



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*.

García Rico R O¹, Herrera Arias F C¹

¹ Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Grupo de investigación en Ciencias Aplicadas, (GICA-UP). Universidad de Pamplona.
Email: rovigar@unipamplona.edu.co

ABSTRACT

In this study, the inhibitory effect of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Allium fistulosum* and *Allium cepa* was evaluated on five pathogenic bacterial strains, important in the food industry, such as: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* The aqueous extract of *A. cepa* showed greater antimicrobial activity as compared to similar extracts of *A. sativum* and *A. fistulosum*. *A. cepa* showed a good antibacterial effect against the tested five pathogenic bacterial strains and it was the extract with the best inhibitory power on *E. coli*, *Salmonella spp.*, y *B. cereus*. The extract of *A. fistulosum*, showed a low antibacterial inhibitory effect, except when it was confronted against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. In these cases it showed to be the extract with greater inhibitory effect. The extracts of *A. cepa* and *A. fistulosum* showed a greater antibacterial effect than the aqueous extract of *A. sativum*. In this study, there is a tendency of major sensitivity of the Gram positive strains, in comparison with the Gram negative strains but this was inconclusive.

KEY WORDS

Antibacterial Effect, Inhibition of growth, Vegetal extracts, Pathogenic Bacterial Strains.

RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cinco cepas bacterianas patógenas de relevancia en la industria alimentaria, como son: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* El extracto de *A. cepa* mostró una mayor actividad antimicrobiana, en comparación con extractos similares de *A. sativum* y *A. fistulosum*. *A. cepa*



demonstró poseer un buen efecto antibacteriano sobre las cinco cepas ensayadas y fue el extracto con mejor poder inhibitorio sobre *E. coli*, *Salmonella spp.* y *B. cereus*. El extracto de *A. fistulosum* mostró un bajo efecto antibacteriano, excepto cuando se enfrentó contra *S. aureus*, y *P. aeruginosa*, frente a los cuales demostró ser el extracto con mayor efecto inhibitorio. Los extractos de *A. cepa* y *A. fistulosum* mostraron un mayor poder antibacteriano que el extracto de *A. sativum*, en contra de lo que ha sido reportado para *A. sativum* hasta el momento. En ninguno de los extractos acuosos ensayados se observó una tendencia de mayor susceptibilidad de las bacterias Gram positivas con respecto a las Gram negativas.

PALABRAS CLAVES

efecto antibacteriano, extractos vegetales, bacterias patógenas, inhibición del crecimiento.

INTRODUCCIÓN

La seguridad microbiológica de los alimentos es un aspecto de vital importancia en la industria agroalimentaria, no sólo por sus efectos directos sobre el tiempo de vida útil de un alimento sino por sus implicaciones en la salud pública (GEORGALA, 1992). Uno de los principales riesgos es la transmisión al hombre de microorganismos patógenos, a través del consumo de los alimentos. Entre las bacterias más frecuentemente implicadas se encuentran *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, siendo, por esto, reconocidos como microorganismos de vital importancia para la salud pública (HOLANDA *et al*, 2005). Este grupo de bacterias, debido a su ubicuidad e incidencia, se ha constituido en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimenticias (SINELL, 1995). En este sentido, los mecanismos de conservación habitualmente empleados en la mayoría de los alimentos se basan en diferentes tecnologías que abarcan desde la aplicación de procesos físicos hasta la adición de sustancias químicas, generalmente artificiales. Sin embargo, el uso indiscriminado de ellos y su consumo crónico tienen diversas consecuencias sobre la salud humana (WILSON & BAHNA, 2005).

Los extractos vegetales han sido utilizados desde hace mucho tiempo para diversas aplicaciones. Los habitantes indígenas de varias regiones utilizaron una amplia variedad de vegetales como agentes medicinales para tratar diferentes padecimientos y en el curado de varios de sus alimentos (CICHEWICZ & THORPE, 1996). Este conocimiento tradicional, sumado a la gran cantidad de sustancias que las plantas elaboran como subproductos metabólicos (DOMINGO & LÓPEZ-BREA, 2003), ha llevado a centrar la atención de una parte importante de la investigación, en conservación de los alimentos, en el estudio de extractos vegetales con poder antimicrobiano y su potencial aplicación como conservantes de alimentos (SUPPAKUL *et al*, 2003; WALLACE, 2004). Desde esta óptica, surgió como un interesante campo de estudio, el análisis de las propiedades antimicrobianas de extractos de diferente índole obtenidos a partir de las especias, ya que hacen parte de la formulación de muchos productos alimenticios proporcionándoles muchas de sus características organolépticas (ARORA & KAUR, 1999). Al respecto, en la literatura disponible, se puede encontrar que muchas de las especias estudiadas poseen propiedades antimicrobianas (DEANS *et al*, 1987; HEFNAWY, 1993); sin embargo, el



estudio exhaustivo de sus componentes activos y/o los mecanismos de acción de cada uno de ellos, es algo que se encuentra aún en sus fases iniciales para la gran mayoría de las especias (COWAN, 1999).

