



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECHNIA

TÍTULO

Efecto bactericida "*in vitro*" del *Allium sativum* en *Pasteurella multocida* biotipo "A".

TESIS QUE PRESENTA

JOSÉ CRUZ NÚÑEZ MANZANO

PARA OBTENER TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR

MVZ. ALBERTO ARRÉS RANGEL

COOASESOR

MVZ. MARTIN BRAVO GARCIA

Morelia, Michoacán. Abril 2016

Contenido

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
<i>Pasteurella multocida</i>	7
Ajo (<i>Allium sativum</i>).....	14
Antecedentes de investigaciones.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	37
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	41
PRESUPUESTO	42
ANEXOS.....	43

RESUMEN

Efecto bactericida “*in vitro*” del *Allium sativum* en *Pasteurella multocida* biotipo “A”
Autor: José Cruz Núñez Manzano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El objetivo general fue conocer el efecto bactericida del *Allium sativum* “*in vitro*” sobre *Pasteurella multocida* biotipo “A”. Se prepararon 4 soluciones acuosas porcentuales de *Allium sativum* al 25%, 35%, 45% y 55%, de éstas, se conformaron 4 grupos A, B, C y D respectivamente. Se trabajaron 96 muestras, haciéndose 8 repeticiones en cada uno de los medios de cultivo agar sangre, agar Mueller Hinton y agar chocolate para cada grupo (A,B,C y D) obteniendo 24 repeticiones por grupo, se trabajó un grupo testigo con la *Pasteurella multocida* biotipo “A” en los medios de cultivo antes mencionados. Se empleó el método de difusión en placa, se inocularon los medios de cultivo agar sangre, agar Muller Hinton y agar chocolate con una cepa de *Pasteurella multocida* biotipo “A”, para posteriormente colocar discos de papel filtro de 6mm de diámetro impregnados con las diferentes concentraciones de la solución acuosa de *Allium sativum*. Se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas para posteriormente observar el halo de inhibición, se procedió a medir cada uno de ellos obteniéndose los siguientes resultados estadísticos, que nos marcaron las diferencias entre ($P<0.05$) A(25%) $8.042^C \pm 0.706$, que fueron menores a ($P<0.05$) B(35%) $8.958^B \pm 0.908$, pero entre estas dos concentraciones son similares C(45%) $9.291^B \pm 0.883$, y dándonos una diferencia favorable en ($P<0.05$) D(55%) $10.042^A \pm 0.988$. La influencia de los medios de cultivo ante las manifestaciones de los halos de inhibición y las diferencias entre sí ($P<0.05$) (CH) $9.328^A \pm 0.997$ que es similar a (AS) $9.078^{AB} \pm 1.219$, y esta mantiene una similitud con (M-H) $8.844^B \pm 1.132$, Concluyendo, que se manifestó un efecto bactericida del *Allium sativum* sobre una cepa de *Pasteurella multocida* biotipo “A”, se observó que a mayor concentración de la solución acuosa de *Allium sativum* mayor es el halo de inhibición sobre la *Pasteurella multocida* biotipo “A”. Aun que se sugiere hacer experimentos a una concentración más elevada. **Palabras clave:** *Allium sativum*. *Pasteurella multocida* biotipo “A”, cultivos bacterianos. Halo de inhibición.

ABSTRACT

Bactericide effect "*in vitro*" of *Allium sativum* in *Pasteurella multocida* biotype "A"
Author: Jose Cruz Nuñez Manzano. Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. The overall objective was to determine the bactericide effect of *Allium sativum* "*in vitro*" on *Pasteurella multocida* biotype "A". 4 percentage *Allium sativum* aqueous solutions of 25%, 35%, 45% and 55%, of these, four groups A, B, C and D respectively were formed were prepared. 96 samples were worked, making 8 repetitions on each media blood agar culture, agar Mueller Hinton agar and chocolate for each group (A, B, C and D) obtaining 24 repetitions per group, a control group worked with the *Pasteurella multocida* biotype "A" in the aforementioned culture media. the diffusion method plate was used, the media blood agar culture was inoculated agar Muller Hinton agar and chocolate with a strain of *Pasteurella multocida* biotype "A", later placing filter paper discs 6mm impregnated diameter with different concentrations of the aqueous solution of *Allium sativum*. Were incubated at a temperature of 37 ° C for 24 hours to subsequently observe the inhibition zone, were measured each obtained the following statistical results, that marked differences ($P < 0.05$) A (25%) $8.042C \pm 0.706$, which were lower ($P < 0.05$) B (35%) ± 0.908 8.958B, but between these two concentrations are similar C (45%) $9.291B \pm 0.883$, and giving us a favorable difference ($P < 0.05$) D (55%) $0.988 \pm 10.042A$. The influence of the culture media of manifestations of the inhibition halos and the differences between them ($P < 0.05$) (CH) $9.328A \pm 0.997$ which is similar to (AS) $9.078AB \pm 1,219$, and this maintains a similarity with (MH) $8.844B \pm 1.132$, concluding that a bactericide effect of *Allium sativum* on a strain of *Pasteurella multocida* biotype appeared "a", it was observed that the higher the concentration of the aqueous solution of *Allium sativum* greater is the halo of inhibition on the *Pasteurella multocida* biotype "A". Even suggested experiments at a higher concentration. **Keywords:** *Allium sativum*. *Pasteurella multocida* type "A", bacterial cultures. Halo inhibition.

INTRODUCCIÓN

La importancia de las investigaciones científicas sobre métodos naturales para curar o tratar algún tipo de patología ya sea animal o humana radica en que es necesario retomar con estudios serios la efectividad de estos en la salud de los organismos. Las repercusiones en la salud de los organismos que ingieren medicamentos de origen químico han orientado a la búsqueda de diferentes alternativas para combatir infecciones bacterianas, con el fin de implementar ahorros y una nueva alternativa orgánica más saludable.

Actualmente se ha iniciado el rescate de conocimientos regionales en el uso de medicina natural para el tratamiento de enfermedades en animales y humanos, en este esfuerzo se encuentran diferentes instituciones internacionales, universidades e investigadores preocupados por una alimentación más sana, en la actualidad está invadida de productos químicos con producciones a gran escala.

Se ha demostrado que ajo (*Allium sativum*) tiene un efecto ante diferentes infecciones bacterianas y se ha utilizado para tratar algunas con resultados favorables un que falta estudios científicos que avalen y respalden el uso del *Allium sativum* como bactericida.

REVISIÓN DE LITERATURA

Patología: Parte de la medicina que estudia las enfermedades, es una ciencia y como tal, comprende todas las anormalidades de la estructura corporal y su función; es decir, estudia las respuestas celulares y tisulares ante una agresión. Su objetivo es entender el proceso de la enfermedad para poder, entre otras metas, establecer un diagnóstico (Trigo Tavera & Valero Elizondo, 2002).

