



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE AJO SOBRE
PARÁMETROS PRODUCTIVOS, INMUNOLÓGICOS Y
LA CALIDAD DE LA CARNE DE CONEJO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A

HÉCTOR DANIEL ARZATE SERRANO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México; Agosto de 2021.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE AJO SOBRE
PARÁMETROS PRODUCTIVOS, INMUNOLÓGICOS Y
LA CALIDAD DE LA CARNE DE CONEJO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A

HÉCTOR DANIEL ARZATE SERRANO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA ANTONIA MARIEZCURRENA BERASAIN

COORDIRECTOR DE TESIS

DR. ADBELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

ASESORA

DRA. MARÍA DOLORES GARRIDO FERNÁNDEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México; Agosto de 2021.



ÍNDICE

| | Pág |
|--|-----|
| I. INTRODUCCIÓN | 10 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 12 |
| 2.1. Carne de conejo..... | 12 |
| 2.2. Producción de carne de conejo..... | 14 |
| 2.3. Producción en México..... | 15 |
| 2.4. Ajo (<i>Allium sativum</i>)..... | 16 |
| 2.4.1. Composición general..... | 18 |
| 2.4.2. Composición química..... | 18 |
| 2.4.3. Tipos de ajo..... | 20 |
| 2.4.3.1. Ajo negro..... | 20 |
| 2.4.3.2. Ajo elefante..... | 21 |
| 2.4.4. Metabolitos secundarios..... | 22 |
| 2.4.6. Compuestos sulfurados..... | 22 |
| 2.4.7. Farmacología de la alicina..... | 23 |
| 2.4.8. Fenoles..... | 24 |
| 2.5. Indicadores de salud en conejos..... | 24 |
| 2.5.1. Actividad inmunoestimulante del ajo..... | 25 |
| 2.5.2. Citometría de flujo..... | 26 |
| 2.5.3. Aplicaciones de la citometría de flujo..... | 26 |
| 2.5.4. Biomarcadores CD11..... | 27 |
| 2.6. Oxidación en carne de conejo..... | 27 |
| 2.6.1. Proceso oxidativo en carne..... | 28 |
| 2.6.2. Alternativas antioxidantes..... | 28 |
| 2.6.3. El ajo como antioxidante..... | 29 |
| 2.7. Microbiología en carne de conejo..... | 29 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 30 |
| IV. HIPÓTESIS | 32 |
| V. OBJETIVOS | 33 |

| | |
|--|-----------|
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 34 |
| VII. RESULTADOS | 40 |
| 7.1. Artículo 1. Antimicrobial resistance of three common molecularly identified pathogenic bacteria to <i>Allium</i> aqueous extracts..... | 40 |
| 7.2. Artículo 2. Capacidad antibacteriana del extracto acuoso de ajo (<i>Allium sativum</i> L.) sobre la microbiota digestiva de conejos..... | 46 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 63 |
| IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág |
|---|------------|
| Figura 1. Lomo (<i>Longissimus dorsi</i>) de conejo, pieza más valorada en el mercado..... | 13 |
| Figura 2. Proceso de cocción del ajo negro..... | 20 |
| Figura 3. Comparación de tamaño entre el ajo blanco y el ajo elefante..... | 21 |
| Figura 4. Estructura química de los principales compuestos sulfurados del ajo..... | 23 |
| Figura 5. Reacción química de la formación de alicina..... | 24 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Cuadro 1. Comparación nutrimental de diferentes carnes para abasto con respecto a la carne de conejo..... | 13 |
| Cuadro 2. Contenido de grasa intramuscular en canales de conejo a diferentes pesos. | 14 |
| Cuadro 3. Número de vientres de conejo por Estado en México..... | 15 |
| Cuadro 4. Características de la planta de <i>Allium sativum</i> | 17 |
| Cuadro 5. Compuestos del <i>Allium sativum</i> con efecto benéfico..... | 18 |
| Cuadro 6. Compuestos sulfurados de <i>Allium sativum</i> con efectos benéficos.... | 19 |

**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE AJO SOBRE
PARÁMETROS PRODUCTIVOS, INMUNOLÓGICOS Y LA
CALIDAD DE LA CARNE DE CONEJO**

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de inhibición bacteriana *in vitro* del ajo, en un primer estudio se analizó su efecto sobre la microbiota bucal, cecal y rectal de conejos en una explotación comercial del Estado de México. Se utilizaron 21 animales Chinchilla x Nueva Zelanda de 40 ± 2 días de edad y 1.82 ± 0.15 kg peso vivo. Se recolectaron muestras de hisopados de boca, ano y ciego. Se aisló *Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Paantoea agglomerans* y *Acinobacter lowffii*. Se utilizó la técnica de difusión en placa por el método de Kirby-Bauber para determinar los halos de inhibición bajo dos concentraciones de extracto acuoso de ajo (125 mg/ml y 62.5 mg/ml). Los halos de inhibición en la concentración de 125 mg/ml fue de 17.16 mm y para la concentración de 62.5 mg/ml fue de 12.37 mm. En el caso de la mayor concentración, el 54% de las muestras se clasifica como Sensible a los antimicrobianos Gentamicina, Amikacina y Sulfametoxazol/Trimetoprima. En el otro trabajo se evaluó la inhibición bacteriana *in vitro* de diferentes tipos de ajo sobre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Se utilizaron 4 ajo: blanco, japonés, elefante y negro con dos diluciones cada uno (0,25 y 0,125 g/mL). Se cuantificaron polifenoles totales de cada extracto por la técnica de Folin-Ciocalteu, el extracto acuoso de ajo negro fue el que mayor cantidad de polifenoles presentó $6,26 \pm 0,21$ mg EAG/mL. Se utilizó el método de Kirby-Bauber, se midió el área de inhibición alrededor de los sensidiscos, para clasificarlos en sensible, intermedio o resistente. El extracto acuoso de ajo blanco a la concentración de 0,25 g/mL fue el que mayor actividad antibacteriana mostró con $21,46 \pm 3,94$ mm para *L. monocytogenes*, $20,61 \pm 2,47$ mm para *S. aureus* y $17,83 \pm 2,21$ mm para *E. coli*. De igual manera, se clasificó como sensible a las bacterias desafiadas, mientras que el resto de los extractos como resistentes comparados con los halos de inhibición que presentó el antibiótico control (Tetraciclina 30 mcg). Se sugiere la utilización del extracto acuoso de ajo como tratamiento preventivo antimicrobiano en conejos de engorda de explotaciones comerciales.

Palabras clave: Antimicrobiano, *in vitro*, conejo, inhibición.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the in vitro bacterial inhibition capacity of garlic, in a first study its effect on the buccal, caecal and rectal microbiota of rabbits in a commercial farm in the State of Mexico was analyzed. 21 Chinchilla x New Zealand animals of 40 ± 2 days of age and 1.82 ± 0.15 kg live weight were used. Swab samples were collected from the mouth, anus, and cecum. *Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Paontoea agglomerans* and *Acinobacter lowffii* were isolated. The plate diffusion technique by the Kirby-Bauber method was used to determine the inhibition halos under two concentrations of aqueous garlic extract (125 mg/mL and 62.5 mg/mL). The inhibition halos in the concentration of 125 mg/mL was 17.16 mm and for the concentration of 62.5 mg/mL it was 12.37 mm. At the highest concentration, 54% of the samples are classified as Sensitive to the antimicrobials Gentamicin, Amikacin, and Sulfamethoxazole /Trimethoprim. In the other work, the in vitro bacterial inhibition of different types of garlic was evaluated on *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. 4 garlic were used: white, Japanese, elephant and black with two dilutions each (0.25 and 0.125 g/mL). Total polyphenols of each extract were quantified by the Folin-Ciocalteu technique, the aqueous extract of black garlic was the one with the highest amount of polyphenols presented 6.26 ± 0.21 mg EAG/mL. The Kirby-Bauber method was used, the area of inhibition around the sensidisks was measured to classify them as sensitive, intermediate or resistant. The aqueous extract of white garlic at a concentration of 0.25 g/mL was the one that showed the highest antibacterial activity with 21.46 ± 3.94 mm for *L. monocytogenes*, 20.61 ± 2.47 mm for *S. aureus* and 17.83 ± 2.21 mm for *E. coli*. Similarly, it was classified as sensitive to the challenged bacteria, while the rest of the extracts as resistant compared to the inhibition halos presented by the control antibiotic (Tetracycline 30 mcg). The use of aqueous garlic extract is suggested as a preventive antimicrobial treatment in fattening rabbits from commercial farms.

Keywords: Antimicrobial, in vitro, rabbit, inhibition.

I. INTRODUCCIÓN

La cunicultura mexicana está consolidada por los sistemas de producción de traspatio, el cual representa el 95%, se lleva a cabo de forma familiar, para autoconsumo y venta local (ANCUM en 2009, CNSPC, 2012; SAGARPA, 2015). El Estado de México, es el mayor productor de carne (25.5%), seguido de Michoacán (16,9%) y Ciudad de México (12,5%). Siendo los municipios de mayor producción: Amecameca, Jilotepec, Atlacomulco, Texcoco; el Valle de Toluca (SAGARPA, 2012).

En comparación con otras carnes (cerdo, bovino y ave), la carne de conejo tiene un mayor contenido proteico (23%) (Bixquert *et al.*, 2011), además del alto contenido de vitaminas del complejo B y bajos niveles de grasa y colesterol (Dalle Zotte, 2002; OIEDRUSBC, 2009; Hernández y Dalle Zotte, 2010). A pesar de todas estas ventajas, el consumo de la carne de conejo no es habitual en México.

Hoy en día, los consumidores muestran más interés en las prácticas y normas pecuarias, y se encuentran dispuestos a pagar más por productos orgánicos, locales, inocuos y con propiedades nutraceuticas, como es la carne de conejo (Napolitano *et al.*, 2010; Kallas y Gil, 2012). Sin embargo, las unidades de producción tienen una deficiente infraestructura, manejo reproductivo, alimenticio y sanitario al ser mayoritariamente de traspatio (Olivares Pineda *et al.*, 2009). Además, se tiene la problemática de la falta de medicamentos específicos para la especie y la falta de asistencia técnica que ocasionan tratamientos ineficientes.

En este sentido, las plantas medicinales se consideran una buena alternativa por su alta efectividad y bajo costo, además de no contribuir a la resistencia bacteriana (Ruiz y Roque, 2009). El ajo (*Allium sativum*) pertenece a la familia Liliaceae, originaria de Asia central (López, 2007; Greco, 2011). Su efecto terapéutico es atribuido a los constituyentes sulfurados, que también son responsables de su sabor y olor típicos. Entre ellos destaca la alicina como antibacteriano,

antiparasitario, antifúngico, hipoglicémico y antiinflamatorio (Ledezma y Apitz-Castro, 2006; Díaz y Jiménez, 2008; Zeng *et al.*, 2012).

El deterioro de la carne de conejo en refrigeración se debe a la actividad de enzimas endógenas junto con la actividad de microorganismos contaminantes del producto durante el proceso de faenado y despiece. Cuando el producto se distribuye en temperaturas de refrigeración, la carne tiene una vida de anaquel entre 6 y 8 días, tal como otros reportes han mencionado (Badr, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005; Nakyinsige *et al.*, 2014; Pereira y Malfeito-Ferreira, 2015). Sin embargo, no siempre se tienen las condiciones adecuadas para el manejo de los productos carnicos, inclusive desde los métodos de transporte e instalaciones de matanza son inadecuadas, sin regulación de autoridades que ayuden a reducir o minimizar los riesgos sanitarios para el consumidor. En la actualidad se está retomando el estudio y uso de productos de origen natural en la industria pecuaria, sobre todo adicionados a la alimentación, para lo cual se espera aportar los resultados obtenidos y que la información sea necesaria y oportuna para la cunicultura mexicana.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Carne de conejo

Los productos cárnicos han jugado un papel importante en la historia, cultura, economía y nutrición de los consumidores. En el mercado cárnico existen especies no convencionales, como la avestruz, codorniz, conejo, entre otras, (Mendoza, 2007). En México existe una desinterés de las instituciones públicas para fomentar la producción de conejos; además de la poca difusión que se hace sobre el consumo de esta carne (Olivares et al., 2015).

Pese a que la cría y consumo del conejo son bajos, la cunicultura es una actividad que favorece a los pequeños y medianos productores en todo el mundo, debido a su fácil manejo, la rapidez para recuperar la inversión y a la posibilidad de generar ingresos modestos durante todo el año (Olivares Pineda *et al.*, 2009).

El conejo es una de las especies animales con mayor eficiencia biológica la hembra puede producir al año entre 16 y 18 veces su peso en gazapos, la carne es más barata que la carne de bovino (SAGARPA, 2012), es de buen sabor y fácil digestión, con niveles elevados en aminoácidos, con mayor proporción de ácidos grasos insaturados y sobre todo se caracteriza por su bajo contenido de colesterol (Hermida *et al.*, 2006), estas cualidades son muy apreciables tanto para la población en general como para determinados grupos poblacionales con necesidades específicas (Ramírez, 2004). Desde el punto de vista nutricional, la carne de conejo tiene un balance adecuado de ácidos grasos, proteína, vitaminas y minerales, bajo en colesterol y sodio, para el consumo humano (Para, 2015). Martínez (2008), menciona que la carne de conejo puede ser sugerida para aquellas personas con necesidades proteicas elevadas, puede integrarse en las estrategias de prevención de enfermedades cardiovascular y obesidad. Es considerado un alimento con alta digestibilidad recomienda a personas con un sistema digestivo delicado.

Figura 1. Lomo (*Longissimus dorsi*) de conejo, pieza más valorada en el mercado.



En comparación con otro tipo de carnes (bovino, ovino y cerdo), el contenido proteico de esta carne es mayor, su perfil de aminoácidos la sitúa entre las de mayor valor biológico, además de presentar niveles de grasa y colesterol menores (Cuadro 1). A pesar de todas estas ventajas, el consumo de la carne de conejo no es habitual en muchos países, probablemente debido a la tradición y a factores culturales así también por considerarse animal de compañía (Dalle, 2002).

Cuadro 1. Comparación nutricional de diferentes carnes para abasto con respecto a la carne de conejo. Valores calculados con base en 1 kg de carne.

| Tipo de carne | Energía (kcal) | Agua (mL) | Proteínas (g) | Lípidos (g) | Cenizas (g) |
|---------------|----------------|-----------|---------------|-------------|-------------|
| Cordero | | | | | |
| Carne Magra | 2100,0 | 660,0 | 180,0 | 143,0 | 14,2 |
| Carne Grasa | 3452,0 | 530,0 | 150,0 | 310,0 | 10,0 |
| Bovino | | | | | |
| Carne Magra | 1950,0 | 669,0 | 200,0 | 120,0 | 10,0 |
| Carne Grasa | 3800,0 | 490,0 | 155,0 | 350,0 | 7,1 |
| Cerdo | | | | | |
| Carne Magra | 2610,0 | 610,0 | 170,0 | 210,0 | 8,1 |
| Carne Grasa | 3300,0 | 545,0 | 150,0 | 295,0 | 6,1 |
| Pollo | 2010,0 | 670,0 | 198,0 | 125,0 | 10,2 |
| Conejo | 1615,0 | 700,5 | 212,4 | 80,7 | 10,3 |

Martínez, 2004.

La composición de la carne de conejo varía con respecto a la edad, sobre todo en la proporción de grasa. En el Cuadro 2 se muestran los contenidos de grasa en cuatro diferentes partes anatómicas de carne de conejo de diferentes pesos.

Cuadro 2. Contenido de grasa intramuscular en canales de conejo a diferentes pesos.

| Peso de la canal | % de Grasa | | |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | Bajo (1750-1850 g) | Medio (2000-2100 g) | Alto (2250-2350 g) |
| Pierna delantera | 6,07 | 6,65 | 6,81 |
| <i>Longissimus dorsi</i> | 0,63 | 0,90 | 0,94 |
| Pared abdominal | 4,24 | 5,19 | 5,70 |
| Pierna trasera | 2,81 | 3,24 | 3,66 |

Pla *et al.*, 1998.

2.2. Producción de carne de conejo

La producción mundial de carnes tradicionales (bovina, aviar, porcina y ovina) se estimó en 220 millones de toneladas anuales. La producción mundial en el período 2002-2005 de carne de conejo fue de 1,1 millones de toneladas anuales. La Unión Europea, junto con la República Popular China monopolizan la producción y el consumo con aproximadamente medio millón de toneladas cada uno. Si se considera por país, China es seguida por Italia, España y Francia con el 20, 10 y 7% respectivamente, de la producción mundial. Así, más del 75% de la producción y consumo se efectúa en tan solo estos cuatro países. Es decir, la producción mundial de carne de conejo, esta geográficamente muy sesgada. Entre otros países productores importantes hay que mencionar a Egipto, República Checa y Alemania. Argentina se encuentra en el decimonoveno lugar como productor. Los países del norte de África, cubren el 90% de la demanda de ese continente en donde la cunicultura es esencialmente de tipo familiar (Jandete *et al.*, 2004).