En la actualidad se conoce sólo de manera parcial, la composición química de las sustancias antimicrobianas de las especias. Se sabe que dentro de sus componentes se encuentran alcaloides como en la pimienta; taninos, aldehídos y ácidos orgánicos como en el clavo y la canela (SI *et al*, 2006). Se ha descubierto que las sustancias antimicrobianas de la mayoría de las especias son los propios aceites esenciales, mezclas de diferentes productos volátiles, entre los que se incluyen alcoholes, cetonas- éteres fenólicos, fenoles, ácidos y sus ésteres (PRABUSEENIVASAN *et al*, 2006; FABIO *et al*, 2007). Muchos de los hidrocarburos, alcoholes y cetonas son terpenoides. Los bulbos y granos de mostaza, poseen derivados sulfurados. Tal vez, el más estudiado es el ajo (*Allium sativum*), del cual se sabe contiene compuestos tales como la alicina y la alistatina de comprobada acción antibacteriana (HUNTER *et al*, 2005; LEDESMA & APITZ-CASTRO, 2006).

Los estudios realizados hasta el momento demuestran que las especies vegetales del género *Allium*, especialmente el ajo, poseen un espectro relativamente amplio, de acción frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (REUTER *et al*, 1996). Se ha demostrado que el ajo no solamente posee efectos antibacterianos, sino que también se ha observado actividad antiviral, antifungal y antiprotozoal (HARRIS *et al*, 2001). Se puede encontrar una extensa bibliografía sobre los efectos antibacterianos de jugo fresco, extractos acuosos y etanólicos, liofilizados, destilados, y algunas preparaciones comerciales del ajo. En estudios realizados en diferentes laboratorios del mundo, se ha visto que el ajo ejerce una acción inhibitoria sobre el crecimiento de géneros bacterianos tan diversos como: *Aerobacter*, *Aeromonas*,

Bacillus, *Citrella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Vibrio* (SIVAM, 2001). Recientemente se ha ensayado el efecto antimicrobiano del ajo sobre cepas de relevancia clínica como *Helicobacter pylori* (CANIZARES *et al*, 2004), *Escherichia coli* O157:H7 (GUPTA & RAVISHANKAR, 2005), *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (RUDDOCK *et al*, 2005) y *Vibrio parahaemolyticus* (YANO *et al*, 2006). Los componentes del ajo implicados en esta actividad antimicrobiana son de diferente naturaleza química y han sido descritos en años recientes, de ellos el más conocido es la alicina (HUNTER *et al*, 2005). Fenwick y Hanley (1985), fueron los primeros en reunir en un documento información sobre las propiedades antibacterianas del género vegetal *Allium*. Sin embargo, a diferencia de *Allium sativum*, las referencias existentes sobre los efectos antibacterianos de variedades de cebolla son muy escasas. Este hecho contrasta con la información existente sobre sus potenciales usos medicinales (STAJNER *et al*, 2006). Esta situación se presenta debido a que en los pocos y antiguos reportes se describe un efecto inhibitorio bajo para *Allium cepa* en comparación con el presentado por *Allium sativum* (DANKERT *et al*, 1979; ELNIMA *et al*, 1983). Recientemente, se ha reportado actividad antifúngica para un péptido aislado de *Allium cepa*, y para los aceites volátiles de *Allium fistulosum* (WANG & NG, 2004; PYUN & SHIN, 2006); sin embargo en lo referente a la determinación de su actividad antibacteriana, la cantidad de estudios y reportes científicos es muy escasa. Por otra parte, experimentalmente hablando, la densidad del inóculo en un ensayo de actividad antimicrobiana es de suma importancia, ya que este puede afectar significativamente los datos obtenidos dependiendo del principio activo en estudio. Por ejemplo, contra *E. coli* la tetraciclina mostró un efecto constante a diferentes



concentraciones de inóculo, mientras que otras sustancias como gentamicina o colistina exhiben un efecto antibacteriano menor a concentraciones elevadas de la bacteria (TILTON *et al*, 1973). Resultados similares se han observado en diferentes estudios hechos en los últimos 30 años. De igual manera, en estudios similares hechos desde hace décadas existe un consenso sobre las variaciones permitidas en la población bacteriana inicial en los bioensayos a realizar en el laboratorio (ERICSSON & SHERRIS, 1971). Debido a estos antecedentes se determinó el uso de concentraciones de 10^4 y 10^6 UFC por placa en este estudio.

Con éste marco de referencia, en el presente trabajo, nos hemos propuesto determinar el efecto inhibitor de los extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium cepa* y *Allium fistulosum*, sobre el crecimiento de cinco de las bacterias patógenas más importantes y frecuentemente aisladas a partir de alimentos, en las que se incluyen Gram positivas y Gram negativas. En este sentido se pretende verificar la actividad antibacteriana del ajo e investigar el efecto antimicrobiano y el espectro de acción de *Allium cepa* y *Allium fistulosum*.