Bacteria: Microorganismo unicelular procarionte, cuyas diversas especies causan las fermentaciones, enfermedades o putrefacción en los seres vivos o en las materias orgánicas.

Antibiótico: Se dice de la sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos, por su acción bactericida.

Bactericida: un efecto bactericida es aquel que produce la muerte a una bacteria.

Pasteurella multocida

En el género *Pasteurella* se incluyen en la actualidad 20 especies que son, fundamentalmente, microorganismos patógenos de animales y que en ocasiones causan infecciones en los mamíferos. La mayoría de éstas están producidas por *Pasteurella multocida*, aunque también, con menor frecuencia, pueden afectar a los mamíferos, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis* y *Pasteurella dagmatis*. Pasteur, en 1880, aisló por primera vez, de sangre de pájaros, *P. multocida*, caracterizándola morfológica y bioquímicamente (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

En 1885, Kit aisló el microorganismo de la sangre de ganado enfermo y lo llamó *Bacterium bipolarmulticidium*. Hueppe, en 1886, le denominó *Bacterium septicemia haemorrhagica* y empleó el término “septicemia hemorrágica” para describir la enfermedad causada por esta bacteria en los animales. Trabajos sucesivos de diferentes laboratorios reconocieron propiedades bioquímicas y morfológicas comunes entre las bacterias no hemolíticas que causaban septicemia hemorrágica en los animales y fueron agrupadas como *Pasteurella septica* en 1929, y como *Pasteurella multocida* en 1939. El primer caso de infección humana por *P. multocida*, tras la mordedura de un gato, fue descrito por Kapel y Holm en 1930 (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

Características generales

Pasteurella multocida, la especie tipo del género, es un cocobacilo pleomórfico gramnegativo. En la tinción de Gram puede observarse como formas cocoides o como bacilos cortos o filamentosos, con una típica tinción bipolar, que pueden aparecer sueltos o agrupados en parejas o cadenas cortas. *Pasteurella multocida* es anaerobio facultativo, inmóvil, crece bien en medios de agar sangre, chocolate y Mueller-Hinton, pero no en agar McConkey, eosina azul de metileno (EMB), ni en otros medios selectivos o diferenciales empleados para el aislamiento de enterobacterias (Velasco, 2008) (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

Tras 24 h de incubación en agar sangre, *P. multocida* crece formando colonias lisas de 1–2 mm de diámetro, de un color gris azulado brillante, no hemolíticas y en ocasiones mucosas. El crecimiento en medio de agar sangre y la característica tinción bipolar ayudan a diferenciar *P. multocida* del género *Haemophilus*, con el que puede confundirse en la observación microscópica inicial. Como la mayoría de las especies del género, *P. multocida* da las reacciones de oxidasa y catalasa positivas, reduce los nitratos a nitritos y es típicamente sensible a la penicilina (Velasco, 2008) (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

La ausencia de hemólisis en medios con sangre, la producción de indol, la descarboxilación de la ornitina y una reacción de urea negativa permiten diferenciar *P. multocida* de las otras especies del género. *Pasteurella multocida* incluye tres subespecies: *P. multocida* ssp *multocida*, *P. multocida* ssp *septica* y *P. multocida* ssp *gallicida*. La identificación de subespecies se basa en la producción de ácido a partir

del sorbitol y del dulcitol, aunque esta distinción no se considera relevante en los aislamientos clínicos (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

Epidemiología

Pasteurella multocida coloniza el tracto gastrointestinal y respiratorio de una gran variedad de mamíferos y aves, que constituyen su principal reservorio. Los animales más frecuentemente colonizados son los gatos (50-90%) y los perros (50-65%). Las tasas de colonización en humanos son muy bajas; en estudios epidemiológicos se ha aislado *P. multocida* de la faringe y de las secreciones respiratorias en el 2-3% de las personas que tienen contacto con animales. La colonización es más frecuente en las personas que presentan patología respiratoria crónica, sobre todo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y bronquiectasias, en ancianos y en pacientes con algún tipo de inmunodepresión (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

En 1980 se describió un brote de infección nosocomial por *P. multocida*, pero no fue posible determinar su origen ni el mecanismo de transmisión. No se ha documentado transmisión persona a persona ni transmisión por el agua o los alimentos contaminados (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

Diagnóstico microbiológico

La identificación de *P. multocida* a partir de muestras clínicas puede realizarse fácilmente por sus características de crecimiento y por las pruebas bioquímicas (Velasco, 2008).

En general, su característica morfología en la tinción de Gram, el crecimiento en medios de agar sangre sin desarrollo en agar McConkey o EMB, junto a las reacciones positivas de oxidasa, catalasa e indol son suficientes para realizar en 18-24 h una identificación presuntiva (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

La identificación puede confirmarse con pocas pruebas bioquímicas adicionales; de ellas, las más comúnmente utilizadas son la hidrólisis de la urea, la descarboxilación de la ornitina y la acidificación de la maltosa y de la sacarosa, junto con la determinación de la sensibilidad a la penicilina. La sensibilidad a la penicilina (disco de 10 U), resulta de gran ayuda en la identificación (Velasco, 2008).

La prueba se realiza en agar Mueller-Hinton inoculado con una suspensión bacteriana equivalente al 0,5 de MacFarland y se consideran sensibles las cepas que presentan halos de inhibición superiores a 15 mm de diámetro. *Pasteurella multocida* debe ser considerada siempre como un posible agente etiológico en las infecciones de heridas producidas por mordeduras y como posible patógeno respiratorio en pacientes con patología pulmonar crónica, especialmente si se conocen antecedentes de contacto con animales. Sin embargo, como sucede con otros patógenos respiratorios, el

aislamiento de *P. multocida* de secreciones respiratorias no siempre implica una relación causal del hallazgo (Velasco, 2008).

Sensibilidad a los antibióticos

La mayoría de las cepas de *Pasteurella multocida* son sensibles a la penicilina, tetraciclinas, cefalosporinas de segunda y tercera generación, quinolonas y cotrimoxazol. La cloxacilina y las cefalosporinas de primera generación son menos activas, sobre todo cuando se administran por vía oral (de Cueto López & Pascual Hernández, 2008).

La sensibilidad a los aminoglucósidos es variable y, aunque estos antibióticos podrían utilizarse tras la realización de pruebas de sensibilidad, no existe experiencia clínica que avale su empleo. *Pasteurella multocida* suele ser resistente o mostrar sensibilidad intermedia a la eritromicina y el 50% de las cepas son resistentes a la claritromicina. Aunque *P. multocida* resulta sensible a la azitromicina, la experiencia clínica con este agente es muy limitada por lo que, en general, no se aconseja este tratamiento. Algunas cepas son resistentes al cloranfenicol y todas lo son a la clindamicina (Velasco, 2008).

