



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE DIFERENTES ESPECIAS SOBRE BACTERIAS  
MULTIRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS AISLADOS DE QUESOS ARTESANALES.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**JOSÉ DAVID PÉREZ VILLA**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE

**VOCAL:** JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

**SECRETARIO:** EDUARDO BONILLA ESPINOSA

**1er. SUPLENTE:** JOSÉ IGNACIO PÉRAMO RAMIREZ

**2° SUPLENTE:** ESMERALDA PAZ LEMUS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, LABORATORIO 1-A, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

\_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**RAQUEL ORTEGA MUÑOZ**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**JOSÉ DAVID PÉREZ VILLA**

\_\_\_\_\_

# *Dedicatoria*

## *Familia Pérez Villa*

La conclusión de esta etapa solo es el cierre de un capítulo de mi vida en el que ustedes, José Pérez, María Villa, Daniel Pérez y Abraham Rivera, son personajes principales dentro de este libro que quiero seguir escribiendo por y para ustedes durante mucho tiempo.

Sé que no ha sido fácil terminar este gran paso en este desarrollo personal y profesional que significa mucho para mí, sin embargo hubiera sido imposible sin su apoyo incondicional en todo momento, tanto en los momentos de triunfo como en varios tropezones que cada quien de manera diferente y singular me ha alentado a través de estos 22 años de una buena y plena vida gracias a ustedes.

Con una gran influencia de ustedes seguiré adelante para ser mejor cada día, que aunado a una felicidad creciente de tenerlos a mi lado con el apoyo mutuo para el bien de todos.

Gracias por todo

# *Agradecimientos*

Para empezar tengo que agradecerles a las personas que me admitieron en su laboratorio y me compartieron su material y conocimientos, Dr. Fernando Montiel y M. en C. Raquel Ortega; también con su esfuerzo, tiempo, inteligencia y ganas de aprender a Carlos Obregón y Citlali Hernández que pasaron horas a mi lado en la experimentación; por último pero no menos importante a Adriana Mesino ya que invirtió horas en los largos y tediosos tramites, claro, en esto y mucho más me apoyaron.

A mis amigos y amigas Luis Ladd, Rodrigo Mejía, Adriana Mesino, Karina Flores, Estefanía Rodríguez, Marco Luna, Miguel Escamilla, Carlos Limón, Andrea Castellanos, Gabriela Salinas, entre otros, por esas mañanas, tardes, noches y madrugadas de trabajo, estudio y/o amistad en nuestra estadía en la H. Facultad de Química de la UNAM..... y fuera de ella, mas a parte el futuro que nos espera.

Por supuesto a todos y cada uno de los profesores que me compartieron una fracción de su conocimiento, y solo por mencionar algunos M. en C. Lucia Cornejo, Dra. Liliana González, M. en C. Argelia Sánchez, I.Q. Federico Galdeano†, Dr. Eduardo Bárzana, etc de todas las buenas personas que me han ayudado a ser el profesionista que soy.

Raymundo Pérez, Dolores Bravo, Sara Pérez, Pedro Villa, toda la familia Pérez y la familia Villa, Erick Cervantes, Ulises Ramírez, Mauricio Ortega, Arturo Alonso, gracias por estar conmigo en todo momento y por los que estaremos juntos durante mucho tiempo.

# ÍNDICE

## Capítulo 1 Introducción

1.1 Generalidades.....	8
1.2 Uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano.....	9
1.2.1 Agentes terapéuticos.....	10
1.2.2 Agentes profilácticos.....	10
1.2.3 Promotores de crecimiento.....	12
1.3 Normatividad nacional e internacional.....	12
1.3.1 Grupo 1.....	13
1.3.2 Grupo 2.....	14
1.3.3 Grupo 3.....	16
1.4 Consecuencias del uso de antibióticos en animales de consumo humano.....	19
1.4.1 Limite Máximo Residual (LMR).....	19
1.4.2 Beneficios del uso de antibióticos en animales para consumo.....	21
1.4.3 Alternativas de promotores de crecimiento (antibióticos).....	23
1.5 Resistencia a los antibióticos.....	24
1.5.1 Desarrollo de la resistencia.....	26
1.6 Resistencia a la vancomicina.....	30
1.6.1 Historia.....	30
1.6.2 Mecanismos de resistencia a vancomicina.....	31
1.7 Métodos de resistencia alternativos.....	33
1.8 Revirtiendo bacterias resistentes a la sensibilidad.....	35

1.9 Barreras de prevención para la diseminación de las resistencias.....	35
1.10 Propiedades y uso de especias.....	37
1.10.1 Ajo.....	40
1.10.2 Albahaca.....	41
1.10.3 Comino.....	42
1.10.4 Orégano.....	44
1.10.5 Pimienta.....	45

## Capítulo 2

2.1 Objetivo general.....	47
2.2 Objetivos particulares.....	47
2.3 Hipótesis.....	47
2.4 Justificación.....	47

## Capítulo 3 Materiales y métodos

3.1 Aislamiento y purificación.....	49
3.2 Prueba de sensibilidad de antibióticos.....	51
3.3 Identificación bioquímica.....	53
3.4 Curva dosis–respuesta a vancomicina en el crecimiento.....	55
3.5 Preparación de los extractos acuosos de especias.....	57
3.6 Pruebas de sensibilidad a extractos acuosos de especias.....	59

## Capítulo 4 Resultados

4.1 Aislamiento y purificación.....	61
4.2 Prueba de sensibilidad de antibióticos.....	62

4.3 Identificación bioquímica.....	63
4.4 Curva dosis-respuesta a vancomicina en el crecimiento.....	65
4.5 Preparación de los extractos acuosos de especias.....	66
4.6 Pruebas de sensibilidad a extractos acuosos de especias.....	67
4.6.1 Ajo fresco: Diferentes pH.....	67
4.6.2 Otras especias frescas y procesadas.....	71
<u>Capítulo 5</u> Discusión.....	83
<u>Capítulo 6</u> Conclusiones.....	91
Referencias.....	93



# Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades

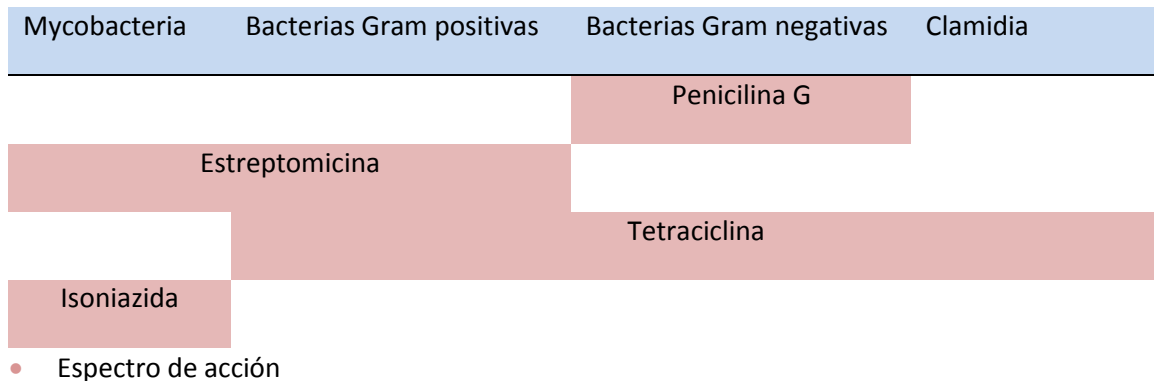
Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos y pueden, eventualmente, destruirlos (Cancho, B. et al., 2000).

En México, los antibióticos están definidos como “Sustancias químicas o metabolitos obtenidos en un proceso de fermentación, las cuales actúan contra microorganismos productores de enfermedades en cualquier ser vivo. Su aplicación en concentraciones subterapéuticas es para mejorar la conversión alimenticia o como promotores de crecimiento en los animales, conlleva riesgo a la vida del consumidor de los productos de origen animal o la salud de éste, ya sea por una reacción de hipersensibilidad, un efecto específico por el desarrollo o transmisión de organismos patógenos resistentes a la terapia con antibióticos” (NOM-004-ZOO-1994).

La palabra antibiótico tiene su origen del griego “anti” (contra) y “bios” (vida), y fue propuesta para definir a las sustancias que afectaban o inhibían el desarrollo microbiano y eran extraídas de estructuras orgánicas vivientes (Lanosa, R., 1997).

Los antibióticos afectan a diferentes especies de bacterias, algunos a muchos tipos y otros a grupos selectos; esto se denomina espectro de acción, en donde dichas sustancias se dividen en “amplio espectro” y “corto espectro”. Los antibióticos de amplio espectro son aquellos que actúan en un rango grande de clases de bacterias, mientras que los de corto espectro en pocas clases o tipos específicos de microorganismos. En la figura 1 se muestra el espectro de acción de algunos antibióticos sobre algunos microorganismos (Tortora, G., 2007).

Figura 1. Espectro de acción de algunos antibióticos



En 1928, Alexander Fleming, observó la inhibición de una cepa de *Staphylococcus aureus* por una cepa de *Penicillium notatum* (actualmente *P. chrysogenum*), por lo que el aislado que produjo lo llamó penicilina. Sin embargo, no fue hasta 1940 que Florey y Chain demostraron y publicaron la potencia y posibilidad de extracción del antibiótico a partir de los sobrenadantes del cultivo (Tortora, G., 2007). Paralelamente, en 1935 se descubrió el efecto curativo del colorante Prontosil en infecciones causadas por estreptococos (Wolfgang, P., 1998).

### 1.2 Uso de antibióticos en animales destinados a consumo humano

Los antibióticos son los agentes farmacológicos peor utilizados, tanto a nivel médico como veterinario, siendo administrados en muchas ocasiones de forma irracional y en dosis inadecuadas. Los antibióticos se incluyen dentro del amplio grupo de compuestos que forman parte de la composición de un pienso animal (Protocolo de tratamiento del Instituto Nacional de Saude, 1990). Los fines con los que se utilizan estos agentes en animales se pueden dividir en 3 categorías: agentes terapéuticos, agentes profilácticos y como promotores de crecimiento (Watson, D.H., 2001).

### *1.2.1 Agentes terapéuticos*

Son medicamentos que se utilizan para controlar las enfermedades infecciosas (microorganismos patógenos, ecto y endo-parásitos y hongos) en la granja y animales domésticos. Las dosis terapéuticas utilizadas tiene el objetivo de librar al animal del agente que causa la enfermedad sin atentar contra su salud a largo plazo. Se deben de utilizar como tratamiento de una infección documentada; sin embargo, muchas veces el tratamiento se comienza de forma empírica cuando se considera urgente la necesidad del mismo. Es importante realizar cultivos pertinentes previos y, además, es preferible recurrir a antibióticos de espectro reducido para poder aumentar la eficacia del tratamiento (Watson, D.H., 2001).

### *1.2.2 Agentes profilácticos*

Para intensificar la producción animal se ha utilizado la selección genética junto con el uso de antibióticos como medida de prevención de enfermedades infecciosas. Sin embargo existen muchos factores que contribuyen al mal uso de estos agentes como son: la prescripción incorrecta, la dispensación de medicamentos en establecimientos no autorizados y sin receta médica, el empleo de antimicrobianos no autorizados, entre otros (Watson, D.H., 2001).

La vía de administración recomendada para cada especie varía en función de las especies animales (Tabla 1), aunque cabe destacar que la alimentación mediante piensos medicamentosos, es una de las más usadas (Cancho, B. et. al., 2000). Sin embargo, esta vía no ofrece ningún tipo de control sobre la dosis administrada y sin duda es menos efectiva (Watson, D.H., 2001).

Tabla 1. Vías de administración (%) más utilizadas en función de las especies animales.				
	Porcino	Ovino	Vacuno de leche	Vacuno de carne
Oral	59	24	11	21
Intramuscular	35	29	49	44
Subcutánea	3	46	19	22
Tópica	2	-	2	7
Intravenosa	-	-	19	-

Tomado de Real Decreto 157/1999

Los piensos medicamentosos proceden de mezclar un medicamento veterinario y el pienso previamente a su comercialización en el cual no se presenten interacciones entre los antibióticos, los aditivos y el propio pienso. Se administra con fines terapéuticos o profilácticos en función las propiedades del fármaco. Estos contienen, en general, concentraciones relativamente elevadas (100 – 1000 mg/L) y se administran durante periodos bastante cortos (Cancho, B. et. al., 2000).

Por otra parte, se pueden preparar piensos medicamentosos a partir de pre mezclas, los cuales suelen ser de naturaleza sólida. Estos llevan en su preparación una elevación de temperatura, lo que puede lleva a una pérdida de compuestos termolábiles, entre ellos antimicrobianos. Esto ha provocado que se ensayen nuevas técnicas para una correcta dosificación, como la incorporación de pre mezclas líquidas mediante spray en el pienso ya elaborado (Real Decreto 109/1995).

Se debe evitar la compra – venta de pre mezclas y piensos en mercado negros, ya que el precio es menor pero no existe ninguna garantía ni en la composición ni en los principios activos (Real Decreto 157/1999).

### *1.2.3 Promotores de crecimiento*

Son sustancias naturales o sintéticas con actividad farmacológica que se administran a los animales sanos a través de los piensos para acelerar la ganancia de peso y mejorar los índices de transformación de los alimentos. Estos promotores de crecimiento pueden ser de tres tipos:

- Antibióticos y quimioterapéuticos de actuación sobre la microflora bacteriana del tubo digestivo, en concentraciones entre 30 y 100 mg/L, administrados sistemáticamente durante periodos largos.
- Sustancias ionóforas de actuación sobre el rumen.
- Anabolizantes, generalmente sustancias de tipo hormonal, los cuales tienen acción sobre el metabolismo. (Cancho, B. et. al., 2000).

Algunos antimicrobianos, especialmente los que actúan contra bacterias gram positivas, se asocian con un aumento de la tasa de crecimiento del animal cuando se administran en cantidades subterapéuticas en la alimentación (OMS, 2003).

### 1.3 Normatividad nacional e internacional

La organización mexicana encargada de regular todo lo relacionado con los medicamentos en animales para consumo humano y sus productos es la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y su subdivisión, SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria).

En México existe normatividad que regula los productos farmacéuticos veterinarios (NOM-064-ZOO-2000), en la cual clasifica en 3 grupos a dichos productos por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos:

### 1.3.1 Grupo 1

Restringidos para venta mediante receta médica cuantificada y uso exclusivo del médico veterinario.

Incluye a aquellos que representan riesgo de toxicidad para el animal de efecto psicotrópico o anabólico, así como inducción de genotoxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad, embriotoxicidad, teratogenicidad real o potencial y su venta debe realizarse mediante receta médica cuantificada y exclusiva a médicos veterinarios acreditados con cédula profesional. En la tabla 2 se encuentran las clases de ingredientes activos de este grupo, así como un ejemplo de cada una.

Tabla 2. Clase de productos con ingredientes activos del Grupo 1

Clase	Ejemplo
Anabólicos inyectables	Nandroiona
Analépticos	Doxopram
Analgesicos	Butorfanol
Anestésicos	Lidocaina
Desinfectantes	Cloruro de etileno
Antiparasitarios	Diclorvos
Hormonas	Progesterona
Promotores de crecimiento	Zilpaterol
Relajantes musculares	Metocarbamol
Tranquilizantes	Zolacepan

Tomado de NOM-064-ZOO-2000

### 1.3.2 Grupo 2

Restringidos para venta mediante receta médica simple.

Incluye a aquellos que pueden ser tóxicos para una especie animal, edad o estado fisiológicos si no se supervisa su dosificación y su interacción posible indeseable con otros ingredientes activos, así también para los que se necesiten conocimientos técnicos en farmacología para su empleo y los que induzcan reacciones de hipersensibilidad leve o mortal. La venta de estos productos puede efectuarse a personas físicas o morales que presenten una receta médica simple expedida por un medico veterinarios con cedula profesional. En la tabla 3 se encuentran las clases de ingredientes activos de este grupo, así como un ejemplo de cada una.

Tabla 3. Clase de productos y ejemplos de ingredientes activos del Grupo 2

Clase	Ejemplo
Anabólicos implantados	Testosterona
Analgésicos	Naproxeno
Antiinflamatorios esteroidales	Fenilbutazona
Desinfectantes	Alcohol Isopropílico
Antihistamínicos	Vetibanzamina
Antimicrobianos	Penicilina
Antiparasitarios	Triclorfón
Promotores de crecimiento	Vancomicina

Tomado de NOM-064-ZOO-2000

Dentro de este grupo se encuentran los ingredientes activos de interés, es decir, los antibióticos, ya sean los utilizados como agentes terapéuticos, profilácticos y factores de crecimiento (NOM-064-ZOO-2000).