METODOLOGÍA

Bacterias

El trabajo se llevó a cabo con las siguientes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella* spp. Estas cepas fueron adquiridas en la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia (HERRERA & GARCIA-RICO, 2006). Para su mantenimiento se cultivaron en agar nutritivo, realizando repiques periódicos en el mismo medio de cultivo incubándolas a 37°C y manteniéndolas, después de 24 horas de incubación, a una temperatura de 4°C . Para su conservación se realizaron suspensiones celulares en una solución de glicerol al 30%, las cuales se almacenaron en crioviales a -20°C .

Preparación de extractos

En el presente estudio, los ensayos fueron realizados con los respectivos extractos acuosos de las siguientes especies vegetales: *Allium sativum*, *Allium fistulosum*, y *Allium cepa*. El procedimiento de extracción seguido a cada vegetal, se resume a continuación. En primer lugar, se llevó a cabo un pelado (en el caso de los bulbos) con un posterior lavado general con agua destilada, seguido de una desinfección utilizando hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm durante 5 minutos. Seguidamente se realizó un enjuague de la planta en suficiente agua destilada estéril, esto para retirar el hipoclorito residual. Posteriormente se procedió a realizar un triturado de cada planta (50 g de cada una), utilizando para ello una licuadora, con recipientes de vidrio estériles, en presencia de una mínima cantidad de agua destilada estéril (5 ml). Luego de obtenido el triturado, éste fue filtrado en dos etapas: una a través de una gasa plegada varias veces, para retirar los residuos más groseros, y la siguiente, empleando papel filtro (Papel Whatman®) realizando la filtración tres veces. Finalmente, los extractos así filtrados, fueron esterilizados por medio de una filtración por membrana (Filtros Millipore 0,45 micras). El extracto final estéril fue transferido a viales estériles de 2 ml, que se conservaron a 4°C , durante 72 horas hasta su empleo.

Patrones de McFarland

Se empleó como guía el patrón de McFarland de Sulfato de Bario N°5, que presentó una absorbancia a luz visible (600nm) de 0,735. Con ayuda de este patrón, se preparó una solución de células bacterianas para cada cepa, con una turbidez equivalente al patrón. Para la preparación de la suspensión de cada cepa, se procedió tomando con asa colonias de un cultivo masivo en Agar Nutritivo de 24 horas de incubación a 37°C , repicado de la cepa original conservada en refrigeración en cultivo por agotamiento (modificado de SURJAWIDJAJA *et al*, 2004). Las asadas se disolvieron en tubos de vidrio estériles de 17 x 100 mm con 5 ml de agua destilada estéril, hasta conseguir una absorbancia equivalente



a la del patrón guía, procurando un estrecho margen de error de con respecto al patrón de McFarland N°5 (Tabla 1). Para determinar la equivalencia de la absorbancia a la concentración de microorganismos por unidad de volumen, fue determinada mediante recuento en placa, realizando sucesivas diluciones decimales consecutivas y sembrando posteriormente, por duplicado en profundidad, en Agar SPC (Standar Plate Count). El conteo y determinación de las UFC/ml equivalentes fueron realizados después de 24 horas de incubación a 37°C.

Determinación del efecto antibacteriano

Para la evaluación del efecto inhibitor de los extractos acuosos sobre el crecimiento de las cepas bacterias, en primer lugar, se realizaron diluciones decimales consecutivas a partir de las suspensiones bacterianas con absorbancia de 0,735 preparadas según las indicaciones anteriores. Se obtuvieron soluciones con una concentración de 10^5 y 10^7 UFC/ml, de las cuales fue inoculado 0,1 ml en la superficie del medio de cultivo, de modo que en cada caja de Petri la concentración bacteriana estimada sería de 10^4 y 10^6 UFC, respectivamente. Esta siembra se hizo por duplicado, en Agar Nutritivo y homogeneizando con un asa de hockey. El procedimiento seguido para continuar con la determinación y valoración de la actividad antimicrobiana, fue esencialmente el descrito por Herrera y García-Rico (2006).

Tratamiento estadístico de los datos

Cada experimento se realizó en tres ocasiones y los datos obtenidos en todos ellos fueron tratados estadísticamente y presentados en forma de gráficos utilizando el programa: MS Excel Office XP complementado con el programa estadístico gratuito Poptools version 2.6.7. obtenido en la dirección <http://www.cse.csiro.au/poptools/index.htm>. En todos los casos, las diferencias significativas entre los diferentes grupos de datos (contrastes paramétricos de grupos con varianza similar o diferente) fueron

determinadas según el test t de Student ($p < 0,005$).

RESULTADOS

Ensayos de equivalencia UFC/ml vs. Absorbancia del patrón McFarland.

En referencia al patrón 05 de McFarland, las absorbancias obtenidas para las diferentes cepas bacterianas oscilaron en torno a $0,735 \pm 0,006$ (datos no mostrados), revelando una adecuada homogeneidad en los inóculos. Al analizar los datos obtenidos para cada cepa (Tabla1), se observa que no se presentaron diferencias significativas entre las cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y las Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella* spp), a pesar de sus diferencias morfológicas (cocos y bacilos). En estas cepas, una absorbancia equivalente al patrón 05 de McFarland representa una concentración de $4-5 \times 10^9$ UFC/ml.