Aunque el antibiótico de elección en el tratamiento de las infecciones producidas por *P. multocida* continúa siendo la penicilina, se han descrito algunas cepas productoras de β -lactamasa, lo que obliga a realizar pruebas de sensibilidad adecuadas en infecciones graves. Como alternativa, en pacientes alérgicos a β -lactámicos, se

recomienda el tratamiento con tetraciclinas, siendo de elección la minociclina (Velasco, 2011).

Hasta disponer de los resultados de los cultivos y de las pruebas de sensibilidad, se considera de elección el tratamiento con amoxicilina-clavulánico, por la frecuencia con que se encuentran en estas infecciones junto a *P. multocida* otros microorganismos, sobre todo, *S. aureus* y anaerobios (Velasco, 2011).

Naturismo

El Diccionario de la Real Academia define como naturismo la “doctrina que preconiza el empleo de los agentes naturales para la conservación de la salud y el tratamiento de las enfermedades”. Una definición más amplia y de los doctores Malte Bühring y Pablo Saz define que medicina naturista: “Es la ciencia que aborda la capacidad curativa de nuestro propio organismo, el uso terapéutico de las sustancias y elementos naturales de nuestro entorno, y la aplicación de los procesos naturales y actividades fisiológicas con fines terapéuticos” (Bühring & Saz Piero, 1998).

Conceptos Básicos de Fitoterapia: En medicina popular se habla de herboristería común y para referirse a la medicina de las hierbas, y hierberos a los que las recolectan, venden y conservan los conocimientos y costumbres de sus lugares de

origen. El empleo preventivo o curativo de las plantas medicinales se basa en la experiencia tradicional (Duke, 1998) (UNAM, 2009).

Actualmente se pretende, sin menospreciar la sabiduría popular, razonar y justificar el uso de las plantas medicinales en base al conocimiento científico derivado del estudio farmacológico y de la experimentación clínica; y se ha denominado a esta ciencia médica como Fitoterapia, y se han establecido algunos conceptos básicos para definir distintos aspectos de esta terapia (UNAM, 2009).

La fitoterapia, es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar, o para curar un estado patológico (Rutiaga, 2007).

Para lo cual se emplea plantas medicinales, esto es la planta completa o alguna de sus partes (hojas, flores, corteza y/o raíz, etc.) contiene sustancias que la hacen útil para mejorar la salud de las personas o los animales (Araujo Díaz & Salas Asencios, 2008).

Así cuando se define una planta como medicinal se debe mencionar obligatoriamente la parte de esta planta que sustenta la actividad curativa (Jiménez Díaz & Cruz Suárez, 2007).

El principio activo de una especie medicinal (poder curativo) le viene dado por uno o más componentes que se encuentran en esa parte de la planta sustancia responsable de la actividad farmacológica (Centeno Canal, 2011).

Ajo (*Allium sativum*)

El ajo es parte de la familia de las liliáceas y el bulbo es de una planta semejante al lirio del cual las hojas crecen hasta 50-60 cm, el bulbo está constituido de diferentes estructuras dientes cada uno de los cuales está recubierto de una película blanca como papel (Centeno Canal, 2009).

El bulbo tiene raíces fibrosas; el tronco verde y liso desarrolla largas hojas achatadas y las flores, blancas o rosadas, brotan al final del verano. Originario, probablemente del Asia, ahora crece bien en todas las regiones en clima templado (Centeno Canal, 2010) (Dawahra, 2009).

Crece en los huertos y se propaga por medio de los dientes que, se plantan al inicio de la primavera o en otoño, en un terreno bien drenado y en un lugar soleado. Los

dientes se entierran a una distancia de 15 cm y la recolección se hace después de 5-6 meses. Los bulbos, al final, se secan en un lugar fresco y seco (Duke, 1998).

Los hebreos, los chinos, los griegos, los romanos, los indios, y los babilónicos lo utilizaban para expeler gusanos intestinales. Todavía es utilizado por los médicos facultativos modernos para el mismo propósito. Clupeper, médico inglés del 1600, afirmaba que podía curar todas las enfermedades, se recomendaba mucho para aclarar la voz, curar el resfriado, la tos, la bronquitis y el asma, pero su propiedad más apreciada era la de combatir enfermedades e infecciones (Dawahra, 2009).

Es todavía más notoria su eficacia como antiséptico externo: durante la Primera Guerra Mundial fue usado ampliamente en la desinfección de las heridas cuando faltaban los antisépticos convencionales. En general, es un óptimo vasodilatador: baja la presión arteriosa y previene enfermedades coronarias. (UNAM, 2009) (Centeno Canal, 2010).

Química

El ajo ejerce efectos sobre numerosos órganos de nuestro cuerpo y sobre numerosos aspectos fisiológicos. El olor que lo delata debe a dos sustancias altamente volátiles llamadas aliina (es un sulfóxido que se encuentra naturalmente en el ajo fresco, es un derivado del aminoácido cisteína) y disulfuro de alilo, estas se disuelven con gran

facilidad en los líquidos y en los gases y al ser transportadas por la sangre impregnan todos los tejidos de nuestro cuerpo (UNAM, 2009).

El ajo crudo y el cocido poseen diferentes propiedades medicinales, es decir, algunos de los efectos del ajo se producen con mayor efectividad ingiriendo ajo crudo, mientras que otros se logran igual o mejor ingiriendo ajo cocido. Varios de los beneficios del ajo se deben a un compuesto llamado alicina que actúa contra numerosos virus y bacterias y que es considerado por muchos investigadores como el más potente antioxidante conocido.

Sin embargo, esta sustancia no está presente en el ajo sino que se forma cuando la aliina y la alinasa, otras dos sustancias que sí están presentes se combinan. La alicina se produce por una reacción enzimática cuando el ajo se tritura o se rasga; cuando la enzima alinasa, que se almacena en un compartimiento aislado dentro del mismo ajo, se combina con el compuesto proteínico llamado aliin produce la alicina. La alicina es un agente antibacteriano de amplio espectro. También se han observado propiedades antifúngicas y antiprotozoos. (Centeno Canal, 2010)

La alicina sólo dura unos minutos por lo que es importante ingerir rápidamente el ajo luego de ser cortado o machacado. Al cocinar el ajo se destruye la alicina. Sin embargo, se liberan otros compuestos como la adenosina y el ajo en que poseen propiedades anticoagulantes, ayudan a reducir el nivel de colesterol y en tratamiento intestinal de helmintos (UNAM, 2009).

El ajo fresco y su aceite son eficaces: Los clavos son machacados, y el aceite del ajo es absorbido por la piel y llevado por la sangre a los intestinos fácilmente, pues posee una fuerza penetrativa de gran alcance (UNAM, 2009).