A continuación, se presenta una lista de todos los antibióticos utilizados con fines terapéuticos y profilácticos:

- Acido Nalidixico
- Acido Oxolinico
- Acido pipemidica
- Aditoprim
- Amikacina
- Amoxicilina
- Ampicilina
- Apramicina
- Azdocilina
- Baquiloprim
- Becampicilina
- Carbadox
- Carbenicilina
- Carbenicilina
- Cefadroxil
- Cefalexina
- Cefalexina
- Cefalotina
- Cefapirina
- Cefapirina
- Cefoperazona
- Cefoxitina
- Cefquinoma
- Ceftiofur
- Ceftriaxona
- Cindamicina
- Ciotetraciclina
- Cioxacilina
- Ciprofloxacina
- Danofloxacina
- Declomicina
- Dicloxacilina
- Dihidroestreptomicina
- Doxiciclina
- Enrofloxacina
- Eritromicina
- Espectinomicina
- Estreptomicina
- Fenaticilina
- Florfenicol
- Flucoxilina
- Flumequina
- Gentamicina
- Josamicina
- Kenamicina
- Lincomicina
- Mafenid
- Metaciclina
- Meticilina
- Mezclociclina
- Minociclina
- Nafcilina
- Neomicina
- Netilmicina
- Norfloxacina
- Oleandomicina
- Ormetoprim
- Oxacilina
- Oxitetraciclina
- Paperazilina
- Penicilinas
- Pirlimicina
- Polimixina B y E
- Rifamicinas
- Rolitetraciclina
- Rosaramicina
- Sarafloxacina
- Sulfabromomerasina
- Sulfabromometasina
- Sulfacetamida
- Sulfacoloriridacina
- Sulfacoloropiracina
- Sulfadiacina
- Sulfadimetoxina
- Sulfafenasol
- Sulfaguanidina
- Sulfameracina
- Sulfametacina
- Sulfametizol
- Sulfametoxasol
- Sulfametoxipiridasina
- Sulfamonometoxina
- Sulfaquinoxalina
- Sulfatiazol
- Sulfifurasol
- Sulfisoxasol
- Tetraciclina
- Tiamulina
- Tianfenicol
- Ticarcilina
- Tilmicosina
- Tilosina
- Tobramicina
- Trimetoprim
- Troleandomicina

Tomado de NOM-064-ZOO-2000

Así también, los antibióticos utilizados como factores de crecimiento en animales y permitidos en México son:

- Avoparcina
- Avilamicina
- **Vancomicina**
- Teicoplanina
- Bacitracina
- Banbermicina
- Tilosina
- Espiramicina
- Virginiamicina
- Salinomicina de sodio
- Flavofosfolipol



### 1.3.3 Grupo 3

De venta libre en el país.

Incluye a aquellos cuya seguridad para el paciente, así como para el usuario hayan sido demostradas científicamente y se consideran de venta libre. En la tabla 4 se encuentran las clases de ingredientes activos de este grupo, así como un ejemplo de cada una.

Tabla 4. Clase de productos y ejemplos de ingredientes activos del Grupo 3

Clase	Ejemplo
Aminoácidos	Lisina
Analgésicos	Acido acetilsalicílico
Antagonistas H <sub>2</sub>	Ranitidina
Antidiaréicos	Sales de bismuto
Desinfectantes	Azul de metileno
Antimicrobianos	Violeta de genciana
Antiparasitarios	Lufenurón
Mucolíticos	Guayacol
Promotores de crecimiento	Lactobacillus
Vitamínicos	Acido ascórbico

Tomado de NOM-064-ZOO-2000

Esta NOM vigente indica que no es equivalente a alguna norma internacional al momento de su elaboración, lo cual es congruente, ya que en Europa solo se admite el uso de la avilamicina, salinomicina y flavofosfolipol. Estos están considerados como aditivos dentro de la alimentación animal (Cancho, B. et al., 2000). Sin embargo, la avilamicina, entre otros fármacos usados en la zootecnia, es de una clase similar a los usados en medicina humana, por lo que las bacterias que empiezan a presentar resistencia a los antibióticos animales, también lo presentan a los de uso humano, y esto se denomina resistencia cruzada.

En prevención a la aparición de la resistencia cruzada, en la Unión Europea se prohibió el uso de 5 promotores de crecimiento (bacitracina, tilosina, espiramicina, virginiamicina y avoparcina [estructura molecular similar a la vancomicina]), los cuales, además de la propia vancomicina, están aprobados en México (NOM-064-ZOO-2000).

Esto se debe a que existen estudios que relacionan la administración de avoparcina a animales, con el aumento de cepas de enterococos resistentes a vancomicina. También preocupa el hecho de que los genes de resistencia a dicho glicopéptido puedan ser transferidos a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA (por sus siglas en inglés Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*), para los cuales la vancomicina constituye uno de los tratamientos de última instancia (OMS, 2003).

El *Codex Alimentarius* creó un comité mundial llamado “Comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, (CCRVDF por sus siglas en inglés) con sede en Estados Unidos. En el 2006 realizó el “Compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del Codex”, en el cual marca el método recomendado para cada antibiótico aprobado:

- Residuo marcador
- Técnica analítica recomendada para cada tejido de interés
- Límite Máximo residual (LMR)
- Sensibilidad del método (Límite mínimo de cuantificación)
- Aprobación y verificación
- Referencias bibliográficas
- Vigencia del método

Por otra parte, el CCRVDF propuso en 2009, los lineamientos no obligatorios para disminuir el aumento y controlar la población de bacterias multiresistentes a antibióticos transmitidos por alimentos de origen animal. Este documento, titulado “Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos

veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos” se propone lo siguiente:

- Un enfoque basado en el riesgo
- Marco reglamentario
  - Competencia de las autoridades
  - Información para los consumidores
  - Sugerencias de venta y uso
  - Orientación a empresarios sobre mejores practicas
- Programas de verificación
  - Diseño y elaboración
  - Elección del programa
- Muestreo
  - Estrategias de muestreo
  - Orientación para toma de muestra y cantidad mínima requerida
- Medidas reglamentarias
  - Métodos de investigación
  - Sanciones
  - Medidas correctivas
- Métodos de análisis
  - Consideraciones generales de los métodos analíticos
  - Selección y validación de los métodos de análisis
  - Implementación de otras directrices del Codex Alimentarius
  - Características necesarias para los métodos de análisis (Teoría y selección)
  - Consideraciones relativas de los métodos analíticos
    - Selección de material
    - Incertidumbre
    - Uso de patrones
    - Consideraciones ambientales
    - Elección del métodos de validación

- Sistemas de gestión de calidad

La CCRVDF se reúne cada año para debatir y actualizar los datos. La última reunión se llevó a cabo del 30 de agosto al 3 de septiembre del 2010, en Burlington, Estados Unidos de América. En esta reunión, como en todas las demás, participaron varios países, entre ellos México, y en dicha ocasión participaron las siguientes personas:

- Dr. Ivan Juárez Rodríguez (SAGARPA)
- Dra. Martha Laura Domínguez (SENASICA)
- Mildred Villanueva (Mexican Meat Council)

Las autoridades mexicanas están tomando en cuenta los lineamientos internacionales, ya que el jueves 12 de mayo del 2011, se publicó en el Diario Oficial el Proyecto de Modificación a la NOM-004-ZOO-1994.

#### 1.4 Consecuencias del uso de antimicrobianos en animales de consumo humano

Tras la administración de un antibiótico a un animal tiene lugar una metabolización que favorece su eliminación y en conjunto la destoxificación. Al no ser suficiente este proceso se pueden originar residuos en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano. Estas son sustancias farmacológicamente activas, se pueden encontrar en tejido muscular y grasa preferentemente y pasar a productos como la carne y la leche (Noa, E. et al., 2009). La toxicidad de estos residuos varía desde la inocuidad hasta presentar consecuencias clínicas, hematológicas, bioquímicas y hasta la muerte (Cancho, B. et al., 2000).

##### *1.4.1 Límite Máximo Residual (LMR)*

Se define como aquella concentración aceptable de una sustancia en los tejidos comestibles de un animal (músculos, hígado riñón, grasa, leche, miel y/o huevos), y que al ser ingerida por el ser humano no constituye ningún riesgo para la salud. Los LMR se fijan para cada especie animal y tejido en función a la sustancia. La

normatividad en México, define al LMR como “Nivel más alto permisible de un residuo que puede considerarse como aceptable en un tejido en particular, cuando éste es analizado por la metodología oficialmente aceptada para su cuantificación. También se conoce como límite de tolerancia” (Modificación 2011 a la NOM-004-ZOO-1994).

Los residuos de antibióticos se acumulan en los tejidos, sin embargo, por la diferencia en la naturaleza de estos, la localización y la concentración de los agentes farmacológicamente activos es variable. En la tabla 5 se muestran los LMR, tejidos y productos de origen animal para algunos antibióticos que pueden pasar a la leche del ganado vacuno (Cancho, B. et. al., 2000).

Tabla 5. LMR de antibióticos en productos de origen animal.

<b>Antibiótico</b>	<b>LMR en leche</b>	<b>LMR (µg/Kg) en otros Tejidos</b>
Ampicilina	4 µg/Kg	50 músculo, grasa, hígado, riñón
Amoxicilina	4 µg/Kg	50 músculo, grasa, hígado, riñón
Oxaciclina	30 µg/Kg	300 músculo, grasa, hígado, riñón
Cefalexina	100 µg/Kg	200 músculo, grasa hígado; 1000 riñón
Cefquinoma	20 µg/Kg	50 músculo, grasa, 100 hígado; 200 riñón
Ceftiofur	100 µg/Kg	1000 músculo; 2000 grasa, hígado; 6000 riñón
Espiramicina	200 µg/Kg	200 músculo; 300grasa, hígado, riñón
Tilosina	50 µg/Kg	100 músculo, grasa, hígado, riñón
Tianfenicol	50 µg/Kg	50 músculo, grasa, hígado, riñón
Tetraciclina	100 µg/Kg	100 músculo; 300 hígado; 600 riñón; 200 huevos
Lincomicina	150 µg/Kg	50 grasa; 100 músculo; 500 hígado; 1500 riñón

(Cancho, B. et al., 2000).

Los valores de los LMR deben fijar la cinética de depreciación, entre otros factores, por lo que es necesario un tiempo de espera para garantizar que la concentración residual de antibiótico no sea superior a los límites estipulados. Dicho tiempo debe de ser respetado, desde el ultimo tratamiento farmacológico hasta el sacrificio de los animales o la colecta de sus productos como huevo y leche (Cancho, B. et. al., 2000).

Existen varios métodos de detección y/o cuantificación para los residuos de antibióticos tanto microbiológicos (prueba de inhibición del yogurt) como analíticos (HPLC).

También existen kits comerciales específicos para algunos fármacos (Noa, E. et al., 2009).

La modificación realizada en 2011 a la NOM-004-ZOO-1994 indica los métodos analíticos oficiales, los criterios para el funcionamiento, aplicación e interpretación de dichos métodos para la identificación y cuantificación de residuos tóxicos, biológicos y contaminantes en alimentos de origen animal.

Esto debe regularse, ya que existen personas sensibles a algunos antibióticos utilizados en animales y, además, se utilizan otros no recomendados para seres humano. Sin embargo, son muy importantes, ya que producen beneficios por la aceleración del desarrollo del animal impactando en los costos pero, por otra parte, aumenta el riesgo de problemas a largo plazo (Errecalde, J., 2004).

El problema de la resistencia en medicina humana se centra en pacientes críticos, esto es, en inmunodeprimidos, niños, ancianos o pacientes con problemas de movilidad (dializados, etc). Cuando un patógeno multiresistente ataca a un paciente con alguna de las características citadas, los antibióticos normalmente usados no funcionan y hay que utilizar agentes más nuevos, y por supuesto, más caros. Obviamente, el fracaso de la terapia puede llevar a la muerte del paciente (Errecalde, J., 2004).

#### *1.4.2 Beneficios del uso de antibióticos en animales para consumo humano*

Las bacterias de la flora intestinal compiten con el hospedero por la captación de aminoácidos, de este modo, reducen la utilización de nitrógeno por el animal. Los aminoácidos pueden ser incorporados en proteínas bacterianas. De manera alternativa, algunas bacterias fermentan aminoácidos produciendo catabolitos tóxicos que tienen impacto en el recambio de células intestinales y en el rendimiento del crecimiento animal, tales como amonio, variedades de aminas, fenoles e índoles. Existe evidencia científica de que grandes concentraciones de amonio reprimen el crecimiento animal. De igual manera, altas cantidades de fenoles e índoles tienen un impacto negativo en el desarrollo, así como en las características sensoriales de la carne. (Dibner, J.J.,

Richards, J.D., 2005). La microflora también decrementa la digestibilidad de las grasas. (Eysen, H. 1973).

Al disminuir y controlar la microflora que provoca los efectos negativos mencionados líneas anteriores y otros más, se logran los siguientes beneficios en el animal y en los costos de producción:

- Resistencia a la colonización por microorganismos patógenos
- Estimulación del sistema inmune del hospedero
- Disposición de nutrientes para el hospedero
- Aumento en la digestibilidad
- Disminución en la competencia por nutrientes disponibles
- Disminución de la secreción de moco intestinal, que significa ahorro de proteína y energía.

La supresión de los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento tendría las siguientes repercusiones:

1. Incremento en el costo de productos ganaderos.
2. Incremento del 5% en el consumo de antibióticos con fines terapéuticos.
3. Aumento en la mortalidad ganadera (10-15%).
4. Pérdida del 2 al 5% (según especie) de los índices de conversión.
5. Mayor consumo de piensos.
6. Mayor tiempo de cría.
7. Mayor consumo de agua.
8. Mayor impacto ambiental (aumento de metano y excremento).
9. Incremento del riesgo a la resistencia a antibióticos por su uso terapéutico.
10. Mayor riesgo de infección de los consumidores por el consumo de productos contaminados.
11. Desarrollo de nuevas metodologías para la sustitución de antibióticos.
12. Desarrollo de controles administrativos para evitar mercados informales.

(Información Veterinaria, Abril 1999).

Las repercusiones anteriormente mencionadas son básicamente económicas. Sin embargo, si se continúan utilizando de la misma manera estas sustancias farmacológicas, sin una mayor regulación o alternativas, puede aumentar las problemáticas actuales o inclusive desarrollarse nuevas consecuencias en la industria alimentaria, farmacéutica y en el sector salud (OMS, 2003).

#### 1.4.3 Alternativas de promotores de crecimiento (antibióticos)

Una alternativa lógica sería la de desarrollar nuevos antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes a los críticamente importantes para la clínica médica humana (Errecalde, J., 2004). Otra alternativa es que existen aditivos que se pueden agregar a las fórmulas de los piensos en sustitución de los antibióticos como agentes promotores del crecimiento, los cuales se describen en la tabla 6. Sin embargo, existen fuertes restricciones para su comercialización en la Unión Europea, aunque en México algunos están autorizados (NOM-004-ZOO-1994).

Tabla 6. Aditivos promotores del crecimiento alternativos a los antibióticos y su normatividad en México

Grupo	Aditivo	Permitido en México	Grupo pp. 13
Enzimas	β-glucanasa Fitasa Xilasa Amilasas Proteasas Entre otras	β-glucanasa Fitasa Xilasa Amilasas Proteasas Entre otras	III
Ácidos Orgánicos	Fórmico Propiónico Láctico	No mencionados en el acuerdo	N/A
Minerales	Zinc Cobre Cromo	Si Si Si	III III III
Vitaminas	Hidrosolubles (C y B) Liposolubles (A,D,E y K)	Si Si	III III



Cultivos probióticos	Levaduras Lactobacilos Bifidobacterias Hongos	Si Si El acuerdo no menciona cuales ya que solo menciona solo "etc"	III III N/A
Oligosacáridos	Oligofruktanos Galactomananos	No No	N/A N/A
Aceites y extractos vegetales	Orégano Ajo		N/A N/A
Otros	Inmunoglobulinas Inmunoestimulante Hepatoprotectores		N/A N/A N/A

N/A=No Aplica

### 1.5 Resistencia a los antibióticos

Es la capacidad de un microorganismo para resistir, inhibir o revertir los efectos de un antibiótico. La resistencia se puede producir naturalmente a través de mutaciones al azar, pero también se puede inducir por medio de una aplicación de presión selectiva a una población microbiana. Una vez que se genera la resistencia, los nuevos genes pueden ser transmitidos entre células bacterianas por transferencia horizontal por diversos procesos de intercambio genético (Cordiés, L. et al., 1998).