La excepción a este comportamiento se evidencia en los datos de la bacteria Gram positiva *Bacillus cereus* (Tabla 1), en los que a una absorbancia similar al patrón 05 de McFarland la concentración bacteriana (1×10^8 UFC/ml) es de alrededor de 40 veces menor que el resto de las cepas bacterianas ensayadas.

Actividad antibacteriana de los extractos

El extracto acuoso de *A. cepa* demostró ser el de más efectiva acción contra *E. coli*, generando importantes tamaños de halo de inhibición, con un promedio de radio de halo de 15 mm (Figura 1C). De igual forma *A. cepa* fue la especie vegetal ensayada con mayor acción inhibitoria contra *B. cereus*, y fue el único extracto que presentó actividad bactericida contra *Salmonella* spp, observando para éste último un promedio de radio de halo de inhibición en torno a los 13 mm. Estos prometedores resultados representan el primer paso para una potencial aplicación del extracto en diferentes escenarios en ensayos *in vivo*. Al ser ensayado contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se observó una importante inhibición del crecimiento, aunque su acción



antimicrobiana no tuvo las dimensiones presentadas contra *E. coli* y *Salmonella* spp (Figura 1C).

Al igual que el extracto de *A. sativum*, el extracto acuoso de *A. fistulosum* no presentó actividad inhibitoria contra *Salmonella* spp. A pesar de ello, *A. fistulosum* exhibió el mayor potencial antibacteriano contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*., consiguiendo unos promedios de radio de halos en torno a los 8 mm (Figura 1B). El referido extracto presentó efecto inhibitorio contra *E. coli* y *B. cereus*, pero con una actividad antibacteriana baja, especialmente contra *E. coli*, en cuyo caso los datos de radio de halo son muy pequeños. En ninguno de los extractos acuosos ensayados se observó una tendencia de comportamiento (sensibilidad o resistencia) de las bacterias Gram positivas o Gram negativas.

De forma sorprendente, en este estudio, el extracto acuoso con menor potencial antibacteriano fue el del ajo (*Allium sativum*). En los ensayos realizados, este extracto no mostró acción inhibitoria alguna contra *Salmonella* spp., y el efecto antibacteriano detectado contra *P. aeruginosa* es muy pobre (Figura 1A), resultados que contrastan con los observados para *A. cepa*. El mayor potencial inhibitorio se evidenció contra *S. aureus*, microorganismo Gram positivo que fue el más susceptible a la acción del ajo, generándose halos de inhibición de alrededor de 6 mm de radio. Al ensayar este extracto contra *E. coli* y *B. cereus*, se observó el efecto de una actividad antibacteriana, pero de una baja relevancia, dado que los tamaños de los halos de inhibición fueron bajos (Figura 1A).

DISCUSION

En el presente trabajo se ha observado que las concentraciones bacterianas empleadas (10^4 y 10^6 UFC/placa), presentaron resultados consistentes, sin las enormes variaciones en los resultados reportadas en estudios similares realizados con anterioridad (TILTON *et al*, 1973; STECCHINI *et al*, 1993; HERRERA & GARCIA-RICO, 2006). Sin embargo, en los datos obtenidos para el efecto del extracto

acuoso de *Allium fistulosum* sobre *S. aureus*, se evidencia una diferencia significativa en los ensayos con ambas concentraciones bacterianas iniciales. En este caso se observa un mayor efecto antibacteriano en la menor concentración, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que en muchas ocasiones el impacto del compuesto activo se ve atenuado por la cantidad del microorganismo objeto de tal efecto (ERICSSON & SHERRIS, 1971). Este tipo de diferencias son las que se pretenden solventar replanteando el tamaño del inóculo bacteriano.

Como se puede apreciar en la tabla 1, los resultados mostraron una homogeneidad en las equivalencias de UFC/ml y los valores de absorbancia en 4 de las 5 cepas ensayadas, sin que sus diferencias morfológicas incidieran sobre dichos resultados. En contraste, se observó que *B. cereus* presenta una concentración muy inferior a la mostrada por las restantes cepas bacterianas. Una suspensión celular aparece turbia porque las células dispersan la luz que atraviesa dicha suspensión y se supone que cuantas más células hay más luz se dispersa y mas turbia aparece la suspensión. Sin embargo, *B. cereus* es un microorganismo que genera endosporas, las cuales presentan como una de sus características físicas la de poseer un comportamiento frente a la luz diferente al resto del citosol bacteriano (NICHOLSON, 2002). Esto traería como consecuencia que los valores de absorbancia presentados fueran diferentes a los que se obtendrían si en todo el citoplasma no hubiesen endosporas. Muy posiblemente esta sea la causa de tal diferencia en la concentración celular presentada por este microorganismo.

