



---

# Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO 2022/2023

**“Estudio del efecto inhibidor de extractos de *Allium sativum* en bacterias patógenas y alterantes de la carne”**

AUTORA: CLARA SIERRA OBRERO

TUTORA: IRMA CARO CANALES

## RESUMEN

La carne es un alimento muy perecedero debido a que contiene microorganismos alterantes que causan olores y sabores desagradables y bacterias patógenas que provocan daños en la salud del consumidor. Con el fin de investigar la actividad antimicrobiana de extractos de *Allium sativum* fresco y negro, se realizaron ensayos de inhibición en bacterias patógenas; *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* y alterantes; *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium viridans* y *Brochothrix thermosphacta* mediante el método de difusión en agar por pocillos. También se estudió el volumen mínimo inhibitorio de un extracto acuoso de ajo fresco, finalmente se estudiaron los compuestos organosulfurados con poder antimicrobiano presentes en ese extracto mediante cromatografía de gases. Los resultados indicaron el poder inhibitorio del ajo fresco en todas las bacterias, sin embargo, el extracto de ajo negro no mostró inhibición en ninguna de las cepas ensayadas. Asimismo, al analizar el extracto soluble de ajo fresco se observó una amplia variedad de compuestos azufrados con poder antimicrobiano como 3-vinil-2,1-dietilciclohexano-5-eno y 2-vinil-4H-1,3diitina, dialil sulfuro, dialil trisulfuro entre otros, mientras que en el extracto soluble de ajo negro no.

### **PALABRAS CLAVE:**

Alterantes de la carne, Bacterias patógenas, Inhibición bacteriana, *Allium sativum*, Método de difusión en agar por pocillos.

## **ABSTRACT**

Meat is a highly perishable food due to the presence of spoilage microorganisms, which cause unpleasant odours and flavours, and pathogens that cause health damage to consumers. To investigate the antimicrobial activity of fresh and fermented *Allium sativum* extracts, the inhibition assays were performed on pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*, as well as spoilage microorganisms *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium viridans*, and *Brochothrix thermosphacta* by well diffusion agar. The minimum inhibitory volume of a fresh garlic aqueous extract was also studied, and the organosulfur compounds present in this extract were analysed by gas chromatography. Results showed the inhibitory effect of fresh garlic in all bacteria; however, the black garlic extract showed no inhibition in any of the tested strains. The soluble extract of fresh garlic showed a wide variety of sulphur compounds with antimicrobial activity such as 3-vinyl-2,1-diethyloxacyclohexane-5-ene and 2-vinyl-4H-1,3dithiin, diallyl sulphide, diallyl trisulfide, among others, were observed, while they were not found in the soluble extract of black garlic.

## **KEY WORDS**

Meat spoilage bacteria, Pathogenic bacteria, Bacterial Inhibition, *Allium sativum*, Well diffusion agar.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN:</b> .....	<b>1</b>
1.1 Justificación:.....	1
1.2 Importancia de la carne en la nutrición:.....	1
1.3 Beneficios y problemática de la carne:.....	2
1.4 Bacterias patógenas y alterantes presentes en la carne:.....	2
1.5 Estrategias utilizadas para disminuir el riesgo de patógenos y alterantes en la carne:.....	3
1.6 Metodología para estudiar la actividad antimicrobiana:.....	4
<b>2. OBJETIVOS:</b> .....	<b>7</b>
2.1 Objetivo principal:.....	7
2.2 Objetivos específicos:.....	7
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS:</b> .....	<b>8</b>
3.1 Preparación de extractos de ajo:.....	8
3.2 Cepas:.....	8
3.3 Recuperación de cepas:.....	8
3.4 Ensayo de inhibición bacteriana método de difusión en agar por pocillos:.....	8
3.5 Volumen mínimo inhibitoria:.....	9
3.6 Tinción de bacterias vivas y muertas:.....	9
3.7 Adquisición de imágenes por microscopio:.....	10
3.8 Análisis de compuestos azufrados por cromatografía de gases-masas acoplado a un lector de masas:.....	10
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:</b> .....	<b>11</b>
4.1 Actividad antimicrobiana:.....	12
4.2 Compuestos organosulfurados con acción antimicrobiana:.....	14
4.3 Volumen mínimo inhibitorio:.....	18
4.4 Efecto de los compuestos organosulfurados en la pared bacteriana:.....	21
<b>5. CONCLUSIONES:</b> .....	<b>23</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA:</b> .....	<b>24</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Justificación

La relevancia de la carne como alimento y su corta vida útil imposiciona la necesidad de disponer de métodos para reducir su perecibilidad. Una de las grandes causas responsables del deterioro de la carne son las bacterias que pueden colonizarla. Se puede tratar de bacterias alterantes, las cuales modifican sus propiedades organolépticas y por tanto hacen que tenga olores, sabores o texturas desagradables o bacterias patógenas, que pueden provocar enfermedades alimentarias peligrosas que pueden desembocar en hospitalizaciones o incluso la muerte. Por este motivo la carne suele llevar aditivos antimicrobianos como nitratos y nitritos entre otros, sin embargo, estas sustancias sintéticas pueden provocar malestar y alergias, además algunos estudios indican que son factores de riesgo para el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Esto ha producido un aumento del estudio de las propiedades antimicrobianas de diferentes sustancias naturales para poder usarlas como sustituto de los aditivos sintéticos y así asegurar mayor seguridad alimentaria. De acuerdo con la bibliografía revisada, existen diversos estudios del efecto inhibitorio del ajo sobre los microorganismos patógenos, sin embargo, no se han encontrado estudios del efecto antimicrobiano en bacterias alterantes presentes en la carne.

## 1.2 Importancia de la carne en la nutrición.

El *Homo erectus* es considerado el primer homínido que comenzó a consumir carne hace 2,6 millones de años. Este hito supuso un ascenso en la cadena alimentaria y una mejora de la capacidad intelectual de la especie humana. En la época del *Homo erectus* el consumo de carne era a través de la caza o del aprovechamiento de animales ya muertos. No fue hasta el año 7000 a.c cuando se empezaron a domesticar animales para poder disponer de alimentos de origen animal sin la necesidad de ir migrando para seguir a las manadas y cazarlas. Esto dio pie a que la especie humana se asentara y dejase de ser nómada. La ganadería, junto al descubrimiento del fuego, supuso un incremento importante en el consumo de carne ya que se aumentó su disponibilidad y por tanto hubo un gran cambio en la dieta de los humanos. Desde entonces, el consumo de carne ha tenido un rol muy importante en la dieta de las personas. <sup>1</sup>

La carne tiene la cualidad nutricional de aportar diez aminoácidos esenciales de forma equilibrada, estos aminoácidos son formadores de proteínas, siendo además responsables de reactivar el metabolismo del cuerpo humano. 100 gramos de carne roja proporcionan aproximadamente 20.7 g de proteínas y 100 gramos de carne blanca 21.9 g de proteínas.

El porcentaje de grasa que contiene la carne varía según la especie de animal de la que provenga, la parte de corte elegida, la alimentación proporcionada al ganado durante su crianza y el método culinario elegido para la preparación de esta. La grasa que contiene la carne desempeña dos funciones principalmente; Intensificar su sabor y transportar las vitaminas liposolubles que contiene la carne. Los hidratos de carbono que aporta son escasos y generalmente en forma de glucógeno. La carne, particularmente la carne roja, contiene una amplia variedad de sustancias bioactivas además de los nutrientes esenciales antes mencionados. Estas sustancias están siendo objeto de estudio debido a sus posibles

beneficios para la salud, tales como su capacidad antioxidante e inmunomodulador. Entre ellas se encuentran la creatina, ácido linoleico conjugado y antioxidantes endógenos y la taurina.<sup>2</sup>

En España el consumo de carne es muy importante, según el informe sobre el consumo de carne y tendencias de 2020 del ministerio de agricultura, pesca y alimentación del gobierno de España, el 97% de las familias españolas compran carne y productos cárnicos llegando a consumir 2.432 millones kg en el año 2020 (unos 50 kg de carne al año por persona). Además, en nuestro país, la industria cárnica se posiciona como la cuarta potencia industrial en cuanto a tamaño, y la primera en el sector de alimentación.<sup>3</sup>

### **1.3 Beneficios y problemática de la carne.**

El consumo de carne, en especial de la carne roja está ligado a un debate continuo sobre sus beneficios y riesgos.

La carne, aparte de lo mencionado anteriormente, contiene nutrientes beneficiosos para la salud como ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico conjugado), vitaminas del grupo B, vitamina A en forma de retinol, también minerales como hierro y zinc de alta biodisponibilidad y magnesio, selenio y fósforo entre otros. Además de su valor nutricional, uno de los beneficios de la carne es su palatabilidad, ya que suele ser del agrado de las personas y muchos de los platos típicos y populares que se consumen hoy en día contienen carne como ingrediente principal.<sup>4</sup>

Por otro lado, En 2015, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), especialistas en cáncer, publicaron un informe en el que se clasificó la carne roja como "probablemente cancerígena para los seres humanos" (grupo 2A) y la carne procesada como "cancerígena para los seres humanos". Según los resultados descritos en el informe de la IARC, se ha demostrado que consumir 100 g por día de carne roja y 50 g por día de carne procesada, podría ser un agente de riesgo de padecer cáncer en un 17% y un 18%, respectivamente.<sup>5</sup> El consumo de carne roja también ha sido asociada con el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y enfermedad coronaria.<sup>6</sup> Sin embargo, siguiendo una dieta equilibrada, consumiendo las raciones de carne recomendadas y siguiendo un estilo de vida activo y saludable, el consumo de esta no debería de suponer un riesgo para la salud.