La resistencia a los antibióticos se identificó en un periodo corto de tiempo después de la introducción de los antibióticos como quimioterapéuticos y otras aplicaciones. En 1946, el descubridor de la penicilina, Alexander Fleming, dijo "Probablemente no exista ningún antibiótico de quimioterapia al cual, en condiciones propias, las bacterias puedan actuar para adquirir por alguna vía la resistencia" (Alekhun, M., 2007).

En la siguiente tabla se muestran algunos tipos de antibióticos, su mecanismo de acción y mecanismos de resistencia de algunas bacterias a estos fármacos.

Tabla 7. Mecanismos de resistencia para algunos antibióticos.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Bacteria	Mecanismo de resistencia	Alternativas de tratamiento futuras
Glicopeptidos (Vancomicina)	Interacción con precursores de pared celular	S. aureus	Disminución de pared celular; sustitución de terminales receptoras	Quinupristin-dalfopritin, tigeciclina
Cefalosporinas	Inhibición de la pared celular	E.coli	Hidrólisis del antibiótico	Carbapenos, tigeciclina
Carbapenos	Inhibición de la pared celular	Acinetobacter spp	Baja permeabilidad, bombas de expulsión	Poliximas, Colistina
Rafimicinas	Inhibición de la transcripción	M. tuberculosis	Mutación del transcriptor <i>rpoB</i>	Vancomicina
Aminoglucósidos, tetraciclina	Inhibición de síntesis de proteínas (16S)	M. tuberculosis	Hidrólisis del antibiótico; Modificación del 16S	Vancomicina
Macrólidos	Inhibición de síntesis de proteínas (23S)	S. pneumoniae	Hidrólisis del antibiótico; Modificación del 23S	Vancomicina
Fluoroquinolonas	Inhibición de replicación de ADN (bloquea subunidad A de ADN girasa)	K. pneumoniae	Mutación de la ADN girasa y topoisomerasa IV	Colistina, tigeciclina
Cloranfenicol	Inhibición de síntesis de proteínas	E. faecium	Modificación del antibiótico (acetiltransferasa)	Quinupristin-dalfopritin, tigeciclina

Alekshun, M., 2007

### 1.5.1 Desarrollo de la resistencia

Existen varios mecanismos genéticos para el desarrollo de resistencia a antibióticos, sin embargo, los principales son la mutación y la adquisición de genes.

Para que se produzca una resistencia total, las mutaciones deben ocurrir en varios genes, debido a la redundancia genética en los blancos de los antimicrobianos (Roe, M.T., Pillai, S.D., 2003). Además, la fisiología, el entorno celular (presiones externas) y la genética bacteriana son muy importantes, por lo que disminuyen la probabilidad de la mutación (resistencia a 1 antibiótico). Por lo tanto, la adquisición de genes es el proceso principal y más fácil para obtener la resistencia a determinado antibiótico. (Mazel, D., Davies, J., 1999).

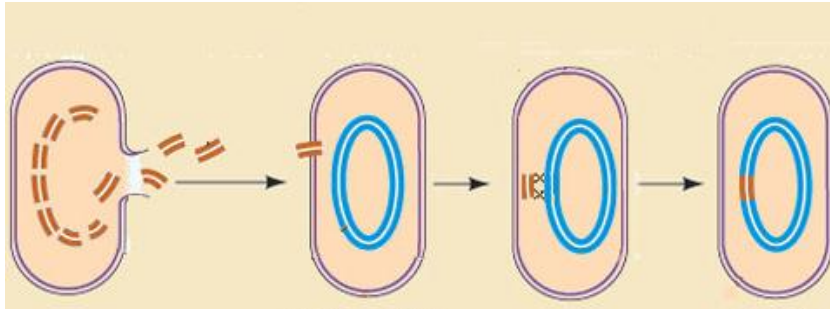
Las secuencias genéticas pueden ser adquiridas por una célula a través de diversos procesos, tales como:

#### Transformación

Es la captación y asimilación del DNA desnudo y se produce de forma natural solo en ciertas especies de bacterias. Cuando la célula se encuentra en un estado que permite la transformación se dice que está en estado competente (Wolfgang, P, 1998). La transformación funciona mejor cuando las células donadora y receptora tienen una relación cercana (Tortora, G., 2007). Es probable que este mecanismo de intercambio genético sea el más importante para bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Haemophilus* y *Neisseria* (Wolfgang, P, 1998).

Los pasos más comunes implican la unión de DNA exógeno a la superficie celular, su transporte al interior de la célula y luego la recombinación con el genoma residente (Wolfgang, P, 1998). La figura 2 ejemplifica dichos pasos.

Figura 2. Mecanismo de transformación genética bacteriana



### Transducción

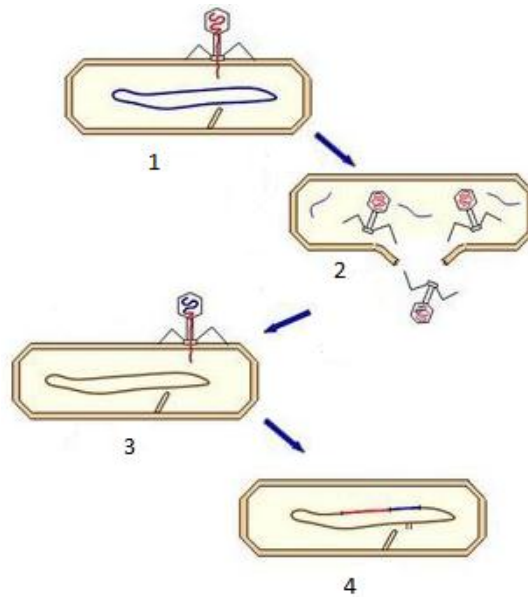
Mecanismo de transferencia de material genético de una célula donadora a otra receptora por medio de un virus que las infecta, denominado como bacteriófago o fago (Tortora, G., 2007).

El proceso de transducción se puede dividir en 2 mecanismos:

- Generalizada: Permite la transferencia de casi cualquier gen bacteriano, producido por el empaquetamiento de fragmentos del DNA del huésped al azar hasta que la cápside del fago se llena. Todo el material en la cápside es totalmente competente. El material inyectado a la segunda célula infectada no transporta información genética del fago, por lo que esta sobrevive a la infección y puede captar los fragmentos de DNA de la primera célula infectada y lisada (Figura 3).
- Especializada: Puede operar solo sobre genes determinados con una eficiencia relativamente elevada. El gen bacteriano se convierte en parte integrante del genoma del fago para infecciones posteriores.

Se pueden transmitir genes específicos por medio de bacteriófagos  $\lambda$ , tales como la resistencia a antibióticos, patogenicias (antígeno somático O de *Salmonella*) o toxinas (enterotoxina de *S. aureus* o toxina botulínica de *C. botulinum* (Wolfgang, P, 1998).

Figura 3. Mecanismo de transducción generalizada

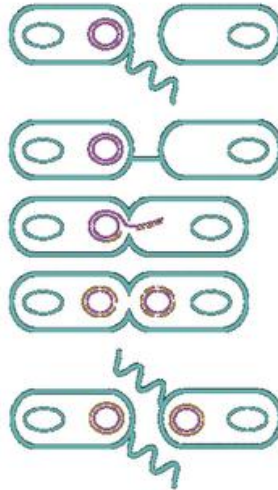


### Conjugación

Es mediada por un plásmido, el cual es un fragmento circular de ADN que se replica independientemente del cromosoma celular y no son esenciales para el crecimiento de la célula en condiciones normales, sin embargo, estos se expresan en cuanto se presentan las condiciones necesarias.

El proceso requiere el contacto célula-célula, por lo que en bacterias gram negativas (Figura 4), los pili permiten el intercambio de material genético, mientras que en gram positivos se producen sustancias “adhesivas” en la superficie que favorecen el contacto. En el proceso se transfiere una hebra del ADN al receptor, para que este sintetice el complemento y obtenga la doble hélice completa (Tortora, G., 2007).

Figura 4. Mecanismo de conjugación en bacterias gram negativas



Cuando un microorganismo ya posee en su material genético la información para la resistencia a los antibióticos y se ve inmerso en un medio en el cual puede expresar esos genes, se lleva a cabo un proceso que puede resumirse en 3 tipos (Fuchs, L.Y. et al, 1994):

- Inactivación del antibiótico
- Alteración del sitio blanco del antibiótico
- Disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula

Estos mecanismos pueden llevarse a cabo simultáneamente, o bien, solo uno puede provocar la resistencia a diferentes clases de antibióticos.

## 1.6 Resistencia a Vancomicina

### *1.6.1 Historia*

Inicialmente, la Penicilina G fue una terapia efectiva para infecciones causadas por *S. aureus*. Sin embargo, en 1947, Barber reportó la resistencia a este antibiótico por la degradación de una enzima (penicilinasa) secretada por la bacteria (Michael, N. et al, 2007). El aislamiento de nuevas cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina ha continuado desde su descubrimiento y en la actualidad, el 95% de las cepas clínicas de esta bacteria son resistentes a dicho antibiótico y más de la mitad también a meticilina (MRSA) (Appelbaum, P., 2006).

La vancomicina es un glicopéptido que presentó una única y efectiva solución al tratamiento de infecciones causadas por MRSA. Sin embargo, en 1997, en Japón se aisló de un bebé de 4 meses la primer cepa clínica de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina, VISA por sus siglas en ingles (Vancomycin Intermediate Resistant *S. aureus*). Esta fue detectada ya que después de 29 días de tratamiento con vancomicina, la fiebre y la infección en la herida quirúrgica no cesaba. Posteriormente se aislaron cepas de *S. aureus* resistentes completamente al antibiótico, denominadas VRSA por sus siglas en ingles (Vancomycin resistant *S. aureus*) (Appelbaum, P., 2006).

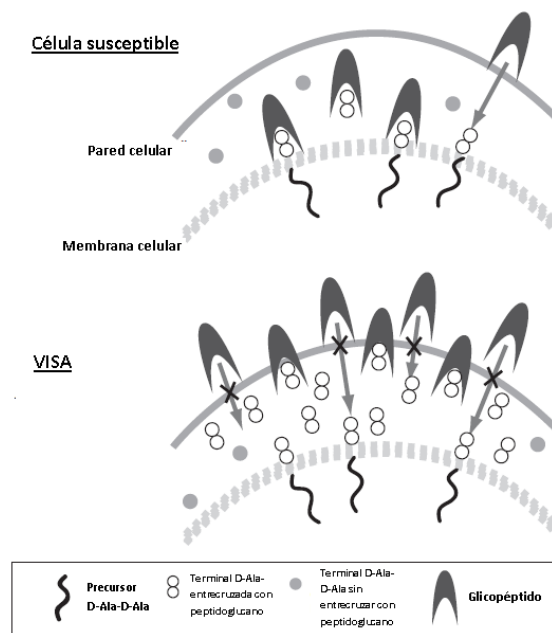
La concentración de vancomicina requerida para inhibir a la mayoría de las cepas de *S. aureus* oscila entre 0.5 y 2 mg/L, pero este intervalo es insuficiente para las cepas VISA, las cuales son inhibidas (CMI's Concentración Mínima Inhibitoria) con concentraciones entre 8 y 16 mg/L. Las cepas VRSA son consideradas como tales cuando su CMI de vancomicina es igual o mayor a 32 mg/L. Hasta el momento, la cepa que necesitó una concentración de vancomicina más alta (1024 mg/L) aislada del catéter de una paciente de 40 años de Michigan, EUA en el 2002 (Appelbaum, P., 2006).

### 1.6.2 Mecanismos de resistencia a Vancomicina

Los glicopéptidos en general actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias gram positivas. Específicamente, interactúa irreversiblemente con la terminal D-alanina-D-alanina de los precursores (Appelbaum, P., 2006).

Las cepas VISA adquieren su resistencia debido a que producen una mayor cantidad de peptidoglucano y además con elevados residuos de las terminales receptoras de la vancomicina, es decir D-alanina-D-alanina, las cuales secuestran irreversiblemente al antibiótico y evitan que llegue a su verdadero objetivo. Esto se evita agregando una concentración mayor de vancomicina. La figura 5 muestra una comparación entre las paredes de una célula sensible a vancomicina y una VISA (Appelbaum, P., 2006).

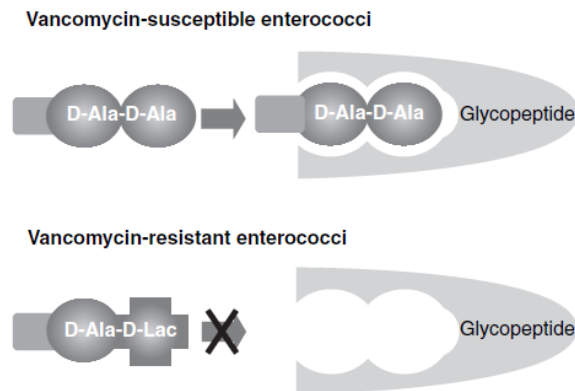
Figura 5. Comparación de la acción de la vancomicina en la membrana de una célula susceptible y VISA





La cepa MRSA que produjo la VRSA de Michigan probablemente obtuvo su resistencia por medio de una transferencia interespecie del transposón Tn1546, el cual contiene el gen VanA, de una cepa de *E. faecalis* resistente a vancomicina (Appelbaum, P., 2006). Esta resistencia se debe a que las terminales del péptido receptor de D-alanina-D-alanina fueron modificadas a D-alanina-D-lactato o D-alanina-D-serina, lo que provoca que la afinidad del antibiótico sea reducida. La figura 6 representa lo antes mencionado (Alekhshun, M., 2007).

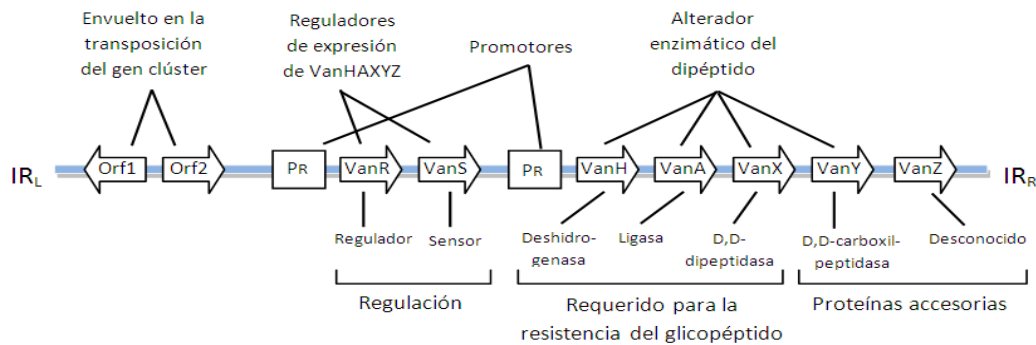
Figura 6. Esquema del mecanismo de resistencia de una célula VRSA



La resistencia es atribuida a los fenotipos de los genes Van A, B, D, E y G, mientras que el gen Van C proporciona la resistencia intrínseca. Van A y D, proporcionan también resistencia a teicoplanina.

En la figura 7 se muestra el clúster que contiene los genes para la resistencia a vancomicina. Orf1 y Orf2 están involucrados en la transposición del cluster, mientras que Van R y Van S son los responsables de la regulación de la expresión de las partes posteriores, el "VanHAXYZ". VanH y VanA son los responsables de la síntesis del dipéptido terminal modificado, mientras que los VanX y VanY limitan la síntesis del dipéptido terminal normal y sus sustratos. La función de VanZ aún es desconocida.

Figura 7. Clúster de genes para la resistencia a la vancomicina



(Alekhshun, M., 2007)

### 1.7 Métodos de resistencia alternativos a antibióticos

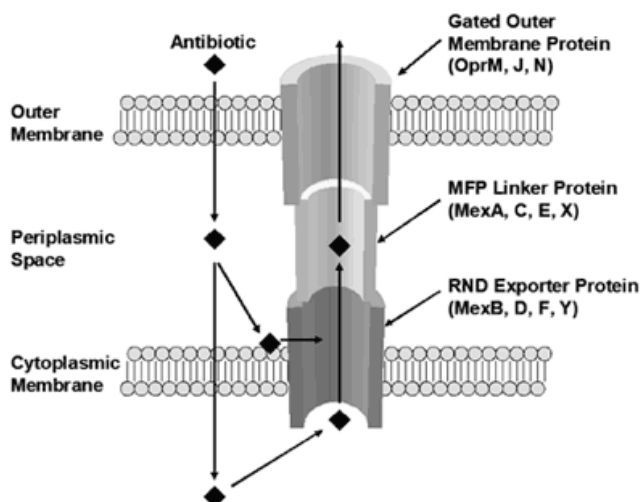
Los métodos descritos son específicos para alguna clase o antibióticos específicos, sin embargo estos no son los únicos mecanismos por los que una bacteria puede ser resistente a los antibióticos. El sobre uso continuo e imprudente de estos fármacos ha provocado que muchas bacterias, entre ellos varios patógenos, incrementen sus resistencias por medio de mecanismos de resistencia intrínseca, tal como la sobre expresión de las bombas de expulsión (Poole, K., 2001).