Con base en los resultados obtenidos podemos afirmar que el extracto de *A. cepa* fue el extracto que mostró un mayor potencial inhibitorio del crecimiento, presentando una buena actividad antibacteriana contra todas las cepas ensayadas en el presente trabajo. El amplio espectro de acción de algunas especies usadas en alimentos ha sido reportado desde



los años ochenta con el estudio pionero de Deans y Ritchie (1987); sin embargo, los reportes sobre la actividad antibacteriana de *A. cepa* son muy escasos. En los pocos estudios publicados se hace más énfasis en las propiedades antifúngicas de estas especies vegetales que en sus cualidades antibacterianas, las cuales se señalan como débiles (KIM *et al*, 2004; WANG & NG, 2004; AMIN & KAPADNIS, 2005). En este trabajo, el efecto antibacterial de *A. cepa* se evidenció muy especialmente contra dos bacterias Gram negativas: *E. coli* y *Salmonella* spp, resultados que contrastan con lo reportado en la escasa literatura, donde se evidencia una mayor actividad inhibitoria contra Gram positivas que contra Gram negativas (DANKERT *et al*, 1979; ZOHRI *et al*, 1995). Los contundentes resultados obtenidos para *A. cepa* y *A. fistulosum* en este estudio, nos hacen suponer que las diferencias metodológicas existentes en la obtención y bioensayo de los extractos, sean las responsables de las novedades reportadas por nosotros, tal como lo observaron Amin y Kapadnis, (2005). Los datos obtenidos para *A. cepa*, posicionan a esta especie vegetal como una potencial fuente de sustancias antibacterianas con posible utilidad a nivel comercial, por lo que cabe considerar a *A. cepa* como un interesante objeto de estudio.

Al igual que sucede con *A. cepa*, las pocas referencias de *A. fistulosum* señalan sus propiedades antifúngicas (FAN & CHEN, 1999; PYUN & SHIN, 2006), sin hacer mención, en este caso, de los efectos antibacterianos de sus extractos. En este estudio encontramos que el extracto acuoso de *A. fistulosum* presenta una interesante actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, observándose un efecto inhibitorio de similares proporciones al presentado por *A. cepa*. Dado que se tratan de especies vegetales muy relacionadas, la similitud en el efecto sobre estas cepas bacterianas puede estar indicando de cierta forma, que comparten alguna fracción de sus compuestos activos (PYUN & SHIN, 2006). En este sentido, se

puede afirmar que *A. cepa* posee un arsenal de compuestos antibacterianos activos de mayor diversidad que *A. fistulosum*, lo cual se evidencia en la enorme diferencia mostrada cuando se enfrentaron ante *E. coli* y *Salmonella* spp. Acerca de los compuestos responsables de este tipo de efectos inhibitorios sobre el crecimiento bacteriano o fúngico, se conoce muy poco (FAN & CHEN, 1999), de modo general se conoce que algunos de los compuestos que parecen poseer actividad antimicrobiana en estas especies vegetales son esencias alílicas, de butilo, de croton y feniletil mostaza (NAGANAWA *et al*, 1996).

El poder antimicrobiano del ajo es bien conocido. El diente de ajo intacto posee un compuesto sulfurado denominado aliina (5-alil-L-cisteína sulfóxido), que es su componente mayoritario (NAGANAWA *et al*, 1996). Cuando el diente es macerado, se libera la fosfopiridoxal alinasa, enzima que hidroliza la aliina produciendo alicina (tiosulfínato dialilo), siendo éste último el componente antibacterial del ajo, que actúa inhibiendo las enzimas respiratorias afectando sus grupos SH (YOSHIDA *et al*, 1999). La alicina puede ser transformada en otros compuestos, debido a su inestabilidad, dentro de éstos se encuentra el ajoeno [(E,Z)-4.5,9-tritriadodeca-1,6,11-trieno-9-óxido] (Figura 2), el cual posee una baja actividad antibacteriana y una excelente actividad antifúngica al afectar la integridad de su pared celular (YOSHIDA *et al*, 1999; LEDEZMA & APITZ-CASTRO, 2006). Naganawa *et al* (1996), sugirieron que la actividad antimicrobiana del ajoeno estriba en la presencia de enlaces disulfito junto con los grupos sulfimilicos presentes en su estructura. Nosotros encontramos que la actividad del extracto acuoso del ajo fue muy irregular, estos resultados no concuerdan con la bibliografía al respecto, ni con los esperados. A pesar de los reportes donde se pone de manifiesto un efecto antimicrobiano mayor en los extractos de *A. sativum* que en los extractos de otras especies vegetales relacionadas, tales como las cebollas (DANKERT *et al* 1979; ZOHRI *et al* 1995; KIM *et al* 2004; AMIN & KAPADNIS, 2005), en el presente estudio sucedió lo contrario, la actividad



antibacteriana mostrada por el extracto acuoso de *A. sativum* fue inferior que la de los demás extractos (Figura 1). *A. sativum* mostró un apreciable efecto inhibitorio, sólo contra *S. aureus*. A este respecto existe un precedente, observado durante el estudio del efecto de variedades de puerro chino sobre *Campylobacter* sp., donde se reportó una mayor acción antibacteriana de los extractos de las especies nativas que los extractos de ajo empleados en el estudio (LEE *et al*, 2004). Este hecho puede ser debido a la relativamente alta inestabilidad de la alicina, ya que el almacenamiento de los extractos en ocasiones fue relativamente prolongado y esto favorece su conversión en ajoeno, compuesto débilmente antibacteriano. Un indicio de esto, puede ser su efecto inhibitorio predominante sobre bacterias Gram positivas (*S. aureus*) en detrimento de las Gram negativas, un comportamiento característico del ajoeno (PAI & PLATT, 1995).