A estos problemas mencionados habría que añadir el debate ético que cada vez cobra más importancia en nuestra sociedad. Comer carne puede ser moralmente reprochable desde el punto de vista ecológico ya que se ha demostrado que la cantidad de carne actualmente producida no es sostenible para el medio ambiente y también desde el punto de vista de los derechos de los animales y cómo son tratados en la industria cárnica.<sup>7,8</sup>

### **1.4 Bacterias patógenas y alterantes presentes en la carne.**

La carne fresca puede ser contaminada por patógenos durante las actividades de faenado de la canal y posteriores manipulaciones. También puede ser contaminada por microorganismos responsables del deterioro organoléptico durante su procesado. La mayoría de las bacterias

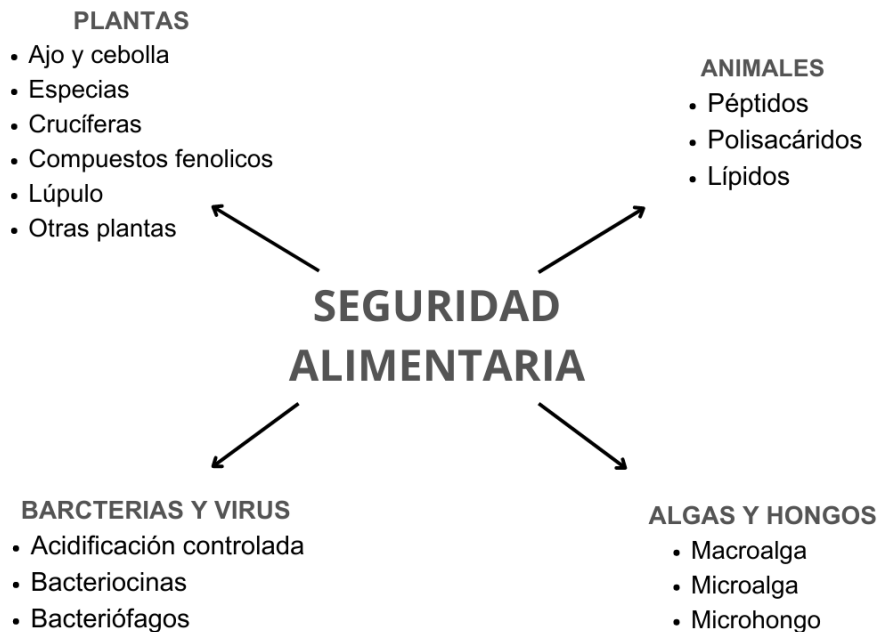
patógenas y alterantes pueden crecer debido a que la carne contiene diversos nutrientes y condiciones como; una actividad de agua alta, aproximadamente 0,99, pH post-mortem 5,5-5,7 y un elevado contenido en nutrientes fácilmente asimilables como la glucosa (2%) que es la principal fuente de energía usada por los microorganismos presentes en la carne. La presencia de microorganismos alterantes y algunos patógenos en carnes frescas es común, pero su multiplicación puede ser evitada al mantener la cadena de frío de manera apropiada, este tratamiento prevenir el crecimiento de aquellos microorganismos que no son psicotrofos. Sin embargo, dado que es común que durante el transporte y almacenamiento doméstico se presenten temperaturas altas, es necesario tener en cuenta las condiciones previsibles de comercialización y almacenamiento por el consumidor. Por lo tanto, el crecimiento de bacterias patógenas y alterantes es un riesgo que se debe controlar. Algunos patógenos relevantes en este tipo de productos son; *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, que son anaerobios facultativos capaces de crecer en productos envasados tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.<sup>9</sup> Estas bacterias patógenas pueden causar problemas graves de salud al consumidor. En el caso de la infección por *L. monocytogenes*, los afectados presentan fiebre, diarrea y en casos extremos puede desembocar en una sepsis o meningitis.<sup>10</sup> La *Salmonella spp* es la causante de los comunes brotes alimentarios por salmonelosis caracterizados por diarrea sanguinolenta, fiebre y cólicos estomacales.<sup>11</sup> Las bacterias alterantes presentes en la carne como *Brochothrix thermosphacta*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Carnobacterium divergens* provocan cambios en las propiedades organolépticas de la carne, cambiando su sabor, color, olor y apariencia, haciendo que resulte desagradable y no apta para su consumo.<sup>12</sup>

### **1.5 Estrategias utilizadas para disminuir el riesgo de patógenos y alterantes en la carne.**

Para evitar que la carne sea alterada por bacterias y así mantener sus propiedades organolépticas primarias, es tratada con aditivos. Los nitritos y nitratos son aditivos químicos que se han utilizado ampliamente en muchos productos cárnicos con la finalidad de evitar la oxidación lipídica, realzar y mantener el color de la carne, resaltar el sabor y prevenir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, estas sustancias pueden provocar alergias y malestar, a algunas personas les causan dolor de cabeza, náusea, vómitos, diarrea y dolor abdominal, además se han relacionado estos aditivos con un aumento en el riesgo de algunos tipos de cáncer.<sup>13</sup>

Los antimicrobianos naturales obtenidos de plantas, hongos, algas y productos animales han ganado un mayor interés recientemente. Una de las ventajas de estas alternativas naturales es que pueden ayudar a abordar los problemas cada vez más notorios de resistencia antimicrobiana, a la vez que reducen o eliminan los posibles efectos secundarios asociados a los compuestos sintéticos. Estudios recientes demuestran que los compuestos antimicrobianos naturales son más inocuos y seguros que los sintéticos.<sup>14,15</sup>

# Antimicrobianos naturales



**Figura 1.** Clasificación de antimicrobianos naturales.

Fuente: Elaboración propia en base a "Food Safety through Natural Antimicrobials"<sup>15</sup>

En este ensayo se estudia la actividad antimicrobiana del *Allium sativum*. El ajo (*Allium sativum*) es una planta con múltiples propiedades beneficiosas para la salud, tanto en la medicina como en la cocina a nivel mundial. En la medicina tradicional china, se utilizan varias formas de preparación del ajo, como jarabe, extracto, decocción, aceite o infusión, para aprovechar sus propiedades medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como la intoxicación alimentaria, el cólera, la fiebre o el dolor de cabeza.<sup>15</sup> El ajo tiene múltiples propiedades farmacológicas que han sido reportadas, entre ellas, su capacidad como antiséptico, antimicrobiano, antifúngico y expectorante. Principalmente, se utiliza para tratar enfermedades respiratorias como la bronquitis y el asma. Diversos estudios han descrito estas propiedades medicinales basadas en los compuestos bioactivos presentes en el ajo, tales como el ajoeno y la alicina.<sup>17</sup> La clasificación típica de los fitoconstituyentes en el ajo fue elaborada de forma detallada por Zhang et al.(2020)<sup>18</sup>, en el ajo se han encontrado más de 20 tipos diferentes de compuestos organosulfurados con una variedad de propósitos. Estas sustancias se clasifican como compuestos azufrados solubles en aceite y en agua, respectivamente y algunas de ellas tienen capacidad antimicrobiana como por ejemplo la aliina.<sup>16,19</sup>

## 1.6 Metodología para estudiar la actividad antimicrobiana.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son técnicas que se pueden emplear para descubrir fármacos, hacer estudios epidemiológicos y prever los resultados terapéuticos. Se



pueden emplear diversos métodos de laboratorio para evaluar o analizar la actividad antimicrobiana in vitro de extractos o compuestos puros. Los métodos más comunes y fundamentales son el método de difusión en disco (entre otros métodos de difusión) y los métodos de dilución en caldo o agar.

- Métodos de difusión:
  - Método de difusión en disco de agar: se inoculan las placas de agar con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba, seguido de la colocación de discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro) que contienen el compuesto de prueba en una concentración deseada sobre la superficie del agar. Después se incuba la placa de Petri bajo condiciones adecuadas. El agente antimicrobiano suele difundirse en el agar e inhibir la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba. Finalmente, se miden los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento.
  - Método de gradiente antimicrobiano (etest): La técnica de gradiente antimicrobiano se define como la combinación de los principios de los métodos de dilución y los de difusión para determinar el valor de la concentración mínima inhibitoria del agente antimicrobiano probado en agar. Esta técnica se basa en la creación de un gradiente de concentración del agente probado. El Etest® (BioMérieux) es una variante comercializada de esta técnica. En este procedimiento, se coloca una tira impregnada con un gradiente de concentración creciente del agente antimicrobiano desde un extremo hasta el otro en la superficie del agar, previamente inoculado con el microorganismo de prueba.
  - Método de difusión en agar por pocillos: El método de difusión de pozos en agar se utiliza para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas o extractos microbianos. Similar al proceso usado en el método de difusión en disco, se inocula la superficie de la placa de agar con la distribución del inóculo microbiano en toda la superficie del agar. Luego, se crea asépticamente un agujero con un diámetro de 6 a 8 mm con una punta estéril, y se introduce en el pozo un volumen (20-100 µL) del agente antimicrobiano o la solución de extracto en la concentración deseada. Después, las placas de agar se incuban en condiciones adecuadas según el microorganismo. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar, deteniendo el crecimiento de la cepa microbiana analizada. Este ha sido el método utilizado en este estudio.
- Métodos de dilución:
  - Dilución en caldo: El método de micro o macrodilución en caldo consiste en preparar diluciones en dos niveles del agente antimicrobiano, en un medio de cultivo líquido, dispensado en tubos de 2 mL de volumen mínimo (en el caso de la macrodilución), o con volúmenes más pequeños utilizando una placa de microtitulación (en el caso de la microdilución). Luego, se inocula cada tubo o pocillo con una muestra microbiana previamente diluida en el mismo medio, ajustada a una escala de McFarland de 0,5 y estandarizada. Una vez mezclado adecuadamente, los tubos o la placa de microtitulación se incuban (principalmente sin agitación) bajo condiciones idóneas según el microorganismo bajo prueba. La MIC es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo, según se detecta por el ojo humano.
  - Dilución en agar: El procedimiento de dilución en agar consiste en agregar diferentes concentraciones del agente antimicrobiano deseado a un medio de agar (líquido) mediante diluciones seriadas de dos en dos, y posteriormente inocular una cantidad definida de microorganismos en la superficie de la placa. La concentración mínima del

agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento en condiciones de incubación apropiadas se registra como el punto final de la prueba de concentración inhibitoria mínima (MIC).<sup>20</sup>

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal.**

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido estudiar la capacidad antimicrobiana del *Alium sativum* en bacterias patógenas y alterantes presentes en la carne mediante el método de difusión en agar por pocillos.