Las bombas de expulsión se expresan naturalmente ya que pueden conferir la resistencia a sustancias producidas por el hospedero, tales como ácidos biliares, hormonas y moléculas de defensa, lo cual indica que estos sistemas pueden contribuir a la sobrevivencia de la bacteria en su nicho ecológico en situaciones de estrés. Dichos mecanismos también contribuyen a la resistencia a antibióticos debido a que estos provocan condiciones estresantes para la célula. La bombas de expulsión pueden ser específicas para una sola clase de sustratos o bien, transportar múltiples clases de sustancias (Borges-Walmsley, I., 2003), tales como colorantes, detergentes, antibióticos, ácidos orgánicos y lactonas involucradas en el quorum sensing (Poole, K., 2001).

Inicialmente se pensaba que la pared celular era la responsable de la resistencia intrínseca, sin embargo, se ha demostrado que los antibióticos sí penetran dicha capa pero son expulsados antes de alcanzar su blanco intracelular, como en el caso de la

resistencia a varios antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* debido al operón que codifica el sistema de expulsión MexAB-OprM (figura 8) el cual, al ser suprimido, convierte a la bacteria en hiper-susceptible a los fármacos (Piddock, L., 2006).

Figura 8. Sistema de expulsión MexAB-OprM



Las bombas de expulsión que confieren resistencia a antibióticos pertenecen a 5 distintas familias de proteínas, así como a 3 diferentes sistemas, los cuales se representan en la tabla 8 con su respectivo ejemplo.

Tabla 8. Familias de bombas de expulsión y ejemplos

	Familias de bombas de expulsión	Ejemplos de transportadores		
		Nombre	Organismo	Resistencia a
Sistema antiport impulsado por protones	Mayor Facilitator Superfamily (MF)	NorA	<i>S. aureus</i>	Cloranfenicol
	Resistance-Nodulation-Cell (RND)	MexB	<i>P. aeruginosa</i>	Azitromicina
	Small Multidrug Resistance (SMR)	EmrE	<i>E. coli</i>	Acriflavina
Sistema antiport impulsado por sodio	Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE)	NorM	<i>V. parahaemolyticus</i>	Fluoroquinolonas
Sistema acoplado a hidrólisis de ATP	ATP- Binding Cassette (ABC)	MacB	<i>E. coli</i>	Macrólidos

## 1.8 Revirtiendo bacterias resistentes a la sensibilidad

Con el conocimiento de los mecanismos que confieren la resistencia a los antibióticos, es posible revertir a las células a la sensibilidad con algunos métodos. A continuación se muestran ejemplos (Henriques, B., 2002):

- Uso de la combinación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.
- Hidrólisis de receptores alterados: Para la resistencia a vancomicina, se han sintetizado moléculas capaces de hidrolizar selectivamente a los dipéptidos alterados (D-Ala-D-Lac).
- Inactivación de proteínas: Proteína PBP2 que es necesaria para la resistencia a meticilina en *S. aureus* (MRSA). Uso de la combinación de metilcilina con inhibidores de transglicosidasas.
- Inactivación genética: Inactivación del operón murMN en *S. pneumoniae* resistente a penicilina. En este caso, las células se vuelven hipersensibles y se lisan más rápidamente que las células normalmente sensibles.
- Disminución de bombas de expulsión: El uso de compuestos sintéticos y/o naturales en *P. aeruginosa* resistente a fluoroquinolonas, disminuyen la expresión de las bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y, por lo tanto, su resistencia intrínseca.

## 1.9 Barreras de prevención para la diseminación de las resistencias

Obtener un alimento libre de microorganismos es muy difícil, por lo que se crean límites máximos de población microbiana en general y específica para conseguir la inocuidad deseada. Sin embargo, dentro de dicha población pueden existir células resistentes a 1 o más antibióticos, las cuales pueden ser ingeridas y pasar al tracto digestivo del consumidor. Aunado al trabajo de las autoridades competentes y los productores de

alimentos por conseguir niveles inocuos de microorganismos en los productos, el manejo higiénico de los alimentos es base fundamental para la prevención de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), por lo que la OMS elaboró las "Reglas de Oro" para la preparación higiénica de alimentos, las cuales son:

1. Elegir alimentos tratados con fines higiénicos: El tratamiento de los alimentos es no solamente para que se mantengan mejor y por más tiempo, sino para que sean más seguros; ejemplo, la pasteurización de la leche.
2. Cocinar bien los alimentos: Las bacterias patógenas en el alimento pueden eliminarse si se cocina bien el producto, es decir, al menos 70°C en toda la masa del producto.
3. Consumir inmediatamente todos los alimentos cocinados: Los microorganismos comienzan a reproducirse inclusive en refrigeración, por lo que conviene su consumo inmediato.
4. Guardar cuidadosamente los alimentos cocinados: En caso que se requiera almacenar los alimentos cocinados, es conveniente mantenerlos por encima de 60°C o debajo de los 10°C con fines de inocuidad microbiológica.
5. Recalentar bien los alimentos ya cocinados: Eliminar los microorganismos que proliferaron durante el almacenamiento, procurando que el alimento alcance los 70°C.
6. Evitar el contacto entre alimentos crudos y cocinados: Evitar la contaminación cruzada con utensilios y por alimentos crudos con cocidos.
7. Lavarse las manos a menudo: Al inicio de la manipulación, entre interrupciones y al final, para evitar propagar bacterias en superficies o personas y además prevenir la contaminación cruzada.
8. Mantener escrupulosamente limpias todas las superficies de la cocina: Pueden estar contaminadas de manipulaciones anteriores a pesar de que estén limpias,

se deben desinfectar antes de empezar la manipulación y el contacto de la superficie con el alimento.

9. Mantener todos los alimentos fuera del alcance de insectos, roedores y otros animales: Las plagas son vectores, las cuales pueden pasar por superficies y dejar microorganismos a pesar de que se vean limpias. Mantener alimentos en recipientes herméticos.

10. Utilizar agua limpia: Hervir el agua antes de su uso si se duda de su calidad microbiológica.

En México, existe una Norma Oficial Mexicana, la NOM-251-SSA1-2011, que tiene los lineamientos a seguir en el país de las prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas y suplementos alimenticios de forma más extensa y rigurosa.

#### 1.10 Propiedades y uso de especias

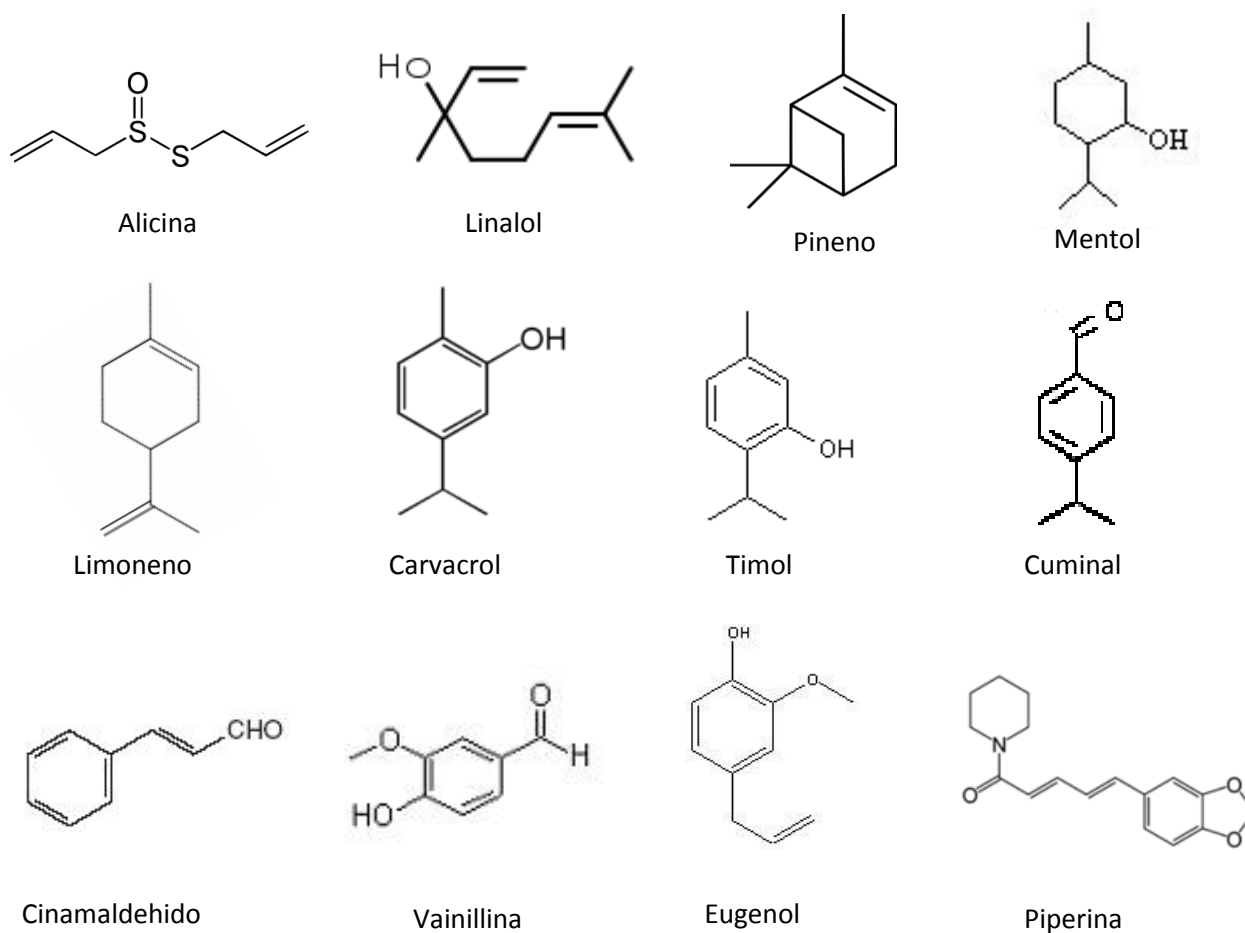
Las especias han sido utilizadas desde la antigüedad con diferentes finalidades. Originalmente, la mayoría de ellas fueron utilizadas para conservar alimentos, tales como la canela (*Cinnamomum zeylanicum*), el clavo (*Syzygium aromaticum*) o la cúrcuma (*Curcuma longa*). Sus propiedades fungicidas, bactericidas o bacteriostáticas afectan el crecimiento bacteriano. Por esta razón, también se han utilizado como medicina desde tiempos antiguos, y hoy en día existen tratamientos a base de especias como remedios caseros (Roldan, L., 2010).

Las plantas, hierbas y especias, así como sus aceites esenciales y extractos, contienen un gran número de sustancias con propiedades inhibitorias para las bacterias y hongos filamentosos y levaduriformes. La mayoría de dichas sustancias son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. En la tabla 9 se presentan algunas, especias, hierbas y condimentos con efecto antimicrobiano y su principal compuesto activo. En la figura 8 se pueden observar las estructuras químicas de algunos de los compuestos de la tabla 9.

Tabla 9. Nombre común y científico de especias y compuestos antimicrobianos

Nombre común	Nombre científico	Compuestos antimicrobianos
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Alicina
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Linalol, eugenol
Canela	<i>Cinnamomim zeylanicum</i>	Cinamaldehido, eugenol
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Alicina
Clavo	<i>Syzgium aromaticum</i>	Eugenol
Comino	<i>Cuminum cyminum</i>	Ciminal, pineno, terpineol
Laurel	<i>Laurur nobilis</i>	Ciñelo, eugenol, limoneno
Menta	<i>Mentha vulgaris</i>	Mentol
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol, timol
Pimienta	<i>Piper nigrum</i>	Piperina, pineno, limoneno, linalol
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol, carvacrol
Vainilla	<i>Vanilla planifolia</i>	Vainillina

Figura 8. Estructura molecular de algunos compuestos antimicrobianos naturales



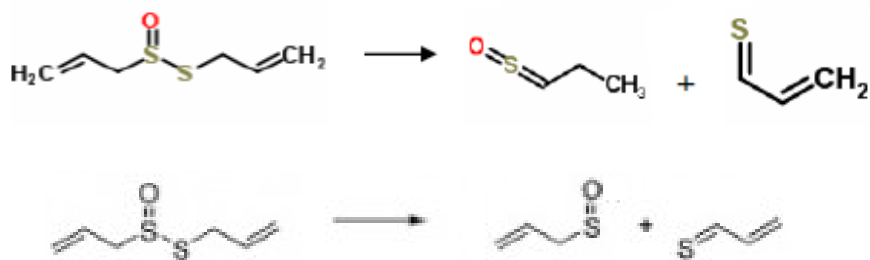
Las moléculas antes presentadas son compuestos volátiles, por lo que poseen algunas características en general, las cuales se enlistan a continuación (Nychas, 1995):

- Solubilidad: Por la base cíclica (excepto Alicina y Linalol) presentan mejor solubilidad en disolventes orgánicos no polares (hidrofóbicos) que, dependiendo de sus sustituyentes, incrementarán su carácter hidrofílico.
- Punto de ebullición: Al ser cadenas alifáticas abiertas y/o cíclicas (aromáticos o no aromáticos) con pocos carbonos, la temperatura en que alcanzan la evaporación es baja y su presión de vapor es mayor a menor temperatura.
- Inflamables: Su combustión se inicia con facilidad debido al punto anteriormente mencionado.

Estas moléculas de alguna manera son sensibles a la temperatura debido a las insaturaciones y/o los sustituyentes de los anillos, lo cual provoca que se modifiquen y, en consecuencia, la capacidad antimicrobiana disminuya o se pierda. Por la misma razón de la naturaleza de las moléculas, los extractos tendrán diferentes concentraciones de los principios activos debido a la solubilidad en los diferentes disolventes de cada compuesto. También se ha reportado que aparte de la temperatura, el contenido de grasa, proteínas, sal y pH del medio afectan la capacidad antimicrobiana de dichos compuestos (Nychas, 1995).

En la figura 9 se pueden observar 2 reacciones que provocan la degradación de la alicina, la primera a temperatura ambiente y la segunda a una mayor temperatura.

Figura 9. Reacciones de degradación de la alicina





### 1.10.1 Ajo

El nombre científico del ajo es *Allium sativum*, el cual ha sido utilizado en la cocina mediterránea y en la medicina casera.

La alicina, presente en el ajo, es el principal compuesto antimicrobiano de dicho bulbo, sin embargo, no se encuentra en su forma activa dentro del vegetal. Puesto que están ubicados en diferentes compartimentos, una acción mecánica como un corte o triturado provoca que la aliina (aminoácido sulfurado) entre en contacto con la enzima aliinasa y se sintetice la alicina (Figura 10), la cual tiene una vida media muy corta, debido a que reaccionan con proteínas vecinas del propio ajo, pero principalmente con las enzimas que contienen grupos tiol de los microorganismos (Ankri, S., Mirelman, D., 1999) mediante una reacción de intercambio tiol-disulfuro (Miron, T., et al., 2002).

Figura 10. Síntesis enzimática de alicina a partir de aliina.

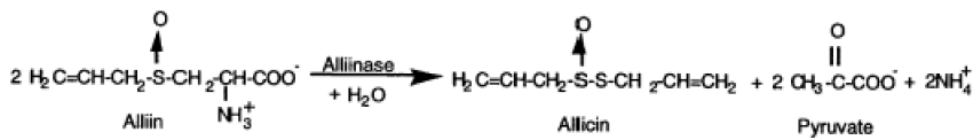
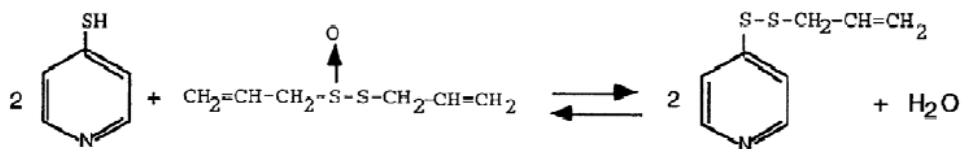


Figura 11. Ejemplo del intercambio tiol-disulfuro de la alicina.



La alicina representa aproximadamente el 70% de la concentración total de tiosulfatos después de triturar los dientes de ajo. Estudios realizados con extractos de ajo molido han demostrado tener propiedades antiparasitarias, antifúngicas, antimicrobianas y antivirales. Algunos ejemplos de organismos inhibidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Algunos microorganismos sensibles a alicina.