Antecedentes de investigaciones

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Monagas, Venezuela. Se estudió la frecuencia de resistencia y sensibilidad *in vitro*, utilizando la prueba de Bauer-Kirby, a 13 antimicrobianos en 61 cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de terneros con problemas neumónicos en el estado Monagas. El 100% de los aislados mostraron resistencia múltiple a los antimicrobianos evaluados, estando entre 25 y 70% para ácido nalidixico (NA), cefalotina (CF), colomicina (CL), eritromicina (E), estreptomycin (S), lincomicina (L), neomicina (N), penicilina (P), sulfametoxazol (TXS) y triple sulfas (SSS) (Clavijo, et al., 2002).

La resistencia se presentó entre 1 y 24% para amikacina (AN), cloranfenicol (C) y tetraciclina (Te), no encontrándose 100% de sensibilidad ante ningún antimicrobiano. Estos resultados demuestran la necesidad de tratamientos específicos, con la ayuda del antibiograma, para las neumonías en terneros, debido al riesgo de la diseminación de cepas de *Pasteurella multocida* resistentes a la mayoría de los antimicrobianos. Esto podría dificultar futuros tratamientos de neumonías en terneros, conllevando implicaciones de salud pública (Clavijo, et al., 2002).

En un estudio realizado en la Facultad de Ciencias Básicas en el departamento de microbiología por el Grupo de Investigación en Ciencias Aplicadas de la Universidad de Pamplona GICA-UP se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cinco cepas bacterianas patógenas de relevancia en la industria alimentaria, como son: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* El extracto de *A. cepa* mostró una mayor actividad antimicrobiana, en comparación con extractos similares de *A. sativum* y *A. fistulosum* (García Rico & Herrera Arias, 2007).

En investigaciones realizadas en 2008 entre la universidad científica del sur y la universidad nacional Federico Villarreal de Perú sobre la actividad antimicrobiana de plantas encontraron que, dentro de las que dieron mejores resultados se encuentra el ajo en las pruebas bacterianas a nivel de laboratorio (*in vitro*) teniendo como resultados que el ajo posee actividad antimicrobiana y anti fúngica teniendo mayor efecto en bacterias Gram positivas (Araujo Díaz & Salas Asencios, 2008).

En facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste en Corrientes. Argentina. Se hizo la investigación sobre la actividad antibacteriana *In Vitro* del extracto de *Allium sativum*. Con el fin de analizar el comportamiento de *A. sativum* frente a dos cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de patologías caninas (una de otitis y otra de piodermatitis), se realizaron dos ensayos por el método de dilución en placa de agar: en el primero se confrontaron 1 ml de 3×10^6 , 3×10^5 y 3×10^4 de cada una de las cepas con 1 ml de macerado de ajo en agua al 35%, 3,5% y 0,35% y en el segundo, se mantuvo estable la concentración de ambas cepas en 2×10^6 , confrontándose con 1 ml de macerado al 25%, 2,5% y 0,25%.

En ambos ensayos se inhibió el desarrollo de ambas cepas utilizando el macerado a las concentraciones de 35% y 25%, obteniéndose desarrollo bacteriano en las diluciones restantes. Vista la efectividad demostrada, se continuarán realizando diluciones crecientes hasta alcanzar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del macerado de *A. sativum* (Medina, 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de medicamentos químicos indiscriminadamente ha ocasionado una gran preocupación dentro de la humanidad ya que se ha generado mayor resistencia en algunos agentes patógenos y las principales modificaciones dentro de sus estructuras físicas y químicas han ocasionado serios problemas tanto en la salud animal como humana. Las alternativas en medicamentos naturales e investigaciones para su uso son muy pocas, los productores solo consiguen los medicamentos comerciales y en muchas ocasiones el que mejor le ha dado resultado a otros productores, sin tomar en cuenta que el medicamento realmente sea el que ellos necesitan y que tanto puede perjudicarles o si estos medicamentos dejan residuos en los animales para consumo humano, esto es más una cuestión cultural y no se le puede pedir conocimientos de farmacopea o de sanidad e inocuidad a los productores.

Las grandes empresas farmacológicas tienen controlado el mercado interesándoles solamente hacer negocio, como lo manifiesta el ganador del Premio Nobel de Medicina Richard J. Roberts que denuncia la forma en la que operan las grandes farmacéuticas

dentro del sistema capitalista, anteponiendo los beneficios económicos a la salud y deteniendo el avance científico en la cura de enfermedades porque curar no es tan rentable como la cronicidad.

También hacen que algunos fármacos que podrían curar del todo una enfermedad no sean investigados y gastan cientos de millones de dólares al año pagando a doctores para que éstos promuevan sus medicamentos, esto demuestra que a lo que ellos conviene es la rentabilidad del producto aunque este haya dejado de funcionar con eficacia, sin contar con el alto costo al que se venden los medicamentos de patente comparado con los costos de producción y la capacidad de pago de los productores (Roberts, 2011).

Actualmente es poca la producción pecuaria orgánica, por lo cual se están produciendo animales en los cuales se están suministrando químicos para controlar enfermedades, produciendo alimentos con un alto riesgo para consumo humano. Tomando en cuenta los altos costos de los medicamentos de patente van mermando la rentabilidad de los productores que no cuentan con otras alternativas para combatir a los agentes patógenos que se han hecho cada vez más resistentes y se necesitan mayores cantidades de medicamentos químicos o recurrir a otros cada vez más costosos generándose así una dependencia tanto en la ganadería como en la agricultura.

Por otra parte, se está olvidando el uso de plantas que se utilizaban comúnmente y que son realmente benéficas para la salud ya que producen menor riesgo en su uso y

aplicación tanto en los animales como en humanos. Por eso investigar, rescatar e innovar alternativas que ayuden a controlar enfermedades con medicamentos de origen natural que sean eficaces, menos agresivos y que nos brinden de esta manera un producto de mayor calidad y así un menor riesgo para la población ayudando a proporcionar un tratamiento eficaz.

JUSTIFICACIÓN

El hombre ha hecho uso de los productos de la naturaleza desde tiempos inmemoriales, no sólo para satisfacer su hambre, sino también con el fin de sanar sus enfermedades, cicatrizar sus heridas y elevar su estado de ánimo (Dawahra, 2009).

El uso de hierbas con fines terapéuticos estaba asociado a un buen conocimiento de las plantas adquirido empíricamente y transmitido de padres a hijos a través de muchas generaciones, en la actualidad existen investigaciones serias de diferentes universidades en donde se está probando el efecto de los extractos naturales en diversas enfermedades tanto humanas como animales (Rutiaga, 2007).