### **2.2 Objetivos específicos.**

- Establecer el volumen mínimo de extracto soluble de ajo fresco necesario para la inhibición de bacterias patógenas y alterantes de la carne.
- Establecer los compuestos presentes en el ajo con capacidad inhibitoria de las bacterias alterantes.
- Explorar técnicas de microscopía para observar el efecto de los compuestos organosulfurados sobre la pared bacteriana.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Preparación de extractos de ajo.**

Se realizaron extractos acuosos de ajo (*Allium sativum*) fresco y negro (fermentado) que fueron obtenidos en dos centros comerciales, uno de Valladolid y otro de León. Para la extracción se pesaron 100 g de ajo fresco o ajo negro que se trituraron con 100 mL de agua con ayuda de un robot de cocina (Cecotec) durante 2 min. Posteriormente, la mezcla fue homogeneizada por segunda ocasión con ayuda del Ultraturrax (Micra D9) durante 2 min. Seguida, se ajustó el pH de la mezcla 7,4 y se centrifugó a 12 rpm durante 25 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante que se congeló a -18°C hasta su uso.

#### **3.2 Cepas**

En este estudio se han utilizado bacterias, patógenas y alterantes que se pueden encontrar en la carne. Las especies de bacterias patógenas fueron: *Escherichia coli* (ATCC 2235), *Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544), *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* (GUCG 981), mientras que las bacterias alterantes usadas fueron: *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 10828), *Carnobacterium divergens* (ATCC 35677), *Carnobacterium viridans* y *Brochothrix thermosphacta* (aislada de carne de pollo). Todas las bacterias fueron cedidas por la colección de cepas de la Dra. María de Rosario García-Armesto del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, con excepción de *C. sakazakii* que forma parte de la colección de bacterias del Área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

#### **3.3 Recuperación de cepas.**

10 µL de cada una de las bacterias fueron sembradas en 1 ml de medio de cultivo TSB (casa comercial Merck, Darmstadt, Alemania) con extracto de levadura 0,5% p/v (casa comercial Laboratorios Conda, Madrid, España). Posteriormente, las bacterias fueron incubadas en condiciones óptimas de crecimiento, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella enteritidis* y *Lactobacillus sakei* a 37°C durante 24 horas. *Listeria monocytogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium viridans* y *Brochothrix thermosphacta* fueron incubadas a 30°C durante 24 horas. Para determinar la concentración bacteriana en un cultivo de 24 horas, se sembraron a través del método de recuento en gota 20 µL de diluciones seriadas apropiadas en agua de peptona (casa comercial VWR international, Lovaina, Bélgica).

#### **3.4 Ensayo de inhibición bacteriana método de difusión en agar por pocillos.**

El ensayo de inhibición bacteriana se llevó a cabo según Parente y Hill (1992)<sup>21</sup> con algunos que se describen brevemente a continuación. 200 µL de un cultivo de 24 horas de cada una de las bacterias antes mencionadas con excepción *B. thermosphacta* - que fue necesario

realizar dos pases de 24 horas debido al bajo crecimiento que presentó a 24 horas de incubación-, fueron inoculados en 20 ml de medio de cultivo a  $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . El medio de cultivo utilizado para las bacterias patógenas fue TSA (casa comercial Merck, Darmstad, Alemania) y para las bacterias alterantes MRS agar (casa comercial LabKem, Barcelona, España). Una vez inoculado el medio cultivo se agitó y se depositó en una placa petri hasta que se solidificó (aproximadamente 15 minutos). Posteriormente, realizaron pocillos de 0,5 mm de diámetro con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. 15  $\mu\text{L}$  de soft agar TSB con 1% de agar bacteriológico (casa comercial ThermoFisher, Kandel, Alemania) fueron depositados en el fondo de cada uno de los pocillos. Una vez depositado el agar se esperó hasta que esté se solidificó. A continuación, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto soluble de ajo fresco o de ajo negro en cada pocillo. Las placas petri con los pocillos y los extractos de ajo fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 10 minutos para facilitar la difusión del extracto de ajo desde los pocillos al agar. Finalmente, los cultivos fueron incubados en condiciones de crecimiento óptimas antes mencionadas durante 24 horas. Tras 24 de incubación se midieron los diámetros ( $\emptyset$ ) de inhibición de cada pocillo y se anotaron los resultados.

### **3.5 Volumen mínimo inhibitoria.**

El volumen mínimo inhibitoria en cada una de las bacterias se llevó a cabo según lo descrito por Ryan et al. (1996)<sup>22</sup>, con algunas modificaciones que se describen a continuación y además usando las condiciones descritas en el apartado “2.3 Ensayo de inhibición bacteriana well-diffusion agar”. En cada uno de los pocillos se añadió 50  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{L}$  de extracto soluble de ajo fresco. A continuación, las placas se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron a las condiciones óptimas de cada una de las bacterias y según lo descrito en los párrafos anteriores durante 24 horas. Pasado este tiempo se midió el  $\emptyset$  de inhibición de cada uno los pocillos. Este experimento se realizó 3 veces en tres días distintos.

### **3.6 Tinción de bacterias vivas y muertas.**

El estudio de la presencia de bacterias vivas y muertas se llevó a cabo a través de dos procedimientos descritos por (Zotta et al., 2011; Yi et al., 2022)<sup>23,24</sup>, con algunas modificaciones descritas en cada uno de los procedimientos. La tinción se realizó según lo indicado en el kit de viabilidad de bacterias Live/Dead<sup>R</sup> BacLight<sup>TM</sup> (ThermoFisher)

#### **3.6.1 Tinción de bacterias vivas y muertas en portaobjetos.**

10  $\mu\text{L}$  de un cultivo de 24 horas de *Listeria monocytogenes* fue inoculada en 1 ml de TSB en cuatro tubos microcentrífuga, en uno de los tubos se añadió 40  $\mu\text{L}$  de extracto soluble de ajo fresco. Las bacterias fueron introducidas en una estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos y seguidamente se retiró el sobrenadante, evitando no llevarse parte del residuo bacteriano. Después se añadió 987  $\mu\text{L}$  de NaCl (Panreac, Barcelona, España) 0,85%, excepto en uno de los tres tubos sin ajo, en el cual se añadió la misma cantidad de isopropanol (esta muestra es la de bacterias muertas). Se agitaron durante 1 min y se esperó 30 min, agitando cada 15 min. El proceso de lavado se repitió una vez más pero no tuvo tiempo de espera, finalmente se retiró el sobrenadante, se añadieron 987  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,85% y a partir de esta solución se llevó a cabo el proceso de tinción.

Las muestras se tiñeron de la siguiente forma; a los 987  $\mu\text{L}$  de NaCl 0'85% que contenía *Listeria monocytogenes* y 40  $\mu\text{L}$  el extracto soluble de ajo fresco se añadió 1,5  $\mu\text{L}$  de Syto-9 y 1,5  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (PI). Así mismo se realizaron tres controles, sin ajo; a) control de bacterias vivas fue teñida solamente con 1,5  $\mu\text{L}$  Syto-9, b) un control con bacterias muertas (las tratadas con isopropanol) que fueron teñidas solo con 1,5  $\mu\text{L}$  de IP y c) un control con los dos colorantes y con la misma cantidad. Una vez teñidas todas las muestras se esperó 15 min en oscuridad. Finalmente, en un portaobjetos lavado previamente con etanol al 70% se depositaron 3  $\mu\text{L}$  de agar 0'3% y en su superficie se agregaron 3  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras y controles ya teñidos.

### **3.6.2 Tinción de bacterias viva/muertas en placa.**

50  $\mu\text{L}$  de un cultivo de 24 horas de *Listeria monocytogenes* fueron inoculados en 2 ml de TSB en cuatro placas Corning™ con un diámetro de 35 mm. A la muestra se problema se agregó 200  $\mu\text{L}$  de extracto soluble de ajo fresco. Los controles de bacterias vivas, muertas no fueron tratadas con ajo. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas se retiró el TSB y a continuación se llevó a cabo el proceso de tinción siguiendo las instrucciones del fabricante y con algunas modificaciones que se describen a continuación, agregaron 2 mL de NaCl 0,85%, excepto a la muestra control de bacterias muertas, a la cual se agregó 2 mL de propanol y se mantuvieron durante 30 min, agitándose cada 15 min. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, se agregó 987  $\mu\text{L}$  de NaCl 0'85% (propanol en el caso de la muestra de bacterias muertas) y se agito. Este proceso se llevó a cabo dos veces. El proceso de tinción fue similar al descrito en el apartado 2.5.1 a excepción de que en este procedimiento se retiró el sobrenadante.