Aunque no se trate de datos concluyentes, se puede apreciar que de las cinco cepas bacterianas ensayadas *Salmonella* spp, parece ser la más resistente frente a la acción de los extractos empleados, siendo marcadamente sensible sólo ante *A. cepa*. En el punto opuesto se encuentra *S. aureus*, que demostró ser la cepa más susceptible, siendo objeto de una evidente acción inhibitoria de los tres extractos ensayados. Sin embargo, de los resultados obtenidos no se puede concluir acerca de la mayor o menor susceptibilidad de las cepas Gram negativas con respecto a las Gram positivas, tal como sugieren algunos estudios (LACHOWICZ *et al*, 1997).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los extractos ensayados, el de *A. cepa* fue el extracto que presentó un mayor efecto bactericida, presentando los halos de inhibición de mayor tamaño (especialmente contra *E. coli* y *Salmonella* spp) y un amplio espectro de acción, puesto que mostró un efecto inhibitorio del crecimiento sobre las cinco cepas bacterianas ensayadas. Estos resultados posicionan a *A. cepa*, como una futura fuente de

sustancias antimicrobianas. Para *A. fistulosum*, los promedios de los tamaños de los halos siempre fueron menores que los presentados por *Allium cepa*, excepto en dos ocasiones: cuando se enfrentó contra *S. aureus*, y *P. aeruginosa*, frente a los cuales demostró ser el extracto con mayor efecto inhibitorio (Figura 1).

Los extractos de *A. cepa* y *A. fistulosum* mostraron un mayor poder antibacteriano que el extracto de *A. sativum*, en contra de lo que cabría esperar. Hecho que puede ser explicado, en parte, por la posible conversión de la alicina en ajoeno durante el almacenamiento de los extractos y por las diferencias metodológicas existentes en la obtención y bioensayo de los extractos.

En ninguno de los extractos acuosos ensayados se observó una tendencia de sensibilidad o de resistencia por parte de las bacterias Gram positivas con respecto a las Gram negativas. Hecho que señala el amplio espectro de acción de las especies vegetales utilizadas.

Los estudios de este tipo siempre generan inquietudes de diversa índole, las cuales pueden ser tema de trabajo de estudios posteriores. Algunos de ellos pueden estar orientados a comparar los resultados en condiciones *in vitro* con los resultados *in vivo*. Otros pueden incluir bacterias emergentes como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* y otros tantos orientados hacia la determinación de la concentración mínima inhibitoria de extractos con resultados verificados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada por los asistentes que voluntariamente se involucraron en el estudio y a la Universidad de Pamplona por trabajar en la creación de un ambiente investigativo propicio. También damos gracias al soporte prestado por el Center for Food Safety and Quality Enhancement de la Universidad de Georgia.

