

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



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.

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

PRESENTA

MARÍA FERNANDA GOYTIA ACEVEDO



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de carrera de Licenciado en Biología

C. MARÍA FERNANDA GOYTIA ACEVEDO

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "Estudio *in Vitro* de la resistencia e inhibición de 10 especies de microorganismos con *Cymbopogon citratos* (DC) Stapf (Limonaria) y *Allium sativum* L. (Ajo), 2008" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la **M. C. Sergio Álvarez Barajas**.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA".
"2009, Año del Bicentenario de Charles Darwin"
Las Agujas, Zopopan, Jal., 11 de junio de 2009.

DRA. GEORGINA ADRIANA GUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

BIOL. MARGARITO MORA NÚÑEZ
SECRETARÍO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

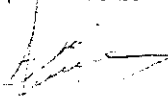
Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias
Presidente del Comité de Titulación
Licenciatura en Biología.
CUCBA
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad "Tesis o informe", opción "Tesis" con el título: "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." que realizó la pasante **María Fernanda Goytia Acevedo** con número de código 397242909 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.


Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

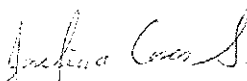
Atentamente
"Prensa y Trabaja"

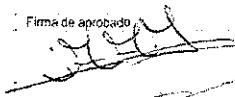
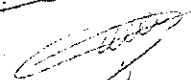
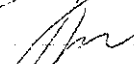
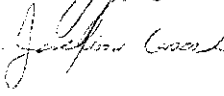
"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"
Las Agujas, Nextipac, Zapopan Jal., a 20 de septiembre 2010.



Firma
Sergio Alvarez Barajas
Director/a del trabajo

Firma 
Martha D. Ocegueda Reyes
Asesor(es)

Firma 
Dra. Josefina Casas Solis
Asesor(es)

Nombre completo de los Síndicales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
MVZ. JORGE ÁLVAREZ OUTSSET		20-09-10
QFB. ADOLFO CARDENAS ORTEGA		20-09-10
DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA		20,09-10
Supl. DRA. JOSEFINA CASAS SOLIS		20-Sept-2010

V. 60
22/09/2010

DEDICATORIA

A MIS PAPÁS
FERNANDO GOYTIA MEDINA
ALICIA ACEVEDO HURTADO

A MIS HERMANOS
ALICIA GABRIELA GOYTIA ACEVEDO
FRANCISCO FERNANDO GOYTIA ACEVEDO

POR TODO SU APOYO Y COMPRENSIÓN,
LOS AMO

AGRADECIMIENTO

A Dios Nuestro Señor y la Virgen de Guadalupe

A mi Director de Tesis
M.C. Sergio Álvarez Barajas

A mis asesores
Dra. Galina Zaitseva Petrovna
QFB. Adolfo Cárdenas Ortega
MVZ. Jorge Álvarez Ousset
Dra. Josefina Casas Solís
M.C. Martha Ocegueda Reyes

A mis compañeros
Omar Guillermo Moya Gutierrez
Lucero Ortega Genera
Tania Carolina Ureña Moreno
Alejandra Motta De La Parra
Gracias por su gran amistad, ayuda y por todas las risas

A todos mis amigos, por sus consejos y ánimos
en particular a José Antonio Moreno Zacarías

A todos mis maestros que han contribuido en la formación de mi persona,
en especial a ti Gaviota.... Gracias

Podremos alzarnos sobre nuestra ignorancia, podremos descubrirnos como
criaturas de perfección, inteligencia y habilidad. ¡Podremos ser libres!
¡Podremos aprender a volar!

Juan Salvador Gaviota (Richard Bach)

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES:.....	5
CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS:	
<i>Cymbopogon citratus</i> (ERILIM).....	9
<i>Allium sativum</i> (Extracto de ajo).....	12
Características de las 9 especies de microorganismos	
<i>Helicobacter pylori</i>	16
<i>Escherichia coli</i>	18
<i>Salmonella enteritidis</i>	21
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
<i>Serratia marcescens</i>	25
<i>Proteus mirabilis</i>	27
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	28
<i>Staphylococcus aureus</i>	31
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34
JUSTIFICACIÓN.....	36
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS	
Objetivo General.....	38
Objetivos Particulares.....	38
METODOLOGÍA	
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
METODO DE DIFUSIÓN CON DISCO EN AGAR.....	41
Procedimiento.....	42
Reporte.....	44
RESULTADOS.....	45
Componentes principales.....	49
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSION.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICAS

Tabla 1. Tiempo de retención e índice de similitud de <i>Cymbopogon citratus</i>	11
Tabla 2. Relación de cepas de microorganismos y medios de cultivo utilizados para su mantenimiento.....	40
Tabla 3. Compuestos que se colocamos en cada disco de papel filtro.....	41
Figura 1. Distribución microbiana y halo de inhibición.....	42
Figura 2. Posición de los discos de papel filtro en la caja de Petri.....	31
Tabla 4. Sensibilidad bacteriana a los antibióticos de acuerdo con el diámetro de los halos de inhibición.....	44
Figura 3. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por el aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	45
Figura 4. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por el aceite esencial de <i>Allium sativum</i>	46
Figura 5. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por Eritromicina.....	46
Figura 6. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por Amoxicilina.....	47
Figura 7. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por Vetericyn.....	48
Figura 8. Comparación entre las 9 especies de microorganismos con los compuestos utilizados.....	48
Figura 9. Comparación entre compuestos orgánicos y compuestos sintéticos.....	49
Tabla 5. Principales componentes analizados.....	50
Figura 10. Distribución de los compuestos.....	50

RESUMEN

La utilización de aceites esenciales destaca para el tratamiento de diversos padecimientos en la medicina tradicional, este hecho ha atraído el interés de investigadores y médicos para su utilización ya no solamente como una alternativa sino como primera opción de tratamiento. Para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites de *Cymbopogon citratus* y *Allium sativum* las bacterias empleadas en el estudio fueron inoculadas en placas de agar Müeller-Hinton, colocando sobre la superficie del agar discos de papel de filtro impregnados con los agentes antimicrobianos, medimos el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos. Dando como resultado que los 2 aceites esenciales tienen mejor inhibición que los antibióticos. Por ello la importancia de su investigación en el caso de *Cymbopogon citratus* (Limonaria) y de *Allium sativum* (Ajo) como agentes antibacterianos contra 9 especies de microorganismos que son patógenas en el ser humano.

Palabras claves: aceites esenciales, *Cymbopogon citratus*, *Allium sativum*, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The use of essential oils stresses for the treatment of various suffering in the traditional medicine, this fact has attracted the interest of researchers and medical specialists for use as not only as an alternative but as first choice for treatment. In order to determine the antimicrobial activity of the oils *Cymbopogon citratus* & *Allium sativum* bacteria were inoculated in agar Müeller-Hinton plates by placing on top of the agar discs of filter paper impregnated with the antimicrobial agents. The diameters of the inhibition zone around the discs were then measured. The results show that the 2 essential oils have better inhibition compared to the antibiotics. Therefore the importance of its investigation in the case of *Cymbopogon citratus* (Limonaria) and of *Allium sativum* (Garlic) as antibacterial agents against 9 species of micro-organisms that are pathogenic in humans.

Key Words: essential oils. *Cymbopogon citratus*, *Allium sativum*, antimicrobial activity.

INTRODUCCION

Aunque el organismo humano tiene un sistema de defensa que lo protege, existen en el ambiente una gran cantidad de microorganismos y elementos tóxicos que cuando penetran en el cuerpo y encuentran las condiciones favorables para reproducirse, atacan y desencadenan las enfermedades infecciosas

(<http://www.esmas.com/salud/enfermedades/infecciosas/434933.html>, 2004).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999) las enfermedades infecciosas representan el 25% de la causa de muerte de niños, jóvenes y adultos en el mundo, de las cuales las infecciones respiratorias agudas (incluidas la neumonía y la gripe) e infecciones gastrointestinales están entre las principales y en menor medida por infecciones cutáneas.

Son producidas por uno o varios microorganismos entre los que se encuentran bacterias, virus o parásitos que penetran al organismo por medio de animales o personas, objetos, alimentos y agua contaminada principalmente con materia fecal, que también se disemina por el ambiente

(<http://www.esmas.com/salud/enfermedades/infecciosas/434933.html>, 2004).

Entre los principales microorganismos que las ocasionan están: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, entre otras. En general, pero dependiendo del tipo de enfermedad infecciosa y del agente agresor que la cause, los síntomas que pueden presentarse son:

- Fiebre
- Dolor, comezón o ardor en alguna parte del cuerpo
- Malestar general
- Diarrea y/náuseas o vómito

Las infecciones respiratorias afectan la nariz, oídos, garganta, hasta los pulmones. Algunas son leves como dolor de garganta, catarro o gripe, tos, fiebre, anginas/infecciones en la garganta, laringitis, faringitis y la complicación provocada por estas infecciones está la bronquitis, bronconeumonía, tuberculosis, neumonía o pulmonía (Osorio, 2001)
(http://www.salud.com/enfermedades/enfermedades__respiratorias.asp, 2008).

En el caso de las infecciones gastrointestinales una de las consecuencias y complicaciones más graves es cuando se presenta diarrea y vómito, y en consecuencia deshidratación. Los órganos que son afectados con mayor frecuencia son: el esófago, el estómago, el duodeno, el ano, el recto, el páncreas y los intestinos, el delgado y el grueso. Entre los estudios para identificar exactamente el tipo de problema, están los de sangre, materia fecal, endoscopias, radiografías y ecografías, además de la exploración física y la historia clínica. Entre las enfermedades más comunes, están: la colitis, el reflujo gastroesofágico, el colon irritable, la hepatitis C, la salmonelosis, amibiasis, gastritis, úlceras, cálculos biliares, agruras o pirosis y otras más
(http://www.hipernatural.com/es/enfermedades_gastrointestinales.html, 2006).

Las infecciones cutáneas por microorganismos pueden presentar un grado de gravedad variable, desde un acné sin importancia hasta una enfermedad potencial mortal. Las infecciones cutáneas más frecuentes son impétigo, foliculitis, furúnculos, carbuncos, erisipelas, celulitis, paroniquia, síndrome de la piel escaldada por *staphylococcus* y eritrasma
(http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_18/seccion_18_201.html#, 2005).

Con el propósito de ampliar el uso de algunas plantas medicinales de nuestra región llevamos a cabo la investigación con los extractos de aceites esenciales de "Limonaria" y del "Ajo" para su utilización como agentes antimicrobianos, así

se podrán comprobar su efectividad contra 9 microorganismos incluyendo *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y *Pseudomonas*.

Con este estudio pretendemos evaluar distintas concentraciones de los extractos, comparando su eficacia con los principales antibióticos que se encuentran en el mercado para el tratamiento de las 9 cepas usadas en esta investigación.

En la actualidad hay muchos laboratorios farmacéuticos que producen medicamentos antibacterianos, estos al ser usado a largo plazo crean una resistencia en los microorganismos. En el paciente este abuso produce también un rechazo y se necesita una dosis más alta para poder combatir estos agentes patológicos, agravando con ello su salud ya no por la enfermedad sino por los medicamentos usados.

Por tanto en este estudio buscamos confirmar la utilización de la Limonaria y el Ajo como antibiótico natural, pudiendo ser más económico y de baja o nula repercusión en el paciente.

ANTECEDENTES

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. Existen innumerables sustancias químicas vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el 74% fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional. Esto nos brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural: las Plantas medicinales (Rojas y col., 2004).

Guerra y col. (2004), actualmente difunden y popularizan de las terapias vegetales en el mundo, aconsejan ya no como alternativas en los servicios de salud, sino como primera intención para diversas afecciones e infecciones, antes de pasar a otros medicamentos más agresivos.

La Asociación Argentina de Fitomedicina (plantas medicinales, 2005), refiere que los aceites esenciales proceden de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales y se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos, en concreto a los brotes en flor. Se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; puede ser para atraer los insectos para la polinización, o para repeler a los insectos nocivos, o puede ser simplemente un producto metabólico intermedio.

Los aceites esenciales son líquidos volátiles, en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Por lo general, no son oleosos al tacto. Pueden agruparse en cinco clases, dependiendo de su estructura química: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y lactosas y óxidos (Lawless, 1995).

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos (Fahn, 1978; Strasburger y col., 1978; Duraffourd y col., 1986; Lock, 1988; Boatto y col., 1994).

El término aceite esencial se aplica también a las sustancias sintéticas similares preparadas a partir del alquitrán de hulla, y a las sustancias semi-sintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales.

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados; ej. Alcoholes, aldehidos, cetonas, ésteres, etc., sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos no frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico; se les cataloga como terpenos: monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15) (Conner y col. 1984).

Las propiedades físico-químicas de los aceites esenciales o esencias son muy diversas, puesto que el grupo engloba sustancias muy heterogéneas, de las que en la esencia de una planta, prácticamente puede encontrarse solo una (como la de canela contiene más de 85% de cinamaldehido) o más de 30 compuestos como en la de jazmín o en la de manzanilla. El rendimiento de esencia obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento de peso vegetal hasta 1-3%. La composición de una esencia puede cambiar con la época de la recolección, el lugar geográfico o pequeños cambios genéticos (Seymour, 2003). En gimnospermas y angiospermas es donde aparecen las principales especies que contienen aceites esenciales, distribuyéndose dentro de unas 60 familias. Son particularmente ricas en esencias, las pináceas, lauráceas, mirtáceas, labiáceas, umbelíferas, rutáceas y asteráceas (Conner y col., 1984).