2.2. Producción en México

En México, la carne de conejo mantiene una posición marginal junto con otras carnes como la ovina, caprina y de pavo. Dicha situación es principalmente influenciada por los hábitos de consumo de la población, así como por los precios de éstas (OIEDRUSBC, 2009). La producción de conejo en México está localizada principalmente en los estados del centro del país, como Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Estado de México y Guanajuato; esto es comprensible dado que la meseta central de México cuenta con climas que favorecen el desarrollo de esta actividad, y no requiere de instalaciones que involucren altos costos de inversión. Armada (2016), reporta que aunque el consumo puede variar de acuerdo a la zona es muy bajo, de 38 a 134 g. El Estado de México es el principal productor y consumidor de carne de conejo dentro del cual Texcoco, reporta el mayor consumo nacional 250 g/habitante/año (SAGARPA, 2012).

Cuadro 3. Número de vientres de conejo por Estado en México.

| Estado | Nº hembra s | % | Estado | Nº. hembras | % |
|---------------|-------------------|-------|----------------|----------------|-------|
| Edo. México | 6831 | 25,5 | Aguascalientes | 220 | 0,8 |
| Michoacán | 4521 | 16,9 | Querétaro | 211 | 0,7 |
| Cd. de México | 3359 | 12,5 | Yucatán | 200 | 0,7 |
| Puebla | 3244 | 12,1 | Sinaloa | 156 | 0,5 |
| Hidalgo | 2182 | 8,1 | Oaxaca | 120 | 0,4 |
| Guanajuato | 1509 | 5,6 | Guerrero | 105 | 0,3 |
| Jalisco | 1487 | 5,5 | Nuevo León | 102 | 0,3 |
| Tlaxcala | 1000 | 3,7 | Chihuahua | 50 | 0,1 |
| Coahuila | 740 | 2,7 | Nayarit | 40 | 0,1 |
| Colima | 394 | 1,474 | Morelos | 9 | 0,034 |
| Veracruz | 240 | 0,898 | Zacatecas | 3 | 0,011 |

CNSPC, 2012.

En cuanto a números, El Estado de México es la entidad de mayor producción (25,5 %), seguido de Michoacán (16,9 %) y Distrito Federal (12,5 %) (Cuadro 3). El Estado de México, tiene un inventario de más de 6, 831 vientres y produce aproximadamente 2, 340 toneladas. En dicha entidad, los Municipios de mayor producción son: Amecameca, Jilotepec, Atlacomulco y Texcoco; además de la zona del Valle de Toluca (SAGARPA, 2012).

A pesar de la diversificación, en México se encuentran bien establecidas las razas especializadas para la producción de carne, como son: Nueva Zelanda Blanco, California, Chinchilla, Mariposa, Azteca Negro y sus cruza entre éstas (Olivares Pineda *et al.*, 2009).

2.1. *Allium sativum*

A lo largo de la historia, el ajo ha gozado de una gran variedad de aplicaciones. Además de su uso culinario, el ajo también se ha utilizado como elemento religioso, higiénico y medicinal (Gómez y Muniz, 2000). Se acepta que el ajo ha formado parte de la dieta de la humanidad desde el pasado más remoto y tiene su origen en Asia Central (Gascón, 2011).

Aunque se habla de los bulbos de ajo en la Biblia y en el Corán, con exactitud no se sabe su origen. Lo que sí se puede decir es que pueden proceder de Asia Central y el Mediterráneo (Cubero, 2003). No fue hasta el siglo XIX que se descubrió su efecto antibacteriano por el científico Luis Pasteur. Posteriormente se utilizó para aliviar la diarrea, el dolor de estómago, la flatulencia o la hipofunción hepática, reducir inflamaciones o eliminar parásitos (Heinerman, 1995).

El ajo, es perteneciente al mismo grupo de plantas de la cebolla, es de tal antigüedad que es difícil saber con certeza su país de origen. De Candolle, en su tratado “Origen de las plantas cultivadas” de 1896, consideró que fue aparentemente indígena del sudoeste de Siberia, desde donde se extendió al sur de Europa, donde se aclimató. Su cultivo se remonta a los tiempos de las primeras

civilizaciones, Babilonia, Egipto, y más tarde Grecia, Roma. La mención más antigua del ajo es de un herborista chino que vivió hace 4 000 años. Lo cita entre las plantas medicinales y hace un listado de sus propiedades terapéuticas (Reyes, 2016).

El nombre del ajo (garlic) tiene un origen anglosajón, derivando de gar (lanza) y de leac (planta), en referencia a la forma de sus hojas. El nombre botánico es *Allium sativum* que deriva de la palabra Céltica al que significa áspero o abrasivo, y de *sativum* que significa plantado, cultivado o sembrado.

El ajo es una planta herbácea, perteneciente a la familia de las Alliáceas, caracterizada por crecer formando bulbo de hasta 20 dientes o más (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características de la planta de *Allium sativum*.

| | |
|------------------------|---|
| Familia | <i>Liliaceae</i> , subfam. <i>Allioideae</i> |
| Nombre científico | <i>Allium sativum</i> L. |
| Planta | Bulbosa, vivaz y rústica |
| Sistema radicular | Raíz bulbosa, compuesta de 20 o más bulbos, reunidos en su base por medio de una película delgada. De la parte superior del bulbo nacen las partes fibrosas, que se introducen en la tierra para alimentar y anclar la planta. |
| Tallo o disco caulinar | Fuertes, de crecimiento determinado, alcanzando hasta 50 cm de altura. |
| Hoja | Las hojas son opuestas, lineales, de unos 45 a más de 60 cm de longitud del limbo y entre 30 y 40 mm de anchura máxima. Sentadas, sin peciolo. La vaina de la hoja es más larga a medida que éstas se van sucediendo en la planta. Las más largas llegan a alcanzar en algunos ecotipos hasta 35-40 cm de altura. |
| Flores | Blancas o rosadas, conformando una umbela en el extremo del tallo que se cierra antes de la floración. |

Alonso, 2007; Thompson *et al.*, 2006.

A pesar de las innumerables propiedades reportadas sobre los efectos beneficiosos del ajo también se han realizado algunos estudios sobre su posible toxicidad. López en 2007, menciona que la ingesta de ajo puede ocasionar desórdenes estomacales, diarreas, disminución de eritrocitos, hipocalcemia y problemas en la piel. Por otro lado, Amagase y col. (2001), con diferentes preparaciones de ajo probaron que produce un olor en la piel y aliento, así como reacciones alérgicas.

1.1 Composición general

A pesar del uso muy frecuente del ajo en la cocina de numerosas culturas como la mediterránea, su importancia nutritiva en la dieta cotidiana es prácticamente insignificante. Debido fundamentalmente a su empleo como saborizante en pequeñas cantidades y no como alimento (Souci *et al.*, 1994). El ajo se compone principalmente de agua 56-68% en peso, seguido por los carbohidratos 36-30%. Los componentes con propiedades nutraceuticas, son los compuestos sulfurados (11-35 mg/100g) de ajo fresco, además de:

- Fósforo, potasio, azufre y zinc: altos niveles.
- Selenio y vitamina A y C: niveles moderados.
- Otras sustancias: fermentos, colina, ácido hidrorrodánico y yodo.
- Se han aislado hasta 17 aminoácidos entre ellos: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano y valina.
- Se han aislado 33 compuestos azufrados (Lawson, 1996).

1.2 Composición química

Desde 1844 se han descubierto más de 200 sustancias componentes del ajo, algunas de las cuales se les atribuye efecto biológico beneficioso (Cuadro 2).

Cuadro 5. Compuestos del *Allium sativum* con efecto benéfico.

| Compuesto | Actividad biológica |
|----------------------|---|
| Compuestos fenólicos | Antioxidantes, anti inflamatorios, antivirales y antibacteriana |

| | |
|---------------------------|---|
| Adenosina | Vasodilatador, hipotensor, miorelajante y estimula la síntesis de hormonas esteroídicas |
| Polisacáridos (Fructanos) | Cardioprotectores, antioxidante y estimula el sistema inmunológico |
| Quercitina | Efectos beneficios contra el asma y algunas alergias |
| Saponinas | Hipotensora y antibacteriana |

García y Sánchez, 2000; Ferri *et al.*, 2003.

Los compuestos sulfurados (azufrados) han sido considerados la clave de los beneficios para la salud (Cuadro 3).

Cuadro 6. Compuestos sulfurados de *Allium sativum* con efectos benéficos.

| Características | Compuesto | Actividad biológica |
|--------------------|-------------------------|---|
| Solubles en agua | S-alil-cisteína | Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer. |
| | S-alil-mercaptocisteína | |
| Solubles en aceite | S-metilcisteína | Favorecen la acción desintoxicante del hígado frente a sustancias químicas. |
| | Y-glutamil-cisteína | |
| | Sulfuro dialílico | Antibiótico, antifúngico, antiviral |
| | Disulfuro dialílico | Desintoxicante |
| | Alicina | Anticancerígeno, previene daños químicos del ADN |
| | Trisulfuro dialílico | Hipocolesterolemiantes, previene la arteroesclerosis, antitumoral |
| | Trisulfuro alilmetílico | |
| | Alíina | Hipotensora, hipoglucemiante |
| | Ditiínas | Anti inflamatorio, vasodilatador, hipotensor, antibiótico |
| | Viniloditiínas | |
| Ajoeno | | |

Alonso, 2007.

1.3 Tipos de ajo

Así como en la casi totalidad de cultivos existen muchas variedades de semillas certificadas a disposición del agricultor, en el cultivo del ajo existen actualmente pocas variedades comerciales, Francia por ejemplo, fue el país pionero en realizar trabajos encaminados a conseguir semilla certificada de ajo. Debido a sus diferentes usos que actualmente tiene el ajo (medicinal, culinario, terapéutico, etc.), el cultivo del ajo se ha diversificado dando origen a diferentes ecotipos que le otorgan diferentes características, pero en general las características son similares en cuanto a morfología, ciclo y comportamiento (Nieto, 2016).

1.3.1 Ajo negro

El ajo negro es un producto elaborado a partir del ajo fresco (*Allium Sativum* L.) mediante un proceso tecnológico a temperatura y humedad controlada durante un período prolongado de tiempo. A medida que el ajo evoluciona poco a poco hasta llegar a aspecto final, numerosos compuestos del ajo fresco se transforman en toda una nueva gama de compuestos diferentes, convirtiéndose en un producto atractivo tanto para su uso terapéutico como culinario. Parece tener su origen en Corea, se produce al envejecer ajo entero (puede utilizarse cualquier variedad) a alta temperatura (70 °C) y alta humedad (90% HR) (Jang *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008). Durante este proceso, los compuestos inestables de ajo fresco, incluida la aliina, se convierten en compuestos estables que incluyen s-ailicisteína (SAC), el compuesto soluble en agua con potente efecto antioxidante (Corzo-Martinez *et al.*, 2007).

Figura 4. Proceso de cocción del ajo negro.



Tradicionalmente se prepara en los países asiáticos y que en los últimos años se ha introducido en países de occidente, como España, Alemania e Italia, e incluso en EEUU o Argentina. Es un producto clave por dos motivos fundamentales: tiene mejor aroma y sabor que el ajo fresco, mayor capacidad antioxidante, además se considera un producto estrella, debido al alto precio que alcanza en los mercados (Toledano Medina, 2017).

1.3.2 Ajo elefante

El ajo elefante es también llamado ajo cabeza grande, como su nombre indica el ajo elefante es mucho más grande en la madurez de lo normal ajo (un solo diente de ajo elefante puede ser tan grande como un bulbo entero de ajo estándar) (Boyhan *et al.*, 2009).

Se trata de una hortaliza comercializada por la vía gourmet, consumida en fresco y apreciada por su sabor suave y el gran tamaño de sus dientes. Esta hortaliza forma un bulbo compuesto por no más de 6 dientes (Lanzavechia, 2007).

Los bulbos del ajo elefante tienen una membrana protectora delgada y frágil, conteniendo alrededor de 6 dientes, los cuales se separan del disco basal donde estaban sostenidos formando una planta simple la cual produce generalmente un bulbo de hasta 500 g. Dientes pequeños y plantaciones tardías producen por lo general bulbos simples llamados unibulbos (Burba *et al.*, 1997; Stephens, 1994).

Figura 5. Comparación de tamaño entre el ajo blanco y el ajo elefante.



1.4 Metabolitos secundarios

Para Bourgaud y col. (2001), un compuesto secundario se diferencia de uno primario por no tener una función aparente en el metabolismo de la planta, pero sí tienen implicaciones de defensa contra herbívoros, virus, hongos y bacterias. Algunos otros desarrollan otra actividad, como los alcaloides y pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, los flavonoides, por ejemplo, realizan funciones protectoras de rayos UV (Wink, 2007).

Estos metabolitos también son responsables de las características organolépticas como el olor, sabor y color de las plantas (Bennett y Wallsgrove, 1994) Aportan la materia prima en la industria de los alimentos y farmacéutica. Así mismo, en el campo de la medicina, nutrición y cosmética (Tuteja y Sopory, 2008). La estructura de los metabolitos secundarios se ha clasificado en grupos químicamente análogos, así están los compuestos fenólicos que abarcan a flavonoides, cumarinas, taninos, estilbenos, entre otros; compuestos de estructura terpenoide, compuestos nitrogenados y compuestos azufrados (Suárez Cunza, 2014).

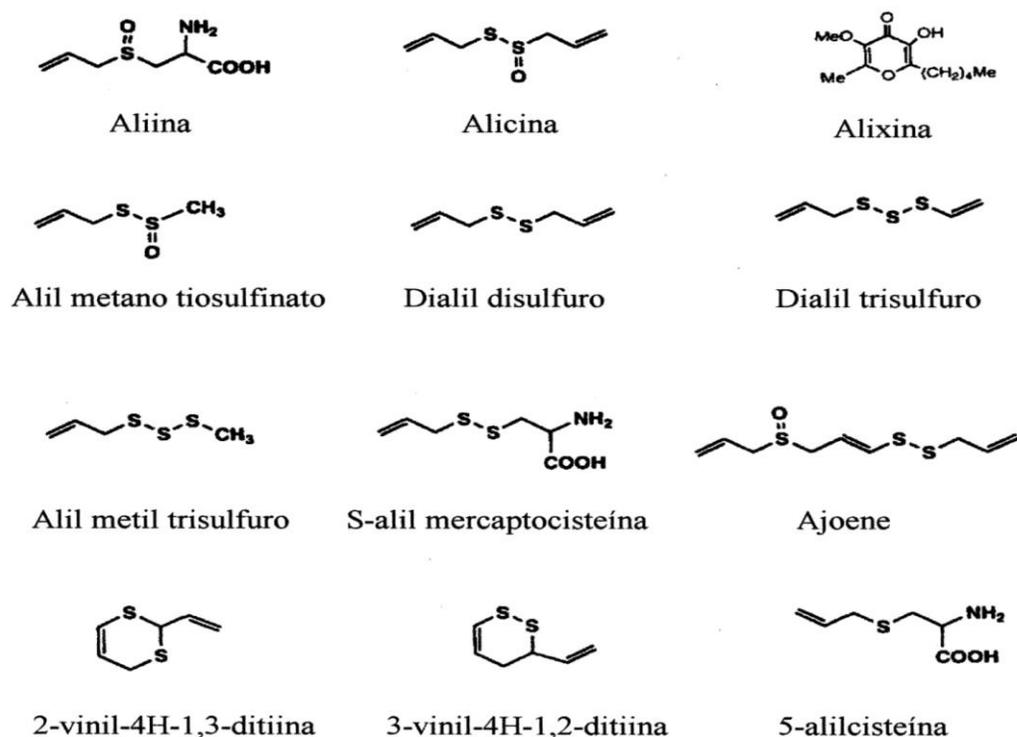
1.5 Compuestos sulfurados

Para Lawson, los principales compuestos sulfurados del ajo son las cisteínas sulfoxidos, como la aliína (7-14 mg/g), metiína (0.5-2 mg/g) e isoaliína (0.1-2 mg/g). El contenido total de sulfuros en el ajo es de aproximadamente 1.0 % en peso seco y 0.35 % en peso fresco.

La mayoría de los componentes azufrados no están presentes en las células intactas. Cuando un ajo es machacado, partido o cortado, varios de sus componentes azufrados son liberados, abandonando el interior de las células vegetales; entonces interaccionan unos con otros para desencadenar una cascada de reacciones químicas, generadora de un elevado conjunto de componentes. Así por ejemplo, cuando la célula se rompe tienen lugar la reacción entre el enzima aliinasa y los precursores volátiles (Salkenilcisteina sulfóxido y ácido sulfónico)

resultando la formación de diferentes tiosulfatos y compuestos derivados relacionados con el ácido sulfónico. La descomposición de los sulfatos tales como la alicina (dialil tiosulfato) puede ocurrir a través de diferentes vías metabólicas. Una de ellas combina tres moléculas de alicina produciendo dos moléculas de ajoeno. A través de otras degradaciones no enzimáticas los tiosulfatos se transforman en otros compuestos azufrados tales como los tiosulfatos, cепенos, mono, di, tri y tetrasulfuros, tioles, tiofenos y anhídrido sulfuroso (Breu y Dorch, 1994).