### **3.7 Adquisición de las imágenes a través de microscopio.**

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio NIKON TI2 Eclipse con un objetivo S PLAN FLUOR ELWD 40x. Para SYTO-9 se empleó el cubo filtros de FITC y para PI el cubo filtros de TRITC.

### **3.8 Análisis de compuestos azufrados por cromatografía de gases-masas acoplado a un lector de masas.**

#### **3.8.1 Extracción de las muestras.**

1 ml de éter dietílico (casa comercial Scharlab, Barcelona, España) fue agregado a 1 ml de extracto soluble de ajo fresco y a otro de ajo negro, a continuación, esta mezcla fue agitada y posteriormente centrifugada a 5.000 r.p.m durante 10 min. Después de ser centrifugadas, se retiró la fase orgánica, con una pipeta Pasteur y se agregó sulfato de sodio anhidro. Estas muestras fueron agitadas y analizadas por cromatografía de gases-masas.

### 3.8.2 Condiciones cromatográficas para el análisis de los extractos de ajo

El análisis de los extractos acuosos de ajo fresco fue realizado en el LTI de la Universidad de Valladolid. Se utilizó un Cromatógrafo de gases 7890N (Agilent Technologies) El detector de ionización se trabajó en las siguientes condiciones 70 eV/250 V y las del detector de masas (MS) trabajo en modo full Scan (40-500 m/z) la temperatura de la llama fue de 230°C y del *MS Quad* a 150°C. Se utilizó una columna de 30 m x 250 µm x 0.25 µm (Agilent 19091S-433), con un flujo de 1 mL/min, además, se utilizó gas helio como transportador. La columna se mantuvo en un horno en las siguientes condiciones; 40 °C, se mantuvo 2 min; 5 °C/min hasta 300 °C; y se mantuvo otros 5 min. El tiempo total del análisis fue de 60 min. La cantidad de muestra inyecta fue 11µL en modo Split y la temperatura del inyector fue 250 °C.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Actividad antimicrobiana

**Tabla 1.** Inhibición de diversos patógenos mediante extracto soluble de dos tipos negro y fresco.

BACTERIA	E 1 (cm)	E 2 (cm)	E3	E4
<i>Escherichia coli</i>	1,8±0,1 *	1,6±0,1 *	-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1,7±0,1	1,6±0,1	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,2±0,1	1,9±0,1	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	1,8±0,1 *	1,5±0,1 *	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	2,0±0,1	1,8 ±0,1	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2,0±0,1	1,5±0,1	-	-
<i>Carnobacterium divergens</i>	1,9±0,2	1,8±0,1	-	-
<i>Carnobacterium viridans</i>	2,1±0,2	1,8±0,1	-	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1,9±0,1	1,8±0,1	-	-

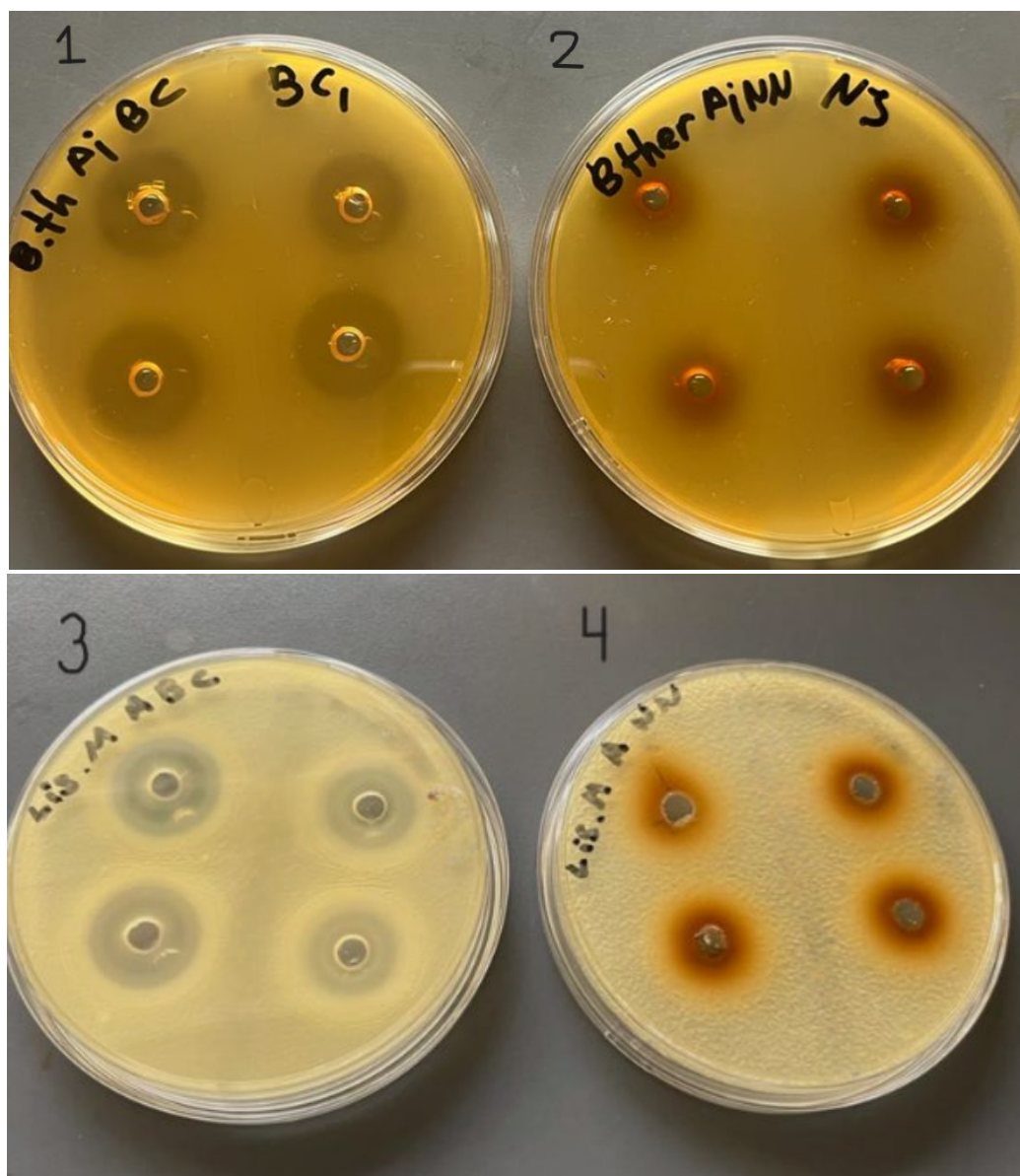
E<sup>1</sup>, E<sup>2</sup>, Experimentos realizados en extractos acuosos de ajo fresco; E<sup>3</sup>, E<sup>4</sup>, Experimentos realizados en extractos acuosos de ajo negro; \* inhibición parcial; - no presenta inhibición; Los valores mostrados es la media de los diámetros de inhibición de tres repeticiones en dos días diferentes.

En la **Tabla 1**, se muestran los resultados de inhibición de algunas bacterias patógenas y alterantes presentes en la carne. El extracto de ajo fresco en agua a pH 7,5 fue el que mostró actividad antimicrobiana en todas las bacterias ensayadas en este estudio. Sin embargo, el extracto de ajo negro no mostro inhibición. En la Figura 1, podemos observar la actividad antimicrobiana o las zonas de inhibición de los extractos solubles de ajo fresco y negro para *B. thermosphacta* y *L. monocytogenes*. Los pocillos que contenían el extracto de ajo negro no mostraron zonas transparentes y por lo tanto no hay signos de que inhiban el crecimiento bacteriano.