Tipo de organismo	Especies sensibles	Bibliografía
Protozoarios	<i>Entamoeba, Typanosomas, Leptomonas</i>	Reuter, H.D., Koch, H.P., Lawson, L.D., 1996
Bacterias	<i>S. aureus, E. coli, Sallmonella sp, B. subtilis, Clostridium sp, Helicobacter sp</i>	Harris, J.C. et al., 2001
Hongos	<i>Candida, Rhodotorula, Aspergillus, Trichosporum, Cryptococcus</i>	Harris, J.C. et al., 2001
Virus	Influeza A, B; Rinovirus, VIH, herpes simple 1 y 2, rotavirus	Fenwick, G.R., Hanley, A.B., 1985

### 1.10.2 Albahaca

Su nombre científico es *Ocimum basilicum*, y es nativa de Irán, India y regiones tropicales de Asia, por lo que ha sido cultivada y utilizada en la cocina de dichas regiones desde hace mas de 5,000 años.

Según la FAO, la albahaca y sus extractos se dividen en 4 tipos según la composición química y su origen botánico (Instructivo técnico del cultivo de la albahaca (*Ocimum basilicum*) en Cuba, FAO):

Grupo I: Tipo Europeo. Rico en metil chavicol y linalol, sin alcanfol. Aceite de mejor calidad por su fino olor.

Grupo II Tipo Reunion. Rico en metil chavicol y alcanfor, sin linalol.

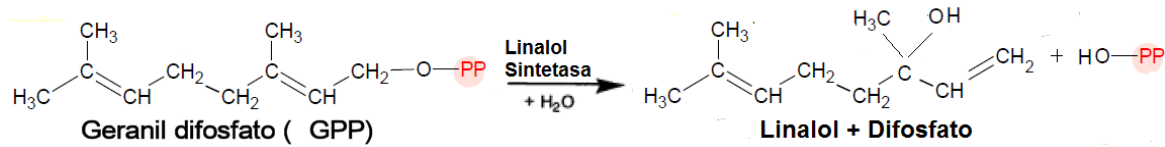
Grupo III Tipo Cinamato de Metilo. Rico en metil chavicol, linalol y cinamato de metilo.

Grupo IV. Tipo Eugenol. Rico en eugenol.

*Ocimum basilicum*, se encuentra en el Grupo I

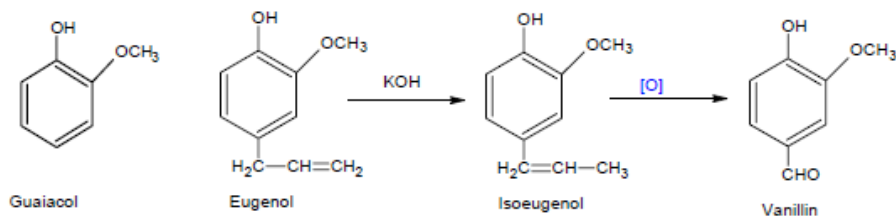
Como se muestra en la figura 12, el linalol se sintetiza en las hojas de las plantas por la enzima linalol sintetasa a partir del geranil difosfato.

Figura 12. Síntesis enzimática de linalol



Otro compuesto que contiene la albahaca es el eugenol, el cual es el 4-propenil guaiacol. Esta molécula se encuentra también en el clavo y la canela. La vainillina se puede sintetizar con eugenol y nitrobenzoceno (Saamena, B., 2007).

Figura 13. Síntesis química de vainillina a partir de eugenol



Se ha reportado que el extracto de albahaca tiene propiedades antibacteriales, especialmente contra bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella*, entre otros (Roldan, L., 2011).

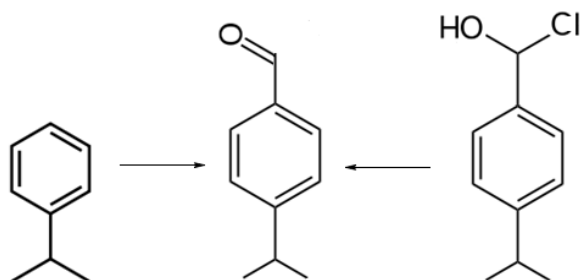
### 1.10.3 Comino

El nombre científico es *Cuminum cyminum*, y se ha utilizado mucho en la cocina asiática en el curry y en Europa en los mojos canarios, entre otros. El comino es mencionado en la biblia (Mateo 23:23) y también fue utilizado por los egipcios para aromatizar sus alimentos y para momificar a sus muertos. Aunque en América se ha difundido, en México no es muy utilizado.

En la cultura griega y en la edad media se utilizaba el comino como medicina y se describieron sus propiedades, tales como estimulante de órganos sexuales, tratamiento para trastornos digestivos leves como carminativo, eupéptico y astringente, infecciones broncopulmonares, tos y como analgésico.

En la molienda y preparación del extracto se puede perder la mitad de la concentración inicial del componente antimicrobiano activo más importante del comino, el cual es el cuminal o cuminaldehído; también puede utilizarse en la fabricación de cosméticos y perfumes, por lo que su síntesis industrial se obtiene a partir de la formulación del cumeno o la reducción del cloruro de 4-isopropilbenzol.

Figura 14. Síntesis industrial de cuminaldehído



Se han realizado estudios de las propiedades antimicrobianas del extracto de comino y del cinamaldehído puro, dando como resultado que el extracto tiene un mayor efecto antibacterial y antifúngico en la mayoría de los casos en comparación con la molécula pura, ya que contienen otros compuestos como aldehídos y pineno, entre otros, que provocan una sinergia (De, M., et al., 2003).

Los microorganismos con los que se ha demostrado la alta sensibilidad al extracto de comino son las bacterias *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas oleovorans* y los hongos *Trichophyton rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe*. Otros microorganismos sensibles han sido las bacterias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y los hongos *Fusarium sp.*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, entre otros (De M., et al., 2003).

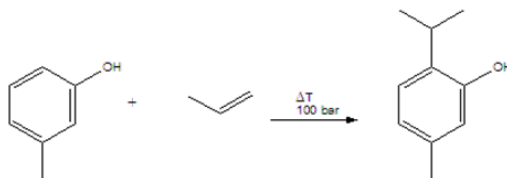
#### 1.10.4 Orégano

El nombre científico es *Origanum vulgare*. Es originario de de la zona mediterránea donde se ha utilizado mucho en la cocina, especialmente en la italiana, así como en la mexicana, argentina y chilena.

El orégano se ha utilizado desde la cultura griega por Hipócrates como antiséptico, así como para ayudar a enfermedades digestivas y respiratorias. También tiene actividad antioxidante por los flavonoides y actividad antimicrobiana por los compuestos fenólicos.

Los compuestos antimicrobianos principales del orégano son el carvacrol y el timol en menor concentración, sin embargo también contiene limoneno, linalol y pineno. Los primeros 2 son los que confieren el aroma y sabor característico de la especia y debido a la similitud de sus moléculas, la síntesis natural lleva a una mezcla racémica mientras que no es así en la síntesis industrial.

Figura 15. Síntesis industrial de timol



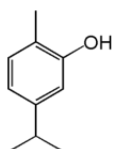
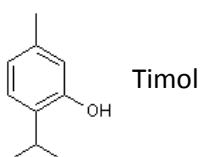
La actividad antimicrobiana del orégano ha sido ampliamente estudiada en varios organismos patógenos, entre ellos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Tiphymurium y *Vibrio cholerae* (Albado, E, et al., 2001).

Existen otras plantas parecidas al orégano, tales como el orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) que es una especie endémica. Dicha planta también tiene propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Otra planta es la mejorana (*Oreganum majorana*) de origen asiático. Estas plantas no deben confundirse ya que sus compuestos activos difieren.

Figura 16. Planta de orégano, orégano mexicano y mejorana con su principal compuesto activo



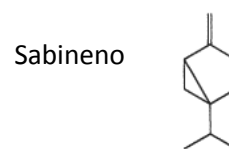
*Lippia berlandieri*



Carvacrol



*Oreganum majorana*



*Oreganum vulgare*

### 1.10.5 Pimienta

El nombre científico es *Piper nigrum*, es originaria de la India y Java. Su fruto es una baya, la cual se emplea seca como especia y se puede utilizar entera o en polvo. Dependiendo el estado de madurez del fruto se pueden obtener distintas propiedades, las cuales se muestran a continuación:

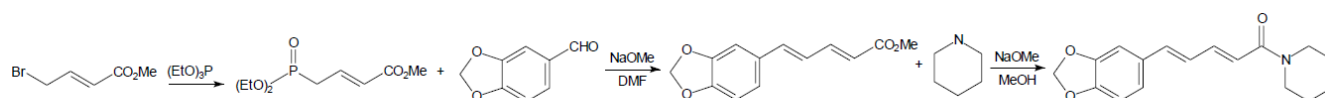
Pimienta verde: Es el fruto no maduro, tiene aromas frutales y tiene poca pungencia

Pimienta negra: Fruto semi-maduro que se seca al sol, se endurece e incrementa pungencia. Es la que más se utiliza.

Pimienta blanca: Fruto muy maduro, sin cáscara. Poca pungencia y se utiliza por su apariencia.

La pungencia y la actividad antimicrobiana se deben principalmente a la presencia de la molécula piperina, la cual se puede sintetizar industrialmente de la siguiente manera:

Figura 17. Síntesis química de piperina



Los extractos de pimienta se han estudiado en varios microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Proteus sp.* (Cabello, M., 2007), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp (Fernández, 2007) entre otras. También se ha demostrado que los extractos realizados con diferentes disolventes tienen distintas capacidades microbianas. Esto se debe a la naturaleza semi-polar de los compuestos antimicrobianos, por lo que el extracto acuoso tiene menor inhibición que el clorofórmico, siendo así el etanólico el de mayor eficacia. Otro factor importante en la concentración final de antimicrobianos en el extracto, es el método de extracción, donde la temperatura y el tiempo degradan a los compuestos volátiles. Este factor se puede hacer extensivo a los extractos de todas las especias (Cabello, M., 2009).

Tabla 11. Diámetro de inhibición máxima (mm) de extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos de pimienta (*Piper nigrum* L.) sobre las bacterias Gram positivas utilizando los métodos de Goldfish y Soxhlet

Bacterias	Diámetro de inhibición máxima (mm)*								
	Método Goldfish			Método Soxhlet			Solvente (sin extractos)		
	EA	EE	EC	EA	EE	EC	A	ET	C
<i>Enterococcus</i>	--	12	--	--	12	11	--	--	--
<i>S. aureus</i>	--	15	--	--	--	11	--	--	--
<i>Streptococcus</i>	--	--	11	--	13	--	--	--	--
<i>Bacillus sp.</i>	--	15	--	--	12	11	--	--	--
<i>Bacillus cereus</i>	--	18	--	--	12	--	--	--	--

EA: Extracto acuoso; EE: Extracto etanólico; EC: Extracto clorofórmico; A: Agua destilada; C: Cloroformo al 99,4%; ET: Etanol al 99,8%; -- Negativo (sin halo de inhibición).

Adaptación de Cabello, M. 2009

## Capítulo 2.

### 2.1 Objetivo General

Aislar e identificar cepas de bacterias resistentes a vancomicina y multirresistentes a antibióticos, a partir de muestras de quesos, así como su comportamiento frente a extractos acuosos de diferentes especias frescas y secas.

### 2.2 Objetivos Particulares

Comprobar la presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en alimentos.

Comparar la respuesta de los microorganismos aislados frente a agentes antimicrobianos naturales y sintéticos.

Observar la diferencia en capacidad antimicrobiana de las especias frescas y procesadas.

### 2.3 Hipótesis

Ya que los quesos elaborados artesanalmente presenten mayor cantidad de bacterias multiresistentes a antibióticos que aquellos producidos industrialmente.

Ya que los extractos acuosos de especias no procesadas industrialmente son más efectivos contra bacterias multiresistentes a antibióticos y a vancomicina que aquellos preparados a partir de especias procesadas.

### 2.4 Justificación

Se ha reportado desde hace varios años el descubrimiento de cepas multirresistentes a antibióticos y a vancomicina presentes en muestras de alimentos para el consumo humano. El origen de la multirresistencia se ha atribuido a factores ambientales, al uso de los antibióticos como promotores de crecimiento en la industria ganadera y avícola, y a un tratamiento erróneo y/o incompleto de enfermedades de animales productores.



La presencia de antibióticos en la leche es un factor que puede afectar la calidad de algunos productos como el yogurt, las leches fermentadas y los quesos madurados, por lo que a niveles industriales este factor se regula, mientras que esto no sucede en la producción a micro escala. La mejor manera de controlarlo es desde la materia prima (Cogan, M., 1972).

La normatividad en México solamente indica que la leche debe de presentar la ausencia de inhibidores microbiológicos y los métodos para la detección de estos, mientras que en Estados Unidos, la Unión Europea y algunos otros países, ya existen estrategias para contener la resistencia a los antimicrobianos (Noa, E. et al., 2009).

La normatividad existe, pero no quiere decir que los productores industriales la cumplan en su totalidad, mientras que los fabricantes de productos lácteos de manera casera o a micro escala no cumplen con las normas establecidas, por lo que los controles y especificaciones mencionadas en ellas no se llevan a cabo, aumentando el riesgo de la presencia de antibióticos y de microorganismos resistentes en los productos (Noa, E. et al., 2009).

Estudios reportan la presencia de cepas de bacterias multiresistentes a antibióticos en alimentos de consumo humano en México. Sin embargo, son reducidos los estudios sobre su susceptibilidad a agentes naturales como las especias, de las cuales de algunas se conoce el o los compuestos antimicrobianos. (Noa, M. et al., 2009).

El uso de especias en alimentos es muy utilizado en la cocina mexicana. Estas se pueden encontrar en varias presentaciones Además, la industria aprovechó ese nicho de mercado para introducir productos. Las especias se pueden encontrar frescas (o curadas), en trozos o en polvo y dependiendo de la presentación sus propiedades antimicrobianas pueden variar, debido a que estos compuestos se degradan rápidamente, ya que son volátiles o sensibles a la temperatura (Sotelo, P., et al, 2008).

Debido a las razones antes mencionadas, se estudiaron cepas bacterianas de quesos artesanales para probar su resistencia a antibióticos y, al ser positivas, el efecto inhibitorio de algunas especias (ajo, albahaca, comino, pimienta y orégano) en diferentes presentaciones en el mercado mexicano.

## Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Aislamiento y purificación

Se realizó a partir de muestras de quesos de venta al menudeo en el Estado de México en la zona de Coacalco y Tultitlán de diferentes comercios (establecidos o no establecidos). Las muestras se transportaron del lugar de adquisición hasta el lugar de análisis según la NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Las muestras fueron manejadas según la NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. En área estéril se cortaron 5 gramos de la periferia de la muestra y 5 gramos del interior con un cuchillo y un tenedor previamente esterilizados, se depositaron en bolsas estériles de alta densidad y se adicionaron 90 mL de agua peptonada estéril. Se homogeneizó en un homogeneizador peristáltico (Stomacher) durante 2 minutos a velocidad media.

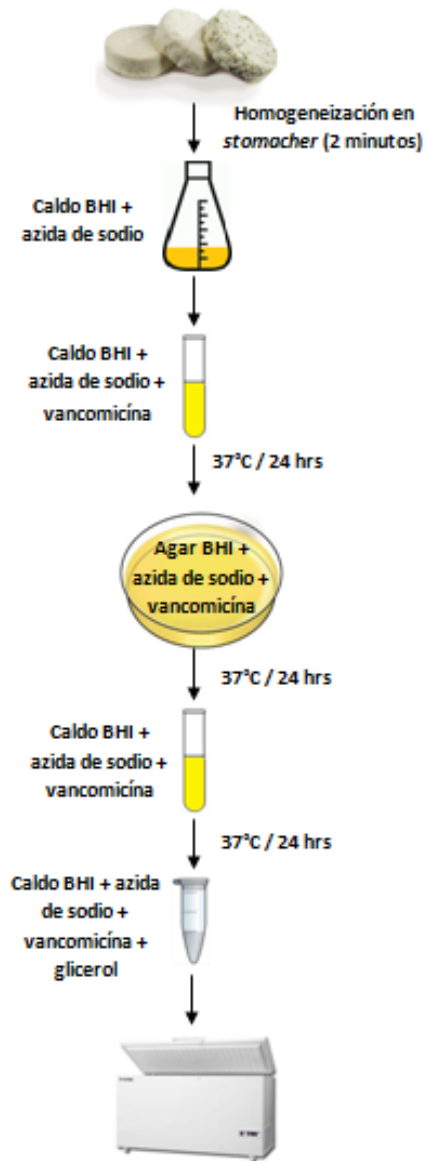
Posteriormente, se tomaron 10 mL de homogeneizado y se depositaron en un matraz con 90 mL de medio de cultivo (Infusión cerebro-corazón, BHI) con inhibidor para bacterias Gram negativas (azida de sodio) estéril y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Trascurrido el tiempo de incubación se realizó una tinción de Gram para observar la presencia o ausencia de bacterias Gram positivas. Posteriormente, se tomaron 2 mL de caldo y se depositaron en un tubo de 22x 165 cm con 18 mL de caldo BHI con azida de sodio y 35.55 µg/mL de vancomicina (Vancocin® (Fracción VI del artículo 226 de la Ley General de Salud)), con el fin de obtener una concentración final de 32 µg/mL y se incubaron nuevamente a 37°C durante 24 horas. La vancomicina utilizada fue la marca comercial Vancocin®, la cual está registrada en el gobierno y actualmente en la lista de medicamentos de venta con receta.