Las plantas medicinales como terapia representan una gran alternativa para prevenir, aliviar dolores y enfermedades. Hoy en día tienen una gran aceptación en todo el mundo y su uso es cada vez más frecuente, incluso la Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas, la atención primaria de salud que se basa en la medicina tradicional es hasta en un 80% de la población de los países en desarrollo, por tradición cultural o porque no existen otras opciones. En los países ricos, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que «natural» es sinónimo de inocuo (OMS, 2004).

En la actualidad el consumo de medicamentos químicos ha ido en aumento y son muchas las repercusiones negativas, ya que los efectos secundarios provocados por muchas sustancias sintéticas en ocasiones son peores que el mal que combaten, dejando en el organismo tanto humano como animal grandes cantidades de agentes químicos que ocasionan resistencia en los agentes patógenos, que los animales tienen procesos de eliminación de toxinas largos y la carne como producto no debe ser consumida, sin embargo, los diferentes laboratorios no se ponen de acuerdo en el tiempo para poder consumir la carne después de la medicación, y en animales de rápido crecimiento muchas ocasiones se mandan al mercado sin que se hayan eliminado por completo los medicamentos de sus organismos.

Es de suma importancia presentar alternativas que tengan base científica en las que este comprobado el por qué, el cómo y los resultados en base a investigaciones detalladas con el fin de ofrecer soluciones a los problemas patológicos con un impacto negativo mínimo en organismos animales y humanos, publicando los trabajos al respecto para que los productores puedan acceder a esos tratamientos mejorando su producción, sus costos y beneficios.

El bajo costo de los medicamentos naturales es una gran alternativa tanto para aumentar la competitividad como para el tratamiento de enfermedades en zonas de bajos ingresos económicos.

Existe gran disponibilidad de plantas medicinales en nuestro país y Michoacán con su diversidad de climas favorece la existencia y producción de casi cualquier medicamento natural (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Michoacán, 2009).

El rescate de los conocimientos sobre medicina natural de las comunidades es necesario para evitar la pérdida cultural e ir generando tratamientos básicos que solucionen problemas de salud en los animales como hace referencia James A. Duke, en su libro la Farmacia Natural en donde menciona que en varios estudios realizados los productos a base hierbas, claramente funcionan mejor que algunos medicamentos comerciales, la medicina racional a base de hierbas es más segura que la medicina convencional porque la medicina de hierbas es más diluida y sus efectos secundarios tienden a ser menos fuertes (Duke, 1998).

La medicina naturista o alternativa no busca una generación de ingresos materialistas, ya que sus principios o ideales son; la solución de un problema de salud, la motivación a las farmacias y la vida natural el cuidado a la ecología “una cura a nuestro planeta” más que hacer un gran negocio con la salud de los pacientes (Duke, 1998).

HIPÓTESIS

Es posible controlar el crecimiento de la cepa de *Pasteurella multocida* biotipo “A” *In vitro* a través de la aplicación de *Allium sativum*.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto inhibición del *Allium sativum* “*in vitro*” en *Pasteurella multocida* biotipo “A”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Comprobar el halo de inhibición del *Allium sativum* “*In vitro*” en *Pasteurella multocida* biotipo “A” en concentraciones al 25%, 35%, 45% y 55%. Y conocer su comportamiento en agar sangre, agar Müller Hilton y agar chocolate.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el área de bacteriología de la Unidad de Servicios Auxiliares para el Diagnóstico, USAD, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en el municipio de Tarímbaro Michoacán, km. 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, al noreste de la capital de Michoacán. El clima que predomina es templado con lluvias en verano, con una precipitación media anual de 773.9mm, temperatura media de 18.6°C y una altura sobre el nivel del mar de 1860m, entre los paralelos 19° 48' de latitud norte y los meridianos 101° 11' de longitud oeste (INEGI, 2004).

MATERIAL

Autoclave	Agua destilada estéril
Microscopio binocular,	Cajas de Petri 100 x 15 mm
Estufa de cultivo,	Frascos de cristal estériles,
Refrigerador,	Pinzas y tijeras,
Mechero bacteriológico	Probeta de 100 ml,
Balanza granataria	20g Base de agar sangre,
Vernier	10g de Agar Muller-Hinton,
Matraz Erlen-Mayer de 100 ml	Suspensión al 10% de eritrocitos de borrego,
Mortero	

Discos de papel filtro estériles de 6mm de diámetro.

MATERIAL BIOLÓGICO: 79.7g de *Allium sativum*, una cepa de *Pasteurella multocida* biotipo "A" donada por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE).

Se prepararon 4 soluciones acuosas de *Allium sativum* a diferentes concentraciones porcentuales al 25%, 35%, 45% y 55%, formando a su vez cuatro grupos respectivamente (Grupo A=25%, Grupo B=35%, Grupo C=45% y Grupo D=55%).

Se trabajaron 96 muestras con un cultivo de *Pasteurella multocida* biotipo "A". De cada grupo se hicieron 24 repeticiones, de las cuales 8 fueron realizadas en agar sangre, 8 en agar chocolate y 8 en agar Müeller Hilton, *Pasteurella multocida* es anaerobio facultativo, inmóvil, crece bien en medios de agar sangre, chocolate y Müeller-Hinton, pero no en agar McConkey, eosina azul de metileno (EMB), ni en otros medios selectivos o diferenciales (Velasco, 2011), con la finalidad de conocer la sensibilidad de la *Pasteurella multocida* biotipo "A", ante los diferentes medios de cultivo y concentraciones de *Allium sativum*.

Se empleó el método de difusión en las diferentes placas de los medios de cultivo anteriormente señalados, para determinar la sensibilidad de la *Pasteurella multocida* biotipo "A" ante las concentraciones acuosas del 25%, 35%, 45% y 55% de *Allium Sativum*. Este método tiene como referencia la prueba de sensibilidad bacteriana del método de Kirby- Bauer (antibiograma en el cual el protocolo indica realizarlo en diferentes medios de cultivo) por difusión en placa frente a drogas específicas, en este

caso el *Allium sativum*. La cepa testigo se procesó en placas de agar chocolate, agar sangre y agar Müller- Hinton, a 37°C durante 24 horas.

ANALISIS ESTADISTICO

Con los datos obtenidos se elaboró una base de datos para su análisis estadístico la cual fue analizada mediante la metodología de GLM. (Bibliografía herrera). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (herrera)

Preparación de soluciones

Para la preparación de las soluciones acuosas de *Allium sativum* se emplearon 79.7 g de *Allium sativum*, de los cuales 12.2 g se emplearon para preparar 50 ml de una solución acuosa al 25% (Grupo- A), 17.5 g que es el resultado de la conversión al 35% de la sustancia para preparar 50 ml de una solución acuosa al 35% (Grupo B), 22.5 g para preparar 50 ml de una solución acuosa al 45% (Grupo C) y 27.5 g para preparar 50 ml de una solución acuosa al 55% (Grupo D) tomadas las diferentes proporciones para observar el comportamiento del halo de inhibición.