Estos aceites han demostrado ser eficaces en diferentes productos en estudios realizados a escala de laboratorio. Es por ello que se están evaluando diferentes plantas o sus extractos, que podrían ser parte de las dietas tradicionales, su

potencial uso para facilitar la conservación de los alimentos, mejorar su vida útil y retomar los aromas y sabores tradicionales de la dieta mediterránea (Jones, 1996).

En este contexto podemos referirnos a numerosos estudios sobre los aceites esenciales, en los cuales se destaca su gran utilidad en diversas áreas tales como la fabricación de los perfumes, productos cosméticos, saborizantes, en la industria farmacéutica, etc. Varios estudios reportan sobre las diferentes actividades biológicas que presentan los aceites esenciales, tales como insecticidas (Karpouhtsis y col., 1998), antioxidantes (Demo y col., 1998; Lagouri y col., 1993), y efecto antibacteriano (Vokou y col., 1993), lo que las hace ideales en gripes y catarros. También poseen propiedades cicatrizantes, antiparasitarias, antirreumáticas, contra las enfermedades de la piel, digestivas y tonificantes. En dosis adecuadas no se presentan efectos secundarios por lo general (<http://www.iesisa.com/equilibrium/index>, 2008).

Hay diferentes compuestos que se han utilizado como tratamientos en enfermedades infecciosas:

Antibióticos:

- Betalactámicos: Amoxicilina
- Macrólidos: Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina
- Nitroimidazoles: Metronidazol, Tinidazol
- Tetraciclina

Compuestos no antibióticos:

- Sales de bismuto, Ranitidina citrato de bismuto (RBC)
- Inhibidores de la bomba de protones de las células parietales gástricas (Omeprazol, Lansoprazol, Pantoprazol, Rabeprazol)
- Antagonistas de los receptores H₂ (Ranitidina, Famotidina, Cimetidina)

La actividad de los antibióticos y de los compuestos no antibióticos puede determinarse in vitro utilizando diferentes métodos. Los métodos de difusión pueden ser de alguna utilidad para determinar la sensibilidad de un aislamiento concreto, sin embargo, el método recomendado como referencia es el de dilución en agar (<http://www.helicobacterspain.com/indexM.htm>; Septiembre/1999).

Los aceites esenciales se obtienen mediante uno de los métodos siguientes:

- Destilación en corriente de vapor
- Extracción con disolventes volátiles
- Extracción a mano
- Extracción a máquina

Hoy los aceites esenciales sintéticos u obtenidos de fuentes naturales por cualquiera de esos cuatro métodos, se purifican normalmente por destilación al vacío (<http://www.plantasmedicinales.org>; 2005).

CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS

***Cymbopogon Citratus* (ERILIM)**

Esta especie se conoce ampliamente en México como té limón; en Honduras como zacate limón, té de limón y zacate de té; en Cuba con los nombres de caña santa, cañita de limón, hierba limón y en la República Dominicana el vulgo la nombra limoncillo.

En la década de los 80, en México, y en la de los 90, en Cuba, se acelera el proceso de resurgimiento de una cultura naturalista científicamente fundamentada, que abarca tanto la actividad agronómica, como la médica, se comienza a revalorizar el uso y producción de las plantas medicinales, tanto en estado natural, como de las sustancias y productos elaborados a partir de ellas. Este proceso, unido a las condiciones económicas excepcionales, ha provocado el auge de la medicina alternativa, en la cual el cultivo, estudio y el procesamiento de las plantas con fines terapéuticos ocupan una posición principal (Rodríguez y col. 1993).

La especie *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf (Gramineae), es una planta herbácea, perenne que generalmente no florece, mide de 60 a 120 cm de altura, sus hojas son largas como listones y despiden agradable aroma si se estrujan. Las flores están agrupadas en espigas y se doblan como hojas. Esta presente en climas cálidos, semicálidos y templados. Vive asociada a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia y perennifolia; se encuentra muy disponible y se emplea, tradicionalmente, en el tratamiento de uñas encarnadas y otras afecciones cutáneas, para la conservación del suelos, ya que tiene rápido crecimiento y es un material vegetativo que se adapta a diversas condiciones de suelo (<http://plantasmedicinales.org>; 2005).

Gracias a su naturaleza aromática del género *Cymbopogon* ha atraído la atención del hombre a lo largo de su historia. El agradable olor que poseen las

diferentes especies de este género por sus contenidos en aceites esenciales ricos en compuestos terpénicos ha creado una demanda de estos para el desarrollo de la industria en países como: Alemania, Argentina, Brasil, Cuba, Ecuador, Sri Lanka, India, Singapur, Malaya, Java, Formosa, China, Francia, Sudáfrica, Seychelle, Islas Comoros, Madagascar, Haití, Puerto Rico, México, Guatemala, Honduras, y Salvador. De manera general, coincidiendo en los diferentes países, la gente ha empleado el té limón en casos de dolor de estómago. Se le atribuyen igualmente propiedades para aliviar el vómito, la mala digestión y la diarrea, así como la tos, gripe, asma, dolor de cabeza, fiebre, infecciones ováricas, nervios y colesterol. Tiene la propiedad de actuar como antiespasmódico, antipalúdico, diaforético y estimulante. Se le ha empleado en la preparación de infusiones, sólo o mezclado con otras plantas, para bajar la presión arterial, la fiebre y gripe. En México se ha carecido de estudios clínicos y fitoterapéuticos de carácter científico. En Cuba, el Ministerio de Salud ha sugerido su empleo en diferentes preparaciones farmacéuticas. Esta planta se cultiva en numerosos países del mundo para la obtención de aceite esencial, como *lemon grass* de gran importancia para la industria, ya que grandes cantidades son utilizadas para la extracción del citral, principal constituyente del aceite, el cual es un importante material para la perfumería, confitería, licores, elaboración de cremas, pomadas de uso tópico como antiinflamatorio y antirreumático, y se emplea como materia prima en la síntesis de las iononas, sustancias aromáticas con fuerte olor a violetas y en la síntesis de la vitamina A.

Por métodos de cromatografía y métodos de espectrografía se ha encontrado al citral como principio activo del aceite del zacate limón, proporcionándole a este las propiedades antibacterianas, inhibiendo a microorganismos gram-negativos y gram-positivos, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Diplococos*, *Proteus*, *Shigella*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Brucella*, *Listeria*, *Pasteurella*, *Streptococos faecalis*, *Pseudomonas*, *Trichophyton interdigital*, y hasta contra protozoarios (Raman y col. 1995).

El citral constituye aproximadamente 3% de los compuestos contiene también aldehídos y ácidos carboxílicos. El citral actúa por contacto, a través del sistema de citoplasmosis, exterminando los microorganismos patógenos al romper y “explorar” su pared celular y su citoplasma. Dañando de esta manera el ciclo vital de la célula e interrumpiendo su multiplicación. Las investigaciones sobre la caracterización química de esta especie han permitido aislar, a partir de las partes aéreas de la planta, sustancias no volátiles entre las cuales se pueden mencionar flavonoides, ácido cafeico, fructosa y sacarosa. Entre los constituyentes volátiles del aceite esencial de dicha planta se encuentran terpenos como geraniol y citronenol (Chan y Loudon, 1998).

En un análisis cromatográfico aplicado a una muestra de aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, dio como resultado:

Tabla 1. Tiempo de retención e índice de similitud de *Cymbopogon citratus*.

No.	Compuesto	Tiempo de retención	Índice de similitud
1.	β -Mirceno	4.97	90
2.	Verbenol	10.53	78
3.	Monóxido de Limonero	11.25	81
4.	Neral	13.62	88
5.	Geranial	14.84	90
6.	Acetato de geranial	17.53	84
7.	Ac. Nérico	18.95	84
8.	2-Tridecanona	21.02	72
9.	Oxido de Cariofileno	22.29	82

Fuente: Departamento de Madera, Celulosa y Papel “Ing. Karl Augustin Grellmann”. Mediante las técnicas de cromatografía de gases/ F.I.D y cromatografía de gases/ Espectrometría.

Los compuestos representativos de la muestra son β -Mirceno, Geranial y Neral, presentan concentraciones del 6.17%, 35.77% y 43.7% respectivamente. Los componentes fueron identificados por comparación con la base de datos NIST.

Cada unidad de 3ml contiene principalmente myrcenos, citral b, geraniol, citral a, y terpenos (<http://www.erilim.com.mx>; 2008).

En esta planta se han realizado estudios agrotécnicos, de actividad antiinflamatoria, analgésica, antiasmática, diurética, antiespasmódica y antimicrobiana, toxicidad y genotoxicidad, entre otros.

***Allium sativum* (Extracto de ajo)**

Especie originaria de Asia central y extendida por el mundo, principalmente por los países ribereños del Mediterráneo.

El ajo es una planta anual, bulbosas, con bulbillos de multiplicación de sección triangular, de hasta 40 cm de altura, con las hojas agrupadas en la base cuando joven, después a lo largo del tallo. Hojas lineales, de márgenes entero, planas, de verde agua a verde oliva, y con la vaina blanquecina. Flores agrupadas en umbelas terminales. Las flores con tépalos blanquecinos a violáceos. Los frutos en cápsula ovoidea.

En China esta planta, el “dá suán”, es utilizado para tratar abscesos, cáncer, dermatomicosis, miofascitis, diarreas, difteria, tifo, hepatitis, sarna, tracoma, tricomoniasis y vaginitis (Dukes y col., 1985). En la medicina tradicional india, conocida como “lahsun”, posee usos similares al de otras farmacopeas como el uso antirreumático dado en la medicina popular europea, o su utilización frente a úlceras de duodeno, hiperlipidemias, flatulencias y dispepsias (Jain y col., 1991). También es muy utilizada en el norte de África como vermífugo, hipotensivo, colagogo, expectorante, digestivo, depurativo, tónico, frente a la disentería, tifus, otitis, hemorroides y tuberculosis entre otros usos (Boulos y col., 1983).

Podemos encontrar numerosos usos procedentes de diferentes compilaciones, entre los que se pueden destacar los indicados para el tratamiento del acné, la aerofagia, para activar la circulación, como adelgazante, en afecciones bronquiales, para el tratamiento de problemas cardiovasculares, afecciones gástricas, hepáticas, intestinales, dificultades respiratorias, como analgésico, anestésico local, antiasmático, anticatarral, anticoagulante, antifúngico,

antihelmíntico, antiinflamatorio, antipruriginoso, antiqueratósico, antirreumático, para el tratamiento de la arteriosclerosis y artrosis, como hipotensora, antiséptico, antiverrucoso, difteria, para aliviar dispepsias, como diurético, en caso de edema, como emenagogo, emoliente, para el tratamiento de enfisemas, enteritis, escorbuto, para evitar mareos, en casa de fiebre, como fluidificante, para combatir gangrenas, glucosuria, gota, gripe, hemorroides, hidropesía, hipertensión, como hipocolesteremiante, hipoglucemiante, hipotensor, frente a la ictericia, intoxicaciones, como necrosante, para tratar nefrosis, otitis, ante picadura de insectos, como preventiva del cólera, resfriados, como reconstituyente, para tratar el prurito anal, reuma, como rubefaciente, para los sabañones, sarna, en alteraciones del sistema nerviosos, sordera por reumatismo, tabaquismo, tifus, como tónico, para combatir la tos, las tos ferina, la tuberculosis, para tratar úlceras y como vulneraria, se ha utilizado como calmante, estimulante y frente al dolor de muelas, al parecer dar constatados resultados para combatir reumas. También en el tratamiento o prevención de enfermedades de transmisión sexual como la gonorrea. Hace muchos años se utilizaban los ajos como un tratamiento para la lepra. También fue un ingrediente en los remedios artesanales que se aplicaban durante la plaga en Europa. Reduce el colesterol, el bloqueo de las arterias y a reparar los daños causados por la arterioesclerosis, a prevenir y aliviar la claudicación intermitente (dolor en las piernas al caminar causado por la arterioesclerosis), a incrementar el nivel de insulina en el cuerpo, reduciendo así los niveles de azúcar en la sangre. Algunos estudios parecen demostrar que el ajo incrementa ligeramente el nivel de serotonina en el cerebro ayudando a combatir el estrés y la depresión (Fernández y col., 1999).

Recientemente se señala que el ajo ayuda a reducir los riesgos de contraer cáncer por sus contenidos antioxidantes como la allicina, la quercitina. Incrementa las defensas del organismo, mejorando nuestra respuesta a virus y bacterias, vasodilatador y depurador. Es un antibiótico natural. (<http://www.euroresidentes.com/Alimentos/ajo.htm>; 1999).

El uso actual del ajo está centrado en su fama de buen antihipertensivo, antitumorogénico, antitrombótico, antimicrobiano, fibrinolítico y reductor lipídico (Barnes y col., 2005).