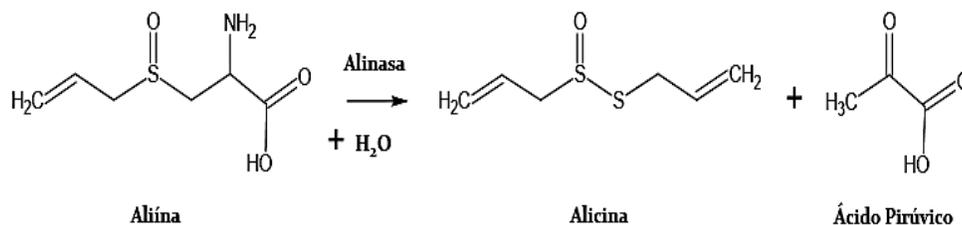
Figura 4. Estructura química de los principales compuestos sulfurados del ajo.



1.6 Farmacología de la alicina

Una gran cantidad de estudios mencionan la reacción enzimática entre el aminoácido azufrado inodoro aliína (citoplasma) y la alinasa (vacuola) (Bhandari, 2012), reacción que genera la formación de la alicina, principal precursor de las actividades biológicas del ajo.

Figura 5. Reacción química de la formación de alicina.



Fuente: Lawson, 1996.

Para Rahman (2007), uno de los mecanismos por los que la alicina (compuesto bioactivo del ajo) presenta actividad antimicrobiana es porque modifica la síntesis de lípidos, disminuyendo su perfil, así como sintetizando el RNA de los microorganismos. La alicina reacciona con grupos tiol libres, por lo que el principal mecanismo de acción es a través su interacción con grupos tiol (proteasas alcohol deshidrogenasas).

1.7 Fenoles

Los compuestos fenólicos son de interés en gran parte debido a su actividad antioxidante. Otro grupo de compuestos bioactivos son los flavonoides. El té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra, bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza, son de los principales productos que aportan gran cantidad de estos metabolitos. Los principales flavonoides del ajo son los flavonoles, la miricetina y la apigenina y, en marcado contraste con las cebollas, sólo los bajos niveles de quercetina (Lanzotti, 2006). Se les atribuyen efectos prebióticos, ya que, estas moléculas escapan al proceso digestivo en el intestino delgado, siendo fermentados selectivamente por bifidobacterias y lactobacillus en el intestino grueso (Espinoza Cáceres *et al.*, 2010).

2. Indicadores de salud

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), define a la salud como un “estado de completo bienestar físico, mental y social y no meramente la ausencia de enfermedad”, para lo cual utiliza indicadores como instrumentos de evaluación que pueden determinar directa o indirectamente

modificaciones del estado de situación de una condición (WHO, 1995). Para poder determinarlos tenemos que hablar del concepto de bienestar animal, herramienta que permite dar un panorama del estado de salud (físico o mental) del animal.

Una de las definiciones de bienestar animal que hasta la fecha es muy bien aceptada es la que propuso Broom (1986), la cual menciona que en situaciones de bienestar el animal se adapta rápidamente al ambiente, mientras que en condiciones de falta de bienestar los intentos de adaptación son numerosos y conllevan un desgaste fisiológico para el animal. Entrando en funcionamiento defensas inmunológicas, respuesta al estrés fisiológico y a una variedad de respuestas de comportamiento (Solano *et al.*, 2004).

Como parte de las metodologías desarrolladas para poder medir el bienestar animal se han desarrollado componentes denominadas las cinco libertades (Council, 1992), descritas a continuación:

- a) libre de hambre, sed o un nivel de nutrición insuficiente
- b) no presentar dolor, heridas o enfermedad
- c) libre de temor o angustia
- d) no presentar incomodidad
- e) libre de manifestar un comportamiento natural

2.1 Actividad inmunoestimulante del ajo

Dentro de la naturaleza existe una variedad de extractos de plantas por sus propiedades farmacológicas y algunas de ellas como inmunoestimulantes. Los inmunomoduladores son agentes biológicos que mejoran el mecanismo de defensa del huésped contra la enfermedad, al lograr un equilibrio entre las células reguladoras y efectoras (Agrawal, 2010), característica que se le adjudica al ajo. Chandrashekar y Venkatesh (2009), sugieren que estos efectos inmunomoduladores del ajo se deben su lectina o a proteínas aglutininas.

Entre los efectos mostrados por los derivados del ajo se incluyen la inducción de la apoptosis, la regulación del ciclo celular y la modificación de los sistemas de transducción (Pinto y Rivlin, 2001).

Gurley *et al.*, 2005 menciona que diferentes extractos de ajo han demostrado estimular la actividad fagocitaria de los macrófagos, incrementa la actividad de células Natural Killer, IL-2, factor de necrosis tumoral (TNF) y gamma-interferón. Ried (2016), oncuerta con estos datos al reportar que los efectos beneficiosos del ajo en el sistema inmune, también se deben a la proteína C-reactiva y las citocinas (IL y TNF).

2.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es un proceso analítico en el que se evalúan células que pasen en fila dentro de un flujo a través del aparato (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems; 1995). Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula, como por ejemplo: tamaño, volumen, densidad, propiedades de dispersión de luz, potencial de membrana, pH, contenido celular, enzimas y proteínas.

2.3 Aplicaciones de la citometría de flujo

La citometría de flujo, hoy en día, tiene una amplia una aceptación en la inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica y biología celular, como una herramienta potencialmente útil (Orfao *et al.*, 1992).

La citometría de flujo ofrece ciertas ventajas como la de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones. Es decir, el análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia. (Parks y Herzemberg, 1984).

2.4 Biomarcadores CD11

Los leucocitos, así como sus precursores hematopoyéticos, presentan patrones característicos en su superficie, que pueden utilizarse como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares, demostrando que los cambios morfológicos coexisten con distintos patrones de expresión inmunofenotípicos asociados a diferenciación celular (Orfao *et al.*, 2004).

Los biomarcadores son moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares con el uso de anticuerpos monoclonales específicos marcados con una sustancia fluorescente. El termino CD significa Cluster of Differentiation ó designación de agrupamiento (Subcommittee, 1984).

CD11b se expresa en las superficies de granulocitos (neutrófilos, eosinofilos y basofilos) y macrófagos que se incrementan por su activación, jugando un papel importante en la defensa del huesped (Lundahl *et al.*, 2012). También se han descrito que expresa para monocitos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK) y un subconjunto de linfocitos T. Tres formas del componente de la molécula de adhesión ha sido identificada: CD11a o antígeno asociado a la función de linfocito, CD11b o complemento receptor tipo 3 y CD11c (Nielsen, 1994).

3. Oxidación en carne de conejo

La oxidación en la carne y/o los productos cárnicos se puede reducir con el uso de antioxidantes. Según Halliwell y Gutteridge en 1990, el término antioxidante es definido como cualquier sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato, provocando una reacción con el radical libre de la sustancia antioxidante que cede un electrón oxidándose a su vez, transformándose en un radical débil.

3.1 Proceso oxidativo en carne

Los potenciadores más importantes de la oxidación son las especies reactivas al oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species), que son compuestos que se derivan de la molécula del Oxígeno por reducción química parcial (Alessio y Hagerman, 2006). Incluyen radicales libres como el radical hidroxilo (OH^\bullet), el radical anión superóxido (O_2^\bullet), los radicales peroxilo (ROO^\bullet) y el alcoxilo (RO^\bullet), y los peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los hidroperóxidos (ROOH) (Morrisey *et al.*, 1998). Cada una de estas ROS es altamente reactiva e inestable debido al hecho de que contienen un electrón no apareado en su cubierta externa de electrones. Esta conformación le proporciona la habilidad de rápidamente interactuar con macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Cecarini *et al.*, 2007).

3.2 Alternativas antioxidantes

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son necesarias para mantener las funciones fisiológicas en todo organismo aerobio, sin embargo pueden producirse en altas cantidades conduciendo a estados fisiopatológicos y patológicos para dicho organismo. Por lo que, productos de origen natural están en creciente demanda aunado a las exigencias del consumidor a la calidad del producto en los aspectos físicoquímicos, microbiológicos, genéticos y bioquímicos (Suárez Cunza, 2014).

3.3 El ajo como antioxidante

López en 2007, menciona que el ajo contiene también componentes como selenio y aminoácidos libres (en especial cisteína, glutamina, isoleucina y metionina) eficaces para inhibir la formación de radicales libres. Además, la alicina también juega un papel importante en el proceso antioxidante, ya que reacciona con las enzimas que tienen grupo tiol libres, atrapando radicales libres inhibiendo la producción de superóxido (Rahman, 2007).

Navarro (2007), menciona que el efecto antioxidante que tiene el extracto de *Allium sativum*, fue probado en un estudio *in vitro* con células amnióticas

humanas, se observó que disminuyó la producción de radicales libres, ya que puede aumentar los niveles de glutatión (GSH) en las células y al mismo tiempo disminuye los niveles de la forma oxidada del glutatión (GSSG), se cree que es debido a un aumento de la actividad de la GSSG reductasa. López en 2007, señala que los principales componentes con mayor actividad antioxidante son S-alil-cisteína y alicina.

Se ha probado el efecto del ajo en carne y productos cárnicos, y se logró inhibir la oxidación lipídica en salchichas (Sallam *et al.*, 2004). Gheisari y Ranjbar (2012) mostraron un retardo en la oxidación de lípidos y crecimiento microbiano, con ajo fresco para la conservación de este producto de carne de camello, almacenada en refrigeración. Por otro lado Park *et al.* (2008), adicionaron ajo y cebolla en polvo a carne de cerdo y obtuvieron un incremento en las tonalidades rojizas amarillas del producto.

4. Microbiología en carne de conejo

La carne es un medio de cultivo para toda clase de microorganismos, ya que es altamente nutritiva, biodisponible y con condiciones favorables de pH muy cercanos a la neutralidad (5,5-6,5). Esto representa condiciones ideales para el crecimiento de bacterias y hongos. Lamentablemente, esto incluye a microorganismos patógenos y deteriorantes. (Moore y Sheldon, 2003).

La calidad microbiológica de la carne está ligada por las características de cría del animal, el estado sanitario al ser faenado, el proceso de obtención de la carne así como su almacenamiento, además de la temperatura son factores que van a determinar la carga microbiana (Gill, 1998).

III. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, el desarrollo tecnológico y la industrialización de la cunicultura han determinado el paso de las explotaciones de tipo tradicional a las de tipo intensivo, semi-industrial o inclusive industrial. En esta transformación, los conejos son sometidos a mayores concentraciones de animales por unidad de superficie, a una estrecha convivencia entre ellos y exigencias productivas casi al límite de sus posibilidades fisiológicas, a mayores y más rápidos crecimientos así como ritmos reproductivos acelerados, entre otros. Esta manipulación provoca alteraciones en la regulación y funcionamiento del sistema inmunológico inhibiendo la capacidad de contrarrestar la penetración de agentes externos. Así también, se generan desordenes metabólicos, que se ven reflejados en las ganancias de peso y conversión alimenticia.

Existen diferentes criterios para evaluar la calidad de la carne, sin embargo, la calidad organoléptica es el criterio más evaluado por el consumidor. La calidad final de la carne es el resultado de la variación genética, alimentación, sanidad y manejo, así como al acondicionamiento medio ambiental que se deriva de los cambios *post mortem* en los días posteriores al faenado. Debido al alto contenido y disponibilidad de nutrimentos y humedad, la carne es altamente perecedera a la contaminación microbiana y otros procesos como la oxidación lipídica, proteolítica, cambios en color y pérdida de humedad, entre otros. La carga microbiana inicial y las reacciones de oxidación se consideran las forma más frecuentes del deterioro de la carne que conduce al desarrollo de enranciamiento, la formación de compuestos que provocan sabores indeseables, polimerización y otro tipo de reacciones que provocan la reducción de la vida útil y el valor nutritivo de la carne de conejo.

Una de las principales pérdidas económicas que se generan en la producción de conejos es debido a las altas mortalidades, las cuales pueden ser mitigadas con nuevas alternativas alimentarias, de bajo costo y con alta viabilidad. La utilización de agentes naturales es una opción potencial en la industria pecuaria, el ajo (*Allium sativum*) es una planta a la que se le atribuyen efectos

inmunoestimulantes, antimicrobianos y antioxidantes, a pesar de reportarse más de 100 compuestos biológicamente activos, los compuestos sulfurados son los de mayor efecto, igualmente, se ha demostrado que son benéficos sobre la salud de animales así como en la carne, en la cual puede prolongarse la vida útil y por consiguiente, la seguridad del consumidor.

IV. HIPÓTESIS

La adición de extracto de ajo en la dieta de conejos, permitirá potenciar los parámetros productivos, el sistema inmunológico y disminuir la carga bacteriana así como la oxidación en vida de anaquel de la carne.

V. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto del extracto acuoso de ajo blanco y negro sobre los indicadores productivos y de inmunidad en conejos; así como la calidad física, microbiológica y sensorial de la carne.

Específicos

- Cuantificar polifenoles totales presentes en el extracto de ajo que se adicionará a la dieta de los conejos.
- Realizar una prueba de inhibición bacteriana *in vitro* del extracto acuoso de ajo.
- Medir indicadores productivos en conejos, con la adición de ajo en su dieta.
- Cuantificar marcadores de poblaciones celulares del sistema inmunológico en conejos con la adición de ajo en su dieta.
- Determinar la oxidación de proteína y grasa en la vida de anaquel de la carne de conejo.
- Cuantificar la carga microbiana y los parámetros físicos de la carne fresca de conejo en la vida de anaquel.
- Realizar un análisis sensorial de carne de conejo con la adición de extracto de ajo en su dieta.

VI. MATERIALES Y MÉTODO

El trabajo se dividirá en dos partes, la primera consistirá en trabajos *in vitro* donde se evaluará la cantidad de polifenoles totales y la capacidad de inhibición bacteriana de 4 tipos de ajo (blanco, japonés, elefante y negro) y dos concentraciones (0.25 y 0.125 g/mL⁻¹). Para la elaboración de los extractos acuosos se seguirá la metodología que sugiere Salem y colaboradores en 2014, donde en la primer dilución (1:4) se utilizaron 50 g de ajo por 200 mL de agua (0.25 g/mL⁻¹) y para la segunda (1:8) 50 g de ajo por 400 mL de agua (0.125 g/mL⁻¹). Los ajos se licuaran durante 5 minutos, dicho extracto será filtrado dos veces con gasas, los extractos acuosos de ajo blanco, japonés, elefante y negro resultantes se almacenaran en refrigeración (4°C).

Para la comparación del diámetro del halo de inhibición las cepas bacterianas que se utilizarán serán: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Listeria monocytogenes* (aislado de campo obtenido del cerebro de ovino proporcionado en medio selectivo Listeria Enrichment Broth, Modified de Sigma-Aldrich, Inc.) y *Staphylococcus aureus* (aislado de lesión localizada en la espalda de canino). Las cepas bacterianas las proporcionará el laboratorio de bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

1. Polifenoles totales

Se realizará la cuantificación de polifenoles totales por la técnica de Folin-Ciocalteu (1927) de los cuatro extractos y sus dos concentraciones, en la que se efectuara una curva patrón con ácido gálico. Se colocaran 240 µL de los extractos y 150 µL de reactivo de Folin, después de 5 minutos se agregaran 600 µL de Carbonato de Sodio al 15% y 2010 µL de agua destilada, se dejará reposar por 2 horas y se medirá la absorbancia a 760 nm.

2. Capacidad de Inhibición

Para esta prueba se utilizará el método de Kirby-Bauber, en la cual se determinará la capacidad de inhibición bacteriana de los extractos por difusión en placa. Las

cepas bacterianas se colocaran en agar infusión cerebro-corazón (BHI) durante 10 minutos, se sumergirá un hisopo estéril en dicho caldo con el cultivo para cubrir la superficie de la placa de Agar Mueller Hinton, incubándose a 37 ± 2 °C 10 minutos. Después de esto se colocaran los discos de membrana 0.2 μ m empapados con los extractos de los cuatro tipos de ajo y dos discos de antibiótico comercial como controles: Tetraciclina 30 mcg y Nitrofurantoína 300 mcg, se incubaran a 37 ± 2 °C 18 horas para su posterior lectura. Con ayuda de una regla de vernier se medirá el área de inhibición bacteriana alrededor de los sensidiscos, para clasificarlos en sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) según Wayne, USA: CLSI; 2012.

Engorda

Para la segunda parte del trabajo se habrán evaluado que ajos se utilizarán con las pruebas *in vitro* anteriores.

- **Control: 1.2 mL de agua por animal/vía oral**
- **T1: 1.2 mL de EAA (0.15 g/mL) por animal/vía oral**
- **T2: 1.2 mL de EAA (0.15 g/mL) por animal/vía oral**
- **T3: 0.6 de EAA/0.6 de EAA (0.15 g/mL) por animal/vía oral**

El extracto acuoso de ajo (EAA), se preparó pesando 50 g de ajo con 400 mL de agua, se picó y se dejó reposar en 400 mL agua (0.125 mL/g) por 48 h, se filtró con doble capa de gasa y posteriormente con papel Whatman 1, se almacenó a 4 °C en un frasco color ámbar. También se preparó extracto etanólico de ajo (EEA), se siguió el mismo procedimiento, para eliminar el etanol se utilizó un rota-vapor, se resuspendió dicho extracto con 500 mL de Medio esencial mínimo y 3.5 mL de Tween 20, se almacenó a 4 °C en un frasco color ámbar.

Los tratamientos que se utilizaron en el estudio *in vivo* fueron los siguientes; Control: 1.2 mL de agua, T1: 1.2 mL de EAA, T2: 1.2 mL EEA, T3: 0.6 mL EAA + 0.6 mL EEA, asperjando con un atomizador el alimento (Ganador conejo Malta

Cleyton: proteína 16%; grasa 3%; humedad 12%, fibra 17%, cenizas 10% y ELN 42%).