En condiciones de esterilidad, se procedió a moler en mortero los diferentes pesajes para posteriormente vaciar la molienda a una probeta estéril y después aforar con agua destilada estéril a un volumen final de 50ml. Cada frasco, con la dilución respectiva se envolvió con papel aluminio, se identificó y se llevó a macerar (triturar) en condiciones de refrigeración durante 15 días a 4°C.

Se activó la cepa de *Pasteurella multocida* biotipo “A” en un medio de agar chocolate, con el propósito de disponer de una cepa joven.

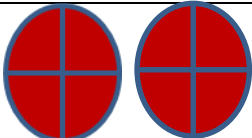
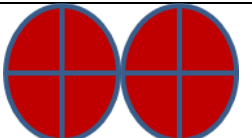
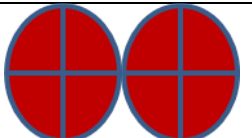
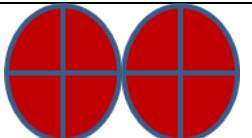
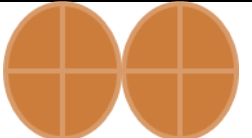
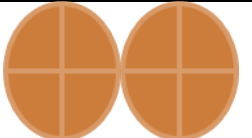
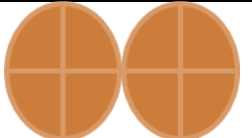
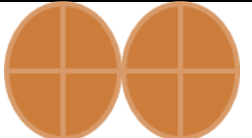
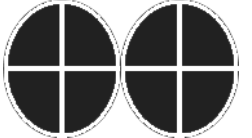
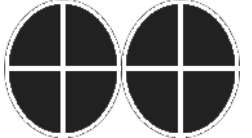
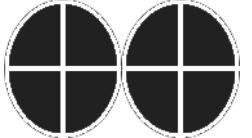
Se inocularon 2 placas de agar sangre con la cepa de *Pasteurella multocida* biotipo “A” cubriendo toda la superficie, subdividiendo en 4 cada una de las cajas, para posteriormente colocar cuatro discos impregnados con la solución al (A) 25% en cada una de las cajas, dando 8 repeticiones, éste procedimiento se repitió en los medios agar Müller- Hinton y agar chocolate. De igual manera se repitió para cada uno de los diferentes grupos (B) 35%, (C) 45% y (D) 55%. (Cuadro N° 1.0). Al término de lo anterior, se identificaron las muestras y se llevaron a incubar a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retiraron las muestras de la estufa de cultivo y con el apoyo de una lupa se observó si hubo halo de inhibición. De la *Pasteurella multocida* biotipo “A” en los diferentes medios de cultivo y se procedió a medir con la ayuda de un vernier cada uno de ellos, comparando los diámetros de los diferentes grupos A, B, C y D.

Se tomó nota de cada una de las repeticiones para así integrar la base de datos. Teniendo un grupo control en donde se obtuvo el desarrollo de la *Pasteurella multocida* biotipo “A” en los medios de cultivos empleados agar sangre, agar Müller Hinton, agar chocolate. Comparando los halos con lo expuesto por (Velasco, 2011).

RESULTADOS

Cuadro 1. División de las cajas de Petri en 4 cuadrantes para depositar los sencidiscos en cada uno de ellos las diferentes concentraciones acuosas de *Allium sativum* que se con forman en: grupos A=25%, B=35%, C=45% y D=55%.

Los medios de cultivo: Agar sangre (A.S), agar Müller Hinton (A.M-H) y agar chocolate (A.CH).

Grupos Medios de cultivo	A 25%	B 35%	C 45%	D 55%
A.S Agar sangre				
A. M-H Agar Muller Hinton				
A.CH Agar chocolate				
TOTAL	24	24	24	24

La observación de los halos de inhibición nos permite expresar los resultados como sensibilidad o resistencia tomando criterio de antibiogramas (Clavijo, et al., 2002) (Williams, et al., 2001) (Velasco, 2011). (tabla1,2,3,4).

Tabla 1 halos de inhibición obtenidos de la solución acuosa de Allium sativum al 25% sobre Pasteurella multocida biotipo "A", después de 24 horas de incubación a 37°C considerando los 6mm de diámetro del disco

A 25%	AGAR SANGRE	AGAR M-H	AGAR CHOCOLATE
1	7mm	7mm	9mm
2	8mm	8mm	8.5mm
3	8mm	7mm	8mm
4	8mm	9mm	8mm
5	8mm	9mm	8mm
6	8mm	7mm	8.5mm
7	8mm	7mm	9mm
8	8mm	8mm	9mm

Tabla 2 halos de inhibición obtenidos de la solución acuosa de Allium sativum al 35% sobre Pasteurella multocida biotipo "A", después de 24 horas de incubación a 37°C considerando los 6mm de diámetro del disco

B 35%	AGAR SANGRE	AGAR M-H	AGAR CHOCOLATE
1	10mm	7mm	8.5mm
2	10mm	7.5mm	9mm
3	9mm	8.5mm	10mm
4	8mm	10mm	10mm
5	9mm	9mm	9mm
6	8mm	9mm	8mm
7	8mm	10mm	9mm
8	10mm	10mm	8.5mm

Tabla 3 halos de inhibición obtenidos de la solución acuosa de Allium sativum al 45% sobre Pasteurella multocida biotipo "A", después de 24 horas de incubación a 37°C considerando los 6mm de diámetro del disco

C 45%	AGAR SANGRE	AGAR M-H	AGAR CHOCOLATE
1	9mm	9.5mm	10mm
2	9mm	9.5mm	10mm
3	9mm	9.5mm	9.5mm
4	9mm	11mm	11mm
5	9mm	10mm	8mm
6	8mm	11mm	9mm
7	9mm	8mm	9mm
8	8mm	9mm	9mm

Tabla 4 halos de inhibición obtenidos de la solución acuosa de *Allium sativum* al 55% sobre *Pasteurella multocida* biotipo "A", después de 24 horas de incubación a 37°C considerando los 6mm de diámetro del disco

C 55%	AGAR SANGRE	AGAR M-H	AGAR CHOCOLATE
1	11mm	9mm	10mm
2	11.5mm	9mm	11mm
3	10mm	10mm	9mm
4	12mm	9mm	10mm
5	10mm	8mm	11mm
6	11mm	9.5mm	11mm
7	10mm	9mm	11mm
8	10mm	9mm	10mm

En las tablas anteriores se observa que hubo efecto bactericida sobre la *Pasteurella multocida* biotipo "A" en los diferentes grupos A25%, B35%, C45% y D55% del *Allium sativum* comprobando que la cepa de *Pasteurella multocida* biotipo "A" muestra un halo de inhibición mayor a la concentración del 55%, los datos obtenidos se analizaron en programas estadísticos (SAS, 200).