Tan amplio espectro terapéutico descrito se puede justificar bioquímicamente. Esta especie presenta abundantes fructosanas (hasta un 75%), aceite esencial (0,2-0,3%): garlicina, aliina o sulfóxido de alilcisteína (1%), que es hidrolizada por la aliinasa produciendo alicina (responsable del olor característico del ajo), que se transforma rápidamente en disulfuro de alilo y pequeñas cantidades de vitaminas (A, B1, B2, B6, C). Experimentalmente se ha comprobado que la aliina y la alicina tienen propiedades anticancerígenas, bactericidas y fungidas (Vanaclocha y col., 2003). Un análisis de 100 gr de bulbo contiene entre 354-363 calorías, 10,9-16,0% de proteínas, 0,5-0,9% de lípidos, 79,6-85,1% de glúcidos, 2,2-3,9% de fibra, 56-75 mg de Ca, 273-522 mg de P, 3,9-4,7 mg de Fe, 49-56 mg Na, 1,158-1,367 mg de K, 0,65-0,75 mg de tiamina, 0,16-0,21 mg de riboflavina, 1,24-1,29 mg de niacina y 31-39 mg de ácido ascórbico (Berdonces, 2001).

La alicina reacciona específicamente con grupos tiol libres de numerosas proteínas, produciendo la inactividad de una variedad de enzimas como la papalina, calpasa y alcohol deshidrogenasa. La alicina también reacciona con tiol libre, contenido en moléculas como glutatión (Ross y col., 2001). Posee una alta reactividad con uniones S-H, presente 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 (Ross y col., 2001; Gara y col., 2000).

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 para volverse resistentes (Gara y col., 2000).

Los microorganismos que inhibe el ajo son: *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton metagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, levaduras patógenas al hombre, lleva a la inhibición de la síntesis de macromoléculas de *Candida albicans*, *Herpes simplex* e influenza B, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Proteus sp* y *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Criptococcus neoformans* y *Aspergillus parasiticus* (Barros y col., 1993).

CARACTERÍSTICAS DE LAS 9 ESPECIES DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados en este estudio consisten en 7 especies de la familia *Enterobacteriaceae* que son: *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. También se han incluido 2 bacterias del género *Staphylococcus*: *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Helicobacter pylori

Es un bacilo gram negativo de forma espiral, microaerofílico, de 2,5 a 5 micras, con 4 a 8 flagelos unipolares que le permiten un movimiento en tirabuzón, se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano y que se ha asociado con diferentes enfermedades digestivas. A finales del siglo XIX Bizzozero describió la presencia de bacterias espirales en el estómago de perros y gatos, sin embargo, no adquirió verdadera importancia hasta que se cultivó *Helicobacter pylori*, en Australia en 1982 por Barry Marshall y Robin Warren, a partir de muestras de mucosa gástrica de pacientes con úlcera y gastritis. Desde 1989 se le considera la especie tipo de un nuevo género, *Helicobacter* en el que existen por lo menos otras 19 especies. El descubrimiento de que *Helicobacter pylori* estaba implicado en diferentes patologías gástricas, ha supuesto un cambio conceptual, ya que es la primera vez que una bacteria se considera como causante de un proceso gástrico el cual era tratado de forma paliativa pero no curativa. El *Helicobacter pylori* afecta al 50 % de la población mundial. La ruta de contaminación es un tema de intensa controversia. No se conoce el hábitat natural de *Helicobacter pylori* por fuera del estómago. Se desconoce cómo se infectan los pacientes y cómo se establece la infección. La diseminación persona- persona es la vía más probable de transmisión. Puede ser por vía fecal-oral, oral-oral o gástrica-oral

(<http://www.helicobacterspain.com/indexM.htm>; Septiembre/1999).

Esta bacteria es un factor de riesgo relevante de gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico, se ha clasificado además como carcinógeno tipo I. Por consiguiente, los pacientes pueden presentar dolor epigástrico y úlceras, hemorragia por gastritis o úlceras, o dolor, náuseas, vómito y disminución del peso por neoplasias. La anemia por pérdida crónica de sangre puede ser el único síntoma en los que experimentan dolor. Como resultado de su interferencia con la secreción de ácido por el estómago, esta bacteria es capaz de generar deficiencias en la absorción de nutrientes que pueden comprometer el estado nutricional de los individuos afectados y vincularse con la aparición de manifestaciones carenciales o con el agente causal de enfermedades crónicas (Suerbaum y col. 2002). La implicación de estas bacterias en la gastritis crónica activa, su asociación con la úlcera gastroduodenal y su inclusión por parte de la IARC en 1994 (grupo de estudio del cáncer, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud) entre los agentes carcinógenos tipo I, las ha convertido en uno de los microorganismos de mayor interés en patología humana. Los más de 15.300 trabajos publicados, demuestran el interés de la comunidad científica mundial en la infección por *Helicobacter pylori*

(<http://www.helicobacterspain.com/indexM.htm>; Septiembre/1999).

Como una alternativa para los métodos de diagnóstico se propone en la actualidad el uso de isótopos estables y radiactivos idóneos para su identificación. El tratamiento de erradicación además de costoso puede ser inefectivo, generar reacciones adversas en los pacientes o cepas resistentes a los antibióticos, por lo que los estudios de búsqueda de una vacuna terapéutica y prevención centran la atención de las investigaciones actuales. (http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol15_1_01/ali07101.htm; 2001).

De la misma manera que en cualquier proceso infeccioso, es necesario el conocimiento de la sensibilidad o resistencia de *Helicobacter pylori* a los distintos antibióticos para erradicar el microorganismo y curar la infección.

Helicobacter pylori es sensible a un gran número de antibióticos in vitro aunque no son siempre útiles in vivo, debido a diversos factores como:

- El antibiótico no llega a las zonas profundas de la mucosa gástrica donde se encuentra *Helicobacter pylori*.
- El antibiótico es inactivado por el pH ácido del estómago.
- Las condiciones en las que la bacteria se encuentra en el estómago, no son fácilmente reproducibles en el laboratorio.
- Se pueden desarrollar resistencias durante el tratamiento.

Escherichia coli

Escherichia coli es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano y de animales homioi térmicos, es un bacilo gram negativo, no esporulados, móvil o inmóvil, aerobios-anaerobios facultativos. (Ewing, 1985). Estas células tienen un diámetro de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$ y una longitud de $2\ \mu\text{m}$ ($1\ \mu\text{m}=20^{-3}\ \text{mm}$). Los flagelos miden sólo $2\ \mu\text{m}$ de largo y la impulsan a una velocidad de $50\ \mu\text{m}\ \text{s}^{-1}$, esto significa que la velocidad es de 25 veces la longitud del cuerpo por segundo (Santamarina y col. 2004). Se clasifican en más de 170 serogrupos O, según las características antigénicas de su LPS, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación (Ewing, 1985; Nataro y Kaper, 1998).

El huésped a las pocas horas de vida se coloniza con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida (Winfield y col., 2003; Kaper y col., 2004; Drasar y Hill, 1974). Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación

fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes". Sin embargo, se ha precisado que seis grupos patógenos o patotipos de *Escherichia coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC). Desde el punto de vista de las zoonosis, la categoría más importante es la enterohemorrágica, que es también la más severa (Kaper y col., 2004).

Escherichia coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos gram negativos identificados (Neidhardt, 1999).

Escherichia coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización (Nataro y Kaper, 1998), que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua y alimentos.

Una infección por *Escherichia coli* puede enfermar mucho a una persona. Los siguientes son algunos de los síntomas más comunes asociados con el *E. coli*,

sin embargo, cada persona puede experimentar los síntomas de diferente forma, y pueden incluir:

- Calambres abdominales.
- Diarrea con sangre, grave.
- Diarrea sin sangre.
- Sin fiebre o fiebre leve.
- Síndrome urémico hemolítico (SUH).

Los síntomas pueden ir de ninguno a una forma grave de la infección conocida como (SUH), se destruyen los glóbulos rojos (las células que transportan oxígeno en el flujo sanguíneo) de un individuo y los riñones dejan de trabajar. Aproximadamente el 8% de las infecciones pueden dar como resultado este síndrome. Los niños y las personas mayores pueden ser más propensos a desarrollar esta complicación, que puede amenazar la vida de la persona (http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_travel_sp/ecoli.cfm; Enero/2000).

Con este tipo de infección no se utilizan antibióticos. Además, no se usan medicamentos antidiarreicos, como la loperamida (Imodium®). La recuperación de la mayoría de las personas que padece esta enfermedad en general ocurre entro los cinco a diez días.

Si una persona desarrolla al síndrome urémico hemolítico (SUH), la complicación que amenaza su vida, podría requerir hospitalización en una unidad de cuidados intensivos. De acuerdo a los CDC, entre el tres y el cinco por ciento de las personas que desarrollan SUH pueden morir por esta complicación (http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult_infectious_sp/ecoli.cfm, 2000).

Salmonella enteritidis

El género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos anaerobios facultativos, no esporulados, posee una cápsula de polisacáridos denominada Vi, produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sorbitol sin originar gas. Se conoce que la bacteria *Salmonella* ha estado causando enfermedades por sobre 100 años. Fueron descubiertas por un científico americano Dr. Daniel E. Salmon (de ahí su nombre) (Brenner, 1984) (http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm; 2005).

El primer brote de salmonelosis se descubrió en Alemania en 1888, entre 50 personas que habían consumido carne cruda molida proveniente de una vaca moribunda (Tauxe, 1991; ICMSF, 1996). El padecimiento se mantiene endémico en todos los países, incluidos los más industrializados en donde de vez en cuando se presentan brotes masivos (Fernández, 2000).

El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Ello se debe a la frecuencia con la cual el germen participa en los brotes y casos individuales de gastroenteritis. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (García del Portillo, 2000; Le Minor y Popoff, 1987).

Estudios de ADN mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está compuesta por 6 subespecies, siendo la subespecie I la que se aísla con mayor frecuencia en el hombre y los animales de sangre caliente, en la que se encuentran *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*. (Popoff y col., 1997; Dorrnsoro y col., 1996; Bopp y col., 1999).

Las infecciones por *S. enteritidis* aparecen en el mundo en la década de los 80 y se han extendido desde entonces en forma progresiva y pandémica (Rodríguez y col., 1990).

Las infecciones causadas por *Salmonella* son:

- Gastroenteritis o envenenamiento por alimento: consecuencia de la ingestión de células de origen alimentaria o agua contaminada, los signos y síntomas son: diarrea, vómito, náuseas, dolor abdominal, fiebre ligera y escalofríos (ICMF, 1996). *S. enteritidis* está presente en el 92% de los casos reportados. La mortalidad en enteritis por *Salmonella enteritidis* en hospederos inmunocompetentes es menor del 0.5% (Restrepo, 2003)
- Fiebre tifoidea: únicamente afecta al ser humano, es causada por *Salmonella typhi*. Los síntomas son malestar, cefalalgia, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolores en el cuerpo, escalofríos, convulsiones, delirio y debilidad, generalmente acompañados de una diarrea parecida al puré de guisantes o de estreñimiento (generalmente hay ulceración). A veces, en el tronco, en el dorso y en el tórax, aparecen manchas de color rosa. Otras veces se observan con ritmo cardíaco lento, abdomen sensible y dilatado, aumento del tamaño del bazo y en ocasiones hemorragia intestinal o nasal. El mecanismo de contagio es fecal-oral, a través de agua y de alimentos contaminados. Cuando no está producida por la *Salmonella typhi*, se habla de fiebre paratifoidea, provocada por *Salmonella paratyphi* A, B o C, es patológicamente y clínicamente similar a la tifoidea pero con síntomas menos fuertes. Implica una infección sistémica, debido a la invasividad de la bacteria. Potencialmente mortal (ICMSF, 1996)
- Bacteriemia con metástasis sépticas o sin ellas: la bacteriemia o septicemia es causada por la presencia de *Salmonellas* en la sangre.

Esta puede aparecer por metástasis cuando el sitio inicial de infección es el tracto intestinal u otros focos. Los síntomas son fiebre alta y persistente, dolor en el dorso, abdomen y en el tórax, escalofríos, sudoración, malestar, anorexia y pérdida de peso. El estado puede ser pasajero o crónico. Las secuelas identificadas incluyen: apendicitis, artritis, colecistitis, endocarditis, abscesos locales, meningitis, osteomielitis, osteoartritis, pericarditis, peritonitis, pleuritis, neumonía e infección de las vías urinarias (Ferreraz, 1996)

- Portador asintomático: se define con la persistencia de *Salmonella* ssp. En heces, durante mas de un año. La incidencia es del 10% de los individuos, excretando las bacterias del bazo. La dificultad de erradicarla reside en la presencia de cálculos biliares. Algunos serotipos se relacionan con mayor frecuencia con un determinado síndrome. Así *Salmonella newport* y *Salmonella anatum* originan predominantemente gastroenteritis; *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* A, B o C son los responsables de fiebre tifoidea; *Salmonella choleraesuis* a menudo bacteriemia (Ferreraz, 1996; Freeman, 1989)
- Salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. Los signos de la enfermedad incluyen: dolor abdominal, diarrea, fiebre moderada y escalofríos; a veces hay vómito, dolor de cabeza y malestar general. Pueden producirse también complicaciones. Entre las bacterias altamente virulentas se encuentran algunas cepas de *S. dublin* y, sobre todo, *S. enteritidis* (Pascual, 2005)

La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes y en niños de corta edad. Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo, el 60-80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos y restaurantes (Adams y Moss, 1995).