3. Parámetros productivos

Los gazapos se pesaron al inicio del experimento y posteriormente cada 7 días hasta llegar a peso de matanza con la finalidad de estimar ganancia de peso, peso semanal y conversión alimenticia.

Cada viernes por la mañana se pesaron los gazapos para evaluar parámetros productivos (ganancia de peso, peso semanal y conversión alimenticia), dicho pesaje se realizó con previo ayuno de 12 h evitando así datos erróneos y registrando todo en la libreta. De igual manera cada viernes se llevó el extracto a la granja para su uso durante la semana.

La metodología de evaluación de indicadores productivos se realizó de la siguiente manera:

Pesos

Se tomará semanalmente el peso de los gazapos de cada tratamiento con ayuda de una balanza digital.

Ganancia de peso (GP)

La ganancia de peso se estimará por diferencia de pesos, entre el peso final menos el peso inicial.

$$\text{GP} = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}$$

Consumo de alimento (CA)

Para esta variable se determinará con la siguiente fórmula:

$$\text{CA} = \text{alimento ofrecido (g)} - \text{sobrante del alimento}$$

Índice de Conversión alimenticia (ICA)

Se determinara mediante la relación entre el consumo de alimento total sobre el peso final obtenido.

$$\text{ICA} = \frac{\text{alimento consumido (kg)}}{\text{peso del gazapo(kg)}}$$

Porcentaje de mortalidad (% M)

$$\% \text{ M} = \frac{\text{número de gazapos muertos}}{\text{número de gazapos iniciados}} \times 100$$

4. Indicadores de inmunidad

De igual manera se tomaron muestras de sangre al inicio del experimento y previo a la matanza, para medir indicadores de inmunidad en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) UAEMéx. Para este análisis se utilizará la técnica de citometría de flujo, la cual permite medir poblaciones o subpoblaciones celulares agrupadas por tamaño, complejidad o por fluorescencia basada en la utilización de biomarcadores moleculares específicos. En este caso se utilizarán marcadores moleculares de granulocitos (CD11a) y niveles de apoptosis.

De igual forma se realizaron estudios parasitológicos para identificar *Eimerias spp.* a los animales en estudio por medio de la técnica de flotación y la cámara de MacMaster para determinar en número de huevos por gramo de heces.

La técnica tiene el siguiente proceso:

- Se pesa 4 g de heces y se mezcla con 60 mL de (SSS), Solución Salina Saturada esta solución está compuesta por 1 L de agua más 300 g de sal y 200 g. De azúcar la mezclamos en una temperatura de 300C a 400C y es enfriada a temperatura ambiente.
- Se homogeniza la muestra.
- Se cierne seis veces la muestra con dos vasos.

- Se retira una cantidad suficiente de la muestra con una pipeta Pausteur.
- Se llena dos cámaras de recuento de McMaster por separado y se deja reposar por unos 3 minutos.
- Se lleva al microscopio y se observa con el lente de 10 aumentos.
- Se cuenta el número de ooquistes.

5.- Matanza

La matanza de los animales se realizó después de 4 semanas de adición del extracto con ayuno previo de 12 h, se pesaron y se realizó la matanza de acuerdo a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-2014. Se tomaron mediciones de pH con ayuda de un Potenciómetro Hanna a los 45 min y 24 h. De igual manera se medirá color objetivo (L^* , a^* y b^*) con ayuda de Colorímetro Minolta. Los lomos fueron transportados en hielera con cubos de hielo (4-5 °C) al Laboratorio de Ciencia de la carne de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UAEMéx para su análisis de oxidación de grasa y proteína en vida de anaquel a los días 1, 3, 5, 7 y 9.

6. Oxidación de grasa y proteína

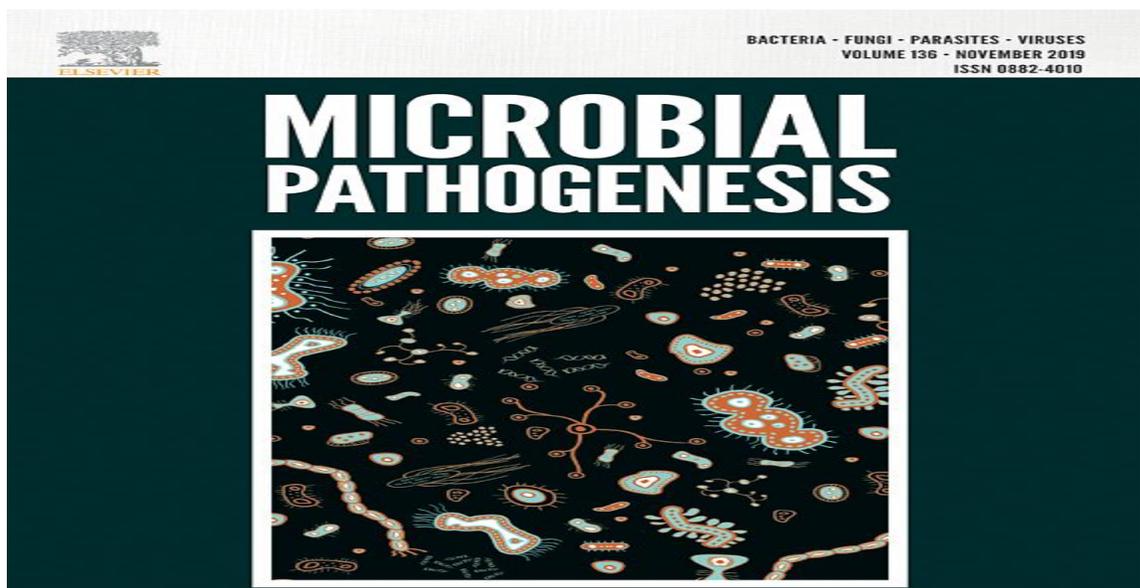
El análisis de la oxidación de grasa y proteína se realizaron a los días 1, 3, 5, 7 y 9 en vida de anaquel a 4 °C. Se medirá el contenido de grasa y proteína total mediante un análisis bromatológico de la muestra (AOAC, 1990), considerando la oxidación de grasas según lo propuesto por Raharjo Sri *et al.*, (1992). El grado de enranciamiento por oxidación de los lípidos de la carne se determinará mediante la prueba de TBARS, los resultados se expresaron como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en mg malondialdehído/Kg de músculo. Para la oxidación de proteínas se realizó siguiendo la técnica de Berlett y Stadtman, (1997), en la que los resultados se expresan en nmol de carbonilos por mg de proteína.

7. Microbiología de la carne

Se utilizaron 5 músculos derechos *Longissimus dorsi* transportados en hielera con cubos de hielo (4-5 °C) al Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Carne de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UAEMéx, para su análisis microbiológico en vida de anaquel a los días 1, 3, 5, 7 y 9. Sembrando por duplicado bacterias Mesofilas Aerobias (35 °C 48 h), Coliformes Fecales (44 °C 24 h) y Psicrófilos (20 °C 5 días) a las diluciones 10^0 , 10^1 , 10^2 y 10^3 .

VII. RESULTADOS

7.1. Artículo 1. Antimicrobial resistance of three common molecularly identified pathogenic bacteria to *Allium* aqueous extracts. Artículo publicado en *Microbial Pathogenesis Journal* Mayo 2020; Volumen 142.



ScienceDirect Journals & Books Register Sign in

COVID-19 campus closures: see options for getting or retaining Remote Access to subscribed content

Get Access Share Export Search ScienceDirect Advanced

Outline Highlights Abstract Keywords 1. Introduction 2. Materials and methods 3. Results 4. Discussion Acknowledgment CRediT authorship contribution statement Declaration of competing interest References Show full outline

 **Microbial Pathogenesis**
Volume 142, May 2020, 104028



Antimicrobial resistance of three common molecularly identified pathogenic bacteria to *Allium* aqueous extracts

Héctor D. Arzate Serrano ^a, María A. Mariezcurrena-Berasain ^a, Adriana Del Carmen Gutiérrez Castillo ^a, Benjamín Valladares Carranza ^a, Alberto Barbabosa Pliego ^a, Martín Talavera Rojas ^a, Uchenna Y. Anelie ^b, Abdelfattah Z.M. Salem ^a, Raymundo R. Rivas-Caceres ^c

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104028> Get rights and content

Recommended articles

- Proteobiotics as a new antimicrobial therapy
Microbial Pathogenesis, Volume 142, 2020, Article ...
Purchase PDF View details
- An endophytic strain of the genus *Bacillus* is...
Microbial Pathogenesis, Volume 142, 2020, Article ...
Purchase PDF View details
- Antimicrobial activity of *Lactobacillus ferment...*
Microbial Pathogenesis, Volume 142, 2020, Article ...
Purchase PDF View details

1 2 Next

Citing articles (0) Feedback



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: <http://ees.elsevier.com>



Antimicrobial resistance of three common molecularly identified pathogenic bacteria to *Allium* aqueous extracts

Daniel A. Serrano^a, María A. Mariezcurrena-Berasain^{a,*}, Adriana Del Carmen Gutiérrez Castillo^a, Benjamín Valladares Carranza^a, Alberto Barbabosa Pliego^a, Martín Talavera Rojas^a, Uchenna Y. Anele^b, Abdelfattah Z.M. Salem^a, Raymundo R. Rivas-Caceres^{c,**}

^a Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Toluca, México, C.P. 50090, Mexico

^b North Carolina Agricultural and Technical State University, Greensboro, NC, 27411, USA

^c Autonomous University of Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, 32310, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords

Allium sativum
Extracts
Inhibition
Bacterial resistance
Antimicrobial

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the *in vitro* bacterial inhibition of different types of garlic on *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. The bacterial strains were molecularly identified using gen 16S rDNA molecular identification. Four different types of garlics were used: 1) white, 2) Japanese, 3) elephant and 3) black, and these were evaluated at two different concentrations (0.25 and 0.125 g/mL) per garlic type. Bioactive compounds present in the garlics were identified using high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detector (HPLC-UV), and total polyphenols were quantified by the Folin-Ciocalteu technique. The Kirby-Baure method was used for the bacterial evaluation. Aqueous extract of black garlic had the highest amount of polyphenols 6.26 ± 0.21 mg GAE/mL. The area of inhibition was measured and classified as sensitive, intermediate or resistant. Using the disc diffusion assay, higher concentration (0.25 g/mL) of aqueous extract of white garlic had the highest antibacterial activity area, with 21.46 ± 3.94 mm for *L. monocytogenes*, 20.61 ± 2.47 mm for *S. aureus* and 17.83 ± 2.21 mm for *E. coli*. White garlic had comparable antimicrobial activity as the control (tetracycline at 30 µg) as indicated by the size of the inhibition halos. Based on your results, white garlic can be used as an alternative to synthetic antimicrobials.

1. Introduction

Previously, natural products were used to combat diseases, however, with the discovery of synthetic antibiotics, they were gradually replaced [1,52,53]. Natural products used to be the major ingredient of many drugs but pharmaceutical companies have decreased or even eliminated research on natural products [2,42–46,52]. The focus has been on synthetic antibiotics and their indiscriminate use have reduced their effectiveness against infectious diseases in addition to incidences of antibiotics resistance [3,47–50]. Foodborne diseases are still a public health problem worldwide and the causal agents are mainly *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Clostridium botulinum* [4,5]. Bacteria have the ability to adapt to an environment and develop resistance mechanisms, which can be of natural or acquired origin [6,7,51].

Due to the current problems of antibiotics resistance facing the livestock industry, natural products can be viable and economical alternatives [55,57,63]. One of such natural products is garlic (*Allium sativum*

) and there is documented literature on its antibacterial effect [8,9]. Therefore, there is a need to look for new medicines of herbal origin as they cannot contribute to antibiotics resistance and they have little or no toxic effect on livestock [10,57,64]. Garlic (*Allium sativum*) is an antimicrobial characterized by its high content of sulfuric compounds [11,12,54] and previous studies reported that garlic has a broad spectrum of antibacterial activity against *E. coli*, *Salmonella* spp [9,13]. Kamra et al. [14] reported garlic as anti-methanogenic and anti-protozoal agent with the ability to reduce methane emission. They concluded that garlic and plant extract, in general, can be used as an eco-friendly rumen modifier for sustainable production [15,56–62]. During processing, the unstable compounds of fresh garlic, including alliin, become stable compounds that include s-allylcysteine (SAC), the water-soluble compound with potent antioxidant effect [16]. The study of medicinal plants is still a work in progress but it has the potential to address some of the major issues such as the antibiotics resistance that have plagued the livestock industry. In the present study, we evaluated two concentrations (0.25 and 0.125 g/mL) of aqueous extracts

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: maria.mariezcurrana@yahoo.com.mx (M.A. Mariezcurrena-Berasain); rriivas@uacj.mx (R.R. Rivas-Caceres)

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104028>

Received 7 January 2020; Received in revised form 28 January 2020; Accepted 29 January 2020

Available online xxx

0882-4010/© 2020.

These shortcomings have resulted in the push for the use of natural food additives, promoting the exploration of natural antimicrobial compounds as an alternative [26].

The bacterial strains were identified by gen 16S rDNA molecular identification; protocol was developed according to Ref. [27]. The ex-

tracted genomic DNA was subjected to 16S rDNA sequence analysis. The resulting sequences were aligned and analyzed with homologous sequences from other bacteria.

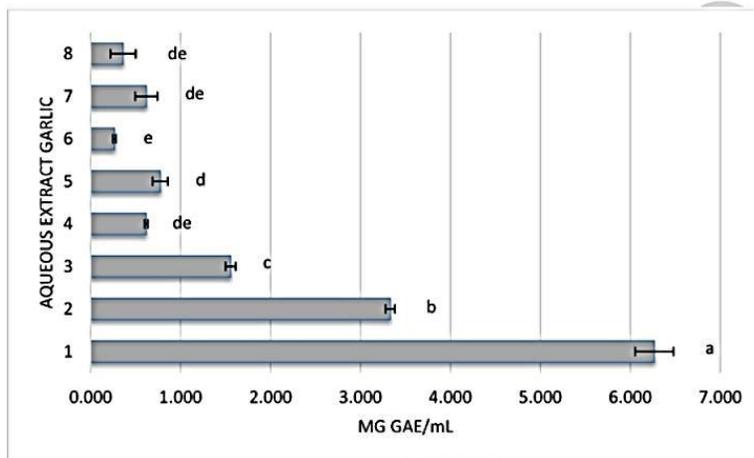


Fig. 1. Content of total polyphenols (expressed in μg equivalents to gallic acid) of the aqueous extracts of garlic. 1, Aqueous extract of black garlic (AEBG) at 0.25 g/mL; 2, AEBG at 0.125 g/mL; 3, Aqueous extract of white garlic (AEWG) at 0.25 g/mL; 4, AEWG at 0.125 g/mL; 5, Aqueous extract of elephant garlic (AEEG) at 0.25 g/mL; 6, AEEG at 0.125 g/mL; 7, Aqueous extract of Japanese garlic (AEJG) at 0.25 g/mL; 8, AEJG at 0.125 g/mL.

Table 4

Inhibition halos (mm) *in vitro* for commercial antimicrobials and their classification according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

| Bacteria | CF 30 μg | CIP 5 μg | FO 50 μg | GM 10 μg | MAC 300 μg | TE 30 μg | TSX 25 μg | SEM | P value |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 14.95 \pm 0.86 ^c | 21.39 \pm 2.36 ^b | 18.20 \pm 1.32 ^{bc} | 19.87 \pm 0.94 ^b | 0 ^d | 26.68 \pm 0.84 ^a | 25.46 \pm 1.25 ^a | 1.86 | 0.001 |
| CLSI | I | S | S | S | R | S | S | | |
| <i>S. aureus</i> | 24.58 \pm 1.42 ^a | 19.36 \pm 1.36 ^b | 0 ^d | 12.11 \pm 2.13 ^c | 0 ^d | 28.12 \pm 1.30 ^a | 26.03 \pm 1.22 ^a | 2.48 | 0.001 |
| CLSI | S | I | R | R | R | S | S | | |
| <i>L. monocytogenes</i> | 24.26 \pm 1.11 ^a | 21.14 \pm 1.89 ^b | 25.66 \pm 0.84 ^a | 19.34 \pm 0.72 ^b | 0 ^c | 25.39 \pm 1.03 ^a | 24.47 \pm 1.21 ^a | 1.90 | 0.001 |
| CLSI | S | S | S | S | R | S | S | | |

CF, Cephalotin; CIP, Ciprofloxacin; FO, Fosfomicin; GM, Gentamicin; MAC, Nitrofurantoin; TE, Tetracycline; TSX, Trimetropim/Sulfamethoxazole; R, Resistant; I, Intermediate; S, Sensitive. The values are expressed as the mean \pm standard deviation. Means with similar letters are not statistically different at a level of $P < 0.05$ according to the Tukey test.