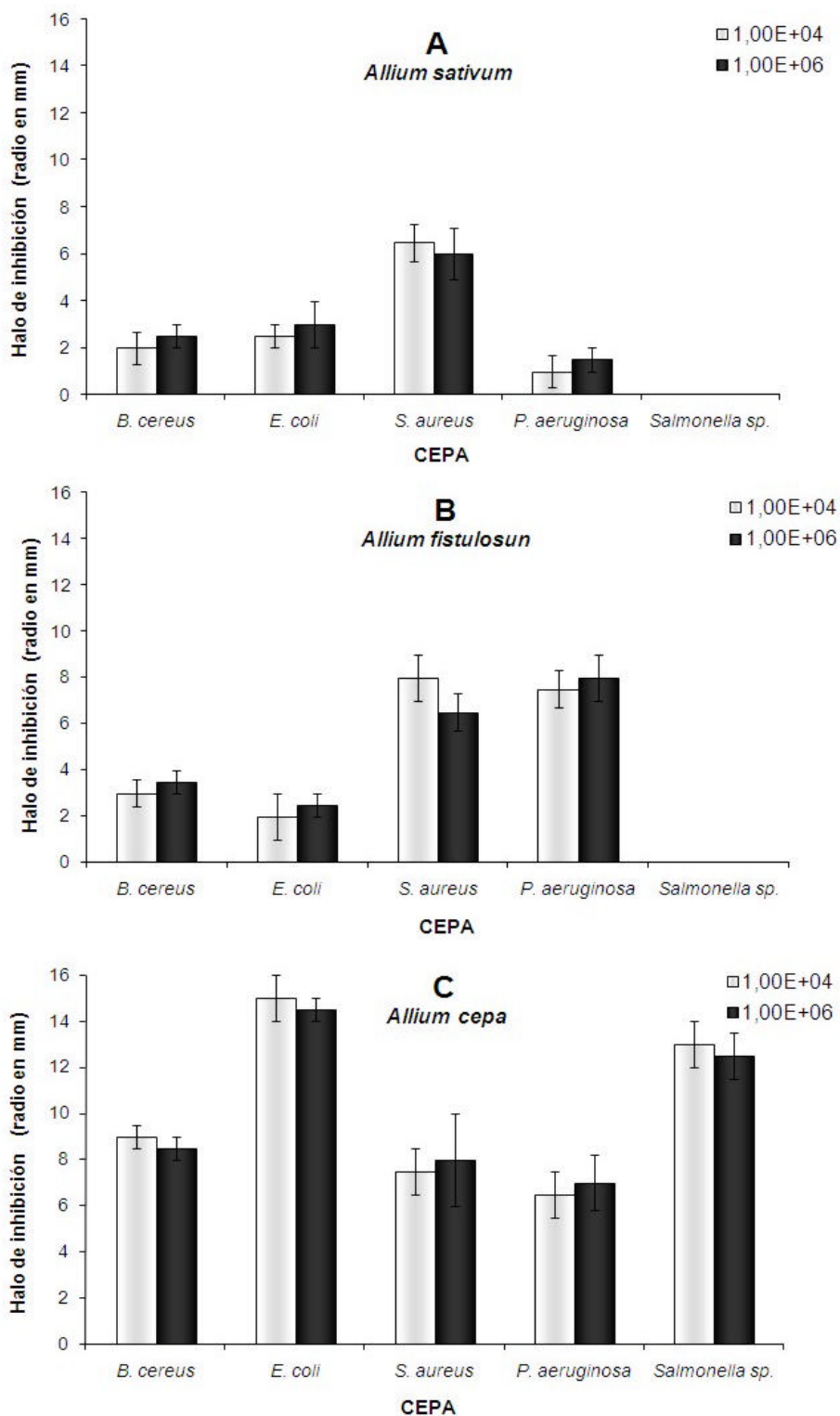


Figura 1. Efecto antimicrobiano *in vitro* de *Allium sativum* (A), *Allium fistulosum* (B) y *Allium cepa* (C), sobre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.* Se indican las medias aritméticas y las desviaciones de tres repeticiones independientes del experimento.

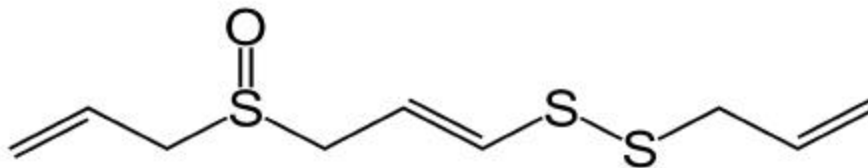


Figura 2. Estructura química del ajoeno [(E,Z)-4.5,9-tritriadodeca-1,6,11 -trieno-9- óxido].

Tabla 1. Equivalencia entre la concentración bacteriana y los valores de absorbancia de cada cepa utilizada en este trabajo. Se indican las medias aritméticas y las desviaciones de tres repeticiones independientes del experimento.

Cepa bacteriana	Absorbancia	UFC/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,731 ± 0,003	4,2x10 ⁹ ± 0,2
<i>Escherichia coli</i>	0,733 ± 0,004	4,4x10 ⁹ ± 0,3
<i>Salmonella</i> spp.	0,738 ± 0,003	5,1x10 ⁹ ± 0,3
<i>Staphylococcus auerus</i>	0,736 ± 0,004	5,0x10 ⁹ ± 0,3
<i>Bacillus cereus</i>	0,737 ± 0,004	1,1x10 ⁸ ± 0,2
Patrón McFarland N°5	0,735	-