Estas infecciones generalmente siguen su curso de cinco a siete días y a menudo no se necesita más tratamiento. Sin embargo, los pacientes con diarrea severa podrían necesitar rehidratación con fluidos intravenosos. Si la infección se propaga desde los intestinos, también podría ser necesario tomar antibióticos. El tratamiento específico para las infecciones por *Salmonella* será determinado por su médico basándose en lo siguiente:

- Su estado general de salud y su historia médica
- Qué tan avanzada está la enfermedad
- Su tolerancia a determinados medicamentos, procedimientos o terapias
- Sus expectativas para la trayectoria de la enfermedad
- Su opinión o preferencia

(http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult_travel_sp/salmonel.cfm, 2000).

Klebsiella pneumoniae

El género *Klebsiella*, que recibe su nombre del microbiólogo Edwin Klebs, son bacilos gram negativos no móviles, con capsula antifagocítica de 0,3 a 1,5 x 0,6 a 6 µm, aerobios, las colonias son grandes y mucosas. El género *Klebsiella* se compone de varias especies, incluyendo *Klebsiella pneumoniae*, que es la cepa clínica más común, y seguida de *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella terrigena*.

Las *Klebsiellas* se detectan en tierra, plantas y agua. Es un habitante común de la cavidad oral, especialmente en individuos con un bajo nivel de higiene oral (Woolf, 1998), además, en alrededor del 30% de la población sana se encuentran en el tracto gastrointestinal o en las vías respiratorias superiores (Spicer, 2009). Aproximadamente un 60-80% de todas las *Klebsiella* aisladas de las heces y las muestras clínicas son *K. pneumoniae*. La fuente de infección está

constituida por pacientes en hospitales (ej., en unidades de cuidado intensivos), puede sembrar focos a distancia en pacientes debilitados como ancianos, pacientes con quemaduras o heridas excesiva, que se someten a terapia inmunosupresora o en aquellos con infección por VIH/SIDA, un modo de contagio puede ser por las gotas emitidas por nariz y boca por portadores del microorganismo (Carmona y col., 1997; WHO, 2004).

Las enfermedades provocadas por *Klebsiella pneumoniae* son principalmente neumonía primaria, cavernosa y grave (neumonía de Friedländer), produciendo necrosis pulmonar complicada, con hemorragia extensa del pulmón, sepsis y ocasionalmente infección urinaria y bacteriemia, también pueden provocar endocarditis, meningitis, enteritis o infecciones de partes blandas, heridas, infecciones del oído, en los últimos años se ha comprobado que *K. pneumoniae* se encuentra con relativa frecuencia entre los agentes bacterianos de gastroenteritis. La proporción de infecciones nosocomiales es de alrededor del 5 -10%. Los microorganismos se absorben por vía aérea, a través de vegetales comestibles o agua contaminada. Una parte de las infecciones se produce de forma endógena. *Klebsiella pneumoniae*, subespecie *ozaenae* y subespecie *rhinoscleromatis* forman parte de los patógenos habituales en las infecciones nasofaríngeas (Spicer, 2009; <http://www.antibioticoterapia.com/modules>).

Estas bacterias son virulentas debido a que poseen una cápsula antifagocítica y a que muchas de estas cepas presentan resistencias múltiples a antibióticos (Ingraham y col., 1998).

Serratia marcescens

El nombre del género de la bacteria se lo dio en honor a Serafino Serrati, es un bacilo gram-negativo, son móviles, anaerobio facultativo. Las especies más importantes en medicina humana son *Serratia marcescens*, que es la especie

que se aísla con más frecuencia de infecciones humanas. La producción de prodigiosina y la creencia de que la bacteria era inocua condujeron a su uso frecuente como marcador biológico para estudiar, entre otras cosas, la transmisión de bacterias a través del habla y el contacto, la colonización ascendente de la vejiga en pacientes con catéteres urinarios y la diseminación de bacterias pulverizadas tras la liberación experimental en modelos de guerra biológica (Mandell y col. 2006).

Clínicamente las bacteriemias por *Serratia marcescens* se presentan con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad de base como: diabetes, neoplasias, insuficiencia renal crónica (Fleisher y col. 2002; Yu y col., 1998). Además, la bacteria tiene una relación particular con infecciones en usuarios de drogar por vía parenteral (Mandell y col. 2006).

Se encuentran en el suelo, en las plantas, en el agua potable y cañería. Su adquisición es mayoritariamente hospitalaria, especialmente en unidad de terapia intensiva encontrándose en catéteres contaminados, las soluciones de infusión, en insumos hospitalarios como jabones, antisépticos, etc. (Demetriou y col., 1999). Pueden encontrarse colonizando la flora intestinal, tracto respiratorio, tracto urinario, aparato cardiovascular, en la población sana, sólo se observan ocasionalmente en el tracto gastrointestinal o en las vías aéreas superiores y de las heridas (Haddy y col., 2000). Por lo tanto, la mayoría de las infecciones se adquiere de manera exógena y diseminarse dentro de los hospitales o entre éstos en las manos del personal (Fleisher y col., 2002). Puede provocar una amplia variedad de infecciones nosocomiales, en pacientes inmunodeprimidos pueden producir infección en heridas, renales y de vías urinarias, infecciones respiratorias, así como sepsis, endocarditis, meningitis e infecciones de prótesis. La diseminación hematogena puede producir casos de osteomielitis, artritis infecciosa y endoftalmítis, mientras que la meningitis puede tener lugar tras procedimientos neurológicos.

El microorganismo puede sobrevivir en condiciones hostiles, incluso en una variedad de desinfectantes, entre ellos las fuentes de brotes y es la transmisión de persona a persona la mas importante forma de diseminación, por lo que las campañas de asepsia de manos, control de la potabilización del agua, y asepsia de instrumentos hospitalarios son de gran importancia (Berthelot y col., 1999; Fleisher y col. 2002).

Proteus mirabilis

El género *Proteus* son bacterias gram negativas, anaerobia, pleomorfa, caracterizada por su movilidad. Aunque por lo general *Proteus* se comporta como saprofitos o comensales, en ocasiones pueden intervenir en procesos patógenos.

De las cuatro especies de *Proteus*, en la actualidad sólo se consideran dos, *P. mirabilis* y *P. vulgaris*. Los estudios sobre el ADN han permitido separar *Proteus morgani* en el nuevo género *Morganella* (*M. morgani*) e incluir *P. rettgeri* en el género *Providencia*.

Proteus mirabilis y *Proteus vulgaris* son especies muy móviles, que cuando se siembran en la superficie de medios sólidos, invaden ésta en forma de ondas muy características que dificultan el aislamiento de los patógenos que puedan encontrarse en el producto, fenómeno que no se produce en los medios inhibidores.

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (aguas residuales, suelo, plantas y materia orgánica en descomposición), forman parte de la flora intestinal del hombre y de los animales, son importantes agentes de la putrefacción de la materia orgánica (García y col., 1994) y pueden intervenir en infecciones humanas como patógenos oportunistas.

La acción patógena en el tracto urinario es la más importante y está asociada con la presencia de fimbrias (*P. mirabilis*), que permiten su adherencia a las células del epitelio y flagelos que por su motilidad, facilitan la producción de infecciones ascendentes y la colonización de la pelvis renal, favorece la producción de cálculos, septicemias, se ha observado en infecciones extrahospitalarias, especialmente en enfermos cateterizados. También pueden intervenir en otras infecciones extra intestinales, como abscesos, infecciones de las heridas, otitis, peritonitis, neumonías y bacteriemias, e incluso se ha sospechado su intervención en procesos intestinales, especialmente en gastroenteritis infantiles y toxiinfecciones alimentarias (Restrepo, 2003).

Atendiendo a la producción de indol, se pueden dividir en especies indol-negativas (*P. mirabilis*), sensibles a la penicilina y a la mayoría de antibióticos, e indol-positivas (*P. vulgaris*, *M. morgani* y *Providencia*), que son mucho más resistentes.

En cuanto a su sensibilidad, *Proteus mirabilis*, que es la especie que se aísla con mayor frecuencia, es también la más sensible a los antibióticos. Presenta cierta sensibilidad a las penicilinas, en especial a las de amplio espectro (Pumarola A. y col., 1987).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo aerobio, móviles rectos o ligeramente curvados (0,5 a 1 x 1,5µm) que suelen disponerse en parejas (Pace, 1997; Woese, 1987). El nombre del género procede de *pseudes*: falso; *monas*: una unidad; *aeruginosa*: repleto de óxido de cobre o verde (se refiere al pigmento verde sinterizado por esta especie). Dentro del género *Pseudomonas* se compone actualmente de unas 10 especies, *Pseudomonas aeruginosa* es la pseudomona más frecuentemente (Murray y col. 2006).

Desde un enfoque básico *P. aeruginosa* representa un modelo de gran interés que, ha sido estudiada desde múltiples enfoques. De hecho es una de las bacterias más estudiadas a nivel molecular y su genoma ha sido totalmente secuenciado (<http://www.pseudomonas.com>; 2001).

Contrariamente a lo que parece, todos nosotros estamos en contacto diariamente con *Pseudomonas aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas, lo que nos muestra que nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales (Hardalo y col., 1997).

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Costerton, 1980; Hardalo y col., 1997), es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón (Hardalo y col., 1997).se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales (invertebrados, insectos, etc.) (Rahme y col., 1997, Tan M.-W. y col. 2000; D'Argenio y col., 2002), asimismo, presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas (Hardalo y col., 1997).

Por otra parte, en ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelícula (Costerton y col., 1994). La formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo dispositivos intrauterinos, catéteres o

válvulas cardíacas. Las biopelículas también representan un problema en el proceso de producción de diversas industrias pues provocan taponamiento y corrosión de conexiones y filtros.

P. aeruginosa representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer (Bergen y col., 1996) o quemados (Madigan y col., 1997). Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso (Britigan y col., 1992; Cox, 1986), degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos (Döring y col., 1987; Nicas y col., 1985), sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune (Döring y col., 1987; Nicas y col., 1985; Singh y col., 2002). También existe un grupo poblacional especialmente vulnerable a las infecciones con *P. aeruginosa* formado por los enfermos de fibrosis quística (George, 1987; Govan y col., 1996; Pier, 1985). Coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio de estos pacientes, produciendo una infección por cepas mucoides en los pulmones, estos están en la etapa terminal de la enfermedad. Esto se debe a que estas cepas no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y, hasta el momento, no existe un tratamiento efectivo contra cepas mucoides.

Sin embargo, a la vez que *P. aeruginosa* causa al hombre distintos problemas, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el tratamiento de la contaminación ambiental. Así se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada (Schaeffer y col., 1979), que produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos (Maier, M. R. y col. 2000) o con metales pesados (Miller, 1995); y que produce enzimas, como la lipasa (Martínez y col., 2001), con distintas aplicaciones potenciales (Soberón-Chávez G. y col.. 1994).

Es importante mencionar que *P. aeruginosa* sobresale entre las bacterias por su extraordinaria capacidad de adaptación, ya que, como mencioné anteriormente,

vive en ambientes muy diversos. Muchos autores incluso la han considerado como un organismo ubicuo, aunque no se ha documentado su presencia en ambientes extremos. Por otra parte, es el único caso conocido de una bacteria ambiental en la que todos los aislamientos son potencialmente patógenos para el hombre. Es también una característica particular de esta bacteria el arreglo de los genes que intervienen en la virulencia de la bacteria, ya que no están codificados en las llamadas "islas de patogénesis" como en las demás bacterias patógenas, sino se encuentran interdispersas en su cromosoma (Costerton, 1980; Hardalo y col., 1997; Stover y col., 2000; <http://www.pseudomonas.com>; 2001).

Para tratar las infecciones por *P. aeruginosa*, es una dificultad, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes (Hardalo y col., 1997; Nikaido y col., 1996; Nikaido, 1998; Trias y col., 1990).

Staphylococcus aureus

Las bacterias del género *Staphylococcus* son cocos (bacterias de forma esférica) gram positivas, del 0,5 a 1,5 μm de diámetro, que se agrupan de forma irregular, son bacterias inmóviles, no forman esporas, generalmente no poseen cápsula y salvo raras excepciones son anaerobias facultativas. El nombre del género procede del griego *staphylé*, que significa "en racimo de uvas". Este nombre fue propuesto por el cirujano escocés Alexander Ogdson en 1880, y se refiere al hecho de que estos cocos gram positivos presentan al microscopio un patrón de agrupación característico que recuerda a un racimo de uvas, aunque también pueden aparecer como células aisladas o agrupadas en parejas, tétradas o cadenas cortas (Pahissa, 2009).

Staphylococcus aureus es un habitante normal de la piel y mucosas. En la edad adulta casi el 40% de la población son portadores de *Staphylococcus aureus*, aproximadamente un 20% de la población es portadora permanente en las fosas nasales y un 30% lo es de manera intermitente (Pahissa, 2009). La cantidad de portadores es mayor en ciertos grupos de población, como en personal que trabaja en contacto con enfermos hospitalizados, personas internadas en residencias de la tercera edad, adictos a drogas parenterales, diabéticos, etc. El estado de portados tiene importancia porque puede servir como reservorio en toxiinfecciones alimentarias y en infecciones de pacientes hospitalizados, sobre todo si el portador es personal sanitario. Pueden originarse brotes hospitalarios de infección por transmisión del microorganismo, a trábeas de las manos del personal sanitario, desde un paciente infectado a otros pacientes.