Table 5

Inhibition of bacterial growth in millimeters (mm) of two concentrations of aqueous extract of white, Japanese, elephant and black garlic on *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

| Bacteria | 0,25 g/mL | | | | TE 30 μg | MAC 300 μg | SEM | P value |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------|--------------------------|------|------------|
| | AEWG | AEJG | AEEG | AEBG | | | | |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 17.83 \pm 1.49 ^a | 9.65 \pm 1.59 ^b | 0 ^c | 0 ^c | 26.24 \pm 0.84 | 0 | 1.20 | 0.001 |
| <i>S. aureus</i> | 20.78 \pm 1.53 ^a | 9.78 \pm 2.23 ^c | 13.28 \pm 1.52 ^b | 0 ^d | 24.64 \pm 1.05 | 0 | 1.46 | 0.001 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 21.57 \pm 3.25 ^a | 11.79 \pm 0.56 ^b | 12.48 \pm 1.16 ^b | 0 ^c | 25.52 \pm 0.61 | 0 | 1.68 | 0.001 |
| Bacteria | 0,125 g/mL | | | | TE 30 μg | MAC 300 μg | SEM | P value |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 13.10 \pm 1.28 ^a | 0 ^b | 0 ^b | 0 ^b | 26.24 \pm 0.84 | 0 | 0.91 | 0.001 |
| <i>S. aureus</i> | 18.06 \pm 1.60 ^a | 0 ^b | 0 ^b | 0 ^b | 24.64 \pm 1.05 | 0 | 1.41 | 0.001 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 16.48 \pm 2.52 ^a | 0 ^b | 0 ^b | 0 ^b | 25.52 \pm 0.61 | 0 | 1.15 | 0.001 |

AEWG, Aqueous extract of white garlic; AEJG, Aqueous Japanese garlic extract; AEEG, Aqueous extract of elephant garlic; AEBG, Aqueous extract of black garlic; TE, Tetracycline; MAC, Nitrofurantoin. The values are expressed as the mean \pm standard deviation. Means with similar letters are not statistically different at a level of $P < 0.05$ according to the Tukey test.

2.5. Experimental design

A completely randomized design with a $4 \times 2 \times 3$ factorial arrangement was used with ten replications for each bacterium. Independent variables were aqueous extracts; white garlic (AEWG), Japanese (AEJG), elephant (AEEG) and black (AEBG), concentrations (0.25 and 0.125 g/mL) and bacteria (*E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* and *S. aureus*) and the response/dependent variable was the inhibition of bacterial growth. An analysis of variance and comparison of means was performed by the Tukey Test ($P \geq 0.05$) using the statistical package Statgraphics Plus version 5.0.

2.6. Inhibition capacity

For this test, the Kirby-Bauber method was used and the extracts' ability to inhibit bacterial growth was determined by plaque diffusion. To determine the appropriate control to use, a preliminary test was carried out in which the bacteria were challenged with 7 different antimicrobials (Polydisks for Gram-negative and Gram-positive bacteria, Productos Biológicos de México, S.A.). With the help of a vernier rule, the area of bacterial inhibition around the senses were measured and classified as sensitive (S), intermediate (I) or resistant (R) according to Wayne USA: CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2012).

3. Results

Concentrations of total polyphenols in the extracts are shown in Fig. 1. Higher concentration (0.25 g/mL) of aqueous extract of black garlic (AEBG) had the highest total polyphenols (6.26 μg gallic acid equivalents (GAE/mL) and pH of 4.61 ± 0.03 ; the lowest values were noted for aqueous extract of elephant garlic (AEEG) 0.26 μg GAE/mL and pH of 6.61 ± 0.01 .

For *E. coli*, higher concentration (0.25 g/mL) of white garlic (AEWG) had the highest inhibition with 17.83 mm compared with aqueous extract of Japanese garlic (AEJG) and AEEG with 9.80 and 2.93 mm, respectively. Similar trend was noted for the lower the concentration (0.125 g/mL) of the extracts, with the highest inhibition halo noted for AEWG with 13.11 mm. No halo was noted for AEBG. In the case of *S. aureus*, AEWG had 20.61- and 17.87-mm halos for the higher and lower concentrations, respectively. The zone of inhibition for AEJG and AEEG were smaller with values of 8.12 and 0.82 mm and 9.01 and 3.13 mm, respectively. Higher concentration of white garlic had the biggest zone of inhibition (21.46 mm) on *L. monocytogenes*, followed by Japanese garlic with 5.88 mm and elephant garlic with 4.32 mm. As noted in the other two bacterial, AEBG showed no antibacterial activity in both concentrations.

The inhibition zones of the seven commercial antimicrobials used in the preliminary study are shown in Table 4. Based on the result, Tetracycline (30 μg) was selected as a positive control and nitrofurantoin (300 μg) as a negative control in the present study. The zone of inhibition on bacterial growth by the different garlic treatments is shown in Table 5. With the exception of AEWG, no halo was noted for the other treatments.

4. Discussion

The analysis identified 2-ethylidene [1,3]dithiane, 2-ethylidene [1,3]dithiane, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene, 3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene, diallyl disulfide, dimethyl trisulfide and methyl 2-propanol trisulfide. Allicin represents 70–80% of the thiosulphinates formed and previous reports documented the presence of allicin in garlic extracts [28,29]. They mentioned that allicin is converted into vinyl dithiols and into other compounds such as methyl 2-propanol disulphide, Dimethyl trisulphide and Diallyl tetrasulphide. Wang et al. [30] concluded that these compounds are the main sulfur components

of fresh garlic which decompose and form other compounds. The black garlic is SAC [31] – (Table 1).

Contrary to expectation, greater concentration of total polyphenols in black garlic did not have any effect on the bacteria. The antibacterial property of garlic is attributed to allicin, which is produced by ground-garlic. Allicin inhibits sulfhydryl enzymes and has been reported to reduce inflammation [8]. Cáceres et al. [32] highlighted the importance of the synergy between phenolic and sulfur compounds by blocking the activity of reactive oxygen on proteins, lipids and DNA. Another mechanism of action is the inhibition of RNA, DNA and protein synthesis [33].

Results showed that only the higher concentration of white garlic was comparable to the control treatment (tetracycline) in inhibiting *S. aureus* and *L. monocytogenes*. [34], reported a linear relation between garlic concentration and the diameter of inhibition halos, which they attributed to the effect of allicin and other sulfur compounds. García Rico et al. [35] evaluated the antibacterial activity of aqueous extract of three species of the Allium family (*Allium sativum*, *Allium fistulosum* and *Allium cepa*) on five bacterial strains, concluding that *A. cepa* showed greater effectiveness against *E. coli* with inhibition halos of 15 mm in diameter. Similarly, Salazar Córdova [36] reported a zone of inhibition of 14.3 mm against *E. coli*, with 25% concentration of aqueous extract of *A. sativum*. A previous study by Jiménez [2] reported that a range of 15.5–24.5 mm inhibition zones were established against *E. coli* 25922, *S. aureus* Methicillin Resistant and *S. aureus* ATCC 25923 using a garlic concentration of 250 mg/mL.

The allicin precursor enzyme, allinase, is inactivated by heat, so that the desirable bioactive is not formed if it is heated before cell disruption [37]. This agrees with Pérez [38], who reported that during cooking, sulfur losses occur due to high temperature; and this could be the reason why black garlic extract showed no antibacterial activity. This reaction could either be enzymatic degradation or Maillard reaction responsible for changes in taste, smell and color [39,40]. Ryu and Kang [41] reported that this process increases the concentration of flavonoids, pyruvate, total phenol, SAC, free sugars and minerals.

In conclusion, higher concentration (0.25 g/mL) of aqueous extract of white garlic had the best antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* compared with the aqueous extracts of Japanese garlic and elephant garlic. Aqueous extract of black garlic had no antimicrobial action on the bacteria studied. According to the results from the present study, the antimicrobial action of the aqueous extract of white garlic was comparable to tetracycline and can be used to replace synthetic antimicrobials.

Acknowledgment

The results are part of the project "Evaluation of garlic extract on productive, immunological parameters and the quality of rabbit meat" 4117/2016 UAEM - and are part of doctoral thesis of Héctor Daniel Arzate Serrano, UAEMéx and CONACYT.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

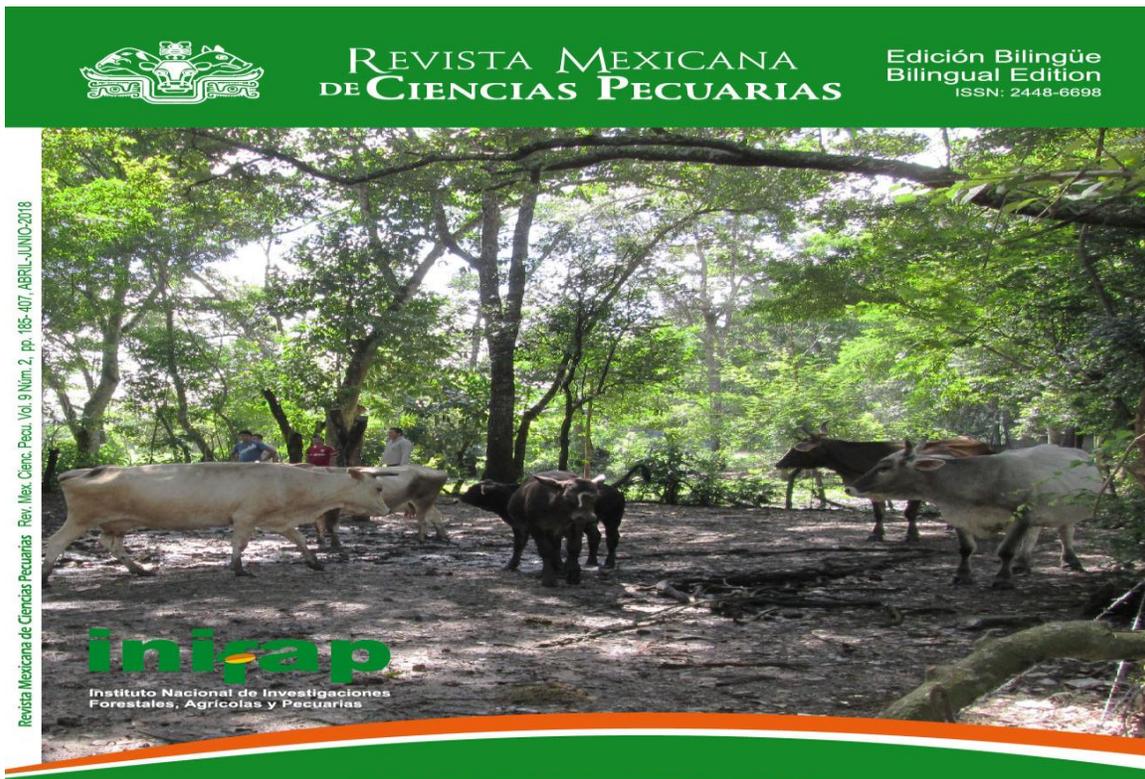
References

- [1] E.N.R. Saucedo, Use of natural antimicrobial agents in the conservation of fruits and vegetables Ra Ximhai, Sci. J. Soc. Cult. Sustain. Dev. 7 (2011) 153–170.
- [2] Jiménez, Y., Sebastián, C., Evaluation of the Antibiotic Effect of the Aqueous Extracts of *Allium Sativum* (Garlic) and of *Coriandrum Sativum* (Culantro) by the Diffusion Sensitivity Method on Bauer-Kirby Agar, on Bacterial Strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Serovar Typhi and *Salmonella Enterica* Serovar Choleraesuis; in Comparison with the Antibiotics Gentamicin and Ampicillin 2015, Catholic University of Ecuador.
- [3] C.L. Ventola, The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats, P T: A Peer Rev. J. Formul. Manag. 40 (4) (2015) 277–283.

