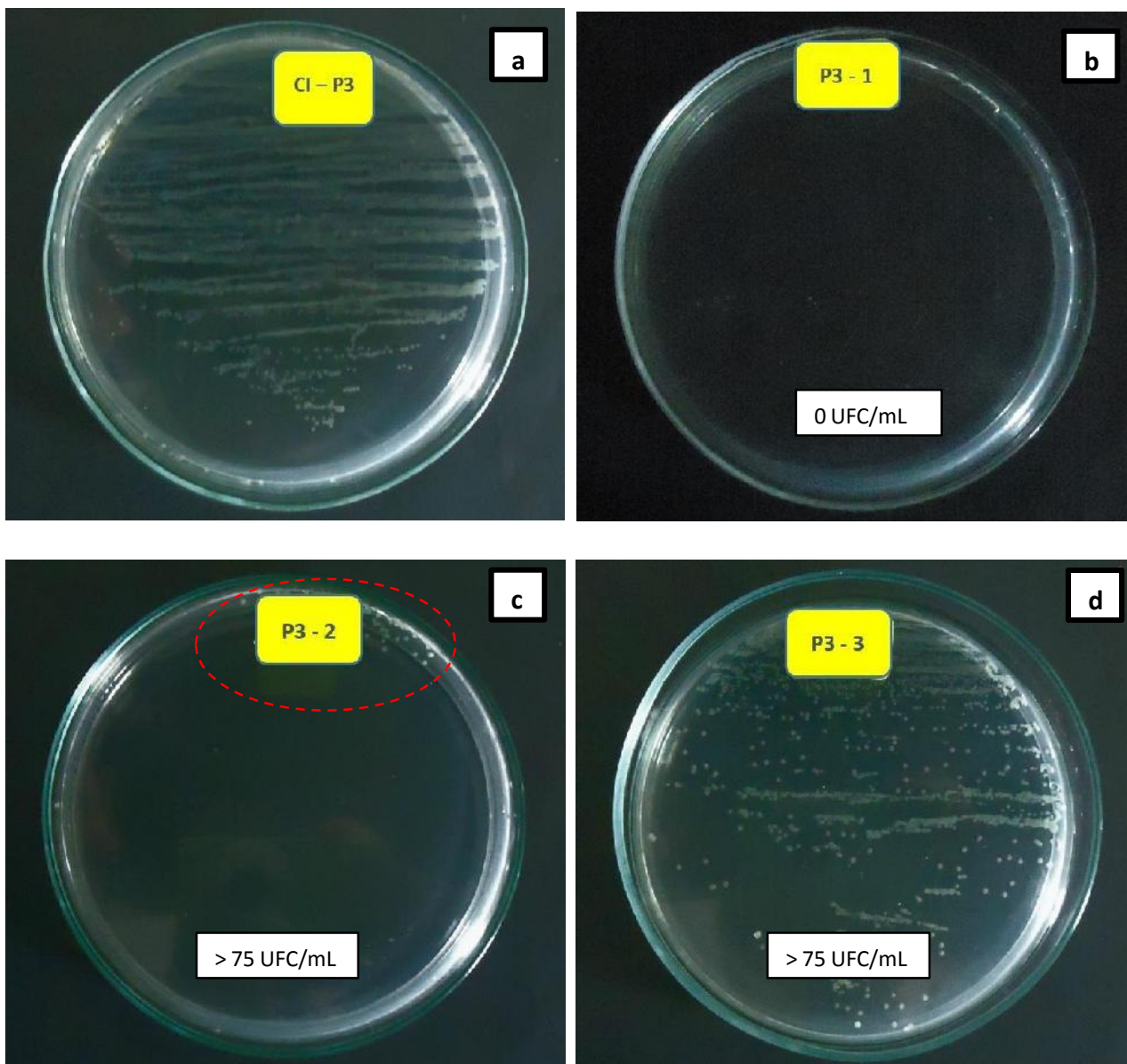


Figura 11. Concentración mínima bactericida de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 2 por efecto del extracto acuoso de *Allium sativum* L. a. Control del inoculo b. cc de 50 mg /ml c. cc de 25 mg /ml d. cc de 12.5 mg /ml

V. DISCUSIÓN

La presente investigación constituye un estudio del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” sobre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque. Se demostró que el extracto tuvo efecto inhibitorio, esto debido al principio activo alicina, la cual es altamente reactiva con las uniones S-H, presenta gran difusión y penetración a través de membranas celulares lo cual incrementa su interacción intracelular con grupos tiol de numerosas enzimas como: papaína, calpasa, alcohol deshidrogenasa, acetil-CoA, tioredoxina reductasa, ARN polimerasa; y moléculas como el glutatión vía una reacción intercambio de tioles en los enlaces disulfuro, por lo tanto bloquea paquetes enzimáticos e inhibe la síntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de bacterias inhibiendo cualquier actividad (Gotya., 2008).