Dos bacterias patógenas entéricas como *Escherichia coli* y *Salmonella* presentaron inhibición parcial y un diámetro de inhibición de 1.8 cm. Esta inhibición se caracteriza por presentar crecimiento bacteriano dentro del halo de inhibición. Es decir, algunas serovariedades de bacterias pueden crecer en la zona que difundió/permeo el extracto de ajo.<sup>25</sup> Estos resultados fueron distintos a los encontrados por Curtis et al., (2004)<sup>26</sup>, quienes observaron una inhibición total de 2.2 cm para *E. coli* a partir de extracto de ajo. Estas diferencias pueden ser debidas a que en este trabajo de investigación se realizó una extracción con agua (dilución 1:1 p/v) y en el estudio anteriormente citado se recogió el zumo del ajo blanco, es decir sin dilución. Así mismo, aunque *Cronobacter sakazakii* es una enterobacteria, este microorganismo se inhibió totalmente con el extracto de ajo. La sensibilidad de *Cronobacter sakazakii* ha sido estudiada por Smith et al. (1999)<sup>27</sup>, quienes observaron que solamente el 2% de las cepas de este microorganismo mostró resistencia a extracto de ajo. Sin embargo, estos autores no indican el nivel de inhibición de la mencionada bacteria. Respecto a *L. monocytogenes*, uno de los principales patógenos presentes en alimentos de origen animal,



presentó una inhibición total de aproximadamente 2.0 cm de diámetro. Este microorganismo patógeno, es Gram positivo y psicrófilo, que puede crecer a temperaturas de refrigeración (2-8°C). Además, es un microorganismo asociado a brotes alimentarios de alimentos listos para su consumo<sup>27,28</sup>. Singh et al. (2001)<sup>29</sup> estudiaron la inhibición del extracto de ajo sobre *Listeria monocytogenes* encontrando que la mayoría de las especies de este microorganismo se inhibió con el extracto de ajo, excepto una cepa aislada de alimentos, así mismo, estos autores observaron que la actividad antimicrobiana del extracto de ajo depende de la temperatura, mostrando mayor inhibición a 4°C. Debido a la importancia de este microorganismo en la seguridad alimentaria algunos autores han utilizado el extracto de ajo en combinación con otros microorganismos para incrementar el efecto antimicrobiano del ajo, por ejemplo, el uso del 1% de extracto de ajo en combinación con *L. reuteri* mostro una reducción de 1,5 ufc/mL de *Listeria monocytogenes* en carne molida (Khalili et al. 2019)<sup>30,31</sup>. Respecto a los microorganismos alterantes, bacterias importantes porque causan alteración en la carne y los productos cárnicos, podemos observar que el extracto de ajo blanco inhibió su crecimiento (ver **Tabla 1**). En este trabajo de investigación se han estudiado diversos microorganismos alterantes, bacterias ácido-lácticas (LAB) como *L. sakei*, *L. mesenteroides*, *Carnobacterium viridans* y *Carnobacterium divergens*. que producen colores y sabores anómalos en los productos cárnicos y *Brochothrix thermosphacta*. Las LAB son reconocidas como uno de los principales grupos de bacterias que alteran la carne, pudiendo alcanzar concentraciones de 7-8 Log ufc/g en tres semanas de almacenamiento a 4°C generando aromas anómalos y mucosidad en la superficie de este alimento (Doulgeraki et al., 2012)<sup>32</sup>. Así mismo, Nieto et al. (2020)<sup>33</sup> observan que las LAB son capaces de crecer y alterar la carne de pollo conservada a 4°C y envasada al vacío. Aunque existen estudios sobre la actividad antimicrobiana de extractos de ajo, lúpulo o aceites esenciales en LAB, (Barcenilla et al.<sup>31</sup>, 2021 Nieto et al., 2020.) no se han encontrado estudios específicos sobre estas bacterias alterantes de la carne con extracto de ajo. Así mismo, el ajo blanco mostró una inhibición total frente a *Brochothrix thermosphacta*, este microorganismos es considerado como uno de los alterantes más importantes en la carne durante su almacenamiento a 4°C debido a que es necesaria solamente una concentración 4 y 5 Log ufc/cm<sup>2</sup> para que se formen olores desagradables (mantequilla, queso, y agrio) en la carne (Nieto et al, 2021). Evitar el crecimiento de este microorganismo permitirá alarga la vida útil de la carne



**Figura 2.** Zonas de inhibición de extractos solubles (pH 7,5) de ajo fresco (1) y negro (2) sobre *Brochothrix thermosphacta* por el método agar difusión en MRSA durante 24 horas a 30 °C. Actividad antimicrobiana de extractos solubles del ajo fresco (3) y ajo negro (4) sobre *Listeria monocytogenes* por el método agar difusión, sembradas en TSA durante 24 horas a 30°C.

#### 4.2 Compuestos organosulfurados con acción antimicrobiana

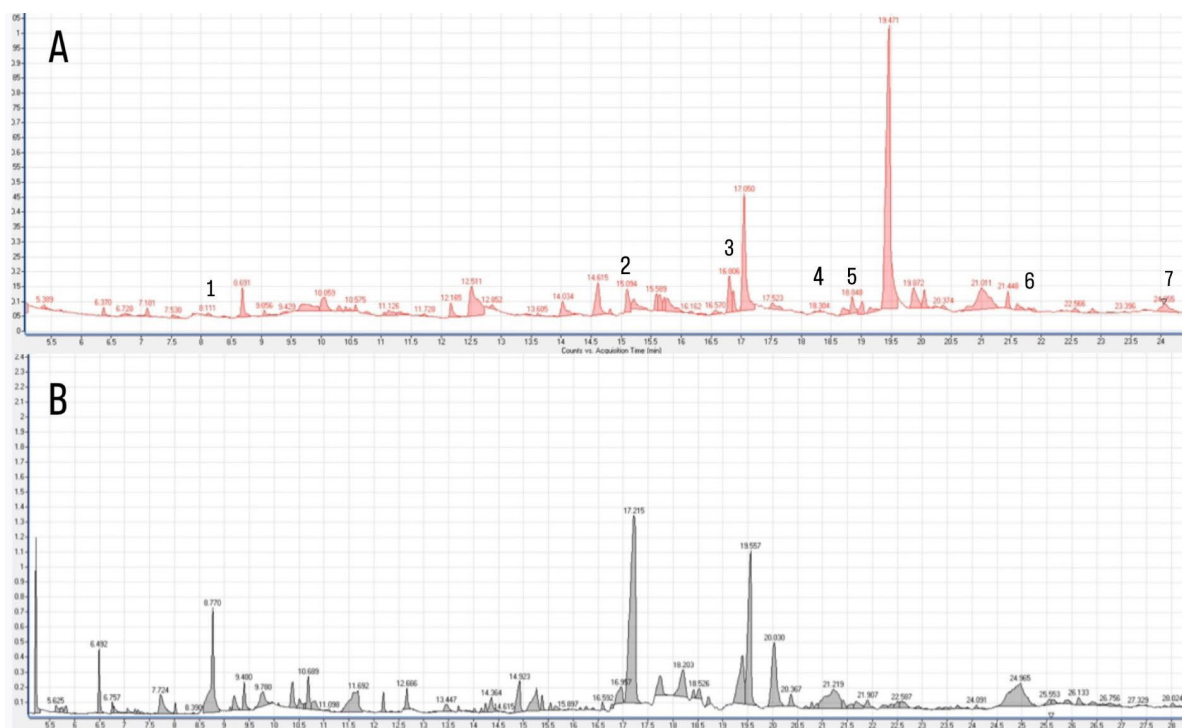
En la **Tabla 2**, se recogen los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana presentes en los extractos de ajo blanco y negro obtenidos por cromatografía de gases acoplado a un lector de masas. Los principales compuestos antimicrobianos presentes en los extractos acuosos de ajo blanco fueron compuestos azufrados derivados de la hidrólisis de la aliina que mediante la enzima alinasa que forma la alicina, uno de los compuestos azufrado más importantes presentes en el ajo. A partir de este compuesto se forman otros azufrados que han mostrado actividad antimicrobiana, por ejemplo, dialil trisulfuro y compuesto organosulfurados 3-vinil-1,2-dithiacyclohex-4-ene, entre otros (ver **Tabla 2**). Además, en la

**Figura 3** podemos observar los cromatogramas obtenidos de los dos extractos solubles de ajo blanco y ajo negro. En los cromatogramas se recogen algunos de los compuestos que han mostrado actividad antimicrobiana según diversos autores <sup>(19)</sup>. Diversos autores mencionan que la alicina es el principal compuesto azufrado antimicrobiano del ajo fresco (Curtis et al., 2004; Chukwuebuka Okoro et al., 2023) <sup>(26)(19)</sup>. Sin embargo, en este estudio este compuesto no ha sido encontrado o identificado en los extractos acuosos del ajo fresco. Similares resultados obtuvieron Chen et al. (2018) <sup>(24)</sup> quienes identifican al 3-Vinil-1,2-dithiaciclohex-4-ene y al Vinil-1,2-dithiaciclohex-4-ene como los compuestos organosulfurados más importantes en el ajo, responsables de la inhibición microbiana. Así mismo, Keles et al. (2014)<sup>34</sup> encuentra otro compuesto organosulfurado el 2-Vinil-4H-1,3-ditiina en cantidades variables en diferentes tipos de ajo fresco. En este trabajo de investigación se han identificado dos de los tres compuestos antes mencionados el 3-Vinil-1,2-dithiaciclohexeno-4-eno y el 2-Vinil-4H-1,3-ditiina, éste último compuesto estuvo presente en una proporción 10 veces mayor que el primero. Finalmente, el dialil trisulfuro estuvo también presente en altas concentraciones en este estudio. Este es capaz de dañar los fosfolípidos presentes en la pared bacteriana, lo que le confiere su actividad antimicrobiana<sup>19</sup>. La actividad antimicrobiana de los compuestos organosulfurados ha sido atribuida a la alteración de la membrana celular (Chen et al., 2018), estos autores observan una salida de proteínas del interior de la pared celular. Los resultados de este estudio, aunque son preeliminares, indican la inhibición de los extractos de ajo fresco en las bacterias es causado por la mezcla de diversos compuestos azufrados derivados de la alicina, así mismo parece ser que la proporción de estos compuestos es dependiente del tipo de la variedad de ajo fresco que se use en los estudios de inhibición. En este estudio se usaron diferentes variedades de ajo, aunque se decidió revisar dos tipos y observamos que la inhibición fue ligeramente distinta según el tipo de variedad (datos no mostrados en Tablas y Figuras).