- [4] C. Barton Behravesh, T.F. Jones, D.J. Vugia, C. Long, R. Marcus, K. Smith, S. Thomas, S. Zansky, K.E. Fullerton, O.L. Henao, E. Scallan, Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996–2005, *J. Infect. Dis.* 204 (2) (2011) 263–267.
- [5] WHO World Health Organization, Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals, 2017.
- [6] R. Cantón, M.I. Morosini, Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics, *FEMS Microbiol. Rev.* 35 (2011) 977–991.
- [7] N.H. Mansoub, M.A.M. Nezhady, Effect of garlic, thyme and yogurt compared to antibiotics on performance, immunity and some blood parameters of broiler chickens, *Indian J. Anim. Sci.* 81 (2011) 1197–1200.
- [8] L. Bayan, P.H. Koulivand, A. Gorji, Garlic: a review of potential therapeutic effects, *Avicenna J. Phytomed.* 4 (1) (2014) 1–14.
- [9] G. Gebreyohanne, M. Gebreyohanne, Medicinal values of garlic: a review, *Int. J. Med. Med. Sci.* 5 (2013) 401–408.
- [10] J.R. Ruiz, M. Roque, Antimicrobial activity of four plants from the north-east of Peru, *Sci. Res.* 12 (2009) 41–47.
- [11] J. Singh, M. Sharma, N. Singh, P. Kaur, A.P.S. Sethi, S.S. Sikka, Effect of sun-dried whole bulb garlic powder on nutrient utilization, blood parameters, duodenal morphology and faecal microbial load in broiler chickens, *Indian J. Anim. Sci.* 87 (2017) 195–198.
- [12] T. López, Garlic pharmacological properties and therapeutic indications, *Phytother. Pharmaceut. Field* 26 (2007) 78–81.
- [13] D. Deresse, Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study, *Asian J. Med. Sci.* 2 (2010) 62–65.
- [14] D.N. Kamra, et al., Garlic as a rumen modifier for eco-friendly and economic livestock production, *J. Appl. Anim. Res.* 40 (2) (2012) 90–96.
- [15] G.E. Boyhan, W.T. Kelley, D.M. Granberry, Production and Management of Garlic, Elephant Garlic and Leek, Extension Horticulturists Cooperative Extension Service, 2009.
- [16] M. Corzo-Martínez, N. Corzo, M. Villamiel, Biological properties of onions and garlic, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (12) (2007) 609–625.
- [17] A.Z.M. Salem, M.Z.M. Salem, M.M. El-Adawy, P.H. Robinson, Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats, *Anim. Feed Sci. Technol.* 127 (3–4) (2006) 251–267.
- [18] A.Z.M. Salem, A.C. Ryena, M.M.Y. Elghandour, L.M. Camacho, A.E. Kholif, M.C. Salazar, I.A. Domínguez, R.M. Jiménez, E.M. Almaraz, A.G.L. Martínez, M.A. Maríezurrena, Influence of *Salix babylonica* extract in combination or not with increasing levels of minerals mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of a total mixed ration, *Ital. J. Anim. Sci.* 13 (4) (2014) 3110.
- [19] W. Oberacher, S.D. Weinmann, Quality evaluation of tandemmass spectral libraries, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2641.
- [20] K. Baghalian, S. Ziai, M. Naghavi, H. Badi, A. Khalighi, Evaluation of alliin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes, *Sci. Hortic.* 103 (2) (2005) 155–166.
- [21] L. Díaz, K. Jiménez, Validación de un Método de Extracción de Alicina en Ajo y su Cuantificación por HPLC, Simposio de Metrológia 1066 (2008) 1–9.
- [22] O. Folini, V. Cioalcu, On tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *J. Biol. Chem.* 73 (1927) 627–650.
- [23] P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Carter, *Clinical Veterinary Microbiology*, second ed., Elsevier, Edinburgh, London, 2013.
- [24] J. Bannoehr, L. Guardabassi, *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity, 23 (4) (2012) p. 253–52.
- [25] Noble, W.C., *Staphylococci on the Skin in the Skin Microflora and Microbial Skin Disease 1992*, Cambridge University Press: Cambridge, p. 135–152.
- [26] W. Woraprayote, Y. Malila, S. Sorapukdee, A. Swetwathana, S. Benjakul, W. Visessanguan, Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products, *Meat Sci.* 120 (2016) 118–132.
- [27] V. Kavitha, A.B. Mandal, A. Gnanamani, Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase: an approach with *Bacillus licheniformis* MTCC 5514, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 94 (2014) 24–30.
- [28] E. Block, The organosulfur chemistry of the Genus *Allium*-Implications for the organic chemistry of sulfur, *Angew. Chem. Int. Ed.* 31 (1992) 1135–1178.
- [29] O. Calvo-Gómez, J. Morales-López, M.G. López, Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation, *J. Chromatogr.* 1036 (1) (2004) 91–93.
- [30] C.A.L. Hincapié, G.E.P. López, R.C. Torres, Comparison and characterization of garlic (*Allium sativum* L.) bulbs extracts and their effect on mortality and repellency of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: tetranychidae), *Chil. J. Agric. Res.* 68 (4) (2008) 317–327.
- [31] D. Wang, Y. Feng, J. Liu, J. Yan, M. Wang, J.I. Sasaki, C. Lu, Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system, *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 4 (1) (2010) 37–40.
- [32] E. Cáceres, F. Wilson, E.M. Ríos, I.E. Peñañe, C.C. Augusto, Determination of total phenols, fructans and pungency in six cultivars of garlic (*Allium sativum* L.) in Peru, *J. Chem. Soc. Peru* 76 (2010) 101–109.
- [33] R. Padiya, D. Chowdhury, R. Borkar, R. Srinivas, B.M. Pal, S.K. Banerjee, Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat, *PLoS One* 9 (5) (2014) e94228.
- [34] Z.Y. Al-Astal, Effect of storage and temperature of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria, *J. Al Azhar Univ. Gaza* 6 (2003) 2–11.
- [35] R.O. García Rico, F.C. Herrera Arias, *Bistua: J. Facul. Basic Sci.* 5 (2007) 68–79.
- [36] L. Salazar Córdova, Antimicrobial Effect of Extracts of *Allium Sativum* L. "garlic" on the *in vitro* Growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, National University of Piura, 2014.
- [37] S. Gorinstein, M. Leontowicz, H. Leontowicz, K. Najman, J. Namiesnik, Y.S. Park, S. Trakhtenberg, Supplementation of garlic lowers lipids and increases antioxidant capacity in plasma of rats, *Nutr. Res.* 26 (2006) 362–368.
- [38] J.P.L. Pérez, *Observation of the Antimicrobial Activity of Garlic (Allium Sativum) in the Secondary Education Laboratory in Eureka Magazine on Teaching and Dissemination of Sciences*, 2011, pp. 491–494.
- [39] S.E. Baq, S.Y. Cho, Y.D. Won, S.H. Lee, H.J. Park, A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl cysteine in black garlic by HPLC, *LWT Food Sci. Technol.* 46 (2012) 532–535.
- [40] D.G. Kim, M.J. Kang, S.S. Hong, Y.H. Choi, J.H. Shin, Antiinflammatory effects of functionally active compounds isolated from aged black garlic, *Phytother. Res.* 31 (1) (2017) 53–61.
- [41] J.H. Ryu, D. Kang, Physicochemical properties, biological activity, health benefits, and general limitations of aged black garlic: a review, *Molecules* 22 (6) (2017) 919.
- [42] E. Lydiá, C. Gupta, A. Khuroo, A.Z.M. Salem, Susceptibility of poultry associated bacterial pathogens to *Momordica charantia* fruits and evaluation of *in vitro* biological properties, *Microb. Pathog.* 132 (2019) 222–229.
- [43] M.Z.M. Salem, M. El-Hefny, H.M. Ali, H.O. Elansary, R.A. Nasser, A.A.A. El-Setawy, N. El-Shanhoury, N.A. Ashmawy, A.Z.M. Salem, Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius* ripened fruits against some pathogenic bacteria, *Microb. Pathog.* 120 (2018) 119–127.
- [44] M.Z.M. Salem, S.I. Behiry, A.Z.M. Salem, Effectiveness of root-bark extract from *Salvadora persica* against the growth of certain molecularly identified pathogenic bacteria, *Microb. Pathog.* 117 (2018) 320–326.
- [45] A. Khuroo, C. Aarti, A.Z.M. Salem, G.B. Rodríguez, R.R. Rivas-Cáceres, Antagonistic trait of *Staphylococcus succinus* strain AAS2 against uropathogens and assessment of its *in vitro* probiotic characteristics, *Microb. Pathog.* 118 (2018) 126–132.
- [46] S.I. Behiry, A.A. Mohamed, H.A. Younes, M.Z.M. Salem, A.Z.M. Salem, Antigenic and pathogenicity activities of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 molecularly identified and detected by indirect ELISA using polyclonal antibodies generated in rabbits, *Microb. Pathog.* 115 (2018) 216–221.
- [47] A. Gutiérrez Morales, V. Velázquez Ordoñez, A. Khuroo, A.Z.M. Salem, M.E. Estrada Zúñiga, M.Z.M. Salem, B. Valladares-Carranza, C. Burrola Aguilar, *Microb. Pathog.* 113 (2017) 181–189.
- [48] M.F. Echeverría Medina, P. Adeniyi Alaba, M.E. Estrada-Zúñiga, V. Velázquez-Ordoñez, A. Barbabosa-Pilego, M.Z.M. Salem, M.U. Alonso-Fresán, L.M. Camacho-Díaz, A.Z.M. Salem, Anti-staphylococcal properties of four plant extracts against sensitive and multi-resistant bacterial strains isolated from cattle and rabbits, *Microb. Pathog.* 113 (2017) 286–294.
- [49] P. Vázquez-Mendoza, M.M.M. Elghandour, P. Adeniyi Alaba, P. Sánchez-Aparicio, M.U. Alonso-Fresán, A. Barbabosa-Pilego, A.Z.M. Salem, Antimicrobial and bactericidal impacts of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 on fecal shedding of pathogenic bacteria in dairy calves and adult dogs, *Microb. Pathog.* 114 (2018) 458–463.
- [50] M. El-Hefny, N.A. Ashmawy, M.Z.M. Salem, A.Z.M. Salem, *Microb. Pathog.* 113 (2017) 348–356.
- [51] M.M.Y. Elghandour, A. Khuroo, A.Z.M. Salem, M.A. Maríezurrena-Berasain, L.M. Camacho Díaz, M. Cipriano-Salazar, Role of dose dependent *Escherichia coli* as ruminal anti-microflora agent to mitigate biogas production in prickly pear cactus flour based diet, *Microb. Pathog.* 115 (2018) 208–215.
- [52] A.Z.M. Salem, A. Khuroo, M.M.Y. Elghandour, J. Olivares-Pérez, S. Rojas-Hernández, R. Jiménez-Guillén, Susceptibility of ruminal bacteria isolated from large and small ruminant to multiple conventional antibiotics, *Microb. Pathog.* 121 (2018) 93–99.
- [53] N.A. Ashmawy, M.Z.M. Salem, M. El-Hefny, M.S.M. Abd El-Kareem, N.A. El-Shanhoury, A.A. Mohamed, A.Z.M. Salem, Antibacterial activity of the bioactive molecules identified in three woody plants against some pathogenic bacteria, *Microb. Pathog.* 121 (2018) 331–340.
- [54] M.A. Maríezurrena-Berasain, G. Velázquez-Garduño, P.M. Marín-Mendoza, A. Barbabosa Pilego, L.F.V. Castillo, B. Valladares Carranza, A. Khuroo, E. Amadika Ugbo, A.Z.M. Salem, Sensitivity of *Coriandrum sativum* extract on bacterial pathogens isolated from digestive system of rabbits, and its role on *in vitro* cecal gas production and fermentation, *Microb. Pathog.* 123 (2018) 18–23.
- [55] M. Nosrati, F. Javandel, L.M. Camacho, A. Khuroo, M. Cipriano, A. Seidavi, A.Z.M. Salem, The effects of antibiotic, probiotic, organic acid, vitamin C and *Echinacea purpurea* extract on performance, carcasses characteristics, blood chemistry, microbiota and immunity of broiler chickens, *J. Appl. Poultry Res.* 26 (2) (2017) 295–306.
- [56] A. Hassan, S.H. Abu Hafa, M.M.Y. Elghandour, R. Ravi Kanth Reddy, M.Z.M. Salem, U.Y. Anele, P.P. Ranga Reddy, A.Z.M. Salem, Influence of *Corymbia citriodora* leaf extract on growth performance, ruminal fermentation, nutrient digestibility, plasma antioxidant activity and faecal bacteria in young calves, *Anim. Feed Sci. Technol.* 261 (2020) 114394.
- [57] A. Safaei-Cherreh, B. Rasouli, P. Adeniyi Alaba, A. Seidavi, S. Rojas Hernández, A.Z.M. Salem, Effect of dietary *Foeniculum vulgare* Mill. extract on growth performance, blood metabolites, immunity and ileal microflora in male broilers, *Agrofor. Syst.* (2020) (in press), doi:10.1007/s10457-018-0326-3.
- [58] A. Parra-García, M.M.Y. Elghandour, R. Greiner, A. Barbabosa-Pilego, L.M. Camacho-Díaz, A.Z.M. Salem, Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on ruminal methane and carbon dioxide production and fermentation kinetics in a steer model, *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 26 (15) (2019) 15333–15344.
- [59] M.M.Y. Elghandour, I. Rodríguez-Ocampo, A. Parra-García, A.Z.M. Salem, R. Greiner, O. Marquez-Molina, M. Barros-Rodríguez, A. Barbabosa-Pilego, Biogas production from prickly pear cactus containing diets supplemented with *Moringa oleifera* leaf extract for a cleaner environmental livestock production, *J. Clean. Prod.* 185 (2018) 547–553.
- [60] A. Parra-García, A.Z.M. Salem, M.M.Y. Elghandour, L.M. Camacho, N. Odongo, Potential impact of prickly pear cactus flour and *Salix babylonica* extract on ce-

- cal fermentation and methane production in horses, *Agrofor. Syst.* 92 (2018) 1145–1154.
- [61] M.M.Y. Elghandour, J.C. Cardenas-Chantres, A. Esquivel-Velázquez, A. Barbabosa-Pliego, M. Cipriano, A.Z.M. Salem, *In vitro* cecal gas and methane production of soybean hulls-containing diets in the presence of *Salix babylonica* extract as a fermentation modulator in horses, *J. Equine Vet. Sci.* 53 (2017) 45–54.
- [62] J. Pedraza-Hernández, M.M.Y. Elghandour, A. Khusro, L.M. Camacho, L.H. Vallejo, A. Barbabosa-Pliego, A.Z.M. Salem, Mitigation of ruminal biogases production from goats using *Moringa oleifera* extract and live yeast culture for a cleaner agriculture environment, *J. Clean. Prod.* 234 (2019) 779–786.
- [63] M.J. Adegbeye, M.M.Y. Elghandour, J.C. Monroy, T.O. Abegunde, A.Z.M. Salem, A. Barbabosa-Pliego, T.O. Faniyi, Potential influence of *Yucca extract* as feed additive on greenhouse gases emission for a cleaner livestock and aquaculture farming - a review, *J. Clean. Prod.* 239 (2019) 118074.
- [64] M. Zeineldin, R. Barakat, A. Elolimy, A.Z.M. Salem, M.M.Y. Elghandour, J.C. Monroy, Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health, *Microb. Pathog.* 124 (2018) 106–115.

7.2. Artículo 2.



REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS



Inicio Acerca de Área personal Buscar Actual Archivos Notas al Autor Ayuda

#5479 Resumen

RESUMEN REVISIÓN EDICIÓN

Envío

Autores/as María Antonia Mariezcurrena Berasain
Título Capacidad antibacteriana del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum* L.) sobre la microbiota digestiva de conejos
Archivo original [5479-13824-1-SM.DOCX](#) 2019-08-19
Archivos comp. Ninguno [AÑADIR UN ARCHIVO COMPLEMENTARIO](#)
Emisor/a María Antonia Mariezcurrena Berasain
Fecha de envío August 19, 2019 - 01:48 PM
Sección Artículos
Editor/a Elizabeth Loza-Rubio
Comentarios del autor/a Estimado MVZ Arturo García Fraustro, enviando un cordial saludo me permito enviar el artículo Capacidad antibacteriana del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum* L.) sobre la microbiota digestiva de conejos, para su posible publicación.

ISSN

ISSN-e: 2448-6698

Impact factor

Journal Citation Reports: 0.884

Scimago Journal Rank en Scopus: 0.260

USUARIO/A

He iniciado sesión como...
maria

Capacidad antibacteriana del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum* L.) sobre la microbiota digestiva de conejos

Antibacterial ability of the aqueous garlic extract (*Allium sativum* L.) on the digestive microbiota of rabbits

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de inhibición bacteriana *in vitro* del extracto acuoso de ajo sobre la microbiota bucal, cecal y rectal de conejos en una explotación comercial del Estado de México. Se utilizaron 21 animales Chinchilla x Nueva Zelanda de 40±2 días de edad y 1.82±0.15 kg PV. Se recolectaron muestras de hisopados de boca, ano y ciego. Se aisló *Escherichia coli*, *Shigella* sp, *Paentoea agglomerans* y *Acinobacter lowffii*. Se utilizó la técnica de difusión en placa por el método de Kirby-Bauber para determinar los halos de inhibición bajo dos concentraciones de extracto acuoso de ajo (125 mg/ml y 62.5 mg/ml). Los halos de inhibición bajo la concentración de 125 mg/ml fue de 17.16 mm en promedio y para la concentración de 62.5 mg/ml fue de 12.37 mm. En el caso de la mayor concentración, el 54% de las muestras se clasifica como Sensible a los antimicrobianos Gentamicina, Amikacina y Sulfametoxazol/Trimetoprima. Se sugiere la utilización del extracto acuoso de ajo como tratamiento preventivo antimicrobiano en conejos de engorda de explotaciones comerciales.

Palabras clave: Antimicrobiano, *in vitro*, conejo, inhibición.

Antibacterial ability of the aqueous garlic extract (*Allium sativum* L.) on the digestive microbiota of rabbits

Abstract

The aim of this study was to evaluate the capacity of bacterial inhibition *in vitro* of the aqueous extract of garlic on the buccal, cecal and rectal microbiota of rabbits in a commercial farm of the State of Mexico. In total, 21 Chinchilla x New Zealand rabbits of 40 ± 2 days of age and 1.82 ± 0.05 kg of body weight were used. Swabs of mouth, anus and caecum were collected. *Escherichia coli*, *Shigella* sp, *Paentoea agglomerans* and *Acinobacter lowffii* were isolated. The plate diffusion technique was used by the Kirby-Bauber method to determine the inhibition zones under two concentrations of aqueous extract of garlic (125 mg/ml and 62.5 mg/ml). The inhibition halos under the concentration of 125 mg/ml was 17.16 mm on average and for the concentration of 62.5 mg/ml was 12.37 mm. In the case of the highest concentration, 54% of the samples were classified as sensitive to gentamicin, amikacin and sulfamethoxazole/trimethoprim. The use of the aqueous extract of garlic as an antimicrobial preventive treatment in fattening rabbits of commercial farms is suggested.

Key words: Antimicrobial, *in vitro*, rabbit, inhibition.

Introducción

En México, la cunicultura se considera una actividad secundaria, donde la producción de carne de conejo se lleva a cabo de forma familiar, para autoconsumo y venta local ^(1,2). El Estado de México se ha consolidado como el de mayor producción de carne (25.5%), seguido de Michoacán (16.9%) y Ciudad de México (12.5%). El inventario del Estado de México es de aproximadamente 45 000 vientres y produce aproximadamente 2 340 toneladas de carne, siendo los municipios de mayor producción Amecameca, Jilotepec, Atlacomulco, Texcoco, además del Valle de Toluca ⁽³⁾. El Estado de México cuenta con corredores gastronómicos como la Marquesa, Tenancingo y la zona del Nevado de Toluca, y cuencas cunícolas, como la zona norte (Atlacomulco, San Felipe del Progreso, El Oro, Ixtlahuaca, entre otros) y suroriente (Chalco, Amecameca, Nezahualcóyotl y Texcoco) ^(4,5). En comparación con otras carnes (cerdo, bovino y ave), la carne de conejo tiene un mayor contenido proteico (23%) ⁽⁶⁾, además del alto contenido de vitaminas del complejo B y bajos niveles de grasa y colesterol ^(7, 8, 9). A pesar de todas estas ventajas, el consumo de la carne de conejo no es habitual en México. Hoy en día, los consumidores muestran más interés en las prácticas y normas pecuarias, y se encuentran dispuestos a pagar más por productos orgánicos, locales, inocuos y con propiedades nutraceuticas, como es la carne de conejo ^(10, 11). Sin embargo, las unidades de producción tienen una deficiente infraestructura, manejo reproductivo, alimenticio y sanitario al ser mayoritariamente de traspatio ⁽¹²⁾. Además, se tiene la problemática de la falta de medicamentos específicos para la especie y la falta de asistencia técnica que ocasionan tratamientos ineficientes. En este sentido, las plantas medicinales se consideran una buena alternativa por su alta efectividad y bajo costo, además de no contribuir a la resistencia bacteriana ^(13, 14).

El ajo (*Allium sativum*) pertenece a la familia Liliaceae, originaria de Asia central^(15, 16). Su efecto terapéutico es atribuido a los constituyentes sulfurados, que también son responsables de su sabor y olor típicos. Entre ellos destaca la alicina como antibacteriano, antiparasitario, antifúngico, hipoglicémico y antiinflamatorio^(17, 18, 19). En la actualidad se está retomando el estudio y uso de productos de origen natural en la industria alimenticia humana y pecuaria. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de inhibición bacteriana *in vitro* del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) de la microbiota bucal, cecal y rectal de conejos en una explotación comercial del Estado de México.

Materiales y métodos

Preparación del Extracto

Se elaboraron dos concentraciones de extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) siguiendo la metodología⁽²⁰⁾ con algunas modificaciones. En la primera dilución se utilizaron 50 g de ajo por cada 400 ml de agua (125 mg/ml) y para la segunda 50 g de ajo por 800 ml de agua (62.5 mg/ml). Los ajos se licuaron durante 5 min (Oster 6630-13) y se filtraron dos veces con papel Watman 1. El extracto acuoso de ajo (EAA) resultante se almacenó en refrigeración (4 °C) en frascos ámbar de 100 ml.

Diseño Experimental

Se utilizó un muestreo aleatorio simple⁽²¹⁾. Se muestrearon 21 conejos Chinchilla x Nueva Zelanda de 40±2 días de edad y 1.82±0.05 kg de peso de una granja comercial, ubicada en la Colonia Virgencitas, municipio de Nezahualcóyotl, Estado de México (19° 21' 36" y 19° 30' 04" latitud norte y 98° 57' 57" y 99° 04' 17" longitud oeste).