Staphylococcus aureus produce diversas toxinas que contribuyen a su patogenicidad, ejerciendo su acción a cierta distancia del foco infeccioso. Las infecciones se produce tras lesiones cutáneas (impétigo y foliculitis), frecuentemente agudas y piogénicas (se produce pus), traumáticas o quirúrgicas, que favorecen la penetración del microorganismo desde la piel hasta los tejidos más profundos (infección por contigüidad). Desde el foco de infección (abscesos, herida infectada) los microorganismos pueden invadir sangre (diseminación hematológica), produciendo cuadros graves de sepsis, neumonía, infecciones asociadas a prótesis y catéteres intravasculares, infecciones recurrentes, fibrosis quística, destrucción tisular, infecciones metastásicas, impétigo bulloso, endocarditis, o llegar hasta las articulaciones produciendo artritis infecciosa u osteomielitis (infecciones del tejido óseo). También puede colonizar la nasofaringe, en la actualidad constituye una de las principales causas de infección nosocomial (Pahissa, 2009).

El síndrome de la piel escalfa se debe a la producción de la toxina exfoliativa, que ocasiona la formación de ampollas y descamación de láminas epidérmicas en cara, axilas o diseminada por todo el cuerpo.

La intoxicación alimentaria por *Staphylococcus* ocurre a menudo cuando una persona que manipula alimentos contamina los productos alimenticios tales como postres (especialmente salsas y los postres rellenos o cubiertos con crema), ensaladas (en especial las que contienen mayonesa) o comidas horneadas, que son servidos o almacenados a temperatura ambiente o en el refrigerador (De la Rosa M. y col., 2003). Son una causa importante de gastroenteritis; causadas por enterotoxinas que no se destruyen por el calor (termoestables) y preformadas en el alimento durante el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, estas enterotoxinas estafilocócicas dan lugar a vómito y diarrea.

Las bacterias se multiplican rápidamente en los alimentos y puede haber una gran colonia de bacterias sin que haya evidencia de descomposición del alimento. Los factores de riesgo son:

- Ingestión de alimentos preparados por una persona con una infección en la piel, dado que estas infecciones comúnmente contienen el *Staphylococcus aureus*
- Ingestión de alimentos almacenados a temperatura ambiente
- Ingestión de alimentos preparados en forma inadecuada
- Síntomas que ocurren en las personas que consumen el mismo tipo de alimentos

Los síntomas que se pueden presentar son: náuseas, vómito hasta por 24 horas, diarrea, pérdida del apetito, cólicos abdominales severos, distensión abdominal, fiebre leve, llegando a complicarse con deshidratación severa, heces sanguinolentas u otros síntomas nuevos

(<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/staphylococcalinfections.html>; 2007).

El síndrome del shock tóxico es un cuadro grave que se presenta en mujeres jóvenes durante la menstruación, y más raramente en otras personas, asociado

al empleo de tampones de gran absorción que han permanecido en la vagina durante un periodo prolongado, y donde se ha desarrollado una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de la toxina. Se caracteriza por la presencia de exantema, hipotensión, fiebre, vómitos y mialgias, pudiendo llegar a producirse un fallo multiorgánico con insuficiencia renal y hepática. Está producido por cepas de *Staphylococcus aureus* que producen una exotoxina muy potente que actúa como superantígeno.

Staphylococcus epidermidis

Las características generales de *Staphylococcus epidermidis* son las descritas para el género (véase página 22). El género *Staphylococcus* incluye actualmente 42 especies diferentes. Algunas de ellas forman parte de la flora microbiana normal de piel y mucosas en humanos y otras se encuentran sólo entre la flora de animales mamíferos y aves. Por lo general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el huésped que coloniza. Entre las especies que suelen colonizar al ser humano, las de mayor importancia clínica son: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus aureus*.

Clásicamente catalogado como una bacteria comensal no virulenta, es la especie más frecuente y persistente, y representa el 65-90% de los estafilococos que forma parte de la microbiota normal de la piel (saprofitos), la faringe, boca, vagina, uretra humana y en membranas mucosas. La colonización, en ocasiones con cepas adquiridas del personal sanitario, precede a la infección, alternativamente, la inoculación directa durante la cirugía puede iniciar la infección de las válvulas protésicas o de los dispositivos vasculares (Behrman y col., 2004). En personas sanas casi nunca causa infecciones; sin embargo, puede comportarse como patógeno en pacientes que tienen disminuidas las defensas, como son aquellos con enfermedades graves y especialmente los

pacientes inmunodeprimidos (pacientes leucémicos tratados con inmunosupresores, adictos a drogas parenterales, etc.) en quienes puede producir sepsis.

La mayoría de las infecciones que produce son de origen hospitalario en pacientes con dispositivos internos (catéter intravenoso: sepsis, fistulas e injertos para hemodiálisis: sepsis, derivaciones de LCR: meningitis, catéteres de diálisis peritoneal: peritonitis, cables y electrodos de marcapasos: infección del bolsillo del marcapasos, válvulas cardíacas protésicas: endocarditis, catéteres urinarios: pielonefritis, prótesis articulares: artritis, catéteres cerebrales), traumatismos quirúrgicos (osteomielitis esternal, endoftalmitis), inmunodeprimidos (neoplasias, granulocitopenia) y, rara vez, enfermedades adquiridas en la comunidad en pacientes sin enfermedad subyacente (infecciones urinaria, osteomielitis). Estas infecciones se producen mayoritariamente por inoculación del microorganismo durante la inserción del material protésico. Desde el foco de infección pueden diseminarse a la sangre originando cuadros de sepsis y endocarditis. Es una causa frecuente de infecciones nosocomiales e infección neonatal nosocomial (Behrman y col., 2004).

Como otros microorganismos de la piel, *Staphylococcus epidermidis* con frecuencia se encuentran como contaminantes en hemocultivos, invalidando los resultados del cultivo y pudiendo dar lugar a graves errores diagnósticos. (De la Rosa M. y col., 2003).

Debido a su baja virulencia, *Staphylococcus epidermidis* requieren la presencia de otro factor, como la inmunodepresión o la presencia de un cuerpo extraño, para desarrollar enfermedad clínica (Behrman y col., 2004).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen un sin número de microorganismos que se han vuelto resistentes, esto representa un grave problema de salud, el cual consiste en que las bacterias crean mecanismos de defensa frente a los antibióticos, con la consiguiente pérdida de acción de estos medicamentos y generar reacciones adversas en los pacientes. El uso y el abuso indiscriminado de antibióticos, es lo que ha facilitado para que las bacterias produzcan estos mecanismos de resistencia.

Las plantas medicinales podrían representar un tratamiento alternativo en caso de enfermedades contagiosas e infecciosas. Ellas pueden ser también una fuente para nuevos antibióticos a los cuales los microorganismos no sean resistentes. Los extractos de plantas medicinales por lo general no presentan efectos colaterales por lo que su uso es más tolerado.

Existe la necesidad de realizar investigaciones para buscar alternativas de nuevos antibióticos que nos permitan solucionar este problema, por lo que el estudio de aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (Limonaria) y *Allium sativum* podrían ser útil para encontrar este fin.

Entonces, ¿Tienen efecto antimicrobiano los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (ERILIM) y de *Allium sativum* (Extracto del ajo)? Las evidencias de los trabajos de investigación realizados en todo el mundo y la utilización milenaria en las civilizaciones más importantes pueden demostrar que sí lo es, pero en la actualidad ya no es posible especular, por ello se realizó la investigación con 9 cepas específicas de microorganismos, dado que el universo de microorganismos es tan vasto y que año tras año van mutando es necesario seguir identificando contra cuáles sí es efectiva o no lo es la utilización de estos aceites esenciales antes mencionados.

HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Allium sativum* tienen efecto antibacteriano contra *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* (13076, Microbiologics), *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Comprobar la eficacia bactericida de *Cymbopogon citratus* y *Allium sativum* en 9 especies de microorganismos.

- **Objetivos particulares.**

1. Evaluar el efecto inhibitor del *Cymbopogon citratus* (ERILIM) en 9 especies de microorganismos
2. Evaluar el efecto inhibitor del *Allium sativum* (Extracto de Ajo) en 9 especies de microorganismos
3. Comparar el efecto inhibitor entre *Cymbopogon citratus* (ERILIM) y *Allium sativum* (Extracto de Ajo) en las 9 especies de microorganismos
4. Comparar el efecto inhibitor de compuestos orgánicos contra compuestos sintéticos en las 9 especies de microorganismos
5. Identificar cual de las 9 especies de microorganismos tuvo mayor resistencia a los diferentes compuestos utilizados

METODOLOGÍA

El método de estudio es cuantitativo y comparativo.

El estudio lo realizamos en el Laboratorio de Docencia de Biología Celular y Molecular; a cargo del MC. Sergio Álvarez Barajas., en el edificio L, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los microorganismos que empleamos para este estudio fueron los siguientes:

Helicobacter pylori, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* (13076, Microbiologics), *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Las cuales nos fueron proporcionados por el Laboratorio de Docencia de Biología Celular y Molecular, además de la colaboración de la gastroenteróloga Teresa González García (*Helicobacter pylori*) y de la Doctora Josefina Casas Solís.

Las cepas fueron inoculadas (por triplicado) en tubos con caldo nutritivo usando la técnica de Macfarland (se describe en anexos), para cada género, las incubamos en estufas bacteriológicas a una temperatura de 37° C por 24 horas, excepto las cepas de *Helicobacter pylori*, las introducimos en un frasco de anaerobiosis, de acuerdo a los requerimientos propios de la bacteria.

Tabla 2. Relación de cepas de microorganismos y medios de cultivo utilizados para su mantenimiento.

CEPAS	AGAR
<i>Helicobacter pylori</i>	Agar sangre/chocolate
<i>Escherichia coli</i>	Eosina Azul de Metileno (EMB)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Agar Salmonella y Shigella (ASS)
<i>Proteus mirabilis</i>	Agar Verde Brillante (AVB)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Eosina Azul de Metileno (EMB)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Sal y Manitol (MAS)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Agar Sal y Manitol (MAS)
<i>Serratia marcescens</i>	Eosina Azul de Metileno EMB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Nutritivo

El extracto de ajo lo extrajimos en el Laboratorio de Inmunobiología, del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Guadalajara, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). La extracción la realizamos de ajo fresco (100grs) y el método utilizado fue tintura alcohólica o extracción orgánica, se realiza dejando los dientes de ajo en alcohol etílico o etanol, la porción es 3 partes de alcohol (70ml) por una parte de agua (30ml). Después se filtro la mezcla con una gasa estéril en un recipiente limpio. La purificación se realizó por destilación al vacío, la dejamos reposar durante dos meses. En el caso del aceite esencial *Cymbopogon citratus* (ERILIM) es de uso comercial, fue proporcionado por MVZ Jorge Alvarez Ousset (CUCBA). El aceite esencial de *Allium sativum* tiene una concentración de 100%, y en el caso de *Cymbopogon citratus* esta al 97%.

Cada cepa la sembramos en dos ocasiones por triplicado con 6 discos de papel filtro impregnados con los compuestos a probar. Después la volvimos a sembrar en dos ocasiones por duplicado. Y por último en cada caja de Petri hicimos la siembra de cada cepa utilizada y la dividimos en dos únicamente. La primera siembra la realizamos para observar el halo de inhibición de cada compuesto utilizado, encontrándose disparidad en uno o dos de las replicas, al no ser homogéneos los resultados se pensó que habían sido mal sembrados. Por otro lado, algunos de los compuestos utilizados como son el aceite esencial de

Cymbopogon citratus y Amoxicilina, siendo los de mayor efectividad, acaparaban el espacio de los otros compuestos, siendo imposible la lectura de inhibición de los compuestos afectados. En el caso de *Salmonella enteritidis* constatamos, en la segunda siembra, que la cepa estaba muerta por lo que se tuvo que volver a conseguir y a sembrar para la lectura de los halos de inhibición. En la última siembra de cada cepa, dividimos en dos la caja de Petri y en cada mitad colocamos un disco de papel filtro con los diferentes compuestos para así obtener los halos de inhibición con mayor claridad.

Tabla 3. Compuestos que colocamos en cada disco de papel filtro:

Discos	Compuestos orgánicos
1	Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>
2	Aceite esencial de <i>Allium sativum</i>
Compuestos sintéticos	
3	Agua bidestilada estéril (testigo negativo)
4	Eritromicina
5	Amoxicilina
6	Vetericyn

Método de difusión con disco en agar

Las bacterias que utilizamos en el estudio las inoculamos sobre la superficie de una placa de agar Müeller-Hinton. Posteriormente colocamos sobre la superficie del agar discos de papel de filtro impregnados con cantidades estandarizadas de agentes antimicrobianos (Tabla 4). Luego del periodo de incubación medimos el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos (Figura 1). Mediante el uso de tablas de referencia, preparamos un reporte cualitativo (sensible, intermedio o resistente).