El efecto mostrado concuerda con los estudios de García y Herrera (2004), Álvarez (2008), Vidarte y Villareal (2008), Mamani y mercado (2009), Lora *et al* (2010), Karuppiyah y Rajaran (2012), Munayko y Moromi (2013); trabajos en los que queda demostrado el potencial antimicrobiano de *A. sativum* L. frente a diversos microorganismos inhibiendo enzimas esenciales para la nutrición y metabolismo de los microorganismos.

Los resultados obtenidos mostraron actividad inhibitoria sobre las bacterias probadas, sin embargo el efecto fue mayor en *Acinetobacter baumannii*, corroborándose con la prueba de Tukey, donde se demuestra que el efecto inhibitorio es independiente de cada especie, esto se explica en los principales mecanismos de resistencia de cada bacteria, en *Pseudomonas aeruginosa* dada por bombas de expulsión que eliminan compuestos tóxicos y la producción del polisacárido extracelular alginato que influye en la susceptibilidad al disminuir la permeabilidad celular

y restringir la difusión de antibióticos por lo tanto impide el ingreso del extracto (Driscoll *et al.*, 2007); mientras que en *A. baumannii* la resistencia se da principalmente por enzimas modificantes y modificaciones en el sitio diana específicos en la acción de los antimicrobianos que no afectaría los mecanismos de acción de antimicrobianos desconocidos para la bacteria (Vanegas *et al.*, 2014).

Las diferencias en la actividad inhibitoria sobre cepas de la misma especie no son significativas en *Pseudomonas aeruginosa*, esto se explica porque a pesar de ser aislamientos distintos comparten mismo biotipo y morfotipo. En cepas de *Acinetobacter baumannii* si hay diferencias significativas de inhibición, esto se explica que aun siendo la misma especie existe cierta variabilidad genética que expresada fenotípicamente influye en la susceptibilidad a la alicina.

También se encontró diferencia significativa con la prueba de Tukey entre concentraciones y promedio de halo. El tamaño de los halos de inhibición aumentaban a medida que se incrementaban las concentraciones coincidiendo con los resultados de Vidarte y Villareal (2008), Álvarez (2008); esto se explica en la relación directamente proporcional entre cantidad de producto y cantidad de principio activo, a mayor cantidad de extracto acuoso de ajo, mayor cantidad de alicina.

Con relación a la CMI se obtuvieron concentraciones más bajas para *A. baumannii* con relación a *P. aeruginosa*, que se explica en las diferencias antes mencionadas. Con respecto a *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo una CMI menor que en el trabajo de Karuppiah y Rajaran (2012) quienes trabajaron con extracto etanólico de ajo, estas diferencias se interpretan a que el extracto acuoso presenta mayor proporción y vida promedio del principal principio activo “alicina” con respecto al extracto etanólico (Navarro., 2007). Con respecto a *Acinetobacter baumannii* no se encontró

estudios anteriores del efecto de *Allium sativum* L. sobre esta bacteria que permitan contrastar los resultados obtenidos.

El presente estudio determinó la concentración mínima bactericida, cantidad necesaria de extracto acuoso de *Allium sativum* L. para eliminar el 99.9 % del inóculo original. Esto se explica en que la alicina no solo detiene el crecimiento bacteriano sino que logra eliminar bacterias al inhibir la síntesis de sus moléculas vitales.