**Tabla 2.** Principales compuestos con actividad antimicrobiana presentes en extractos solubles de dos tipos de ajo expresada en unidades de pico de área\*

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Tipos de ajo	
		Ajo blanco	Ajo negro
8,38	Dialil sulfuro (DAS)	0,1Xx0 <sup>6</sup>	-
15,09	Dialil disulfuro (DADs)	3,2X10 <sup>6</sup>	-
15,21	Clindamicina	2,2X10 <sup>6</sup>	-
16,86	Trisulfuro de metil alilo	1,9 X10 <sup>6</sup>	-
18,30	3-Vinil-1,2-dithiol ciclohex-5-eno	0,08 x10 <sup>6</sup>	-
19,02	2-Vinil-4H-1, 2-ditiina	1,8 x10 <sup>6</sup>	.
21,87	2-Amino-4-hidroxi-aminopirimidina	0,4X10 <sup>6</sup>	-
24,44	Dialil Trisulfuro (DATs)	1,5 X10 <sup>6</sup>	-

\* Unidades de área expresada x 10<sup>6</sup> ; - sin actividad antimicrobina. & Chen et al., 2018.



**Figura 3.** Cromatogramas de los compuestos solubles, en éter dietílico, obtenidos a partir de los extractos de acuosos del ajo fresco (A) y ajo negro (B) a través de Cromatografía de Gases acoplado a un lector de espectro de masas. **1**, dialil sulfuro; **2**, dialil disulfuro; **3**, Trisulfuro de metil alilo; **4**, 3-vinil-1,2-dithiaciclohexeno-5-eno; **5**, 2-vinil-4H-1,3-ditiina; **6**, 2-Amino-4-hidroxi-aminopirimidina; **7**, dialil trisulfuro

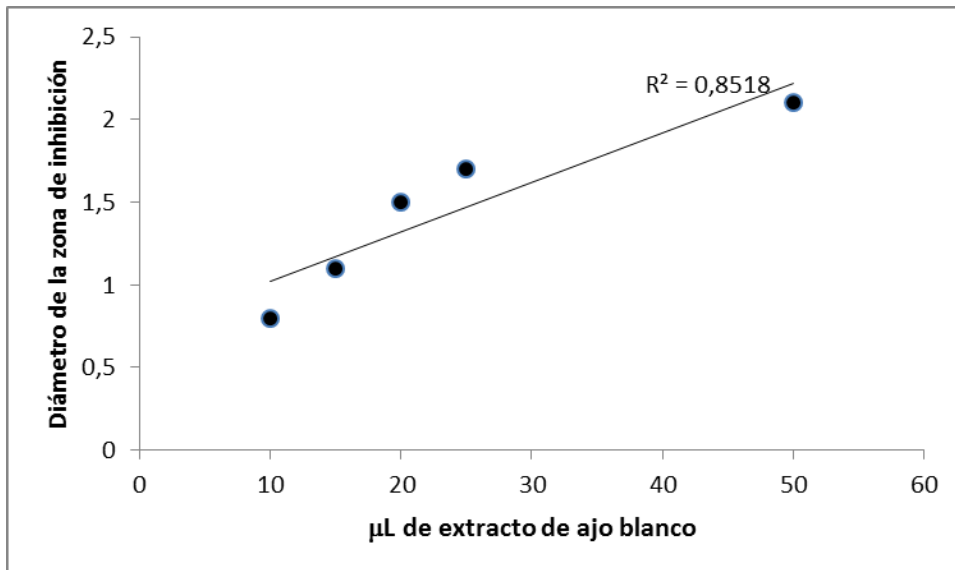
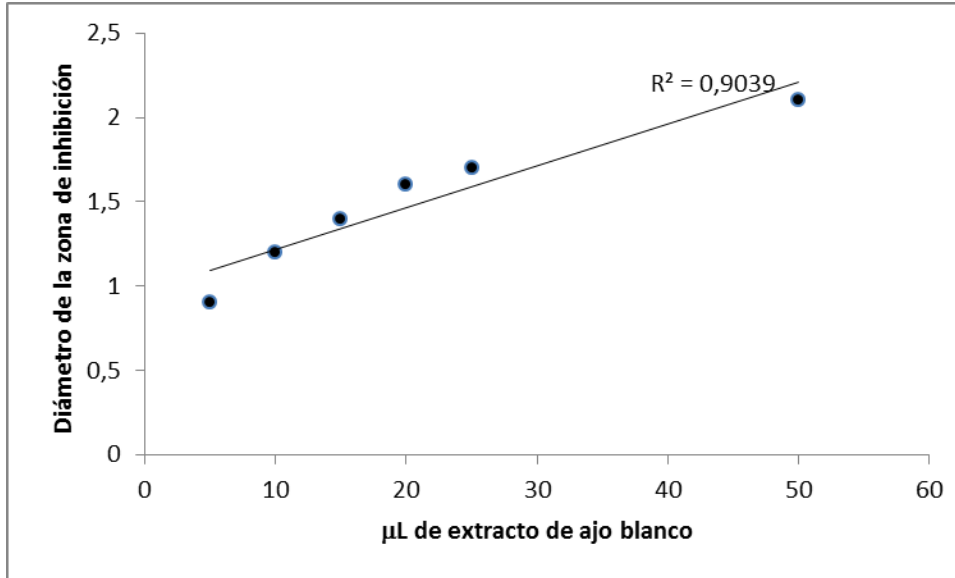
Encontramos diferentes compuestos (dialil sulfuro, dialil disulfuro, alil metil trisulfuro, 3-vinil-1,2-dithiaciclohexeno-5-eno, 2-vinil-4H-1,3-ditiina, 2-amino-4-hidroxi-aminopirimidina y dialil trisulfuro) en los extractos solubles de ajo empleados en los ensayos de este estudio mediante una cromatografía de gases masas. Estos compuestos azufrados poseen acción antimicrobiana. Sin embargo, estos solo se encuentran en el extracto de ajo fresco, al analizar el ajo negro no se ha encontrado ninguno de estos compuestos azufrados antimicrobianos. Esto podría explicar el motivo por el que el extracto de ajo fresco presenta inhibición bacteriana mientras que el extracto de ajo negro no. Entre los compuestos podemos destacar la alta concentración de dialil Trisulfuro que es capaz de dañar los fosfolípidos encontrados en la pared bacteriana<sup>18</sup>.

#### 4.3 Volumen mínimo inhibitorio.

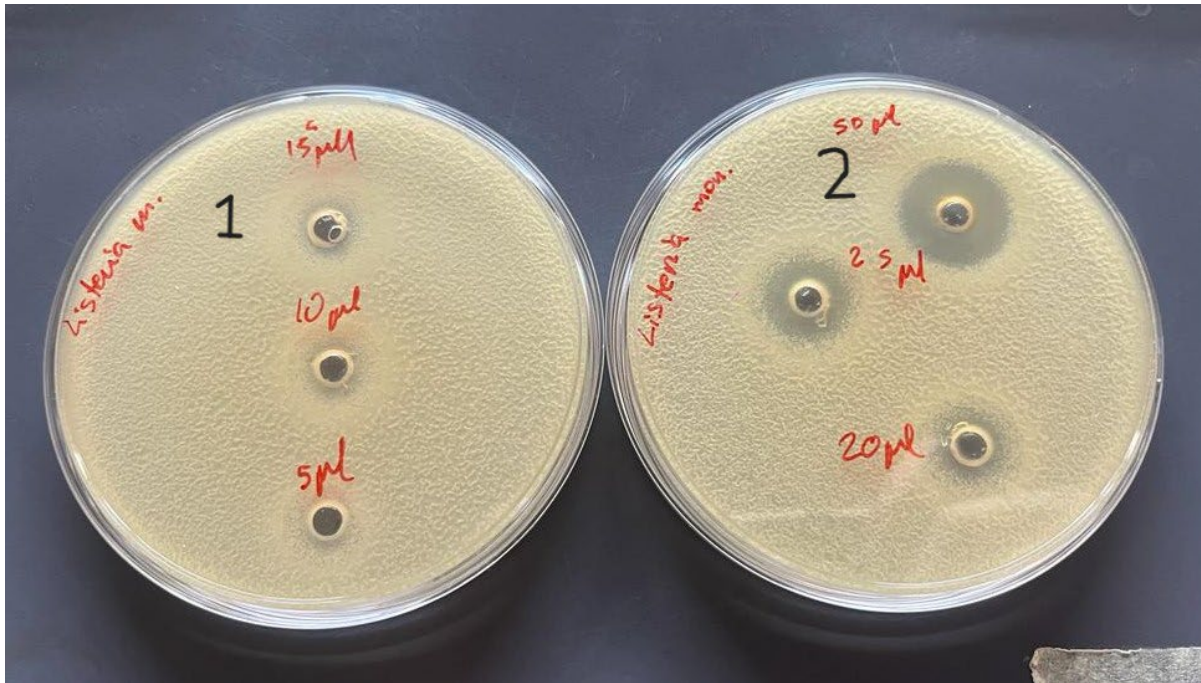
**Tabla 3.** Inhibición (diámetro de los halos de inhibición) obtenida por volúmenes decrecientes de un extracto acuoso de ajo fresco sobre una selección de bacterias patógenas y alterantes

BACTERIA	50 µL	25 µL	20 µL	15 µL	10 µL	5 µL
	Diámetro de inhibición expresado en cm					
<i>Cronobacter sakazakii</i>	2,1±0,1	1,8±0,1	1,6±0,1	1,5±0,1	1,2±0,0	1,0±0,1
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,0±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1 *	1,4±0,1 *	1,2± 0,1	0,9±0,1 *
<i>Salmonella enteritidis</i>	1,8±0,1 *	1,5±0,1 *	1,3±0,1	1,1±0,0 *	1,0±0,1 *	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	1,8±0,0	1.4±0,1	1,2±0,1	1,0±0,1	-	-
<i>Leuconostoc carnosum</i>	1,9±0,1	1,5±0,1 *	1,4±0,0 *	1,2±0,1 *	1,1±0,1 *	0,9±0,0 *
<i>Carnobacterium divergens</i>	2,4±0,1	2,0±0,0	1,8±0,1	1,8±0,1	1,5±0,1	-
<i>Carnobacterium viridans</i>	2,0±0,1	1,5±0,1	1,3±0,0	1,1±0,0	1,0±0,0	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	2,1± 0,2	1,7±0,1	1,5±0,1	1,1±0,1	0,8±0,0 *	-

Experimentos realizados con diferentes concentraciones de extracto acuoso de ajo fresco; \* inhibición parcial; - no presenta inhibición; Los valores mostrados es la media de los diámetros de inhibición de dos repeticiones.