A término el tiempo de incubación se tomaron 100  $\mu$ L de caldo y se depositaron en una caja con agar BHI con azida de sodio y 32  $\mu$ g/mL de vancomicina, los cuales fueron extendidos con una varilla de vidrio en forma de "L" estéril. El cultivo fue incubado a 37°C durante 24 horas. Se realizaron tinciones de Gram a partir de colonias aisladas para verificar la pureza y morfología de las bacterias Gram positivas. Las cepas que no desarrollaban crecimiento en medio sólido ni en medio líquido en presencia de vancomicina fueron rechazadas.

Se suspendió 1 colonia en un tubo con 10 mL de caldo BHI con azida de sodio y 32  $\mu$ g/mL de vancomicina e incubó durante 24 horas a 37°C. Después del periodo de incubación se realizó tinción de Gram para observar la pureza y morfología de las bacterias. Al no presentar contaminación, se tomó 1 mL de caldo y se depositó en un tubo Eppendorf, el cual se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante un minuto, posteriormente se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL más, se homogeneizó y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió 3 veces más. Una vez obtenido el centrifugado de células, se agregó 1.5 mL de una solución al 70% de caldo BHI con azida de sodio y 32  $\mu$ g/mL de vancomicina y 30% de glicerol y se homogeneizó. De esta manera se obtuvieron 2 tubos Eppendorf de cada cepa, los cuales se almacenaron en un ultracongelador a -72°C para su posterior uso.

Figura 18. Diagrama de aislamiento y purificación de las cepas obtenidas



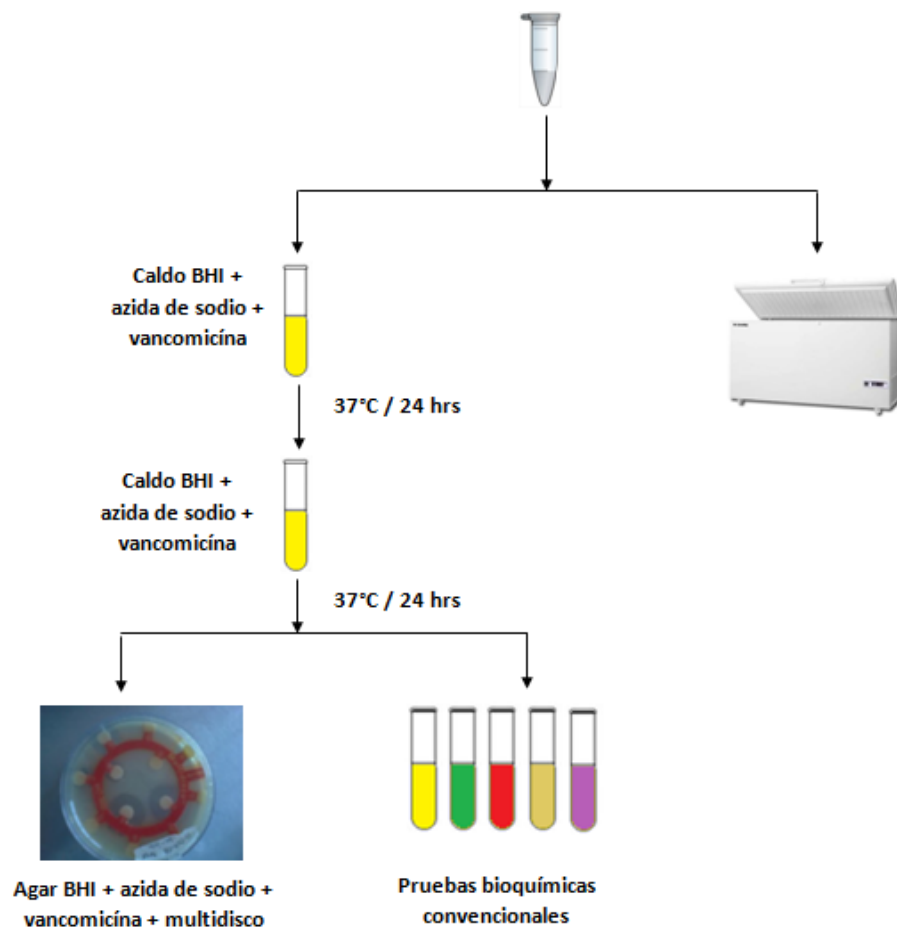
### 3.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos

Una vez que se aislaron varias cepas, se descongelaron las que se mantenían almacenadas. Se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  del caldo descongelado y se depositó en un tubo con 3 mL de caldo BHI con azida de sodio y 32  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Los tubos Eppendorf se conservaron nuevamente

en el ultracongelador a  $-72^{\circ}\text{C}$ . Con las cepas resultantes de la incubación se resembraron nuevamente tubos con el mismo medio de cultivo y se incubaron con las mismas condiciones, con el fin de utilizar cepas recuperadas en su totalidad en los posteriores experimentos.

Con las cepas de la segunda resiembra se inocularon cajas con agar Mueller-Hinton con alícuotas de  $100\ \mu\text{L}$  de las cepas y se extendieron sobre la superficie del medio con una varilla en "L". Una vez que el medio absorbió el inóculo se colocaron multidiscos de antibióticos Biorad® para Gram positivos de acuerdo con el método Bauer-Kirby. Posteriormente las cajas fueron incubadas durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al término del periodo de incubación se observó la presencia o ausencia del halo de inhibición alrededor de las muestras de antibiótico de los multidiscos y, en caso de presentarlo, se registró su tamaño.

Figura 19. Diagrama de las pruebas de sensibilidad a antibióticos e identificación bioquímica



### 3.3 Identificación bioquímica

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas a cada una de las cepas aisladas y probadas: Bilis – esculina, Catalasa, Coagulasa, Oxidación de carbohidratos (Glucosa, Lactosa, Arabinosa, Manitol, Maltosa, Sacarosa, Inulina, Sorbato, Fructosa, Galactosa, Manosa, Trehalosa), Hemolisis de sangre, Nitrato, Ornitina, Rojo de metilo, Ureasa, Voges-Proskauer.

- *Prueba de bilis-esculina*

Se inocularon las cepas en el medio comercial bilis-esculina por estría en el pico de flauta. Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 horas. El ennegrecimiento del pico de flauta o del medio, indicó que el microorganismo puede hidrolizar la esculina, por lo que se tomó como positiva la prueba.

- *Prueba de catalasa*

Se inocularon las cepas en cajas con agar BHI por cuadrante radial y se incubaron a 37°C durante 24 horas. A una colonia aislada se le agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30%. Se consideró como positiva la prueba si se observó un burbujeo inmediato, indicando la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno por acción de la enzima catalasa.

- *Prueba de coagulasa*

Se inocularon las cepas en tubos estériles con plasma humano, se agitó suavemente para suspender las células bacterianas. Se incubaron a 37°C durante 2 horas, revisando cada 30 minutos para observar si se presentaba coagulación.

- *Prueba de oxidación de carbohidratos*

Se inocularon las cepas en tubos con caldo rojo de fenol, diferentes carbohidratos (Glucosa, Lactosa, Arabinosa, Manitol, Maltosa, Sacarosa, Inulina, Sorbato, Fructosa, Galactosa, Manosa, Trehalosa) y campana Durham en el interior. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideró positiva la prueba al observarse un vire del medio a

color amarillo por acción del indicador indicando la disminución del pH debido a la degradación del carbohidrato. La presencia de gas dentro de la campana Durham indica la producción de gas a partir del uso del carbohidrato.

- *Prueba de hemólisis de sangre*

Se inocularon las cepas en cajas petri con agar sangre por estría recta. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideró como positiva la prueba al observarse un halo transparente alrededor del área de crecimiento indicando hemólisis; y pueden presentar tres tipos;  $\beta$  (hemólisis total),  $\gamma$  (no hemolíticas) y  $\alpha$  (hemólisis parcial).

- *Prueba de Nitrato*

Se inocularon las cepas en caldo nitrato y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la producción de gas dentro de la campana Durham, se agregaron 5 gotas de reactivo A ( $\alpha$ -Naftilamina) y 5 gotas de reactivo B (ácido sulfanílico), se agitó el tubo y se dejó en reposo durante 2 minutos. Se consideró como positiva la prueba el desarrollo de una coloración rosa a rojo en el medio de cultivo. En caso de haber obtenido un resultado negativo se agregó zinc al medio para inducir el desarrollo de la coloración, considerando este resultado como positivo, debido a la capacidad del microorganismo de reducir el nitrato presente en el medio a nitrito.

- *Prueba de Ornitina*

Se inocularon las cepas en medio comercial MIO, por picadura y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideró como positiva la prueba una coloración púrpura del medio, indicando la degradación de la ornitina por la acción de una enzima descarboxilasa.

- *Prueba de Rojo de metilo*

Se inocularon las cepas en tubo con medio RM/VP y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Al terminar el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 2.5 mL de medio y se agregaron 5 gotas del indicador de rojo de metilo. Se consideró como positiva la

prueba el desarrollo del color distintivo rojo brillante en la superficie del medio, lo cual indica la producción de ácidos.

- *Prueba de Ureasa*

Se inocularon las cepas en tubo con caldo urea y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideró como positiva la prueba al vire del medio a color rosa debido al aumento del pH, indicando la presencia de amoniaco debido a la hidrólisis de la urea por acción de la enzima ureasa presente en el microorganismo.

- *Prueba de Voges - Proskauer*

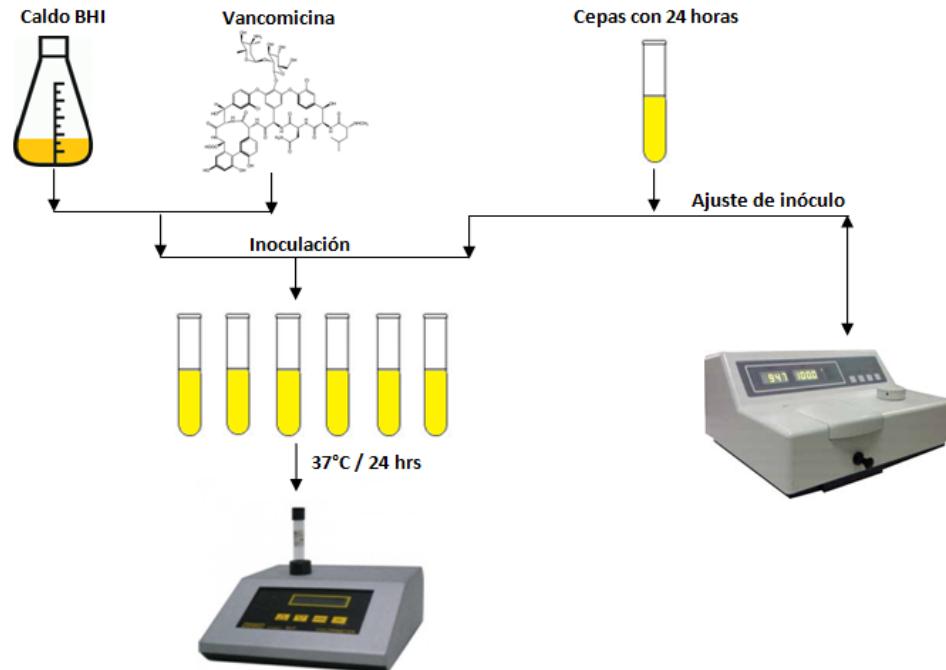
Se inocularon las cepas en tubo con medio RM/VP y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al terminar el tiempo de incubación se agregaron 3 gotas de  $\alpha$ -naftol y 1 gota de hidróxido de potasio al 40%, se agitaron los tubos suavemente durante 30 segundos y se mantuvieron en reposo durante 10 minutos favoreciendo el contacto con el oxígeno presente en el aire. Se consideró como positiva la prueba el desarrollo de un color rosa-rojo en la superficie del medio, lo cual indica la presencia de acetoína.

### 3.4 Curva dosis-respuesta a vancomicina en el crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento de los microorganismos, para lo cual se inocularon tubos con 3mL de caldo BHI a diferentes concentraciones de vancomicina (32, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con los  $\mu\text{L}$  necesarios para agregar  $10^5$  células de las cepas correspondientes medidas previamente por espectrofotometría. Se inocularon tubos sin vancomicina como control positivo y referencia del crecimiento sin sustancias inhibitorias. Los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas. También se incubaron tubos de todas las diluciones sin inóculo como control negativo. Posteriormente al periodo de incubación se registró el crecimiento bacteriano mediante un densitómetro para obtener en número de McFarland para después calcular la cantidad de células presentes en la suspensión.



Figura 20. Esquema de la curva de crecimiento en vancomicina



Por otra parte se inocularon cajas con agar para antibióticos con 100  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana con 24 horas de crecimiento y se expandió con una varilla en "L" homogéneamente. Posteriormente se realizaron pocillos de aproximadamente 5mm en el agar y se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de vancomicina a diferentes concentraciones (32, 100, 200, 400, 600 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en cada uno de ellos. En caja se colocó un pocillo en el centro con 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril como control negativo. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas y transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición observados.

### 3.5 Preparación de los extractos acuosos de especias

#### *Ajo (*Allium sativum*) fresco: Diferentes valores de pH*

Esta prueba se realizó con el objetivo de comprobar la influencia de este factor físico sobre los agentes antimicrobianos presentes, así como también demostrar que la inhibición bacteriana no se debe al pH en el que se encuentran, para poder determinar condiciones óptimas para la preparación de los extractos. Para su preparación se tomaron varias cabezas de ajo adquiridas el mismo día de la preparación del extracto, se separaron y pelaron los dientes. Se determinó la humedad de los dientes de ajo por medio de termobalanza. Posteriormente se pesaron 300 g de dientes de ajo y se homogeneizaron en una licuadora con 300 mL de agua destilada estéril. El homogeneizado se filtró con gasa para retirar los restos celulares más grandes; posteriormente el filtrado se separó en 3 partes de 100 mL cada uno, el resto se desechó. Un filtrado se ajustó a pH 4 con ácido clorhídrico concentrado, mientras que los demás se ajustaron a pH 7 y 10, respectivamente, con hidróxido de sodio 1 molar. Una vez ajustado el pH el extracto se filtró en Whatman No.1 y No 5 respectivamente, posteriormente se centrifugaron a 2,000 rpm para retirar los restos celulares y finalmente se esterilizaron por filtración en Millipore® con papel filtro de 0.22 µm de tamaño de poro (Fani, M. et al., 2007; Iwalokun, B. A., 2004).

#### *Otras especias frescas y procesadas*

Se adquirió albahaca, comino, orégano y pimienta procesados y comercializados por McCormick®, en presentaciones comerciales sumando 150 gramos y se almacenaron según las recomendaciones del fabricante.