De acuerdo a la literatura consultada este es el primer trabajo en el departamento de Lambayeque realizado con extracto acuoso de *Allium sativum* L. "ajo" en el cual se hayan ensayado cepas de bacterias gramnegativas no fermentadoras multirresistentes obteniendo además buenos resultados en *P. aeruginosa* pero sobre todo en las cepas de *A. baumannii*, por lo que el empleo de extracto acuoso de *A. sativum* L. puede ser una gran alternativa para su control y erradicación.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” presentó efecto inhibitorio *in vitro* significativo sobre *Acinetobacter baumannii* multirresistente con un promedio de halo de inhibición de 22.02 mm y leve en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente con un promedio de halo de inhibición de 7.28 mm.
- Se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” sobre cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* es de 1.56 mg/ml, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* de 12.25 mg/ml (cepas 2 ,3) y 25 mg/ml (cepa 1).
- Se determinó que el extracto acuoso de *Allium sativum* L. tuvo menor concentración mínima bactericida (CMB) sobre *Acinetobacter baumannii* multirresistente cepa 3 igual a 1.56 mg/ml y mayor en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente cepa 3 igual a 50 mg/ml.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vitro* de la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” con otras especies bacterianas multirresistentes de importancia clínica.
- Efectuar estudios comparativos *in vitro* de la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” con los antibióticos y desinfectantes de rutina.
- Comprobar *in vitro* la actividad del principio activo “alicina” purificado sobre bacterias multirresistentes de importancia clínica.
- Realizar estudios *in vivo* para determinar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” sobre *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

VIII. RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivos determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 mg/ml frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque, concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida. Utilizando como métodos: la difusión de Kirby Bauer modificada, técnica de macrodilución en tubo y concentración mínima bactericida según Abadie *et al.* El extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” presentó efecto inhibitorio *in vitro* significativo sobre *Acinetobacter baumannii* multirresistente con un promedio de halo de inhibición de 22.02 mm y leve en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente con un promedio de halo de inhibición de 7.28 mm.. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” sobre cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* es de 1.56 mg/ml, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* de 12.25 mg/ml (cepas 2 ,3) y 25 mg/ml (cepa 1). Se determinó que el extracto acuoso de *Allium sativum* L. tuvo menor concentración mínima bactericida (CMB) sobre *Acinetobacter baumannii* multirresistente cepa 3 igual a 1.56 mg/ml y mayor en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente cepa 3 igual a 50 mg/ml.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abadie, R; R, Medina; L, Ruiz y A, Tresierra. 2014. Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias, Iquitos-Perú. Revista ECIPerú. 11(1): 31 - 38.
- Álvarez, F. 2010. Efecto inhibitorio *in vitro* de *Allium sativum* L. “ajo” en solución hidroalcohólica sobre *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina y *Escherichia coli* y evaluación de su toxicidad sobre *Artemia salina* “camarón de salmuera”. Tesis Lic. Biología – Microbiología y Parasitología. FFCCBB - UNPRG.
- Alvitres, V. 2000. Método científico. Planificación de la investigación. 2da Edición. Editorial Ciencia. Chiclayo-Perú. 158 pp.
- Carmen, M. y L. Martínez. 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enferm Infecc Microbiol Clin. 31(6):402–409. https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/eimc/seimc_eimc_v31n06p402a409.pdf
- Chalar, L; J. Moya; E. Vargas; M. Sejas y B. Romero. 2014. Función Antimicrobiana de la Alicina de Ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Rev. Cient Cienc Méd. 17 (1).
- Coaguila, L.; J. Rodríguez; R. Ponce y N. Román. 2014. INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA POR BACTERIAS GRAMNEGATIVAS NO FERMENTADORAS EN LOS PACIENTES HOSPITALIZADOS EN LOS SERVICIOS DE UCI-UCIN DEL HOSPITAL REGIONAL LAMBAYEQUE 2014. REV EXP MED. 1(2).
- Cobeñas, C. y R. Ramos. 1998. Efecto Antibacteriano “*in vitro*” de una solución hidroalcohólica de “ajo” *Allium sativum* en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp. Tesis para optar el Título de Licenciado en Microbiología-Parasitología UNPRG. Lambayeque.
- Córdova, M. 2010. “Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas”. Tesis MSc. En ciencias en conservación y aprovechamiento de recursos naturales. Instituto politécnico Nacional.