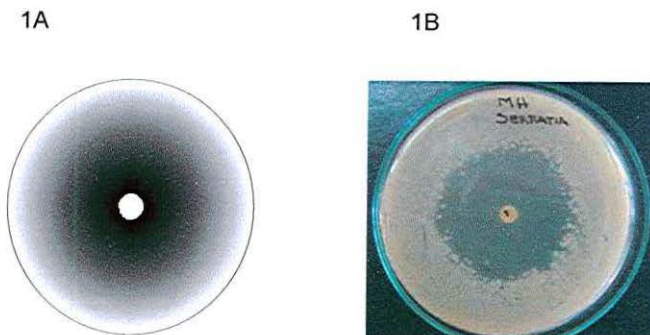


Figura 1. Distribución microbiana y halo de inhibición.

Fuente: 1A: netropica.org/bacteriologia/DifusionKB.pdf, 2005;

1B: María Fernanda Goytia Acevedo, 2009.

Principio de la técnica de difusión con disco en agar. La concentración del antibiótico decrece conforme mayor sea la distancia desde el borde del disco (A). En el área en donde la concentración del antibiótico sea insuficiente para inhibir el crecimiento, se observará un margen a partir del cual ocurrirá un crecimiento confluyente (B)

(<http://www.netropica.org/bacteriologia/DifusionKB.pdf>, 2005).

Procedimiento

1. Permitimos que las placas de agar Müller-Hinton y los discos alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlos
2. Preparamos una suspensión de caldo nutritivo a partir de un cultivo fresco. Utilizamos esta suspensión para inocular las placas de agar Müller-Hinton antes de 15 minutos
3. Introducimos la torunda de algodón en la suspensión y rotándola contra las paredes internas del tubo para remover el exceso de inóculo

4. Inoculamos con la torunda la superficie del agar en tres direcciones, rotando la placa aproximadamente 60° entre las inoculaciones. Utilizamos una torunda por cada placa de medio
5. Permitimos que el inóculo sobre la superficie del medio de cultivo se seque antes de aplicar los discos. La aplicación de los discos se debe hacer **luego de 3 minutos y antes de 15 minutos** de inoculada la placa
6. Aplicamos los discos a la superficie del medio de cultivo utilizando pinzas:
 - No debemos colocar más de 6 discos en las placas que tienen 90 mm de diámetro y la distancia entre los centros de los discos no debe ser menor a 25 mm

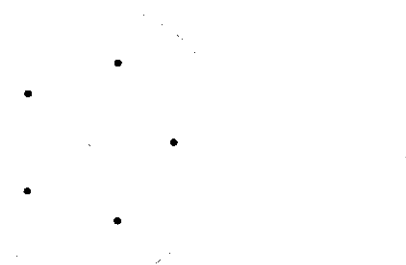


Figura 2. Posición de los discos de papel de filtro en la caja de Petri.

- Una vez colocados, presionamos levemente cada uno de los discos para que se adhieran a la superficie del agar
 - Una vez colocados los discos, las placas deben ser colocadas en la incubadora antes de 15 minutos
7. La incubación la debemos efectuar a 37°C por 24 horas
 8. Realizamos la lectura de la prueba mediante determinación del diámetro de la zona de inhibición (incluyendo el diámetro del disco):
 - Colocamos la placa sobre una superficie negra pero bien iluminada (luz directa a 45°), con el fondo hacia arriba y la tapa hacia abajo. En el caso de los medios de cultivo opacos (agar Müeller-Hinton suplementado con

sangre), colocamos la placa con el fondo hacia abajo y removimos la tapa para realizar la lectura

- Medimos el diámetro de inhibición con una regla milimétrica al milímetro más cercano

Reporte

- Interpretamos los diámetros de la zona de inhibición de acuerdo a los criterios dados en la tabla adjunta y reportamos los resultados

Tabla 4. Sensibilidad bacteriana a los antibióticos de acuerdo con el diámetro de los halos de inhibición

ANTIBIOTICO	CONCENTRACION	Diámetro del halo de inhibición (mm)			
		RESISTENTE	INTERMEDIO	MEDIANAMENTE SENSIBLE	SENSIBLE
ERITROMICINA	15µg	< 13	14 a 17		> 18
AMOXICILINA	5 - 8µg	< 5	6 a 7		> 8

En el caso del Vetericyn, al ser un desinfectante no contamos con la sensibilidad bacteriana de acuerdo a los halos de inhibición de un antibiograma.

Para el análisis estadístico utilizamos el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 en donde obtuvimos análisis de varianza (ANOVA), desviación estándar (σ), media (\bar{X}), rangos mínimos y máximos y la significancia. Así mismo obtendremos gráficos de barra, caja y bigote e histogramas. Los cuales analizamos para conocer los efectos de cada compuesto en las diferentes cepas y obtener el de mejor eficacia bactericida.

RESULTADOS

La inhibición microbiana del compuesto orgánico *Cymbopogon citratus* (ERILIM) se presenta en la figura 3. *Pseudomona aeruginosa* presento una mayor sensibilidad al compuesto, con halos de inhibición de 42.43 ± 1.27 mm, seguida de *Staphylococcus epidermidis* con 32 ± 10 mm y con menor resistencia se encontraron *Escherichia coli* con un halo de inhibición de 11.14 ± 2.79 mm y *Klebsiella pneumoniae* con 8.14 ± 0.38 mm.

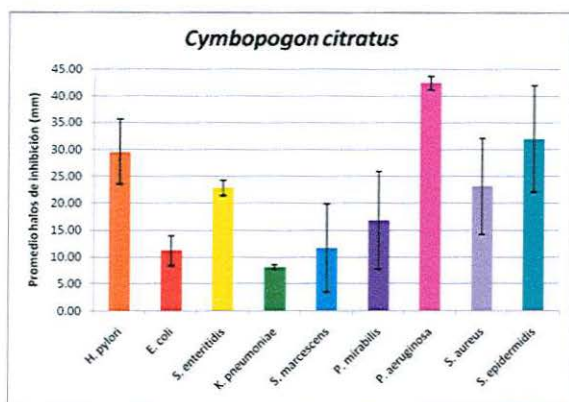


Figura 3. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*.

En la figura 4 se presenta la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Allium sativum*. Se observó que *Helicobacter pylori* mostró mayor halo de inhibición con 16 ± 0.82 mm, seguida de *Salmonella enteritidis* con 12.71 ± 2.29 mm, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentaron un halo de inhibición de igual tamaño con 9 ± 1.63 y 9 ± 2.77 mm; por otro lado *Pseudomonas aeruginosa* es la que menos resistencia mostró frente a este compuesto orgánico con 6 ± 0.58 mm. Los microorganismos restantes tienen un halo de inhibición entre 7.29 y 6.43 mm.

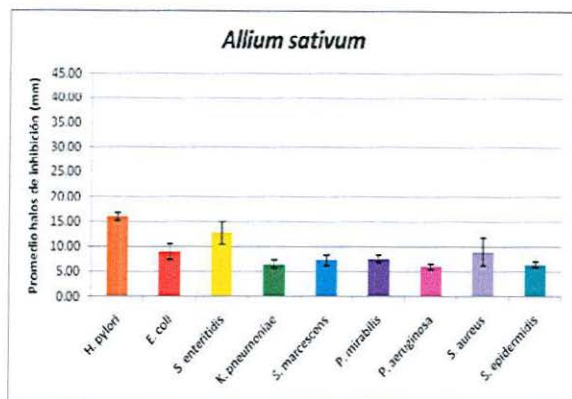


Figura 4. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por el aceite esencial de *Allium sativum*

En la figura 5 se muestra la inhibición microbiana por Eritromicina. *Staphylococcus epidermidis*, fue el que presentó mayor zona de inhibición con 21.57 ± 8.46 mm, seguido por *Pseudomonas aeruginosa* con 19 ± 8.21 mm. Los microorganismos que tuvieron menor resistencia al compuesto fue *Escherichia coli* con un halo de inhibición de 5.29 ± 0.49 mm (siendo el dato más bajo de todo el estudio), *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus* con 6.14 ± 0.90 y 6.14 ± 0.69 mm respectivamente.

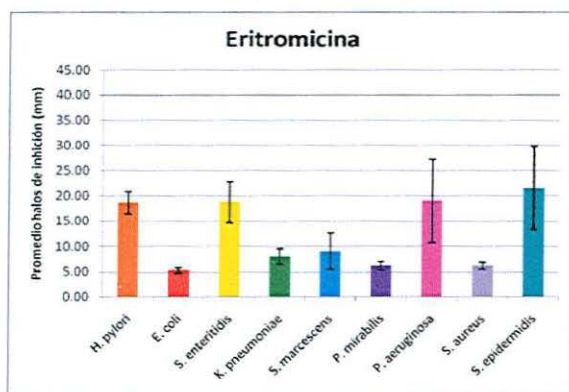


Figura 5. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por Eritromicina

En la figura 6 *Escherichia coli* al igual que en el compuesto anterior (figura 5), presentó halos de inhibición de menor diámetro con respecto al resto de las bacterias analizadas (5.86 ± 0.69 mm), resultando la menos susceptible a Eritromicina y Amoxicilina. Por otro lado *Helicobacter pylori* presentó un halo de inhibición de mayor diámetro con 28.57 ± 4.39 mm, muy similar que con el compuesto orgánico de *Allium sativum* (figura 4). *Pseudomonas aeruginosa* muestra un halo de inhibición de 28 ± 1.15 mm, seguida de *Proteus mirabilis* con 22.43 ± 1.40 mm.

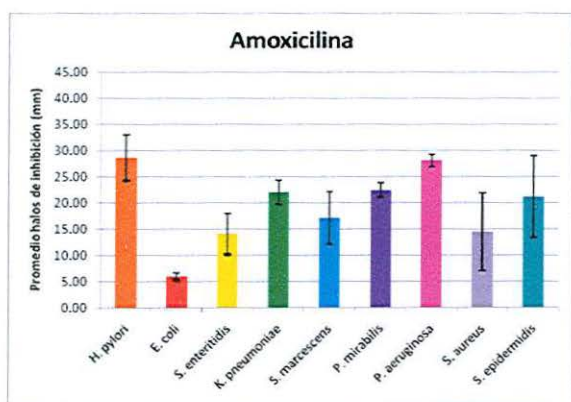


Figura 6. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por Amoxicilina

En la figura 7 se observa que la bacteria mayormente afectada por Vetericyn en su crecimiento fue *Pseudomonas aeruginosa* con 16.71 ± 7.74 mm, este mismo comportamiento lo mostró con *Cymbopogon citratus* (aunque mayor con este compuesto con 42.43 ± 1.27 mm, figura 3). La segunda bacteria más afectada fue *Staphylococcus epidermidis* con un halo de inhibición de 12.43 ± 7.89 mm, seguida de *Helicobacter pylori* con 8.57 ± 0.98 mm. Las bacterias menos afectadas fueron *Escherichia coli* con 7.29 ± 0.76 mm y *Staphylococcus aureus* con 6.57 ± 0.53 mm.

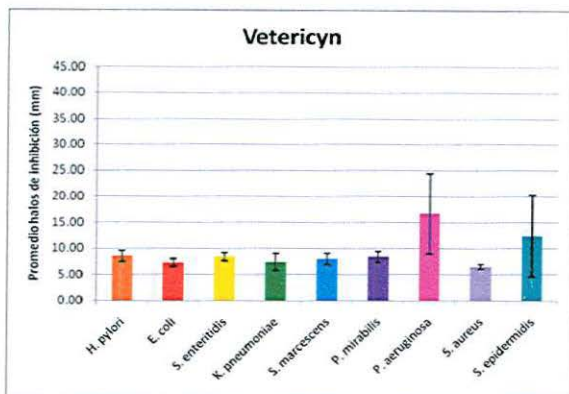


Figura 7. Promedio de halos de inhibición de crecimiento de 9 bacterias por Vetericyn

Identificamos cual de las 9 especies de microorganismos tuvo mayor resistencia a los diferentes compuestos utilizados, siendo *Escherichia coli* seguida de *Klebsiella pneumoniae* (figura 8).

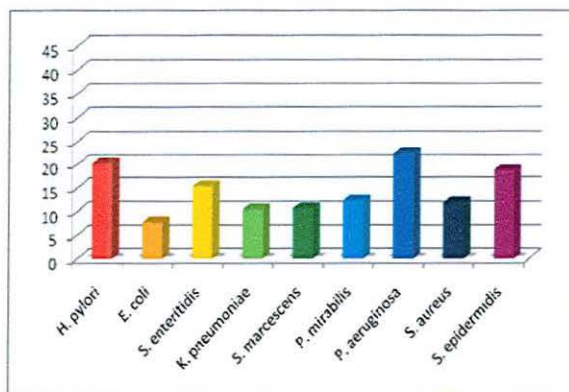


Figura 8. Comparación entre las 9 especies de microorganismos con los compuestos utilizados.

Comparando los 2 compuestos orgánicos, observamos que *Cymbopogon citratus* (ERILIM) tuvo mayor efecto inhibitor que *Allium sativum* (Extracto de Ajo) en todos los microorganismos utilizados. De igual manera se compararon los compuestos orgánicos con los compuestos sintéticos. En donde *Cymbopogon citratus* fue el que presentó un mejor efecto inhibitor en todas las bacterias, seguido de Amoxicilina y Eritromicina (figura 9).