**Figura 4.** Curva de regresión del diámetro de la zona de inhibición frente a distintos volúmenes (µL) de extracto de ajo fresco. **a)** Curva de regresión de *L. monocytogenes*; **b)** Curva de regresión de *B. thermosphacta*



**Figura 5:** Inhibición de *Listeria monocytogenes* usando el método pocillos y difusión en agar (TSA 30°C durante 24 horas) con diferentes volúmenes (50 µL, 25 µL, 20 µL, 15 µL, 10 µL, y 5 µL) de extracto acuoso de ajo fresco.

1: Inhibición parcial; 2: Inhibición total.

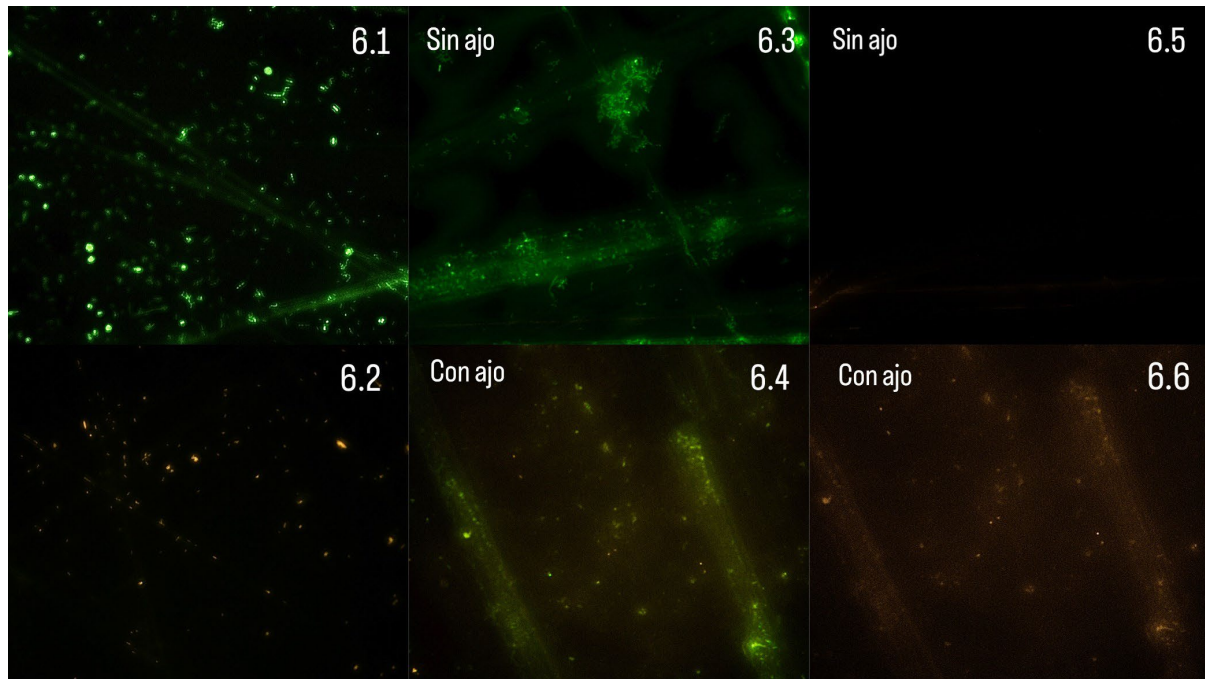
En la **Tabla 3** se puede observar los diámetros de inhibición con diferentes volúmenes de extracto soluble de ajo fresco en bacterias patógenas y alterantes presentes en la carne. Así mismo, en la **Figura 5** podemos observar que la inhibición se ajustó al recta de regresión lineal, especialmente en el caso de *L. monocytógenes* (**Figura 4a**) y en menor medida para *B. thermosphacta*. Es decir, la cantidad de extracto ajo fresco es directamente proporcional al tamaño del halo de inhibición. Mas aún los resultado muestran que la resistencia a los extractos de ajo es dependiente de la especie bacteriana, por ejemplo *C. sakazakii*, *L. monocytogenes* y *L. carnosum* mostraron mayor sensibilidad a estos extractos debido a que presentan inhibición hasta con 5 µL de extracto soluble de ajo fresco, mientras que *Lactobacillus sakei* mostró mayor resistencia ya que se requiere como mínimo 15 µL para obtener un diámetro de inhibición de 1cm.

En la **Figura 5** se puede observar la inhibición de *L. monocytogenes* con distintos volúmenes de extracto de ajo fresco. A medida que disminuyó el volumen de extracto de ajo fresco se observó una inhibición parcial de *L. monocytogenes*, es decir a partir de 20 µL de extracto soluble de ajo fresco se observó crecimiento dentro del halo/ diámetro de inhibición. Este hecho puede ser debido a que la inhibición de *L. monocytogenes* es llevada a cabo por más de uno de los compuestos presentes en el extracto acuoso del ajo fresco, aunque no podemos indicar cuales son, parece ser que estos compuestos muestran una sinergia en la inhibición de este microorganismo. Además, Singh et al. (2001), observan que la concentración mínima inhibitoria de *L. monocytogenes* se incrementa con la temperatura y atribuye este aumento a la baja a la estabilidad que presentan algunos compuestos del extracto acuoso del ajo fresco a 4°C. *Brochothrix thermosphacta* es inhibida totalmente hasta llegar de 10 µL de extracto de ajo fresco donde esta inhibición se vuelve parcial. Posiblemente, uno de los compuestos que presenta sinergia en la inhibición de estos microorganismos se encuentre a bajas concentraciones en el extracto acuoso de ajo fresco. Este compuesto podría ser el 3-vinyl-



1,2-dithiacyclohex-5-ene que esta presente en el ajo fresco  $0,8 \times 10^6$  unidades de área y que de acuerdo con Chen et al. (2018) es uno del compuesto organosulfurados más importantes inhiben a las bacterias

#### 4.4 Efecto de los compuestos organosulfurados en la pared bacteriana.



**Figura 6:** *Listeria monocytogenes* con diferentes tratamientos vista en un microscopio NIKON TI2 Eclipse (objetivo 40X); **6.1**; Cultivo de 24 horas de incubación teñido con SYTO-9 (bacterias vivas); **6.2**; Cultivo de 24 horas de incubación teñido con IP (bacterias muertas-tratadas con isopropanol); **6.3** y **6.5**; *Listeria monocytogenes* tras 24 horas incubación teñida con SYTO-9 e IP; **6.4** y **6.6**; *Listeria monocytogenes* tratadas con 200  $\mu$ L de extracto de ajo fresco tras 24 horas de incubación. Para SYTO-9 se empleó el filtro de FITC y para PI el filtro de TRITC

En la **Figura 6** se recogen las imágenes obtenidas con un microscopio NIKON TI2 Eclipse y un objetivo de 40X de *Listeria monocytogenes* cultivada con y sin extracto de ajo fresco. En la **Figura 6.1** se muestra el control de una población de bacteria vivas, crecidas en TSB a 30°C durante 24 horas de incubación y teñida con SYTO-9. En la **Figura 6.2** se puede observar el control de una población de bacterias muertas, tratadas con isopropanol y teñidas con yoduro de propidio. En las **Figuras 6.3** y **6.5**, se muestran una población *L. monocytogenes* después de 24 horas de incubación, teñida con los dos fluorocromos SYTO-9 y yoduro de propidio. Finalmente, en las **Figuras 6.4** y **6.6**, podemos observar las imágenes de un cultivo de *L. monocytogenes* con 200  $\mu$ L de extracto soluble de ajo fresco y teñido con los fluorocromos SYTO-9 y yoduro de propidio. En estas figuras, se evidencia el efecto del extracto de ajo fresco sobre la inhibición de *L. monocytogenes* en un cultivo de 24h de incubación con extracto de ajo fresco por la presencia de bacterias muertas que emiten fluorescencia a partir de yoduro de propidio usando el canal FITC (**6.6**). En la **Figura 6.4** encontramos dos tipos de poblaciones, una población reducida que emiten fluorescencia verde debido a la presencia de SYTO-9 y otra población, mayoritaria que evidencia la

presencia de los dos fluorocromos; yoduro de propidio y SYTO-9, en el interior de la célula. Esto se pone de manifiesto al superponer ambas señales, con la presencia en la imagen de bacterias en color amarillo.