- Driscoll, J; S, Brody and M, Kollef. 2007. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs*. 67(3): 351 – 368.
- French, G. 2005. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1514 –1527.
- García, R y A. Herrera. 2007. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Grupo de investigación en Ciencias Aplicadas, (GICA-UP). Universidad de Pamplona.
- Giske, C.; D, Monnet; O. Cars y Y. Carmeli. 2008. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 52 (3):813-821. https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=es&prev=search&rurl=translate.google.com.pe&sl=en&u=http://dx.doi.org/10.1128%2F52FAAC.01169-07&usq=ALkJrhimyUX45hFnuW0XKAtekGTVak-l5Q
- Gotya, A. 2008. Estudio *in vitro* de la resistencia e inhibición de 9 especies de microorganismos con *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf (Limonaria) Y *Allium sativum* L. (Ajo), 2008. Tesis Lic. Biología. Centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Jalisco-México.
- Hernández, A.; E. García; G. Yagüe y J. Gómez. 2010. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter*. 23(1):12-19. <http://seq.es/seq/0214-3429/23/1/hernandez.pdf>
- Holland, T.; C, Woods y M. Joyce. 2009. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. *Infect Dis Clin North*. 23(4):757-790.
- Karuppiyah, P. y S. Rajaran. 2012. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(8): 597–601. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60104-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60104-X)
- Kinsbruy D.; G. Warner y G. Seagel. 1991. Manual de Microbiología médica: Edit. Orientación S.A. España. 222pp.
- Lora, C; Luján, M; Robles, H; Saravia, V Y Cabeza, J. 2010. Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de *Allium sativum* “ajo” frente a dermatofitos y *Candida albicans*. *UCV - Scientia* 2(2).

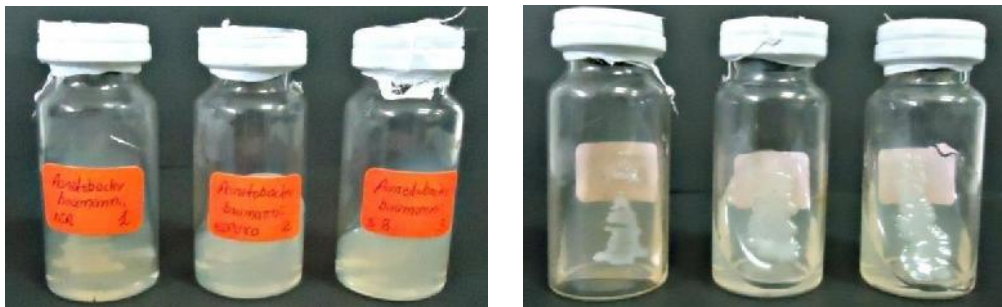
- Luján, D. 2014. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. Acta bioquím. Clin. latinoam. 48 (4). http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572014000400009
- Luján, D.; J. Ibarra, T y E. Mamani. 2008. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. Rev Biomed 19:156-160
- Mamani, E y S. Mercado. 2009. Efecto *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) liofilizado, sobre *Candida albicans*. Revista Estomatológica Del Altiplano – Juliaca
- Moreno, K. 2013. Terapéutica médica. Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. Revista médica de costa rica y Centroamérica. 70(608): 599 – 605.
- Munayco, E. 2011. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal. Tesis cirujano dentista. Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M.
- Munayco, E y H. Moromi. 2013. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal. Odontol. Sanmarquina. 16(2):21-24
- Navarro, C. 2007. Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). Revista de fitoterapia. 7(2):131 -151
- Sacsquispe, R y J. Velásquez, 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud – Lima.
- Vidarte L. y Z. Villarreal, 2009. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo” fresco y “ajo” industrializado “Toña” sobre cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Tesis Lic. Biología - Microbiología y Parasitología. FFCCBB – UNPRG.
- Villegas, E. and G. Corzo 2005. Pore-forming peptides from spiders. Toxin Reviews. 24: 345-357.

X.- ANEXOS

Anexo 1: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aisladas de esputo en pacientes con neumonía



Anexo 2: Cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas de esputo en pacientes con neumonía



Anexo 3: Antibiograma de *Acinetobacter baumannii* cepa 1



Antimicrobiano	Susceptibilidad		
	S	I	R
Colistin	X		
Meropenem			X
Imipenem			X
Tetraciclina			X
ciprofloxacina			X
Cefepime			X
Ceftazidima			X
Tygeciclina			X
Gentamicina			X
Amikacina			X
Trimetoprim / sulfametoxasol			X