- Ali M, Thomson M, Afzal M. (2000). Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **62**(2): 55-73.
- Amin M, Kapadnis BP. (2005) Heat stable antimicrobial activity of *Allium ascalonicum* against bacteria and fungi. *Indian J Exp Biol*. **43**(8): 751-754.
- Arora DS, Kaur J (1999). Antimicrobial activity of spices. *Int J Antimicrob Agents*. **12**: 257-262.
- Canizares P, Gracia I, Gomez LA, Martin de Argila C, Boixeda D, Garcia A, de Rafael L. (2004). Allyl-thiosulfinates, the bacteriostatic compounds of garlic against *Helicobacter pylori*. *Biotechnol Prog*. **20**(1): 397-401.
- Cichewicz RH, Thorpe PA (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J Ethnopharmacol*. **52**: 61-70.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. **12**: 564-582.
- Dankert J, Tromp TF, de Vries H, Klasen HJ. (1979). Antimicrobial activity of crude juices of *Allium ascalonicum*, *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]*. **245**(1-2): 229-239.
- Deans SG, Ritchie G (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol*. **5**: 165-180.
- Domingo D, López-Brea M (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioter*. **16**(4): 385-393.
- Elnima EI, Ahmed SA, Mekkawi AG, Mossa JS. (1983). The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie*. **38**(11): 747-748.
- Ericsson HM, Sherris JC. (1971). Antibiotic sensitivity testing: Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand: Sec B. Suppl* 217. pp. 3-90.
- Fabio A, Cermelli C, Fabio G, Nicoletti P, Quaglio P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother Res*. Feb 26 [Epub ahead of print].
- Fan JJ, Chen JH. (1999). Inhibition of aflatoxin-producing fungi by wesh onion extracts. *J Food Prot*. **62**: 414-417.
- Fenwick GR, Hanley AB. (1985). The genus *Allium*—part 3. Medicinal effects. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. **1**: 1–74.
- Georgala DL (1992). Food hazards: the myth and reality. *Trans Med Soc Lond*. **108**: 18-28
- Gupta S, Ravishankar S. (2005). A comparison of the antimicrobial activity of garlic, ginger, carrot, and turmeric pastes against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory buffer and ground beef. *Foodborne Pathogen Dis*. **2**(4): 330-340.
- Harris JC, Cottrell SL, Plummer S, Lloyd D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol*. **57**(3): 282-286.
- Hefnawy YA, Moustafa S, Marth EH (1993). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. *J Food Prot*. **56**: 876-878.
- Herrera FC, García-Rico RO. (2006). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *BISTUA*. **4**(2), pp 13-19.
- Holanda ML, Melo VM, Silva LM, Amorim RC, Pereira MG, Benevides NM (2005). Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. *Braz J Med Biol Res*. **38**: 1769-1773.
- Hunter R, Caira M, Stellenboom N. (2005). Thiolsulfinate allicin from garlic: inspiration for a new antimicrobial agent. *Ann N Y Acad Sci*. **1056**: 234-241.
- Kim JW, Kim YS, Kyung KH. (2004). Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *J Food Prot*. **67**(3): 499-504
- Lachowicz KJ, Jones GP, Briggs DR, Bienvenu FE, Wan J, Wilcock A, Coventry MJ (1997). The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Lett. Appl. Microbiol*. **26**: 209-214.
- Lee CF, Han CK, Tsau JL. (2004). In vitro inhibitory activity of Chinese leek extract against *Campylobacter* species. *Int J Food Microbiol*. **94**(2): 169-174.
- Ledezma E, Aritz-Castro R. (2006). Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*),



- un nuevo agente antifúngico. *Rev Iberoam Micol.* **23**(2): 75-80.
- Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. (1996). Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4238-4242.
- Nicholson WL. (2002). Roles of Bacillus endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci.* **59**(3): 410-416.
- Pai ST, Platt MW. (1995). Antifungal effects of *Allium sativum* (garlic) extract against the *Aspergillus* species involved in otomycosis. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 14-18.
- Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* **6**:39-47.
- Pyun MS, Shin S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine.* **13**(6): 394-400.
- Reuter HD, Koch HP, Lawson DL. (1996). Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. In: *Garlic: The Science and Therapeutic Applications of Allium sativum L. and Related Species*, 2nd ed. (Koch HP & Lawson DL, eds.), pp. 135–212. William & Wilkins, Baltimore, MD.
- Ruddock PS, Liao M, Foster BC, Lawson L, Arnason JT, Dillon JA. (2005). Garlic natural health products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Phytother Res.* **19**(4): 327-334.
- Si W, Gong J, Chanas C, Cui S, Yu H, Caballero C, Friendship RM. (2006). In vitro assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *J Appl Microbiol.* **101**(6): 1282-1291.
- Sinell HJ (1995). Control of food-borne infections and intoxications. *Int J Food Microbiol.* **25**: 209-217.
- Sivam GP. (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *J Nutr.* **131**(3s):1106S-1108S.
- Stajner D, Milic N, Canadanovic-Brunet J, Kapor A, Stajner M, Popovic BM. (2006). Exploring *Allium* species as a source of potential medicinal agents. *Phytother Res.* **20**(7): 581-584.
- Stecchini ML, Sarais I, Giavedoni P. (1993). Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *J. Food Prot.* **56**: 406 - 409.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *J Agric Food Chem.* **51**(11): 3197-3207
- Surjawidjaja JE, Hidayat A, Lesmana M. (2004). Growth inhibition of enteric pathogens by zinc sulfate: an in vitro study. *Med Princ Pract.* **13**(5): 286-289.
- Tilton RC, Lieberman L, Gerlach EH. (1973). Microdilution antibiotic susceptibility test: examination of certain variables. *Appl Microbiol.* **26**: 658-665.
- Wang HX, Ng TB. (2004). Isolation of allicepin, a novel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs. *J Pept Sci.* **10**(3): 173-177.
- Wallace RJ (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc.* **63**: 621-629.
- Wilson BG, Bahna SL (2005). Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **95**: 499-507.
- Yano Y, Satomi M, Oikawa H. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol.* **111**(1): 6-11.
- Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. (1999). An organosulfur compound isolated from oil-macerated garlic extract, and its antimicrobial effect. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63**(3): 588-590.
- Zohri AN, Abdel-Gawad K, Saber S. (1995). Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiol Res.* **150**(2): 167-172.

Recibido 28 Mayo 2007
aceptado 29 Octubre 2007