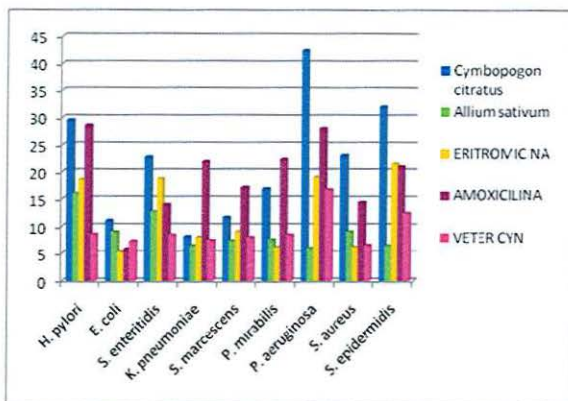


Figura 9. Comparación entre compuestos orgánicos y compuestos sintéticos.

Como era de esperarse, el agua bidestilada estéril (testigo negativo) no presentó ninguna inhibición a los microorganismos utilizados en el estudio, permitiendo el crecimiento y reproducción de cada uno, en todas las pruebas realizadas.

Componentes principales

Una vez obtenido los resultados fueron analizados en el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 donde obtuvimos los componentes con mayor eficacia bactericida, se analizaron los cinco compuestos utilizados en el estudio: *Cymbopogon citratus*, *Allium sativum*, Eritromicina, Amoxicilina y Vetericyn.

Tabla 5. Principales Componentes Analizados

Componentes	Datos evaluados	Varianza	Porcentaje acumulado
<i>Cymbopogon citratus</i>	2.48107	49.621	49.621
<i>Allium sativum</i>	1.0422	20.844	70.465
Eritromicina	0.658005	13.160	83.625
Amoxicilina	0.464266	9.285	92.911
Vetericycyn	0.354463	7.089	100.000

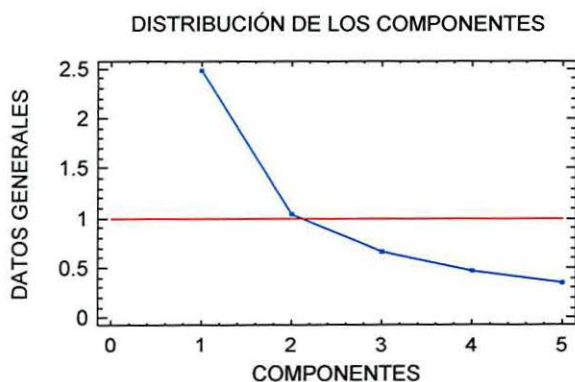


Figura 10. Distribución de los componentes

Los 2 compuestos naturales (*Cymbopogon citratus* y *Allium sativum*), representan un 70.46% de valores propios mayores o igual a 1,0. Juntos representan la variabilidad de los datos originales.

DISCUSIÓN

Los 9 microorganismos demostraron ser resistentes a la acción del testigo negativo (agua bidestilada estéril).

Los 3 componentes sintéticos (Eritromicina, Amoxicilina y Vetericyn) agrupan el 30% de los datos analizados, se identificó una menor capacidad de inhibición del crecimiento microbiano por Eritromicina y Vetericyn en comparación con Amoxicilina en mayoría de bacterias estudiadas, lo que indica que algunos de los microorganismos fueron medianamente resistentes a estos, como se observa en la tabla 5 y en la figura 11. El 70% de los datos corresponden a los 2 aceites esenciales *Cymbopogon citratus* y *Allium sativum* que concentran 22 datos de halos de inhibición, en donde el 20.8% corresponde a *Allium sativum* y el 49.6% a *Cymbopogon citratus*, lo que nos indica que el *Cymbopogon citratus* (ERILIM) es el que presenta halo de inhibición mayor, por lo tanto es el más eficaz contra los 9 microorganismos utilizados, siendo más relevante su efecto contra *Pseudomonas aeruginosa*, le sigue *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enteritidis* y *Helicobacter pylori* con el mismo promedio de halo de inhibición (Figura 3 y 5). Estos resultados coinciden con los mencionados por Raman (1995).

La acción bactericida de *Cymbopogon citratus* es debida a su propiedad liposoluble, esta molécula pasa a través de la pared y membrana celular bacteriana, rompe estas estructuras y la bacteria muere, así mismo, puede romper sitios activos del ADN y RNA.

Por lo anteriormente expuesto es significativo mencionar y por su importancia en la salud ambiental y humana que la *Pseudomonas aeruginosa* es potencialmente patógena para el hombre, entre los efectos nocivos que le produce es el daño tisular y al sistema inmune, el *Staphylococcus epidermidis* causa también daño tisular severo. También es relevante mencionar que el *Cymbopogon citratus* (ERILIM) combate a 2 enterobacterias extremadamente

patógenas como son la *Salmonella enteritidis* causante de la tifoidea y la *Helicobacter pylori*, bacteria que provoca la gastritis, enfermedad que padece más del 95% de la población mundial.

El uso del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (ERILIM) se sugiere por vía oral, para las 7 especies de la familia *Enterobacteriaceae* que se utilizaron en este estudio y para *Staphylococcus aureus*, y de forma cutánea para *S. epidermidis*.

De manera substancial el *Allium sativum* (extracto de ajo) inhibió el crecimiento bacteriano de 2 enterobacterias sumamente patógenas como son *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* que provoca una de las enfermedades entéricas más mortales, y el halo de inhibición mayormente significativo lo presento la *Helicobacter pylori*, como lo hemos mencionado en los párrafos anteriores esta bacteria es inhibida por los 2 aceites esenciales utilizados en este trabajo de tesis (ver Figura 3 y 4). Los resultados obtenidos con *Allium sativum* coinciden con los mencionados por Barros (1993) y Fernández y col. (1999).

La acción bactericida de *Allium sativum* es la misma mencionada para *Cymbopogon citratus*.

El uso de *Allium sativum* (extracto de ajo), se recomienda que sea por vía oral, como lo hemos citado con anterioridad, las bacterias que inhibe producen enfermedades gastrointestinales.

Este tipo de estudios se hacen necesarios para destacar el tratamiento de diversos padecimientos en la medicina tradicional, este hecho ha atraído el interés de investigadores y médicos especialistas para su utilización ya no solamente como una alternativa sino como primera opción de tratamiento.

Las plantas aportan una gran cantidad de compuestos químicos con carácter antimicrobiano, algunos de los cuales muestran una actividad *in vitro* comparable a la de los antimicrobianos utilizados.

El arsenal terapéutico del reino vegetal es incalculable, ya que hasta el momento se conoce un porcentaje muy pequeño de los compuestos naturales procedentes de las plantas.

Los estudios relacionados a la resistencia e inhibición de los microorganismos ante la presencia de antimicrobianos son excelentes referencias para darle continuidad a este trabajo de investigación.

CONCLUSION

De los 6 componentes utilizados en el estudio, 2 son de origen natural: *Cymbopogon citratus*, *Allium sativum*; 3 son de origen sintéticos: Eritromicina, Amoxicilina y Vetericyn.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* demostró mayor eficiencia que los compuestos sintéticos al inhibir el crecimiento de los microorganismos, los cuales mostraron menor resistencia a este compuesto natural.

El aceite esencial de *Allium sativum* mostró mayor eficiencia en la inhibición de *E. coli* en comparación con todos los antibióticos convencionales estudiados y el comportamiento es igual que ellos, excepto con Amoxicilina, en inhibición de los demás microorganismos.

Estas sustancias pueden ser utilizadas directamente o como base para la síntesis de nuevos principios útiles en el tratamiento de las infecciones.

BIBLIOGRAFIA

Adams M. R. and Moss M. O., 1995. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia. 175-181, 241-251.

Aguilar, A.; Camacho, J.R.; Chino, S., Jáquez P. y López M.E., 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Primera Edición. Dr. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 106-108.

Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, 2005. Plantas Medicinales. Barcelona. Pharma Editores.

Barros, S.T.; Oliveira N.T. & Maia, L.C., 1993. Efeito do estrato de bulbo de alho, (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinacao de conidios de alguns fungos fitopatogénicos. Fitopatologia Brasileira, Brasilia, v.18 (Suplemento) agosto. 302.

Behrman R., Kliegman R., Jenson H., 2004. Tratado de Pediatría de Nelson. 17° edición. Ed. Elsevier España. 886.

Berdonces JL, 2001. Gran enciclopedia de las plantas medicinales. El Dioscórides del siglo XXI. Barcelona. Tikal ediciones.

Bergen, G.A., & J.H. Shelhamer, 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. Infect. Dis. Clin. North Am. 10: 297-325.

Berthelot P., Grattard F., Amerger C., et al, 1999: Investigation of a nosocomial outbreak due to *Serratia marcescens* in a maternity hospital. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 20:233.

Boatto G., Pintore G., Palomba M., De Simone F., Ramundo E., Todice G., 1994. Composition and antibacterial activity of *Inula helenium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Fitoterapia*. 3:279-280.

Bopp CA, Brenner FW, Wells JG and Strockbine NA, 1999. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: Patrick R Murray, Ellen Jo Baron, Michael A Pfaller, Fred C Tenover and Robert Ia Yolken. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition. ASM Press, Washington, DC. 459-474.

Boulos L, 1983. *Medicinal Plants of North Africa*. Michigan. Reference Publications, Inc.

Brenner D. J., 1984. Facultatively anaerobic gram-negative rods', Krieg, N. R. and Holt, J. C. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (vol.1) Baltimore: Williams and Wilkins. 408-516.

Britigan, B.E., T.L. Roeder, G.T. Rasmussen, D.M. Shasby, M.L. McCormick, & C.D. Cox, 1992. Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radicals and causes synergistic damage to endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 90: 2187-2196.

Cahn, C. and Loudon K., 1998. Activity of tea oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*. 39(3):244-245.

Carmona, O., Gómez, M. J.; Montes, T.; Marcano, C. y Mariño, F., 1997. *Microbiología Médica de Divo*. Mc Graw-Hill Interamericana, 5^o Ed. México.

Conner, D. E., Beuchat, L. R., Worthington, R. E. and Hitchcock, H. L., 1984. Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 1:63- 74.

Costerton, J.W., 1980 *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.15-24.

Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber & G. James, 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176: 2137- 2142.

Cox, C.D., 1986. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun.* 52: 263-270.

D'Argenio, D.A., Gallegher, L.A., Berg, C.A. and Manoil C., 2002. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.* 183: 1466-1471.

De la Rosa M., Prieto J., 2003. *Microbiología para Ciencias de la Salud, Conceptos y Aplicaciones*. 2da edición. Elsevier España. 72-75.

Demetriou C.A., Cunha B.A., 1999. *Serratia marcescens* bacteremia after carotid endarterectomy and coronary artery bypass grafting. *Heart Lung.* 28 (4): 293.

Demo A., Petrakis C., Kefalas P., and Boskou D., 1998. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Res. Int.* 31, 351-354.

Dorronsoró I, Sarasqueta R, Perfecto B y González AI., 1996. Epidemiología de las gastroenteritis por *Salmonella* *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 14: 604-607.

Döring, G., Maier, M., Müller, E., Zoubair, B., Tümmler, B. & Kharazmi, A., 1987. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother.* 39: 136-148.

Drasar BS Hill MJ., 1974. *Human intestinal flora*. Academic Press, London, UK.

Dukes JA, Ayensu ES, 1985. Medicinal Plants of China. 2 vols. Michigan. Reference Publications, Inc.

Dupont H., 1995. *Shigella* species (Bacillary dysentery). En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of Infectious Diseases. 4ª ed. Churchill Livingstone, New York. 2033 - 2039.

Duraffourd C., D'hervocourt L., Lapraz JC., 1986. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1ª edición. Barcelona, España: Edit. Masson S.A.

Ewing WH., 1985. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th. Edition, Elsevier.

Fahn A., 1978. Anatomía Vegetal. H. Madrid, España: Blume Ediciones.

Fauci- Braunwald- Isselbacher-Wilson- Martin- Kasper- Hauser- Longo. Harrison, 1998. Principios de medicina interna. 14ª edición vol.I Mc graw-hill-interamericana. España, S.A.V. 1073-1074.

Fernández C, Guzmán A, Fernández AM, Camacho AM, 1999. Plantas medicinales y útiles en la Península Ibérica. Jaén. Herbario Jaén.

Fernández E.E., 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. 7, 10, 746, 789.

Ferreraz R., 1996. Medicina Interna. Mosby/Doyma libros. 13ª edición. México. 2289-2295.

Fleisher F., Zimmerman-Baer U., Zbinden R., et al, 2002: Three Consecutive Outbreaks of *Serratia marcescens* in a Neonatal Intensive Care Unit. Clin. Infect. Dis. 34: 767.

Flores M.M.A., Noviembre 2003. Agua superoxidada- Protocolo de Aplicación Odontológica Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán. <http://www.odontologia-online.com/cgi->

Freeman B., 1989. Microbiología de Burrows. Interamericana/McGraw-Hill. 22^o edición. México. 526-532.

Gara, E. A., Hill, D. J. and Maslin, D. J., 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Applied and Environmental Microbiology. 66:2269-2273.