Anexo 4: Antibiograma de *Acinetobacter baumannii* cepa 2



Antimicrobiano	Susceptibilidad		
	S	I	R
Colistin	X		
Meropenem			X
Imipenem			X
Tetraciclina			X
ciprofloxacina			X
Cefepime			X
Ceftazidima			X
Tygeciclina			X
Gentamicina			X
Amikacina			X
Trimetoprim / sulfametoxasol			X

Anexo 5: Antibiograma de *Acinetobacter baumannii* cepa 3



Antimicrobiano	Susceptibilidad		
	S	I	R
Colistin	X		
Meropenem			X
Imipenem			X
Tetraciclina			X
ciprofloxacina			X
Cefepime			X
Ceftazidima			X
Tygeciclina			X
Gentamicina			X
Amikacina			X
Trimetoprim / sulfametoxazol			X

Anexo 6: Antibiograma de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 1



Antimicrobiano	Susceptibilidad		
	S	I	R
Colistin	X		
Meropenem			X
Imipenem			X
ciprofloxacina			X
Cefepime			X
Ceftazidima			X
Aztreonam	X		
Gentamicina			X
Amikacina	X		

Anexo 7: Antibiograma de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 2



Antimicrobiano	Susceptibilidad		
	S	I	R
Colistin	X		
Meropenem			X
Imipenem			X
ciprofloxacina	X		
Cefepime	X		
Ceftazidima	X		
Aztreonam	X		
Gentamicina			X
Amikacina			X

Anexo 8: Antibiograma de *Pseudomonas aeruginosa* cepa 3



Antimicrobiano	Susceptibilidad		
	S	I	R
Colistin	X		
Meropenem	X		
Imipenem	X		
ciprofloxacina	X		
Cefepime	X		
Ceftazidima	X		
Aztreonam			X
Gentamicina			X
Amikacina			X

Anexo 9: Taxonomía y descripción de la planta *Allium sativum* L. “ajo”

Familia	<i>Liliaceae</i>, subfam. <i>Allioideae</i>
Nombre científico	<i>Allium sativum</i> L.
Planta	Bulbosa, vivaz y rustica
Sistema radicular	Raíz bulbosa, compuesta de 20 o más bulbos, reunidos en su base por medio de una película delgada. De la parte superior del bulbo nacen las partes fibrosas, que se introducen en la tierra para alimentar y anclar la planta.
tallos	Fuertes, de crecimiento determinado, alcanzando hasta 50 cm de altura.
Hoja	Lineares, dispuestos en forma de roseta alcanzando hasta 60 cm de largo.
Flores	Blancas o rosadas, conformando una umbela en el extremo del tallo que se cierra antes de la floración.

Anexo 10: Componentes mayoritarios del bulbo de ajo según tipo de procesado

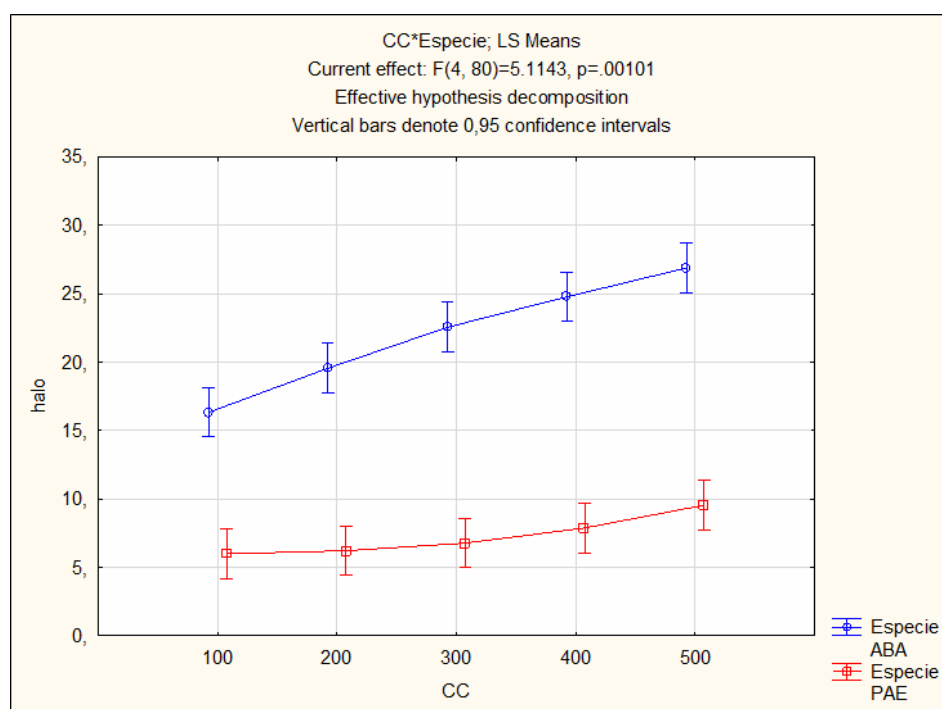
Procesado	Componente
Molturación	Alicina
Decocción	Ajoeno, sulfuro de alilo
Destilado (aceite)	DADS y DATS
Extracción acuosa	Alicina
Extracción alcohólica	Ajoeno
Extracción hidroalcoholica del ajo envejecido (AJE)	SAC y SAM
DADS: Disulfuro de dialilo; DATS: trisulfuro de dialilo; SAC: S-alil-cisteina; SAMC: S-alil-mercapto-cisteina	