Muestreo

Las muestras se tomaron por la mañana, se obtuvo un hisopado bucal y anal de cada conejo y luego del sacrificio ⁽²²⁾ se recolectó un hisopado del ciego. Las 63 muestras se transportaron en tubos con medio Stuart a temperatura de refrigeración (4 ± 1 °C) al laboratorio de bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Universidad Autónoma del Estado de México, para la siembra e identificación bacteriana.

Siembra y Aislamiento Bacteriano

Las muestras fueron sembradas en Agar Tripteína Soya y Agar McConkey e incubadas a 37 °C por 24 h. Se realizó una descripción morfológica de la colonia bacteriana, tinción de Gram y microscopía de cada muestra. Se procedió a la purificación de las colonias y sobre estos aislados se realizaron las pruebas de sensibilidad. La identificación de las bacterias se hizo con el Kit EnteroPluri-Test Becton Dickinson® (BD Cat. No. L010570-02) ⁽²³⁾.

Capacidad de Inhibición del Extracto Acuoso de Ajo

Se utilizó la técnica de Kirby-Bauber ⁽²⁴⁾. Las cepas bacterianas se ajustaron a una escala de 0.5 McFarland (1×10^6 UFC/ml), se inoculó la cepa bacteriana aislada en caldo peptona de carne durante 10 min a 37 °C. Se sumergió un hisopo estéril en el caldo con el cultivo para cubrir la superficie de la placa de Agar Mueller Hinton, incubándose a 37 ± 2 °C durante 10 min. Después, se colocaron los discos estériles de papel Whatman® No. 1 (Cat. No. 1001090) impregnados con el EAA (125 mg/ml y 62.5 mg/ml). Se utilizaron como control de la inhibición de crecimiento bacteriano, un sensidisco de Gentamicina (10 µg), Amikacina (30 µg) o Sulfametoxazol/Trimetoprima (25 µg) (Polidiscos para bacterias de

tipo Gram negativos y Gram positivos, Productos Biológicos de México, S.A. ®) y un control negativo de inhibición de crecimiento bacteriano de agua (se colocó por ser un extracto acuoso, de esta manera se asegura que el agua utilizada en dicho extracto no interviene en el crecimiento bacteriano). Se incubaron a 37 ± 2 °C por 18 h. Con ayuda de una regla de vernier se midió el área de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco, clasificándose de acuerdo con el halo de inhibición en Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R) ⁽²⁵⁾.

Resultados

Los halos de inhibición sobre el crecimiento bacteriano presentados por las dos concentraciones de EAA (125 mg/ml y 62.5 mg/ml) se muestran en la Tabla 1. Además de la clasificación del antibiótico utilizado y de ambas concentraciones de EAA en actividad resistente, intermedia o sensible.

Se realizaron un total de 63 sembrados en los medios de cultivo bacteriológicos, en los cuales el crecimiento bacteriano se presentó en nueve muestras de boca (14.2%), seis de ciego (9.5%) y cuatro de ano (6.3%). En ocho animales se aislaron bacterias de las tres zonas muestreadas, en 44 (69.8%) no hubo crecimiento bacteriano. La lectura del Kit EnteroPluri-Test Becton Dickinson®, así como el complemento de las pruebas bioquímicas de los aislados bacteriológicos dio como resultado la identificación de las siguientes bacterias: 11 aislados de *Escherichia coli*, tres de *Shigella* sp, tres de *Paantoea agglomerans* y dos de *Acinobacter lowffii*.

Al comparar los halos de inhibición sobre el crecimiento bacteriano del extracto acuoso de ajo con la Gentamicina se muestra que dicho antibiótico mostró sensibilidad en 7/7 aislados, para la concentración 62.5 mg/ml de EAA solo dos aislados fueron sensibles y

para la concentración de 125 mg/ml se presentó una actividad similar a la de la Gentamicina 6/7. Para el Sulfametoxazol/Trimetoprima las seis cepas aisladas fueron sensibles, al comparar los EAA se aprecia que desarrollaron actividad antibacteriana intermedia, solo fueron sensibles 2/6 en la concentración de 62.5 mg/ml y 3/6 en la concentración de 125mg/ml. Los aislados bacterianos que fueron desafiados con la Amikacina, mostraron el mismo número de cepas catalogadas como sensibles 3/6, que el EAA en la concentración de 125 mg/ml.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* de aislados de muestras de boca, ano y ciego de conejos comparando los halos de inhibición de los antibióticos con las concentraciones de extracto acuoso de ajo - EAA (*Allium sativum*) y su clasificación ⁽²⁶⁾.

| M | Origen | Aislamiento | Antibiótico | | EAA | | | | | |
|----|--------|------------------------------|-------------|-------|------------|-----------|------|-------|---|---|
| | | | | | 62.5 mg/ml | 125 mg/ml | Agua | | | |
| | M | | | | | | | | | |
| 1 | Boca | <i>Escherichia coli</i> | GM | 21.20 | S | 0 | R | 10.96 | R | 0 |
| 2 | Boca | <i>Acinetobacter lowffii</i> | TSX | 30.64 | S | 8.42 | R | 8.61 | R | 0 |
| 3 | Boca | <i>Escherichia coli</i> | AMK | 26.53 | S | 10.97 | R | 17.48 | S | 0 |
| 4 | Boca | <i>Pantoea agglomerans</i> | GM | 27.05 | S | 13.48 | I | 17.91 | S | 0 |
| 5 | Boca | <i>Escherichia coli</i> | TSX | 25.45 | S | 11.54 | I | 13.31 | I | 0 |
| 6 | Boca | <i>Escherichia coli</i> | AMK | 0 | R | 12.49 | R | 19.54 | S | 0 |
| 7 | Boca | <i>Pantoea agglomerans</i> | GM | 23.45 | S | 10.79 | R | 15.55 | S | 0 |
| 8 | Boca | <i>Shigella sp</i> | TSX | 32.07 | S | 18.59 | S | 21.51 | S | 0 |
| 9 | Boca | <i>Pantoea agglomerans</i> | AMK | 16.17 | I | 15.47 | I | 15.85 | I | 0 |
| 10 | Ciego | <i>Shigella sp</i> | GM | 25.59 | S | 18.22 | S | 26.77 | S | 0 |
| 11 | Ciego | <i>Escherichia coli</i> | TSX | 23.97 | S | 13.60 | I | 16.07 | S | 0 |

| | | | | | | | | | | |
|----|-------|------------------------------|-----|-------|---|-------|---|-------|---|---|
| 12 | Ciego | <i>Acinetobacter lowffii</i> | AMK | 13.05 | R | 9.40 | R | 12.60 | R | 0 |
| 13 | Ciego | <i>Escherichia coli</i> | GM | 21.89 | S | 12.19 | R | 16.17 | S | 0 |
| 14 | Ciego | <i>Shigella sp</i> | TSX | 47.43 | S | 21.49 | S | 30.34 | S | 0 |
| 15 | Ciego | <i>Escherichia coli</i> | AMK | 23.41 | S | 11.20 | R | 17.67 | S | 0 |
| 16 | Ano | <i>Escherichia coli</i> | GM | 21.16 | S | 9.73 | R | 15.58 | S | 0 |
| 17 | Ano | <i>Escherichia coli</i> | TSX | 24.36 | S | 9.81 | R | 12.11 | I | 0 |
| 18 | Ano | <i>Escherichia coli</i> | AMK | 18.77 | S | 8.59 | R | 14.10 | R | 0 |
| 19 | Ano | <i>Escherichia coli</i> | GM | 33.49 | S | 19.15 | S | 23.91 | S | 0 |

M: muestra; GM: Gentamicina 10 µg; TSX: Sulfametoxazol/Trimetoprima 25 µg; AMK: Amikacina 30 µg.

R: Resistente, I: Intermedia, S: Sensible.

GM= Gentamicina: R ≤12, I 13-14 y S ≥15.

TSX = Sulfametoxazol/Trimetoprima: R ≤10, I 11-15 y S ≥16.

AMK = Amikacina: R ≤14, I 15-16 y S >17.

El dato numérico se refiere a los halos de inhibición en mm.

Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano de mayor diámetro se presentaron en la concentración de 125 mg/ml, con un promedio del halo obtenido de 17.2 mm, mientras que para la concentración de 62.5 mg/ml fue de 12.4 mm.

Discusión

La actividad antimicrobiana del ajo depende principalmente del compuesto alicina, que es más eficaz en las bacterias grampositivas que en gramnegativas. El principal efecto antimicrobiano de la alicina se debe a su reacción química con los grupos tiol de diversas enzimas ⁽²⁶⁾, por ejemplo, alcohol deshidrogenasa, tioredoxina reductasa y ARN polimerasa, lo que causa su inactivación ^(27, 28). Además, contiene otros compuestos productos de su degradación como: ajoene, disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo,

vinilditiínas, salicisteína, S-alil-mercapto cisteína, entre otros⁽²⁹⁾. El efecto del ajo depende de las diferencias estructurales de las cepas bacterianas, los polisacáridos y lípidos contenidos en la pared celular tienen un efecto sobre la permeabilidad de la alicina y otros constituyentes de ajo⁽³⁰⁾.

En este estudio se utilizaron como controles dos aminoglucósidos (Gentamicina y Amikacina), los cuales se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, que contienen ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S) y proteínas llamadas S (small o pequeña, en la subunidad 30S)⁽³¹⁾. Actúan interfiriendo la lectura del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria, o bien la inhibición total de la síntesis proteica de la bacteria⁽³²⁾. La Gentamicina utilizada en este trabajo, muestra halos de inhibición clasificados como Sensibles para el aislado de *E. coli* (24.43 mm), mismo resultados que muestra el EAA a la concentración alta (16.65 mm). Para la Amikacina se reporta un promedio de 16.32 mm para el total de aislados, 11.35 mm para la concentración baja de EAA y 16.20 mm para la concentración alta, por lo que el EAA 125 mg/ml tiene actividad intermedia al igual que la Amikacina.

Por otro lado, las sulfamidas son análogos del ácido paraaminobenzoico, por lo que compiten por la enzima dihidropteroatosintetasa, evitando la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Actúa sinérgicamente con las diaminopirimidinas, como la Trimetoprima, estas compiten por la enzima dihidrofolatoreductasa que cataliza la conversión de ácido dihidrofólico en ácido tetrahidfólico⁽³³⁾. Los resultados obtenidos indican que el Sulfametoxazol/Trimetoprima muestra halos de inhibición con diámetros que se clasifican como Sensibles con una promedio de 30.65 mm, al comparar estos resultados con el EAA a la concentración de 62.5 mg/ml (13.90 mm) y 125 mg/ml (16.99 mm), se aprecia que existe una diferencia marcada

entre los halos de inhibición, aunque la concentración alta se clasifica como sensible al igual que el antibiótico utilizado como control.

Entre las enterobacterias de importancia clínica se encuentra *Escherichia* sp, *Pantoea agglomerans* y *Shigella* sp⁽³⁴⁾, especies que fueron aisladas en el presente trabajo y en la que se resalta la importancia de la cecotrofia, proceso fisiológico que permite el desarrollo de una población microbiana estable de los productos de la fermentación, como los ácidos grasos volátiles.

Escherichia coli fue aislada en las tres zonas muestreadas de los conejos (boca, ciego y ano), presentando inhibición de su crecimiento con ambas concentraciones del extracto acuoso de ajo. Se ha reportado que se necesita una concentración de 12.5 mg/ml de ajo para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*⁽³⁵⁾. En un estudio similar con una concentración de ajo de 250 mg/ml establece un promedio de 12 mm de diámetro en los halos de inhibición de *E. coli*⁽³⁶⁾, siendo en el presente trabajo de 14.7 mm el diámetro promedio de halos de inhibición que generó el EAA sobre esta bacteria en la concentración de 125 mg/ml, mientras que fue de 10.2 mm para la concentración de 62.5 mg/ml. Así mismo,⁽³⁷⁾ demostró el efecto antimicrobiano del ajo sobre *E. coli* con una concentración de extracto acuoso de 25%, con promedio de diámetro de halos de inhibición de 14.3 mm. Esto se relaciona con lo que reporta⁽³⁸⁾, quien establece que a mayor concentración de ajo se obtendrán halos de inhibición con mayor diámetro.

Las enterobacterias se han asociado a la fácil adaptación de los mecanismos de resistencia frente a antibióticos⁽³⁹⁾. Existen diversos estudios en el que se demuestra la resistencia de agentes bacterianos a diferentes antibióticos sintéticos, por su capacidad adaptativa y efecto combinado de rápidos índices de crecimiento, de mutaciones genéticas y de la selección de las mismas⁽⁴⁰⁾. Han surgido cepas de *Shigella* sp resistentes a diversos antibióticos, tal es el

caso de la cepa que se aisló entre el periodo de 1969-1970 en la epidemia de Centroamérica y México en la que se reportó resistencia a Sulfonamidas, Estreptomicina, Tetraciclinas y Cloranfenicol ⁽⁴¹⁾. Existe la necesidad de buscar alternativas antimicrobianas debido a la notable resistencia de gran número de patógenos oportunistas con los antibióticos existentes ⁽⁴²⁾. Los antimicrobianos de origen natural no contribuyen, al desarrollo de cadenas de resistencia bacteriana con poco o nulo efecto tóxico ⁽⁴³⁾.

Conclusiones

El extracto acuoso de ajo a la concentración 125 mg/ml tiene una capacidad similar de inhibición de crecimiento *in vitro* sobre las bacterias aisladas de boca, ciego y ano (*Escherichia coli*, *Shigella* sp, *Paontoea agglomerans* y *Acinobacter lowffii*) de conejos de una granja de producción del Estado de México en comparación con los antibióticos sintéticos que se utilizaron. Por lo que se sugiere suplementar en el alimento el extracto acuoso de ajo a una concentración de 125 mg/ml como tratamiento preventivo antimicrobiano en conejos de engorda. El extracto acuoso de ajo de menor concentración, no es considerado con potencial antibacteriano.

Literatura citada

1. CNSPC. Comité Nacional Sistema Producto Cunicola. <http://sistemaproductocunicola.org.mx/cunicola.html> Consultado 29 Ago, 2018.
2. SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Manual de Buenas Prácticas de Producción de la Carne de Conejo. México. 2015.

3. SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. El Estado de México primer lugar en producción y consumo de conejo. México. 2012.
4. Mendoza B. Situación de la cunicultura en México. Ciclo internacional de conferencias en cunicultura empresarial. Chihuahua. 2001: 60-68.
5. Rodríguez AGI. Competitividad del sistema agroalimentario localizado productor de carne de conejo de la zona sur oriente del Estado de México [tesis maestría]. México: Universidad Autónoma del Estado de México; 2012.
6. Bixquert M, Fuertes A, Gómez BJ, Hernández P, Martínez E, Monereo S, et al. Guía científica y gastronómica de la carne de conejo. España: Organización Interprofesional de la Carne de Conejo de España 2011; 15-17.
7. Dalle Zotte A. Perception of rabbit meat and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livest Prod Sci* 2002; (75): 11-32.
8. OIEDRUSBC. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable de Baja California. Estudio sobre cunicultura en el Estado de Baja California. Baja California, México. 2009.
9. Hernández P, Dalle Zotte A. Nutrition of the rabbit. In: Blas C, Wiseman J editors. *Influence of diet on rabbit meat quality*. UK: CABI. 2010: 163-178.
10. Napolitano F, Braghieri A, Piasentier E, Favotto S, Naspetti S, Zanolli R. Effect of information about organic production on beef liking and consumer willingness to pay. *Food Qual Prefer* 2010; (21): 207-212.
11. Kallas Z, Gil JM. A dual response choice experiments (DRCE) design to assess rabbit meat preference in Catalonia: A heteroscedastic extreme-value model. *British Food Journal* 2012; 114 (10): 1394-1413.

12. Olivares R, Gómez MÁ, Schwentesius R, Carrera B. Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. *Región y Sociedad* 2009; (21): 191-207.
13. Ruiz JR, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriental peruano. *Cienc Invest* 2009; (12): 41-47.
14. Arroyo-Lara A, Landín-Grandvallet LA, Alonso-Bustamante A, Sánchez-Aguilar MA, Suárez-Franco G. Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. *Rev Cient Biol Agropec Tuxpan* 2015; (3): 1045-1052.
15. López T. El ajo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Offarm* 2007; (26): 78-81.
16. Greco MF. Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo [tesis licenciatura]. Argentina: Universidad Nacional de Cuyo; 2011.
17. Ledezma E, Apitz-Castro R. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. *Rev Iberoam Micol* 2006; (23): 75-80.
18. Díaz L, Jiménez K. Validación de un método de extracción de alicina en ajo y su cuantificación por HPLC. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México. 2008: 1-6.
19. Zeng T, Guo FF, Zhang CL, Song FY, Zhao XL, Xie KQ. A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials for the effects of garlic on serum lipid profiles. *J Sci Food Agr* 2012; (92): 1892-1902.
20. Salem AZ, Ryena AC, Elghandour MM, Camacho LM, Kholif AE, Salazar MC, et al. Influence of *Salix babylonica* extract in combination or not with increasing levels of

- minerals mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of a total mixed ration. Ital J Anim Sci 2014; (13): 873-879.
21. Aguilar-Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. Salud en Tabasco 2005; (11): 333-338.
 22. NOM-033-SAG/ZOO-2014. Norma Oficial Mexicana, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Secretaría de Gobernación. México. 2014.
 23. Vullo D, Wachsmann M, Alche L. Microbiología en Práctica. Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. Buenos Aires, Argentina: Ed Atlante; 2000.
 24. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; (45): 493-496.
 25. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Second Informational Supplement. United States, 2012.
 26. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect 1999; (1): 125-129.
 27. Kyung KH. Antimicrobial properties of allium species. Current opinion in biotechnology, 2012; 23 (2): 142-147.
 28. Roemer T, Xu D, Singh SB, Parish CA, Harris G, Wang H, Bills GF. Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery. Chemistry & biology 2011; 18 (2): 148-164.
 29. Bhandari PR. Garlic (*Allium sativum* L.): A review of potential therapeutic applications. International Journal of Green Pharmacy 2012; 6 (2): 118-129.