Efecto de concentración por % de *Allium sativum* sobre la cepa de *Pasteurella multocida* biotipo "A". Se encontró efecto del tratamiento y porcentaje que los promedios de 25% 8.042^C existieron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) con el tratamiento de 35% 8.9542^B pero una similitud al 45% 9.291^B ello con respecto a los tratamientos al 55% con una diferencia ($P < 0.05$) 10.042^A porcentajes que se expresan en los siguientes tablas (tabla 5, tabla 5.1)

Tabla 5 medias de cuadrados mínimos para el efecto de la concentración de *Allium Sativum* sobre *Pasteurella multocida*

<i>Allium sativum</i>		
Concentración	Promedio	E.E
25%	8.0417 ^C	0.1791
35%	8.9542 ^B	0.1791
45%	9.4167 ^B	0.1791
55%	10.0417 ^A	0.1791

A, B, C = diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Tabla 5.1 Promedios de los halos de inhibición a sus diferentes concentraciones.

25% X	S	35% X	S	45% X	S	55% X	S
8.042 ^C	0.706	8.958 ^B	0.908	9.291 ^B	0.883	10.042 ^A	0.988

Resultados Estadísticos de los diferentes halos de inhibición en relación a los medios de cultivo acuosas de *Allium sativum* sobre la *Pasteurella multocida* biotipo “A”. En donde los medios de cultivo reaccionaron a las diferentes concentraciones. Al 25% para agar sangre ($P<0.05$) 7.875^{A1} que es similar al agar Mueller Hinton ($P<0.05$) 7.75^{A1} al igual que agar chocolate ($P<0.05$) 8.5^{A1}, al 35% para agar sangre ($P<0.05$) 9^{B1} que es similar al agar Mueller Hinton ($P<0.05$) 8.875^{B1} al igual que agar chocolate ($P<0.05$) 8.9875^{AB1}, al 45% para agar sangre ($P<0.05$) 8.875^{B1} diferente al agar Mueller Hinton ($P<0.05$) 9.6875^{C1} con una similitud al agar chocolate ($P<0.05$) 9.6875^{BC2} en la concentración al 55% para agar sangre ($P<0.05$) 10.6875^{C1} con diferencia para agar Mueller Hinton ($P<0.05$) 9.0625^{BC2} en donde se es presa diferente para agar chocolate ($P<0.05$) 10.375^{C1} pero una similitud para agar sangre compartiendo la literales ¹.

Tabla 5.2 medias de cuadrados mínimos para el efecto de la concentración de *Allium Sativum* con interacción de medio de cultivo sobre *Pasteurella multocida*

Concentración	<i>Allium sativum</i>					
	Medio de cultivo					
	A. Sangre	E.E	A. M.H.	E.E	A. Chocolate	E.E
25%	7.875 ^{A1}	0.2801	7.75 ^{A1}	0.2801	8.5 ^{A1}	0.2801
35%	9 ^{B1}	0.2801	8.875 ^{B1}	0.2801	8.9875 ^{AB1}	0.2801
45%	8.875 ^{B1}	0.2801	9.6875 ^{C2}	0.2801	9.6875 ^{BC2}	0.2801
55%	10.6875 ^{C1}	0.2801	9.0625 ^{BC2}	0.2801	10.375 ^{C1}	0.2801

A, B, C = diferencias estadísticas ($P<0.05$) dentro de columna.

1, 2 = diferencias estadísticas ($P<0.05$) dentro de fila.

En cuanto a los diferentes medios de cultivo se observa que el agar chocolate es el que presenta mejores resultados, seguido del agar sangre que es similar tanto al agar chocolate como al de Mueller Hinton.

DISCUSIÓN

Las observaciones de los halos de inhibición en las diferentes concentraciones de la solución acuosa del *Allium sativum* sobre la cepa de *Pasteurella multocida* biotipo “A”, nos permite expresar los resultados como moderadamente sensible o sensibilidad intermedia ante las concentraciones al 25% con un promedio de halo de inhibición de 8.042 mm, en la concentración al 35% y el promedio del halo de inhibición fue de 8.958 mm y un halo de inhibición de 9.291 mm para 45%, las diferencias no son significativas, sin embargo, en la concentración al 55% el halo de inhibición promedio fue de 10.042mm, apreciándose un efecto bactericida significativamente mayor del *Allium sativum*. A un que se consideran sensibles las cepas que presentan halos de inhibición superiores a 15 mm de diámetro en *Pasteurella multocida* spp. frente a distintas drogas (Velasco, 2011).

Esta investigación se orientó a determinar; si el *Allium sativum* en su forma de solución acuosa tiene efecto bactericida sobre el desarrollo de la bacteria *Pasteurella multocida* biotipo “A” corroborándose su eficiencia. Existen trabajos en los que se utilizan los extractos producidos por destilación y condensación en los que se demuestra inhibición 9,20mm similares a nuestros resultados (García Rico & Herrera Arias, 2007).

A pesar de que otra investigación reporta que al hacer una comparación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra la neomicina concluyen que los extractos de plantas no podrían combatir una infección por si solos por su bajo poder

antimicrobiano lo que es refutable según nuestros resultados e indican que los extractos no presentan una toxicidad significativa a las concentraciones estudiadas por lo que puede ser utilizado sin ningún riesgo en tratamientos prolongados

Se observa inhibición en todas las concentraciones de *A. sativum* “ajo”; es decir que el halo de inhibición indicó que a medida que aumenta la concentración de *A. sativum* el crecimiento de *Pasteurella multocida* biotipo “A” es afectado como se confirma en los resultados obtenidos (Coronado Castañeda Rafael Roberto Segundo, 2011).

CONCLUSIONES

- Se demostró que la preparación del extracto acuoso de *Allium sativum* tiene un efecto bactericida sobre la cepa de *Pasteurella multocida* biotipo “A” con la cual se realizó el presente trabajo, observándose este efecto en sus diferentes concentraciones 25%, 35%, 45% y 55%, apreciándose un mayor halo de inhibición en la concentración del 55% teniendo como medida promedio 10.042 lo que indica su efecto bactericida para controlar enfermedades causadas por esta bacteria.
- Se comprueba el efecto bactericida de *Allium sativum* en la solución acuosa ante las diferentes concentraciones.

- Se observa el efecto bactericida de *Allium sativum*. en una cepa de *Pasteurella multocida* biotipo "A".
- Se observó que a mayor concentración *Allium sativum* mayor es el halo de inhibición.
- La concentración acuosa de *Allium sativum* al 55% es la que demostró mayor efecto bactericida.
- Se recomienda utilizar concentraciones más elevadas de *Allium sativum* y evaluarlas con los halos de drogas para llegar a una similitud, que se sensible al 100%

BIBLIOGRAFÍA

Tkac, D., 1990. *GUÍA MÉDICA DE REMEDIOS CASEROS*. EE.UU: Rodale Press, Emmaus, Pennsylvania.