Anexo 11. Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición para *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* para la interacción especie-concentración del extracto acuoso de *Allium sativum* L. "ajo"

Especie	Concentración (mg/ml)	Promedio del halo (mg/ml)	Significancia
<i>P. aeruginosa</i>	100	6.000	A
<i>P. aeruginosa</i>	200	6.222	A
<i>P. aeruginosa</i>	300	6.777	A
<i>P. aeruginosa</i>	400	7.888	A
<i>P. aeruginosa</i>	500	9.555	A
<i>A. baumannii</i>	100	16.333	B
<i>A. baumannii</i>	200	19.555	B C
<i>A. baumannii</i>	300	22.555	C D
<i>A. baumannii</i>	400	24.777	D E
<i>A. baumannii</i>	500	26.888	E

Letras diferentes = diferencia significativa

Letras iguales = no hay diferencias significativas



Anexo 12: Prueba de significancia de Tukey (0.05) para los promedios de halo de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes en relación a la interacción cepa – concentración (CxK) del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”

C x K (mg/ml)	Tamaño de halo (mm)	Significancia
<i>P. aeruginosa</i> 1 - 100	6	A
<i>P. aeruginosa</i> 2 - 100	6	A
<i>P. aeruginosa</i> 3 - 100	6	A
<i>P. aeruginosa</i> 2 - 200	6	A
<i>P. aeruginosa</i> 2 - 300	6	A
<i>P. aeruginosa</i> 3 - 200	6	A
<i>P. aeruginosa</i> 1 - 200	6.666	A
<i>P. aeruginosa</i> 3 - 300	6.666	A
<i>P. aeruginosa</i> 2 - 400	7	A
<i>P. aeruginosa</i> 3 - 400	7.666	A
<i>P. aeruginosa</i> 1 - 300	7.666	A
<i>P. aeruginosa</i> 2 - 500	8.666	A B
<i>P. aeruginosa</i> 1 - 400	9	A B
<i>P. aeruginosa</i> 3 - 500	9.666	A B
<i>P. aeruginosa</i> 1 - 500	10.333	A B C
<i>A. Baumannii</i> 2 - 100	13.333	B C D
<i>A. Baumannii</i> 2 - 200	15	C D E
<i>A. Baumannii</i> 3 - 100	17	D E F
<i>A. Baumannii</i> 1 - 100	18.666	E F G
<i>A. Baumannii</i> 3 - 200	19.333	E F G H
<i>A. Baumannii</i> 2 - 300	20.333	F G H I
<i>A. Baumannii</i> 3 - 300	20.666	F G H I
<i>A. Baumannii</i> 2 - 400	22	G H I J
<i>A. Baumannii</i> 3 - 400	23.333	G H I J
<i>A. Baumannii</i> 2 - 500	24	H I J
<i>A. Baumannii</i> 1 - 200	24.333	I J K
<i>A. Baumannii</i> 3 - 500	25	I J K
<i>A. Baumannii</i> 1 - 300	26.666	J K
<i>A. Baumannii</i> 1 - 400	29	K L
<i>A. Baumannii</i> 1 - 500	31.666	L

Letras diferentes = diferencia significativa

Letras iguales = no hay diferencias significativas

Anexo 13: Promedios de los halos de inhibición (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes en relación a la interacción cepa – concentración (CxK) en el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Allium sativum* L. “ajo”