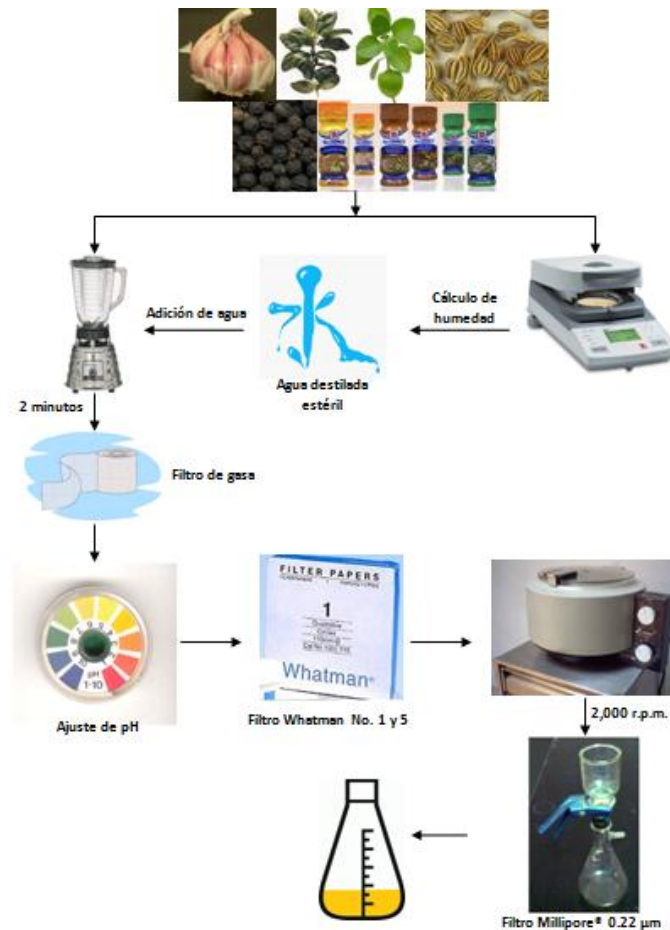
Posteriormente se adquirió comino (*Cuminum cyminum*), el cual se obtuvo el mismo día de la preparación del extracto. Se determinó la humedad del comino fresco y del comino procesado McCormick® por medio de termobalanza. Con base a los datos de humedad se calculó la cantidad de agua destilada estéril y de especia que se debía agregar para obtener unos 300 mL de extracto acuoso con la cantidad de sólidos totales presentes en el extracto de ajo fresco. Dichas cantidades se homogeneizaron

en una licuadora. El homogeneizado se filtró con gasa para retirar los restos celulares más grandes para posteriormente ajustar el pH a 4 con ácido clorhídrico concentrado. Una vez ajustado el pH el extracto se filtró en Whatman No.1 y No 5 respectivamente, posteriormente se centrifugaron a 2,000 rpm para retirar los restos celulares y finalmente se esterilizaron por filtración en Millipore® de 0.22 µm.

Los extractos frescos y procesados de albahaca (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare*), pimienta negra (*Piper nigrum*) y ajo (*Allium sativum*) procesado se prepararon con la misma metodología anteriormente mencionada.

Los extractos de albahaca y orégano frescos fueron preparados a partir de hojas que se secaron a temperatura ambiente para que perdieran agua. La humedad de dichas hojas se monitoreaba cada 24 horas en termobalanza hasta que llegaron a un valor menor a 80% y se preparó el extracto con la metodología anteriormente mencionada.

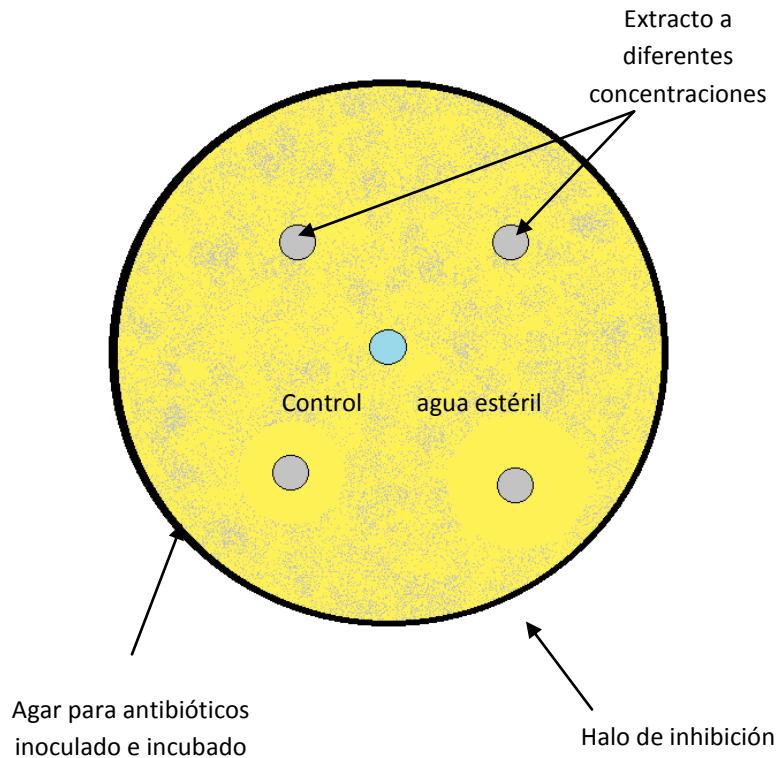
Figura 21. Diagrama de preparación de extracto acuoso de especias



### 3.6 Pruebas de sensibilidad a extractos acuosos de especias

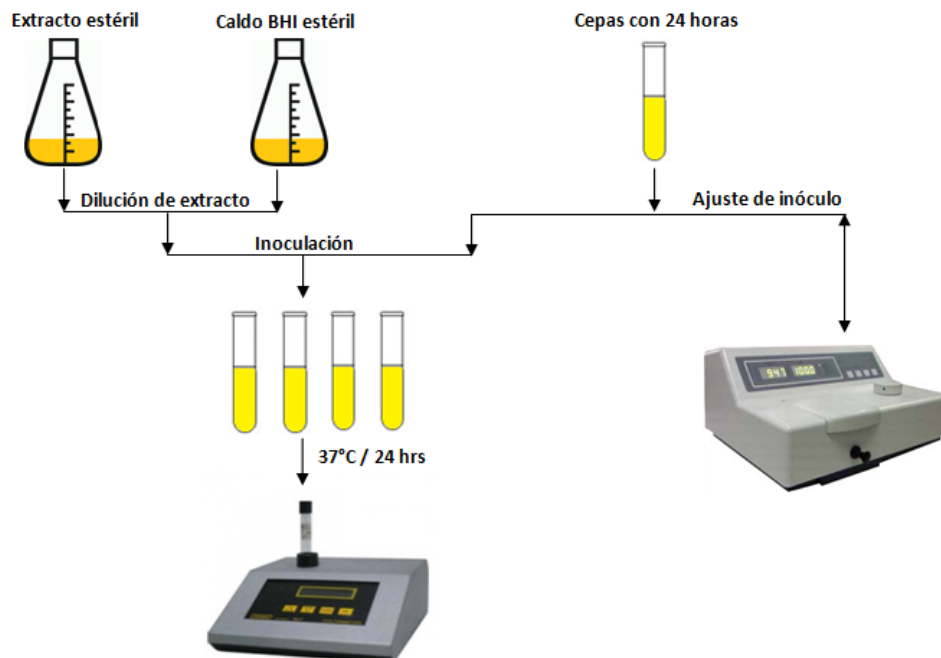
Se crecieron las cepas durante 24 horas a 37°C en caldo BHI y se tomaron 100µL de la suspensión bacteriana y se inoculó una caja con agar para antibióticos. Posteriormente se realizaron pocillos de aproximadamente 5mm en el agar y se colocaron 50µL de extracto acuoso a diferentes concentraciones en cada uno de ellos. En caja se colocó un pocillo en el centro con 50µL de agua destilada estéril como control negativo. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas y transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición observados.

Figura 22 Esquema de la prueba de sensibilidad a extractos en medio sólido



Se realizaron diluciones de los extractos para obtener soluciones con concentraciones de 75, 50 y 25% respectivamente con caldo BHI. Tubos con 3mL de dichas soluciones fueron inoculados con  $10^5$  células/mL de cepa con 24 horas de crecimiento. Se colocaron tubos con 3mL de diluciones de los extractos con BHI sin inóculo como controles negativos. Los tubos fueron incubados durante 24 horas a 37°C. Posteriormente al periodo de incubación se midió la absorbancia de los tubos por medio de un densitómetro para obtener el número de McFarland para después calcular la cantidad de células presentes en la suspensión.

Figura 23. Esquema de la prueba de sensibilidad a extractos en medio líquido



## Capítulo 4. RESULTADOS

### 4.1 Aislamiento y purificación

Al realizar tinciones de Gram se observó que el tipo de bacterias aisladas fueron Gram positivas. Cada cepa se obtuvo de una muestra diferente, debido a que el crecimiento en las cajas no presentaba más de un tipo de colonias. Algunas de estas bacterias fueron inhibidas por la vancomicina y fueron eliminadas, mientras que las bacterias que sobrevivieron al agregar el antibiótico se consideraron resistentes (Heshey Medical Center, 2006) y se conservaron. La morfología microbiana de la cepa pura era muy importante, ya que el antibiótico de interés solamente actúa contra Gram positivos.

En la Tabla 12 se muestra la procedencia de los quesos muestreados, tanto la variedad de queso como el establecimiento donde se adquirió. También se pueden observar las bacterias seleccionadas.

Tabla 12. Resultados del aislamiento de bacterias, su procedencia y selección

Código	Tipo de queso	Procedencia	Presencia de bacterias Gram positivas	Resistencia a vancomicina
1	Cotija	Tianguis Bosques del Valle (Coacalco)	SI	NO
2	Cotija	Tianguis Bosques del Valle (Coacalco)	SI	NO
3	Panela	Tianguis Bosques del Valle (Coacalco)	SI	NO
A	Parmesano	Kraft	SI	NO
B	Panela	Cafetería "Tultitlán"	SI	NO
C	Oaxaca	Lala	SI	NO
D	Oaxaca	Cafetería "Tultitlán"	SI	SI
E	Oaxaca	Cafetería Coacalco	SI	SI
F	Oaxaca	Casa San Juan (Tultitlán)	SI	SI
G	Oaxaca	Mercado "Villa de las flores" (Coacalco)	SI	SI
H	Botanero	Casa San Juan (Tultitlán)	SI	SI
I	Botanero con	Casa láctea "Teya" (Tultitlán)	SI	SI

	chile			
J	Oaxaca	Casa láctea “Teya” (Tultitlán)	SI	SI
K	Panela	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	SI	SI
L	Ranchero	Casa San Juan (Tultitlán)	SI	SI
M	Botanero con chipotle	Casa láctea “Teya” (Tultitlán)	SI	SI
N	Panela	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	SI	SI
N	De Morral	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	SI	SI
O	Gouda	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	SI	SI
P	Cotija	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	SI	SI
Q	Manchego	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	SI	NO
R	Canasto	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	SI	SI
S	Panela	Producido en Coyoacán con leche de Casa Láctea “Teya” (Tultitlán)	SI	SI
T	Panela (Rayado)	Marca “La villita”	SI	SI
U	Manchego	Casa San Juan (Tultitlán)	SI	SI
V	Oaxaca	Frankly	SI	SI
W	Manchego	Establo San Miguel	SI	SI
X	Cotija	Establo San Miguel	SI	SI
Y	Oaxaca	Artesanal comercializado en Mega Comercial Mexicana Coacalco	SI	SI
Z	Asadero	Marca “Aguascalientes”	SI	NO

#### 4.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos

Como se mencionó en el capítulo 3, las cepas se sometieron a una prueba de sensibilidad a antibióticos, por lo que en la tabla 13 se presentan los resultados del antibiograma, observándose la suma de los antibióticos a los cuales fueron total y medianamente resistentes, incluyendo a la vancomicina.

Tabla 13. Antibiograma de las cepas resistentes a vancomicina

Cepa	Peni	Peflo	CXM	CTX	SXT	Amp	Eritr	Clor	Diclo	Gent	TE	CAZ	Total
D	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	3
E	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	R	7
F	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	11
G	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	6
H	R	R	S	S	R	S	S	I	R	S	S	R	7
I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	I	S	R	7
J	R	R	S	R	R	R	S	S	R	I	S	R	9
K	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	7
L	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	6
M	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	6
N	R	R	S	S	R	S	S	S	R	I	S	R	7
Ñ	R	R	S	S	R	S	S	S	R	I	S	R	7
O	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
P	I	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	6
R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
T	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	2
U	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	4
V	R	R	S	S	R	R	S	I	R	S	I	R	9
W	R	R	S	S	R	S	S	S	R	I	R	R	8
X	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	11
Y	R	R	S	S	R	S	S	I	I	R	R	I	9

*Referencias:*

Resistente (R): Sin halo de inhibición

Intermedia (I): La CMI del antibiótico no es la suficiente para inhibir por completo al microorganismo, aún es sensible al agente, sin embargo puede desarrollar por completo la resistencia.

Sensible (S): La CMI del antibiótico es suficiente para inhibir al microorganismo

Cepas en color verde: Se descartaron ya que fueron sensibles a menos de 5 antibióticos probados

Cepas en color amarillo: Se conservaron ya que fueron resistentes a más de 5 antibióticos probados

### 4.3 Identificación bioquímica

La tabla 14 muestran los resultados de las pruebas bioquímicas, mientras que en la tabla 15 se muestran el género y la especie de las bacterias caracterizadas de las bacterias resistentes a 5 o más antibióticos incluyendo vancomicina



Tabla 14. Resultados de las pruebas bioquímicas

Prueba	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	P	V	W	X	Y
Esc	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Cat		-	+			+			+		+	-	+			
Coag		+	-			-			+		-	+	-			
Arb		-	-			-			-		-	-	-			
Fru		+	+			+			+		+	+	-			
Gal		-	+			-			+		-	-	+			
Glu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inu	-			+	+		+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Lac	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Mal		+	+			+			+		+	+	+			
Mnl	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Mno		-	-			-			+		+	-	-			
Raf	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Sac		+	+			+			+		+	+	+			
Sal	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Srb	+			-	+		-	+		-				+	+	+
Tre	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Hemo	γ			γ	γ		γ	γ		γ				Γ	γ	Γ
NO <sub>2</sub>		-	-			-			+		-	-	+			
Orn		+	-			-			-		-	+	-			
RM	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ure		-	+			-			+		+	+	-			
VP	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Referencias:

**Esc:** Hidrólisis de esculina; **Cat:** Catalasa; **Coag:** Coagulasa; **Arb:** Oxidación de alabinosa; **Fru:** Oxidación de fructosa; **Gal:** Oxidación de galactosa ; **Glu:** Oxidación de glucosa ; **Inu:** Oxidación de inulina ; **Lac:** Oxidación de lactosa ; **Mal:** Oxidación de maltosa ; **Mnl:** Oxidación de manitol; **Mno:** Oxidación de manosa ; **Raf:** Oxidación de rafinosa; **Sac:** Oxidación de sacarosa; **Srb:** Oxidación de sorbato; Tre: Oxidación de trehalosa; **Hemo:** Hidrólisis de hemoglobina; **NO<sub>2</sub>:**Reduccion de nitrato; **Orn:** Presencia de ornitina descarboxilasa; **RM:** Producción de ácidos; **Ure:** Presencia de ureasa; **VP:** Producción de acetoina.