García del Portillo F., 2000. Molecular and celular biology of *Salmonella* pathogenesis: 3-49. In: Microbial Foodborne Diseases. Cary, J.W., Linz J.E. and Bhatnagar, D. (Eds) Technomic Pub. Co. Pennsylvania, USA.

García M. P., Paredes S. F., Fernández B.M.T., 1994. Microbiología clínica práctica. Ed. Servicio Publicaciones UCA, Cádiz. 183.

George, R.H., 1987. *Pseudomonas* infection in cystic fibrosis. Arch. Dis. Child. 62: 438-439.

Govan, J.R. W. & V. Deretic, 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev. 60: 539-574.

Guerra-Ordóñez M., Rodríguez-Jorge C.M., García-Simón G. y Llerena Rangel C., 2004. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Rev Cubana Plant Med. 9(2).

Gupta, M.P. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Editor Mahabir P. Gupta. Ph. D CYTED-SECAB. Ciencia y Tecnología No. 55. Impreso en Colombia. Santafé de Bogotá D.C. –Colombia. 308-309.

Gutierrez J.H., Jofré A., Villena F., 1990. Scanning electron microscopic study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 69: 491-501.

Hacker, J., G. Blum Oehler, I. Mueldorfer & H. Tschaepé, 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23: 1089-1097.

Haddy R.I., Mann B.L., Nadkarni D.D., Cruz R.F., Elshoff D.J., Buendía F.C., Domers T.A., Oberheuer A.M., 2000. Nosocomial *Serratia marcescens* infections associated with extrinsic contamination of liquid nonmedicated soap. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 21 (3): 196-9.

Hardalo, C. & S. C. Edberg, 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.

Ingraham J.L., Ingraham C. 1998. Introducción a la microbiología. Vol. 2. Ed. Reverte. Barcelona. 533.

International Commission of Microbiological Specifications for Food (ICMSF), 1980. Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol. 2 productos alimenticios. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 696-697.

Jain SK, DeFilippis R, 1991. Medicinal Plants of India. 2 vols. Michigan. Reference Publications, Inc.

Jones, F. A., 1996. Herbs-useful plants. Their role in history and today. European journal of Gastroenterology and Hepatology. 8:1227-1231.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2(2):123-140.

Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z. G., and Mavragani-Tsipidou P., 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils, J. Agric. Food. Chem. 46, 1111-1115.

Kotloff K.L., 1999. Bacterial diarrheal pathogens. Adv. Pediatric Infect. Dis. 14: 219-267.

LaBrec E., H. Schneider, T. Magnani, y S. Formal, 1964. Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. J. Bacteriol. 88: 1503- 1518.

Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S., and Boskou D., 1993. Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. Z. Untersuch. Forsch. 197, 20-23.

Lawless, J., 1995. The illustrated encyclopedia of essential oils. Element Book.63 - 67.

Le Minor L. and Popoff M., 1987. Designation of *Salmonella* Enteritica sp. Nov., Nom. Rev., as the type and species of the genus *Salmonella*. International Journal Systems Bacteriology. 37:465-468.

Lock de Ugaz O., 1988. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker, 1997 Brock Biology of Microorganisms, Eighth edition. Prentice Hall. New Jersey. 698-701.

Maier, M.R. & Soberón-Chávez, G., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 625-633

Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., 2006. Enfermedades infecciosas, Principios y práctica, Vol.2. Sexta edición. Elsevier España. 2579.

Martinez, A. & Soberón-Chávez G., 2001. Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* IGB83. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 731-735.

Miller, R. M., 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metalcontaminated soils. Environ. Health Perspect. 103(Suppl): 59-62.

Misch C.E., 2009. Implantología Contemporánea. 3ª edición. Elsevier España. 470.

Murray P.R., M. A. Pfaller, 2006. Microbiología Médica. 5º edición. Elsevier España. 357-366.

Nataro JP, Kaper JB., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142- 201.

Neidhardt FC., 1999. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington.

Nicas, T. I., & B. H. Iglewski, 1985. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol. 31: 387-392.

Nikaido, H., 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:516-523.

Nikaido, H., H. Okusu, D. Ma, & X.-Z. Li, 1996. Multidrug efflux pumps make a major contribution to drug resistance in *Pseudomonads*. In: *Molecular biology of Pseudomonads*. T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas and S. Silver (eds.) ASM Washington DC. 353-362.

Osorio C. R., 2001. *Entender y atender la enfermedad*. Primera edición. CIESAS. México. 94.

Pace, N. R., 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 139-144.

Pascual A. M., 2005. *Enfermedades de origen alimentario*. Ed. Díaz de Santos. España. 24-26.

Pahissa A., 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1era edición. Sant Andreu de la Barca, Barcelona. 15-17, 24, 152.

Pier, G.B., 1985. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* 151: 575-580.

Popoff MY, Bockemühl J and Hickman-Brenne FW., 1997. R Supplement (n° 40) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* 148: 811-814.

Pumarola A., Pumarola Busquets A., 1987. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2da edición. Elsevier España. 444-445.

Rahme, L. G., M. W. L. Le, S. M. Wong, R. G. Tompkins, S. B. Calderwood, F. M. Ausubel, 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 13245-13250.

Raman, A. Weir, U. and Bloomfield S., 1995. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. Letter in Applied Microbiology. 21(4):242-245.

Restrepo MA, 2003. Enfermedades infecciosas. Editor Corporación para Investigación Biológica. 449, 453.

Rodríguez B., 1993. El cultivo de las plantas medicinales. Centro de información y Documentación Agropecuaria.

Rodríguez D C, Tauxe R V, Rowe B., 1990. International increase in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic? Epidemiol Infect. 105: 21-7.

Roig J.T., 1988. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Ciencia y Técnica. Instituto del Libro. La Habana, Cuba. 261-263.

Rojas-Hernández C.N.M., Matos-Aguilera M. y Romeu-Álvarez B., 2004. Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav., Universidad de La Habana, Rev Cubana Plant Med. 9 (2).

Ross, Z. M., Gara, E. A., Hill, D. J., Sleightholme, H. V. and Maslin, D. J., 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic sulfides and garlic powder. Applied and Environmental Microbiology. 67:475-480.

Salyers A.A and Whitt D.D., 2001. *Shigella*. In: Bacterial Pathogenesis: A molecular approach. 2 ed. American Society for Microbiology.

Santamarina S.M.P., García F., Vilella V., Roseiló J., 2004. Biología y botánica: Tomo I. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. 21.

Schaberg D., Culver D. & Gaynes R., 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Amer.J.Med. (suppl.3B): 72S.

Schaeffer T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S. & Fall, R. R., 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 38: 742-746.

Selkon J.B., Babb J.R., Morris R., 1999. Evaluation of the antimicrobial activity of a new super- oxidized water, Sterilox®, for the disinfection of endoscopes. *J Hosp Infect.* 41: 59-70.

Seth, G.; Kikate, C.K., 1976. Effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf on essential central nervous system, Indian - *J. Exp. Biol.* 14(3):370-371.

Seymour, R., 2003. Additional properties and uses of essential oils. *Journal of Clinical Periodontal.* 5:19-21.

Shetty N., Srinivasan S., Holton J., Ridgway G.L., 1999. Evaluation of microbicidal activity of a new disinfectant: Sterilox® 2500 against *Clostridium* difficult spores, *Helicobacter pylori*, vancomycin resistant *Enterococcus* species, *Candida albicans* and several *Mycobacterium* species. *J Hosp Infect.* 41: 101-105.

Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg & J. Welsh, 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 917: 552-555.

Soberón-Chávez G. & B Palmeros, 1994. *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol.* 20: 95-105.

Spicer WJ, 2009. *Microbiología Clínica y enfermedades infecciosas*. Elsevier España. 48-49.

Stover, C.K., X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Miizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, I.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R.E.W. Hancock, S. Lory, & M.V. Olson, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 406: 959-964.

Strasburger E., Noll E., Schenk H., Schimper Y., 1978. *Tratado de Botánica*. 7ª edición. Barcelona, España: Ediciones Marín.

Suerbaum S, Michetti P., 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 347:1175-1186.

Tan M.-W. & F. M. Ausubel, 2000. *Caenorabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 29-34.

Tauxe R. T., 1991. *Salmonella* pathogen. *Journal of Food Protection.* 54:663-568.

Trias, J. & H. Nikaido, 1990. Diffusion of antibiotics via specific pathways across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. In: .S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (Ed) *Pseudomonas: Biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology* ASM Press, Washington, D. C. 319-327.

Tsao, S. M. and Yin M., 2001. In vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *Journal of Medicine Microbiology*. 50:646-649.

Vanaclocha B, Cañigueral F., 2003. *Fitoterapia. Vademécum de Prescripción*. Barcelona. Masson.

Vokou D., Varelzidou S., and Katinakis P., 1993. Effects of aromatic plants on potato storage-sprout suppression and antimicrobial activity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 47, 223-235.

Wendtt C., Herwaldt L., 1997. Epidemics: Identification and management. En *Prevention and Control of Nosocomial Infections*. Wenzel R. Ed. Third edition. Williams & Wilkins.190-2.

Winfield MD, Groisman EA., 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*.69 (7):3687-3694.

Woese, C. R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Woolf Neville, 1998. *Pathology: basic and systemic*. Elsevier Health Sciences. 457

World Health Organization, 2004. *Guidelines for Drinking-water Quality: Recommendations*. 3era edicion. 232.

Yu W.L., Lin C.W., Wang D.Y., 1998. *Serratia marcescens* bacteremia: clinical features and antimicrobial susceptibilities of the isolates. *J Microbiol Immunol Infect.* 31(3):171-9.

Páginas en internet

Álvarez M.M., García D.P., 2002. Ámbito Farmacéutico Farmacología, Vol. 21 Núm. 2 Febrero, publicación electrónica.

<http://external.doyma.es/pdf/4/4v21n02a13026500pdf001.pdf>

Álvarez O.J.A., 2008. Centro de Investigación y Desarrollo de Alternativas Naturales (C.I.D.A.N), publicación electrónica.

<http://www.erilim.com.mx>

Antibioticoterapia, 2006, publicación electrónica.

<http://www.antibioticoterapia.com/modules>

Asociación Argentina de Fitomedicina, 2005, publicación electrónica.

<http://www.plantamedicinales.org>

Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología Aplicada Avantis, 2007, pagina de internet.

<http://www.singastritis.com>

Esmas Bien contigo, Grupo Televisa, 2004, publicación electrónica, México.

<http://www.esmas.com/salud/enfermedades/infecciosas/434933.html>

Equilibrium mente y cuerpo S.A. de C.V., 2008, pagina de internet.

<http://www.iesisa.com/equilibrium/index>, 2008

Euroresidentes, 1999. Alicante, España, publicación electrónica.

<http://www.euroresidentes.com/Alimentos/ajo.htm>

García F., 2005. Método de Difusión con Disco en Agar.

<http://www.netropica.org/bacteriologia/DifusionKB.pdf>

Hernández T. M., 2001. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición 2001; 15(1):42-54, publicación electrónica.

http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol15_1_01/ali07101.htm

Hipernatural, 2006, publicación electrónica, Madrid, España.

http://www.hipernatural.com/es/enfermedades_gastrointestinales.htm

Lindberg D., 1993. National Library of Medicine, publicación electrónica, Rockville Pike, Bethesda.

<http://www.nlm.nih.gov/hinfo.html>

Lindberg D.A.B. y colaboradores, 2007. Medline Plus, información de salud para usted, publicación electrónica, Rockville Pike, Bethesda.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/staphylococcalinfections.html>

Merck Sharp & Dohme, 2005, España, publicación electrónica.

http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_18/seccion_18_201.htm#

Navarrete Equipo Medico, Catalogo de productos 2007, publicación electrónica, Guadalajara, Jalisco.

http://nafarrate.com/cat/e_jpmic100.html

Organización de las Naciones Unidas, 1999, pagina de internet.

<http://www.who.int/es/>

Plantas Medicinales: Antigua y Nueva Alternativa de Salud, 2008, publicación electrónica.

<http://www.saludparati.com/ajo.htm>

Pseudomonas Genome Database v2, Improving Disease Treatment through Genome Research, 2001, publicación electrónica.

<http://www.pseudomonas.com>

R. Frieden T., 2005. Center for Disease Control and Prevention, publicación electrónica, Atlanta, Georgia.

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm

Roldán V.A. y colaboradores, 2001.Ulceras.net, web dirigida a profesionales de la salud, publicación electrónica.

<http://www.ulcera.net>

Salud.com, 2008, pagina de internet.

http://www.salud.com/enfermedades/enfermedades_respiratorias.asp

Secretaría de Salud, Noviembre 2001, portal electrónico del Gobierno de México.

<http://www.salud.gob.mx/>

Servicio de Microbiología, H. U. La Princesa, 1999, publicación electrónica, Madrid, España.

<http://www.helicobacterspain.com/indexM.htm>; Septiembre

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, 2007, publicación electrónica.

http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Amoxicilina%20Caps.htm

Universidad técnica de Delft, 1993, publicación electrónica, Delft, Países Bajos.

http://www.lenntech.com/espanol/agua_desionizada_desmineralizada.htm

University of Virginia Health System, 2000, publicación electrónica.

http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_travel_sp/ecoli.cfm;

http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult_travel_sp/salmonel.cfm;

http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/adult_infectious_sp/ecoli.cfm