30. Eja ME, Asikong BE, Atriba C, Arikpo GE, Anwan EE, Enyi-Idoh KH. A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organisms. Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 2007; 38 (2): 343-348.
31. Kaczanowska M, Rydén-Aulin M. Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev 2007; 71 (3): 477-494.
32. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica. 1st ed. 2006; 631-647.
33. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica 2009; 27 (1), 44-52.
34. Puerta-García A, Mateos-Rodríguez FM. Enterobacterias. Medicine 2010; (10): 3426-3431.
35. Arroyo-Lara A, Landín-Grandvallet LA, Alonso-Bustamante A, Sánchez-Aguilar MA, Suárez-Franco G. Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Rev Cient Biol Agropec Tuxpan 2015; (3): 1045-1052.
36. Jiménez YCS. Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y de *Coriandrum sativum* (culantro) mediante el método de sensibilidad por difusión en agar Bauer-Kirby, sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* serovar *typhi* y *Salmonella entérica* serovar *choleraesuis*; en comparación con los antibióticos Gentamicina y ampicilina [tesis de licenciatura]. Quito: Universidad Católica del Ecuador; 2015.

37. Salazar Córdova L. Efecto antimicrobiano de extractos de *Allium sativum* L "ajo" sobre el crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [tesis de licenciatura]. Perú: Universidad Nacional de Piura; 2014.
38. Al-Astal ZY. Effect of storage and temperature of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria. J Al Azhar Univ-Gaza 2003; (6): 11-20.
39. Ovejero CM. Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental [tesis doctoral] España: Universidad Complutense de Madrid; 2017.
40. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature 2004; 427 (6969), 72-74.
41. León-Ramírez S. Shigelosis (disentería bacilar). Salud en tabasco 2002; 8 (1), 22-25.
42. Christensen DJ, Gottlin EB, Benson RE, Hamilton PT. Phage display for target-based antibacterial drug discovery. Drug discovery today 2001; 6 (14), 721-727.
43. Beg AZ, Ahmad I. Effect of *Plumbago zeylanica* extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical origin. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2000; 16 (8-9), 841-844.

VIII. CONCLUSIÓN

Artículo 1.

En el presente trabajo, el extracto acuoso de ajo blanco presenta la mejor actividad antibacteriana a la concentración $0,25 \text{ g/mL}^{-1}$ sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* respecto a los extractos acuosos de ajo japonés y ajo elefante. Por otro lado, es extracto acuoso de ajo negro se ratifica que no tiene acción antimicrobiana sobre las bacterias estudiadas.

De acuerdo a la acción antimicrobiana comprobada del extracto acuoso de ajo blanco en este trabajo, establecemos que es una de las posibles alternativas de sustitución en el uso de antimicrobianos sintéticos.

Artículo 2.

El extracto acuoso de ajo a la concentración 125 mg/mL tiene una capacidad similar de inhibición de crecimiento in vitro sobre las bacterias aisladas de boca, ciego y ano (*Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Paontoea agglomerans* y *Acinobacter lowffii*) de conejos de una granja de producción del Estado de México en comparación con los antibióticos sintéticos que se utilizaron. Por lo que se sugiere suplementar en el alimento el extracto acuoso de ajo a una concentración de 125 mg/mL como tratamiento preventivo antimicrobiano en conejos de engorda. El extracto acuoso de ajo de menor concentración, no es considerado con potencial antibacteriano.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal SS., Khadase SC., Talele GS. 2010. Studies on immunomodulatory activity of capparid Zeylanica Leaf Extracts. *Int J Pharm Sci Nonotechnol*, 3, 887-892.
- Alessio HM., Hagerman AE. 2006. *Oxidative stress, exercise and aging*. World Scientific.
- Alonso J. 2007. *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. Editorial CORPUS, Argentina, 2007.
- Amagase H., Petesch BL., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of nutrition*, 131(3), 955S-962S.
- ANCUM. Asociación Nacional de Cunicultores de México. 2009. *Cunicultura en México*, disponible en: <http://www.ancum.com.mx/web/Cunicultura%20en%20Mexico2.html>. Consultado 17/03/2020.
- Armada E.R. 2016. La explotación cunícola en México, una revisión a través del VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. <http://www.ancum.com.mx/web/pdfs/Organizacion%20de%20productores/LA%20EXPLOTACION%20CUNICOLA%20EN%20MEXICO.pdf>.
- Badr H.M. 2004. Use of irradiation to control food borne pathogens and extend the refrigerated market life of rabbit meat. *Meat Science*. 67: 541-548.
- Beckton Dickinson Immunocytometry Systems. 1995. *FACS Training Manual*. Modulos: 1, 5-6.
- Bennett RN., Wallsgrave RM. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.

- Bhandari P. 2012. Garlic (*Allium sativum* L.): A review of potential therapeutic applications. International journal of green pharmacy, 6(2), 118.
- Bixquert M., Fuertes A., Gómez BJ., Hernandez P., Martínez E., Monereo S., Villarino A. 2011. Guía científica y gastronómica de la carne de conejo. España: Organización Interprofesional de la Carne de Conejo de España (INTERCUN): 15-17.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161:839-851.
- Boyhan GE., Kelley WT., Granberry DM. 2009. Production and Management of garlic, elephant garlic and leek.
- Breu W, Dorch W. 1994. *Allium cepa* L (onion): Chemistry analysis and pharmacology. Econ Med Plant Res; 6: 116-147.
- Broom D.M. 1986. Indicators of poor welfare. British veterinary journal, 142(6), 524-526.
- Burba J., Lanzavechia S., Vignoni M. 1997. Validación de índices como referentes para determinar el momento óptimo de plantación de ajo (*Allium sativum* L.), La Consulta INTA EEA La Consulta, 1997. 12 p. PROAJO/INTA documento, 55, 97.
- Cekarini V., Gee J., Fioretti E., Amici M., Angeletti M., Eleuteri AM., Keller JN. 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. Biochim. Biophys. Acta. 1773: 93-104.
- Chandrashekar PM., Venkatesh YP. 2009. Identification of the protein components displaying immunomodulatory activity in aged garlic extract. J Ethnopharmacol 124: 384-390.

- CNSPC. Comité Nacional Sistema Producto Cunícola. 2012. "Antecedentes". México, D.F. disponible en: <http://www.cunicultura.org.mx/antecedentes.php>. Consultado 05/03/2019.
- Corzo-Martínez M., Corzo N., Villamiel M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in food science & technology*, 18(12), 609-625.
- Council FAW. 1992. *The five freedoms*. London: Farm Animal Welfare Council.
- Cubero JI. 2003. *Introducción a la mejora genética vegetal*. 2ª ed. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Dalle Zotte A. 2002. Perception of rabbit meat and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livest Prod Sci* 75: 11-32. doi: 10.1016/S0301-6226(01)00308-6.
- Díaz L., Jiménez K. 2008. Validación de un método de extracción de alicina en ajo y su cuantificación por HPLC. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México.
- Escaff M. 1991. Variedades de ajo cultivadas en Chile. Primer Curso Taller de Ajos, 19-21.
- Espinoza Cáceres FW., Ríos Ríos EM., Elías Peñafiel CCA. 2010. Determinación de fenoles totales, fructanos y pungencia en seis cultivares de ajos (*Allium sativum* L.) en el Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(1), 101-109.
- Ferri N., Yokoyama K., Sadilek M., Paoletti R., Apitz-Castro R., Gelb M. H. Corsini A. 2003. Ajoene, a garlic compound, inhibits protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation. *British journal of pharmacology*, 138(5), 811-818.

- Folin O., Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry*, 73(2), 627-650.
- García LJ., Sánchez FJ. 2000. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, volumen 503, pp. 219-229.
- Gascón AA. 2011. Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Cuyo, Argentina, 60 p.
- Gheisari HR., Ranjbar, VR. 2012. Antioxidative and antimicrobial effects of garlic in ground camel meat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 36: 13-20.
- Gill CO. 1998. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. *The microbiology of meat and poultry*. London: Blackie Academic and Professional, 118-157.
- Gómez LG., Muniz FS. 2000. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(3), 219-29.
- Greco MF. 2011. Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo. Tesis de Licenciatura. Argentina: Univ. Nacional de Cuyo. 60 p.
- Gurley BJ., Gardner SF., Hubbard MA., Williams DK., Gentry WB., Cui Y., Ang CY. 2005. Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly. *Drugs & aging*, 22(6), 525-539.
- Halliwell B. Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.

- Heinerman J. 1995. El ajo y sus propiedades curativas: historia, remedios y recetas. Ed. Paidós. Sant Adrià de Besós, Barcelona.
- Hermida M., Gonzalez M., Miranda M., Rodríguez-Otero JL. 2006. Mineral analysis in rabbit meat from Galicia (NW Spain). *Meat Science*, 73(4), 635-639.
- Hernández P., Dalle Zotte A. 2010. Nutrition of the rabbit. In: Blas C de, Wiseman J (eds). Influence of diet on rabbit meat quality. UK: CABI. p 163-178.
- Jandete H., Martínez M. Gálvez C. 2004. Zootecnia Cunícola. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Jang EK., Seo JH., Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 40(4), 443-448.
- Kallas Z., Gil JM. 2012. A dual response choice experiments (DRCE) design to assess rabbit meat preference in Catalonia: A heteroscedastic extreme-value model. *British Food Journal*, 114(10), 1394-1413.
- Kang MJ., Lee SJ., Shin JH., Kang SK., Kim JG., Sung NJ. 2008. Effect of garlic with different processing on lipid metabolism in 1% cholesterol fed rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37(2), 162-169.
- Lanzavechia S. 2007. Contribución al conocimiento para la producción de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) En Mendoza Argentina. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-tesis_ajo_elefante.pdf
- Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2), 3-22.

- Lawson L. 1996. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Koch, H.P., Lawson, L.D., Garlic. The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species. Williams and Wilkins, Baltimore. MD. 37-107.
- Ledezma E, Apitz-Castro R. 2006. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. Rev Iberoam Micol 23: 75-80. doi: 10.1016/S1130-1406(06)70017-1.
- López T. 2007. El ajo propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Ámbito farmacéutico Fitoterapia*. 26: 78-81.
- Lundahl J., Jacobson SH., Paulsson JM. 2012. IL-8 from Local Subcutaneous Wounds Regulates CD11b Activation. *Scandinavian journal of immunology*, 75(4), 419-425.
- Martínez A. 2004. Cunicultura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Mendoza B. 2007. Situación de la cunicultura en México. *Revista Lagomorpha-numero* 117. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2869717> [citado: 18 de octubre del 2019].
- Moore CM., Sheldon BW. 2003. Use of time- temperature integrators and predictive modeling to evaluate microbiological quality loss in poultry products. *Journal of Food Protection*. 66 (2): 280-286.
- Morrissey PA., Sheehy PJA., Galvin K., Kerry JP., Buckley DJ. 1998. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci*. 49: 73-86.
- Nakyinsige K., Fatimah AB., Aghwan ZA., Zulkifli I., Goh YM., Sazili A.Q. 2014. Bleeding efficiency and meat oxidative stability and microbiological quality of New Zealand White rabbits subjected to halal slaughter without

stunning and gas stun-killing. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 27(3): 406.

- Napolitano F., Braghieri A., Piasentier E., Favotto S., Naspetti S., Zanolli R. 2010. Effect of information about organic production on beef liking and consumer willingness to pay. *Food Qual Prefer* 21: 207-212. DOI: 10.1016/j.foodqual.2009.08.007.
- Navarro C. 2007. Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Rev. fitoter.* 7(2): 132-35
- Nielsen HV., Christensen JP., Andersson EC., Marker O., Thomsen AR. 1994. Expression of type 3 complement receptor on activated CD8+ T cells facilitates homing to inflammatory sites. *The Journal of Immunology*, 153(5), 2021-2028.
- Nieto MDP. 2016. Variedades y ecotipos del ajo, el libro del salmorejo cordobés, 47.
- OIEDRUSBC Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable de Baja California. 2009. Estudio sobre cunicultura en el Estado de Baja California. Baja California, México: OIEDRUSBC. 21 p.
- Olivares Pineda R., Gómez Cruz MÁ., Schwentesius Rindermann R., Carrera Chávez B. 2009. Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. *Región y sociedad*, 21(46), 191-207.
- Orfao A., González M., Ciudad J., López-Berges MC., López A., San Miguel J.F.1992. Aplicaciones de la citometría de flujo en el diagnóstico hematológico. *Biological Clinic Hematology*; 13:456-523.
- Orfao A., Ortuno F., De Santiago M., Lopez A., San Miguel J. 2004. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry*; 58: 62-71.

- Para P.A., Ganguly S., Wakchaure R., Sharma R., Mahajan T., Praveen P.K. 2015. Rabbit meat has the potential of being a possible alternative to other meats as a protein source: A brief review. *Int J Phar Biomed Res.* 2: 17-19
- Parks DR., Herzenberg LA. 1984. Fluorescence-Activated Cell Sorting: Theory, Experimental Optimization, and Applications in Lymphoid Cell Biology. *Methods in Enzymology*, 108: 197-241.
- Park SY., Yoo SS., Shim JH., Chin KB. 2008. Physicochemical properties and antioxidant and antimicrobial effects of garlic and onion powder in fresh pork belly and lion during refrigerated storage. *Journal of Food Science.* 73: 577-584.
- Pereira M., Malfeito-Ferreira M. 2015. A simple method to evaluate the shelf life of refrigerated rabbit meat. *Food Control.* 49: 70-74.
- Pinto JT., Rivlin RS. 2001. Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. *Journal Nutrition*; 131:1058S-60S.
- Pla M., Guerrero L., Guardia D., Oliver M. A. and Blasco A. 1998. Carcass characteristics and meat quality of rabbit line selected for different objectives: I. between lines comparison. *Livestock Production Sciences*, 54, 115-123.
- Rahman MS. 2007. Allicin and other functional active components in garlic: health benefits and bioavailability. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 245-268.
- Ramírez J. 2004. Características bioquímicas del músculo, calidad de la carne y de la grasa de conejos seleccionados por velocidad de crecimiento. Tesis Doctoral. Centro de tecnología de la carne. Universidad de Barcelona, Facultad de Veterinaria.
- Reyes EC. 2016. Aportaciones a la mecanización de la siembra del ajo. Diseño de una sembradora neumática de precisión (Doctoral dissertation).

- Ried K. 2016. Garlic Lowers Blood Pressure in Hypertensive Individuals, Regulates Serum Cholesterol, and Stimulates Immunity: An Updated Meta-analysis and Review, 2. The Journal of nutrition, 146(2), 389S-396S.
- Rodríguez JM., García ML., Santos JA., Otero A. 2005. Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. Meat Science. 70: 389-394.
- Ruiz JR., Roque M. 2009. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. Cienc Invest 12: 41-47.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. El Estado de México primer lugar en producción y consumo de conejo. Boletín 78. México. 2 p.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2015. Manual de Buenas Prácticas de Producción de la Carne de Conejo, Mover a México, Coordinación General de Ganadería. 1ª Ed.
- Sallam KI., Ishloroshi M., Sameji-ma K. 2004. Antioxidant and antimicro-bial effects of garlic in chicken sausage. Lebensm. Wiss. Technol. 37:849-855.
- Solano J., Galindo F., Orihuela A., Galina CS. 2004. The effect of social Rank on the physiological response during repeated stressful handling in Zebu cattle (*Bos indicus*). Physiol Behav; 82:679-683.
- Souci SW., Fachmann W., Krant H. 1994. Food Composition and Nutrition Tables. Stuttgart: Medpharm.
- Stephens JM. 1994. Garlic, Elephant-*Allium Ampeloprasum* L. (*Ampeloprasum* Group). University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.

- Suárez Cunza S. 2014. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum* var. Huaralino (ajo) en modelos *in vitro*.
- Subcommittee IWN. 1984. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. Bulletin of the World Health Organization, 62(5), 809.
- Thompson M., Al-Qattan KK., Bordia T., Ali M. 2006. Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol, and triglycerides. Journal of Nutrition. (Supplement) 136:800S-802S.
- Toledano Medina MÁ. 2017. Optimización del proceso de elaboración y caracterización fisiológica y físico-química del ajo negro.
- Tuteja N., Sopory SK. 2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. Plant signaling & behavior, 3(8), 525-536.
- Wayne PA. USA: CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22.
- Wink M. 2007. Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 97-116. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- WHO. World Health Organization. (1995). Constitution of the world health organization.
- Zeng T., Guo FF., Zhang CL., Song FY., Zhao XL., Xie KQ. 2012. A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials for the effects of garlic on serum lipid profiles. J Sci Food Agr 92: 1892-1902. doi: 10.1002/jsfa.5557.