En este estudio se usaron dos fluorocromos; yoduro de propidio, que estudia la viabilidad de las bacterias ya que este fluorocromo entra en células muertas que tienen una membrana debilitada, con presencia de poros, pero no es capaz de penetrar en las bacterias vivas, y el fluorocromo SYTO-9, el cual se interna fácilmente en las células vivas, presenta una alta afinidad y tiñe los ácidos nucleicos emitiendo una señal de fluorescencia verde. De acuerdo con Chen et al. (2018), los compuestos organosulfurados presentes en el ajo producen cambios en la membrana celular de las bacterias provocando rupturas de la pared celular, esto explicaría la color verde-amarillento que presenta *L. monocytogenes* cuando fue crecida con 200  $\mu$ L extracto soluble de ajo fresco evidenciando el poder antibacteriano del ajo.

## 5. CONCLUSIONES

El extracto acuoso del ajo fresco presenta actividad antimicrobiana sobre los principales microorganismos alterantes de la carne; *L. sakei*, *L. mesenteroides*, *C. divergens*, *C. viridans* y *B. thermosphacta*. También se confirma el efecto inhibitorio del ajo sobre las bacterias patógenas: *E. coli*, *C. sakazakii*, *L. monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Se determinó que el volumen mínimo de extracto soluble de ajo fresco necesario para la inhibición de bacterias patógenas y alterantes de la carne es de 10  $\mu\text{L}$  en el caso de *Salmonella enteritidis*, *C. divergens*, *C. viridans* y *B. thermosphacta*, 15  $\mu\text{L}$  para *L. sakei* y 5  $\mu\text{L}$  cuando se trata de *C. sakazakii*, *L. monocytogenes* y *L. carnosum*.

El análisis de la cromatografía de gases revela 3 compuestos como los responsables de la actividad antimicrobiana del ajo fresco; 3-vinil-1,2-dithiaciclohexeno-4-eno y el 2-vinil-4H-1,3-ditiina y dialil trisulfuro. En este estudio la concentración del segundo compuesto mencionado, debido a su baja concentración, pudo provocar la inhibición parcial que presentaron *L. carnosum* y *L. monocytogenes*, que se evidenció al utilizar volúmenes más pequeños de extracto de ajo blanco.

Finalmente, las imágenes de microscopía revelan que estos compuestos provocan ruptura de la pared bacteriana permitiendo la entrada de los fluorocromos de yoduro de propidio y Syto-9, ya que las bacterias tratadas con ajo fresco emitieron una fluorescencia verde-amarillenta usando el cubo de filtro de fluorescencia FITC. Sin embargo, se requiere un estudio más profundo para establecer una metodología adecuada para estudiar los cambios en la pared bacteriana.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Celso, A. V. (s. f.). (2018) Importancia nutricional de la carne. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2409-16182018000300008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182018000300008&lng=es&tlng=es)
2. Pereira, P. M., & Vicente, A. F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat science*, 93(3), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
3. Font-I-Furnols, M., & Guerrero, L. (2022). Spanish perspective on meat consumption and consumer attitudes. *Meat Science*, 191, 108874. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108874>
4. McAfee, A., McSorley, E. M., Cuskelly, G., Moss, B. W., Wallace, J. M. W., Bonham, M. P., & Fearon, A. M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.029>
5. IARC; OMS. Monografías de la IARC evalúan el consumo de la carne roja y de la carne procesada. OMS [Internet]. 2015;(26 de octubre de 2015):2.Disponible en: [https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240\\_S.pdf](https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_S.pdf)
6. Wang, M., Ma, H., Song, Q., Zhou, T., Hu, Y., Heianza, Y., Manson, J. E., & Qi, L. (2022). Red meat consumption and all-cause and cardiovascular mortality: results from the UK Biobank study. *European journal of nutrition*, 61(5), 2543–2553. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02807-0>
7. Kemper, J. A., Benson-Rea, M., Young, J., & Seifert, M. (2023). Cutting down or eating up: Examining meat consumption, reduction, and sustainable food beliefs, attitudes, and behaviors. *Food Quality and Preference*, 104, 104718. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2022.104718>
8. Parlasca, M. C., & Qaim, M. (2022). Meat Consumption and Sustainability. *Annual Review of Resource Economics*, 14(1), 17-41. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-111820-032340>
9. Soriano, P. S. (2018). Vida útil en carnes frescas, carnes picadas y preparados cárnicos. *Eurocarne: La revista internacional del sector cárnico*, 269, 83-96.
10. Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, 77(1), 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
11. Dekker, J. P., & Frank, K. M. (2015). Salmonella, Shigella, and yersinia. *Clinics in laboratory medicine*, 35(2), 225–246. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.002>
12. Liu, Z., Shaposhnikov, M., Zhuang, S., Tu, T., Wang, H., & Wang, L. (2023). Growth and survival of common spoilage and pathogenic bacteria in ground beef and plant-based meat

analogues. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 164, 112408.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112408>

13. Chazelas, E., Pierre, F., Druesne-Pecollo, N., Esseddik, Y., De Edelenyi, F. S., Agaesse, C., De Sa, A., Lutchia, R., Gigandet, S., Srour, B., Debras, C., Huybrechts, I., Julia, C., Kesse-Guyot, E., Allès, B., Galan, P., Hercberg, S., Touvier, M., & Touvier, M. (2022). Nitrites and nitrates from food additives and natural sources and cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort. *International Journal of Epidemiology*, 51(4), 1106-1119.

<https://doi.org/10.1093/ije/dyac046>

14. Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N., & Máthé, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European journal of medicinal chemistry*, 143, 922-935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>

15. Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-Silleras, B., & Redondo-Del-Río, M. P. (2019). Food Safety through Natural Antimicrobials. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 8(4), 208. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>

16. Chen, C., Liu, C., Cai, J., Zhang, W., Qi, W., Wang, Z., Liu, Z., & Yang, Y. (2018). Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Food Control*, 86, 117-125.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.015>

17. Gutiérrez, A. L., Barrantes, J. B., Navarro, M., Monge, M. E., Segovia-Vargas, M. J., & Redondo, G. M. (2021). Aspectos generales del *Allium sativum* - una revisión. *Ars Pharmaceutica*, 62(4), 471-481. <https://doi.org/10.30827/ars.v62i4.20843>

18. Zhang, Y., Liu, X., Ruan, J., Zhuang, X., Zhang, X., & Li, Z. (2020). Phytochemicals of garlic: Promising candidates for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 123, 109730. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109730>

19. Okoro, B. C., Dokunmu, T. M., Okafor, E., Sokoya, I. A., Israel, E. N., Olusegun, D. O., Bella-Omunagbe, M., Ebubechi, U. M., & Ugboogu, E. E. A. (2023). The Ethnobotanical, Bioactive Compounds, Pharmacological Activities and Toxicological Evaluation of Garlic (*Allium sativum*): A Review. *Pharmacological research*, 8, 100273.

<https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100273>

20. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.

<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

21. Parente, E., & Hill, C. (1992). Inhibition of *Listeria* in Buffer, Broth, and Milk by Enterocin 1146, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium*. *Journal of food protection*, 55(7), 503–508. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.7.503>

22. Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin,

lacticin 3147. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 612–619.

<https://doi.org/10.1128/aem.62.2.612-619.1996>

23. Zotta, T., Guidone, A., Tremonte, P., Parente, E., & Ricciardi, A. (2012). A comparison of fluorescent stains for the assessment of viability and metabolic activity of lactic acid bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(3), 919–927.

<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0889-x>

24. Yi, L., Chen, S., Li, G., Ren, J., Zhou, R., & Zeng, K. (2022). Prevalence of antibiotic resistance pathogens in online fresh-cut fruit from Chongqing, China and controlling *Enterococcus faecalis* by bacteriocin GF-15. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 165, 113678. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113678>

25. Khin, M., Knowles, S. L., Crandall, W. J., Jones, D. D., Jr, Oberlies, N. H., Cech, N. B., & Houriet, J. (2021). Capturing the antimicrobial profile of *Rosmarinus officinalis* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with bioassay-guided fractionation and bioinformatics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 197, 113965.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113965>

26. Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., & Slusarenko, A. J. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.11.006>

27. (EFSA. (2021). The European union one health 2019 zoonoses report. *EFSA Journal*, 19 (2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.

28. Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., & Vijila, H. M. (2007). *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 40(1), 4–13.

29. Singh, B., Falahee, M. B., & Adams, M. R. (2001). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology*, 18(2), 133-139. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0383>

30. Sadaghiani, S. K., Aliakbarlu, J., Tajik, H., & Mahmoudian, A. (2019). Anti-*Listeria* activity and shelf life extension effects of *Lactobacillus* along with garlic extract in ground beef. *Journal of Food Safety*, 39(6). <https://doi.org/10.1111/jfs.12709>

31. Barcenilla, C., Ducic, M., López, M., Prieto, M., & Álvarez-Ordóñez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat science*, 183, 108661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108661>

32. Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology*, 157(2), 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>

33. Nieto, C., Carballo, D. E., Caro, I., Quinto, E. J., Andrés, S., & Mateo, J. (2020). Immersing fresh chicken into an aqueous hop (*Humulus lupulus*) extract to delay spoilage during vacuum refrigerated storage. *Cyta-journal of Food*, 18(1), 132-136. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1722245>

34. Keleş, D., Taşkın, H., Baktemur, G., Kafkas, E., & Büyükalaca, S. (2014). Comparative Study on Volatile Aroma Compounds of Two Different Garlic Types (Kastamonu And Chinese) Using Gas Chromatography Mass Spectrometry (Hs-Gc/Ms) Technique. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(3), 217. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i3.30>