Williams, j. d. j., Salazar, M. d. R., Ramírez Porras, R. & Mosqueda, Z., 2001. Sensibilidad in vitro de cepas *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* tipo “A” ante diferentes antimicrobianos. *Rev Biomed*, pp. 172-179.

Alfredo Stauffer B., A. O. F. A. A. J., 2000. SELECCION DE EXTRACTOS VEGETALES CON EFECTO FUNGICIDA Y/O BACTERICIDA. 1(2).

Araujo Díaz, J. & Salas Asencios, R., 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Revista científica*, 1(6), pp. 6-18.

Buhring, M. & Saz Piero, P., 1998. *INTRODUCCIÓN A LA MEDICINA NATURISTA. LAS BASES CIENTÍFICAS DE LAS TERAPIAS NATURALES*. Madrid: Paidós Iberica .

Cabrera Corona, R., 2011. *EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL "RICINUS COMUNIS" APLICADO EN PROCESOS DIARREICOS EN CONEJOS*. Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Centeno Canal, M. E., 2009. *Frutas para la salud y el bienestar*. México, D.F.: Mexicana.

Centeno Canal, M. E., 2010. *El maravilloso poder curativo del ajo*. México, D.F.: Mexicana.

Centeno Canal, M. E., 2011. *El maravilloso poder curativo de la cebolla*. México, D.F.: Mexicana.

Clavijo, A. M. y otros, 2002. RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Pasteurella multocida* AISLADAS DE TERNEROS CON NEUMONÍA EN EL ESTADO MONAGAS, VENEZUELA. *REVISTA CIENTIFICA 1 Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Sanidad Animal.*, XII(1), pp. 626 - 629.

Coronado Castañeda Rafael Roberto Segundo, 2011. *COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE PLANTAS*. San Nicolas de los Garza N.L, UNIVERSISIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, CONGRESO INTERNACIONAL QFB 2011.

Cruz Hernández, Á. R., Huerta Martínez, L. M. & Lugo Ramírez, V., 2010. *Conejo manual de producción comercial*. Morelia: Papiro Omega.

Dawahra, S., 2009. Evolución del uso de las plantas medicinales. 1(1).

de Cueto López, m. & Pascual Hernández, a., 2008. *departamento de microbiología hospital universitario virgen macarena sevilla*. [En línea]
[Último acceso: 13 octubre 2012].

de Cueto López, m. & Pascual Hernández, a., 2009. *microbiología y patogenia de las infecciones producidas por staphylococcus aureus*. 1 ed. barcelona: icg marge.

Duke, J. A., 1998. *La Farmacia Naturista*. primera ed. Estados Unidos de America : rodale.

Espinoza Aguilera, M. k., 2011. *Desparasitantes naturales para tratar endoparasitos en conejos de la FMVZ de la UMSNH[tesis de licenciatura]*. Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

García Rico, R. O. & Herrera Arias, F. C., 2007. *EVALUACIÓN D E LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CINCO CEPAS BACTERIANAS PATÓGENAS POR EXTRACTOS*

ACUOSOS DE ALLIUM SATIVUM, ALLIUM FISTULOSUM Y ALLIUM CEPA: ESTUDIO PRELIMINAR IN VITRO. 5(002).

INEGI, 2004. *Secretaría de Desarrollo Social*. México. D.F: s.n.

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Michoacán, 2009. *Enciclopedia de los Municipios de México*. [En línea]

Available at: www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/michoacan

[Último acceso: 3 febrero 2012].

Jiménez Díaz, J. F. & Cruz Suárez, J., 2007. *MEDICINA NATURISTA FITOTERAPIA*. ARRECIFE: UNIVERSIDAD DE VERANO DE LANZAROTE.

Lanzara, P., 1977. *Guía del arboles*. barcelona: Grijalbo.

medina, A. S. & Cicuta, M. E., 2010. Actividad antibacteriana in vitro de *Allium sativum*.

Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

Medina, A. S. y. C. M., 2010. *Actividad antibacteriana In Vitro del extracto de Allium sativum*.

Argentina: UNNE - Secretaría General de Ciencia y Técnica.

OMS, 2004. *Organización Mundial de la Salud*. [En línea]

Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/index.html>

[Último acceso: 2 febrero 2012].

Roberts, R. J., 2011. Cura del Cáncer: ¿Bloqueada por las farmacéuticas?. *Vanguardia*, 25 mayo, pp.

[http://www.vanguardia.com.mx/cura_del_cancer:_%C2%BFbloqueada_por_las_farmaceuticas?_\(entre_vista_con_el_dr._michelakis\)-731485.html](http://www.vanguardia.com.mx/cura_del_cancer:_%C2%BFbloqueada_por_las_farmaceuticas?_(entre_vista_con_el_dr._michelakis)-731485.html).

Rutiaga, I., 2007. *curación con plantas medicinales*. México, D.F.: Ediciones Viman, S.A. de C.V..

Tennant, B., 2005. *BSAVA Small Animal Formulary*. 5 ed. España: Ediciones S.

Trigo Tavera, F. J. & Valero Elizondo, G., 2002. *PATOLOGIA GENERAL VETERINARIA*. México: UNAM.

UNAM, 2009. *boblioteca digital de la medicinal mexicana*. [En línea]

Available at: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>

[Último acceso: 11 marzo 2012].

Velasco, J., 2008. *Manual práctico de bacteriología clínica*. Primera ed. Venezuela(Mérida): Editorial Venezolana C. A..

Velasco, J., 2011. *Manual pláctico de bacteriología clínica*. 2 ed. Venezuela: CODEPRE.

Villacis Villalba, R., 2009. *Curación con el Aguacate*. México, D.F.: Época.

Vu Dang La1, F. L. D. R. D. F. S. G. F. E. D. G., 2010. *Phytotherapy Research*. 24(11).

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	Agosto	Octubre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
PROGRAMADAS	2012	2012	2012	2013	2013	2013	2013	2013	2013	2013
	Septiembre	Noviembre								
Redacción de Protocolo	X	X								
×Inicio de fase experimental							X	X	6 junio	28 julio
Análisis de datos y Discusión de resultados							X	X	X	X
Redacción de tesis				X	X	X	X	X	X	X
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

PRESUPUESTO

Costo por prueba	Precio	Cantidad necesaria	Total
Agar Sangre	\$ 70. 00	8 placas	\$ 560.00
Agar Chocolate	\$ 70. 00	8 placas	\$ 560.00
Agar Muller hinton	\$ 70. 00	8 placas	\$ 560.00
Ajo	\$12	100g	\$12.00
		Suma total	\$ 1,692.00

ANEXOS