Tabla 15. Género y especie de las cepas aisladas

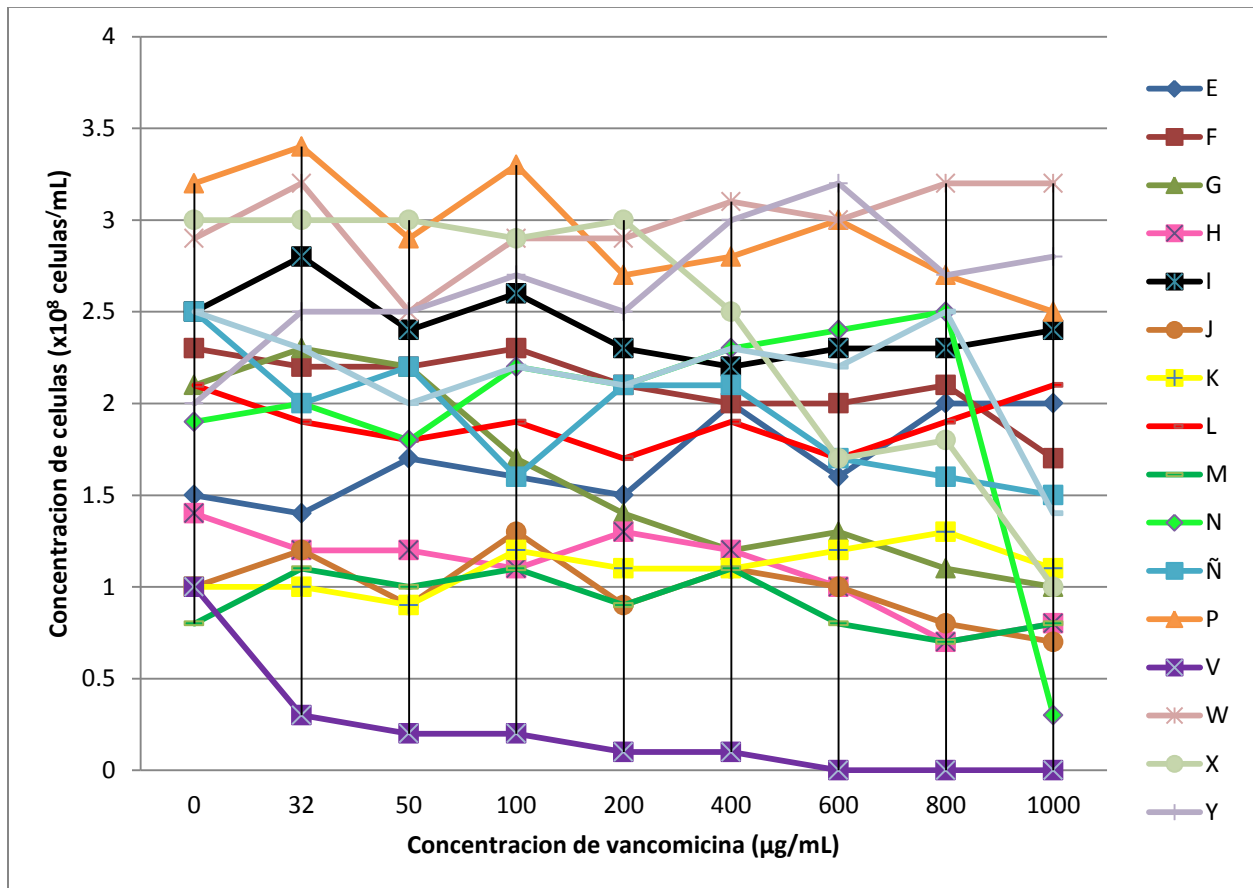
Cepa	Identidad del microorganismo
E	<i>Streptococcus porcinus</i>
F	<i>Staphylococcus aureus</i>
G	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
H	<i>Streptococcus salivarius</i>
I	<i>Streptococcus mitis</i>
J	<i>Staphylococcus auricularis</i>
K	<i>Streptococcus salivarius</i>
L	<i>Streptococcus mutans</i>

M	<i>Staphylococcus aureus</i>
N	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Ñ	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
P	<i>Staphylococcus aureus</i>
V	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
W	<i>Streptococcus porcinus</i>
X	<i>Streptococcus mutans</i>
Y	<i>Streptococcus mutans</i>

#### 4.4 Curva dosis-respuesta a vancomicina en el crecimiento

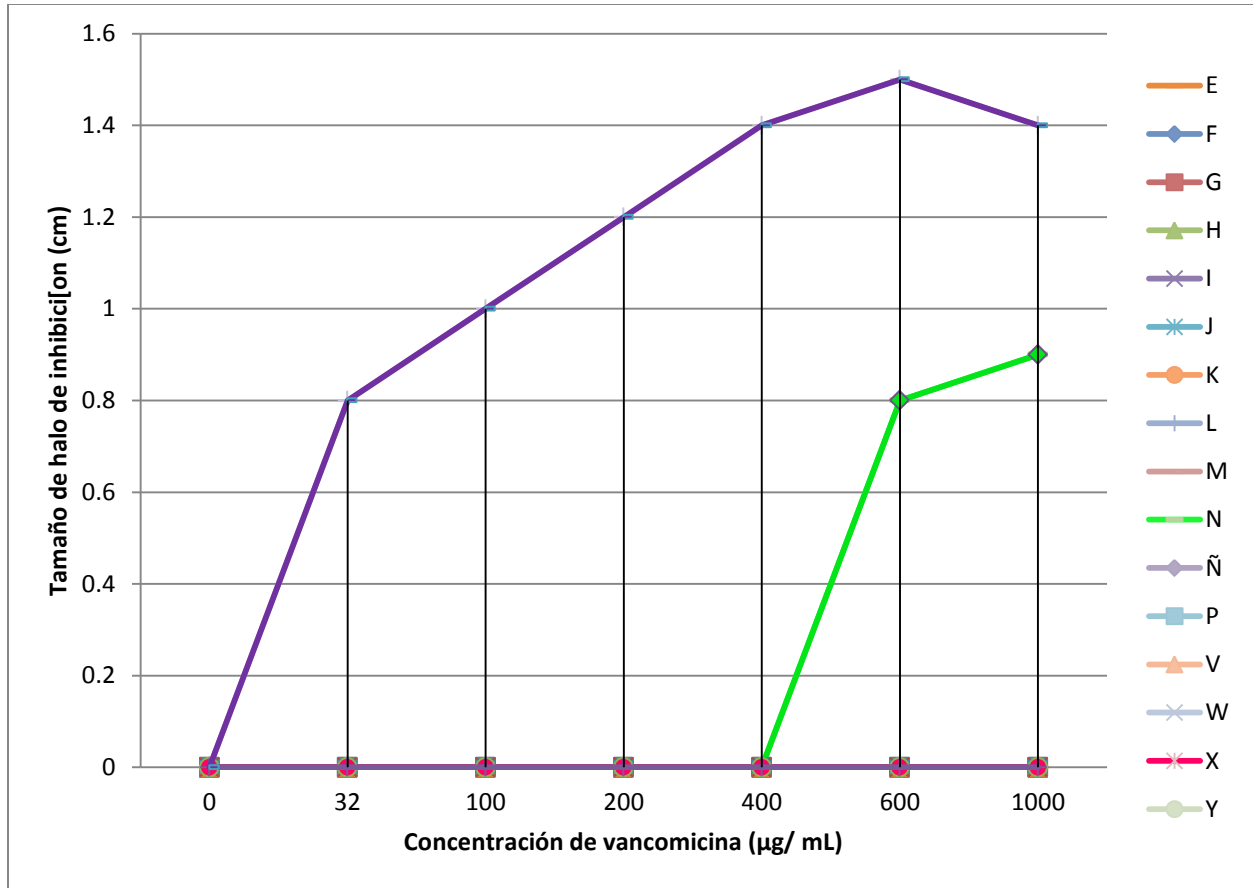
En la grafica 1 se muestra la curva de crecimiento de las cepas en presencia del antibiótico vancomicina, resaltando que el crecimiento de las cepas es heterogéneo, mientras que la resistencia al antibiótico, hasta la concentración más alta, la presentan prácticamente todas las cepas (87.5%)

Grafica 1. Curva de crecimiento de las cepas en vancomicina



Como se puede observar en la gráfica número 1 la cepa “V” es la menos resistente, mientras que la cepa “N” se ve inhibida a altas concentraciones de vancomicina. Esta tendencia se presenta nuevamente al realizar la prueba en medio sólido (Gráfica 2), lo cual confirma lo antes mencionado.

Gráfica 2 Prueba de difusión en agar de vancomicina



#### 4.5 Preparación de los extractos acuosos de especias

En la Tabla 16 se muestran los datos obtenidos de la humedad de las especias y las cantidades calculadas de agua y especia de la preparación de los extractos acuosos

Tabla 16. Datos de la preparación de extractos.

Especia	Humedad	Peso	Agua agregada
Ajo fresco	59.97 %	150 g	150 mL
Ajo McCormick	4,64 %	62.96 g	237.04 mL
Albahaca fresca	78.16 %	274.93 g	25.07 mL
Albahaca McCormick	5,40 %	63.47 g	236.53 mL
Comino fresco	48.15 %	115.8 g	184.2 mL
Comino McCormick	4,96 %	63.18 g	238.82 mL
Oregano fresco	11.85 %	213.3 g	86.7 mL
Oregano McCormick	5.06 %	63.24 g	236.76 mL
Pimienta fresca	20.53 %	73.56 g	225.44 mL
Pimienta McCormick	4.88 %	63.12 g	236.88 mL

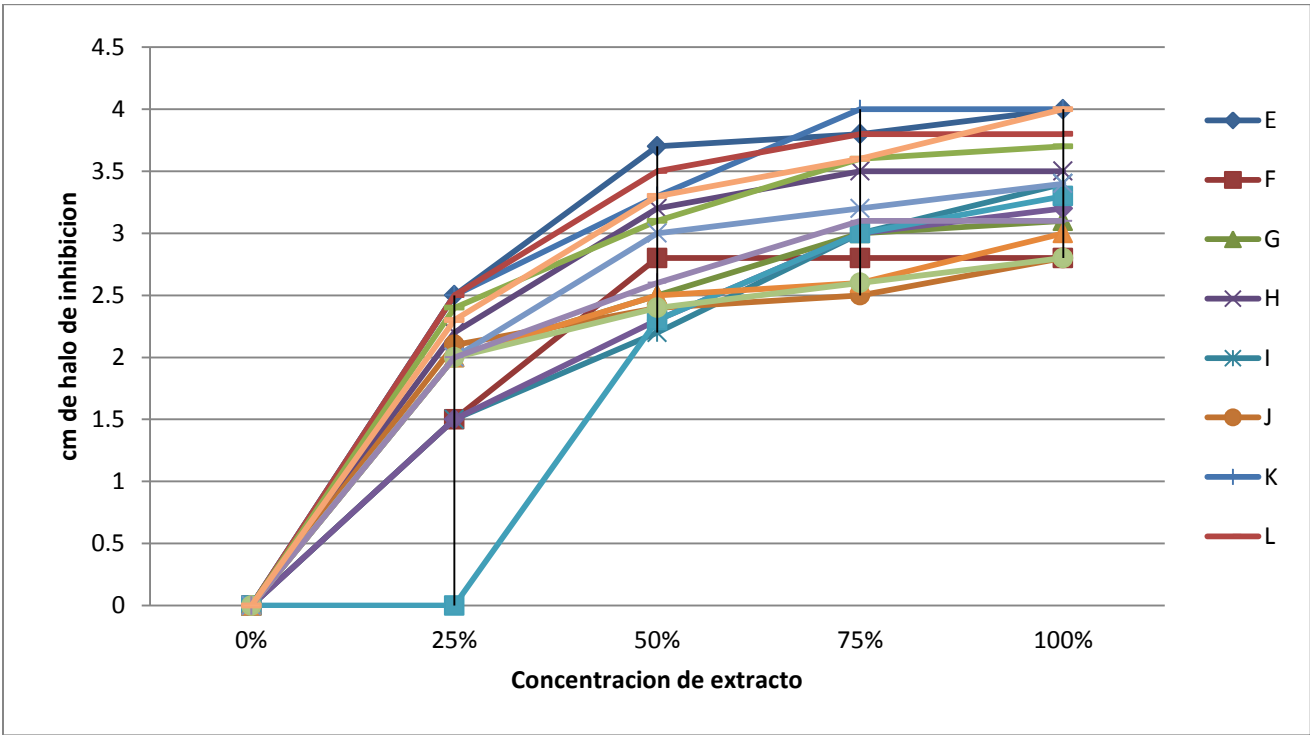
#### 4.6 Pruebas de sensibilidad a extractos acuosos de especias

##### *4.6.1 Ajo fresco: Diferentes valores de pH*

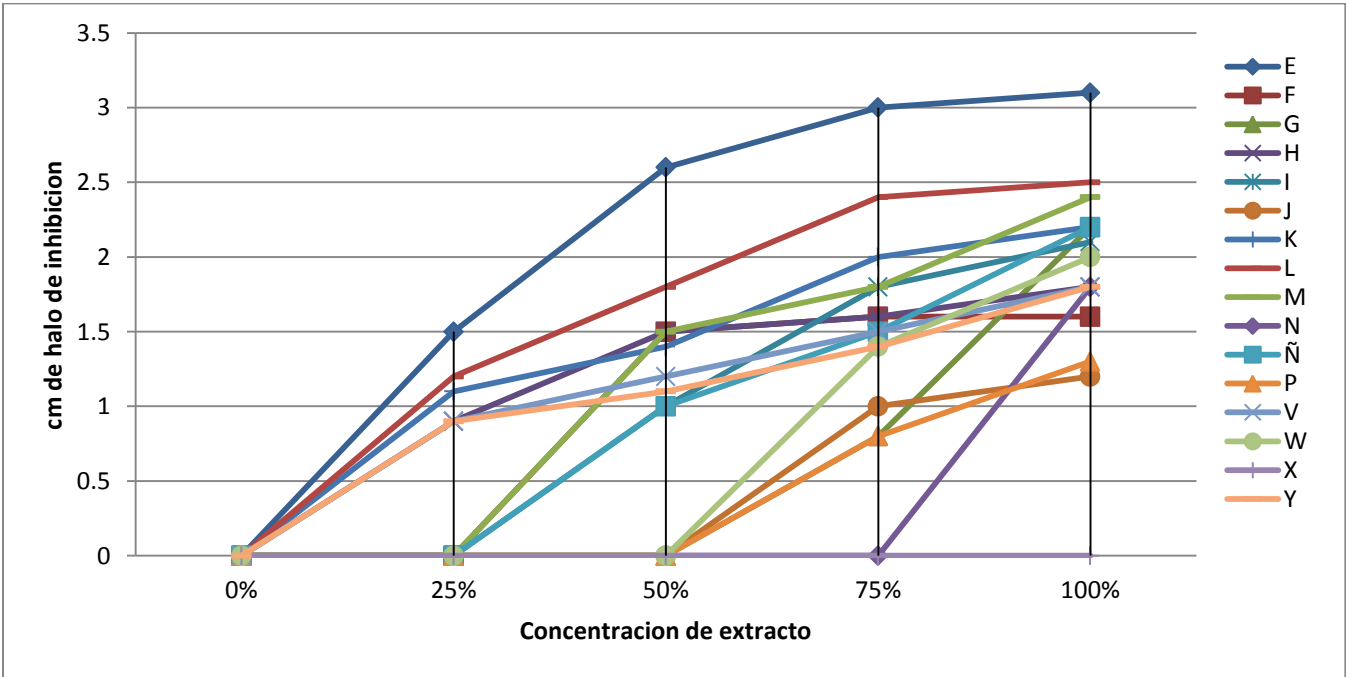
En las gráficas 3, 4 y 5 se demuestra el comportamiento de las cepas en medio sólido frente a los extractos de ajo a diferentes pH. Claramente se puede ver una disminución en la actividad antimicrobiana al aumentar la alcalinidad. También se puede observar que el pH no inhibe el crecimiento, debido a que la concentración 0% no presentó inhibición.

Esta misma tendencia se presenta nuevamente en medio líquido, representadas en las gráficas 6, 7 y 8. El crecimiento de bacterias en medio líquido no se ve inhibido totalmente, mientras que en medio sólido se observa un halo de inhibición igual al de bacterias inhibidas totalmente.

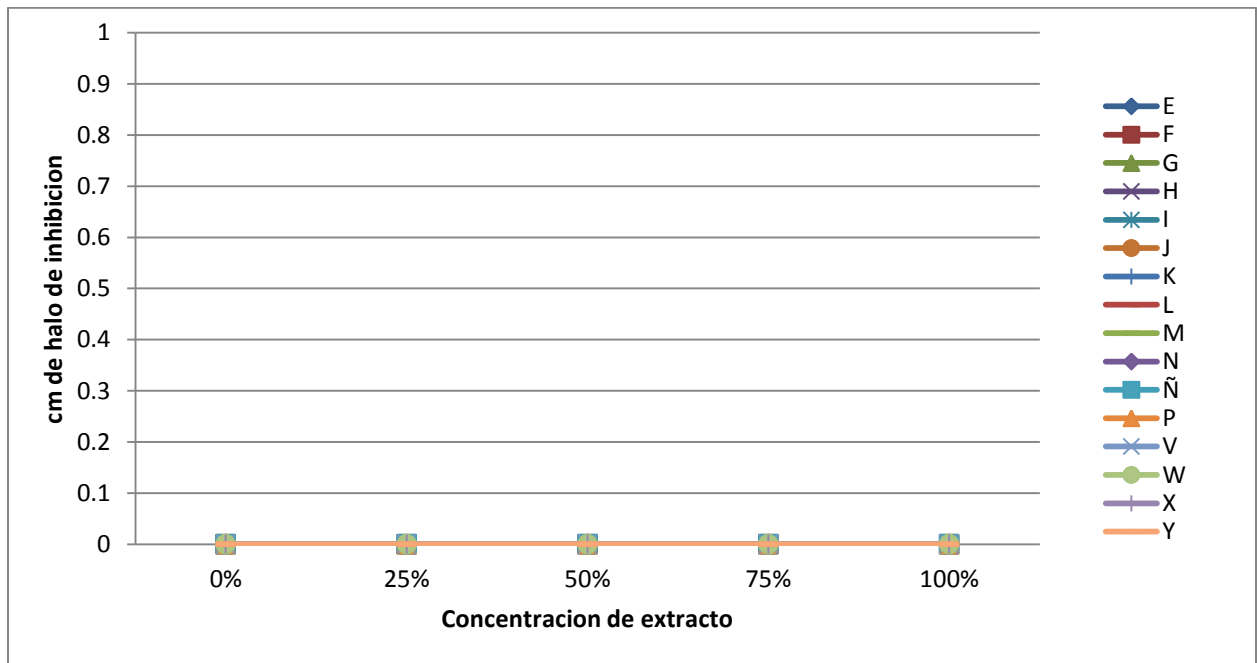
Gráfica 3. Comportamiento de las cepas en medio sólido a extracto de ajo fresco pH 4



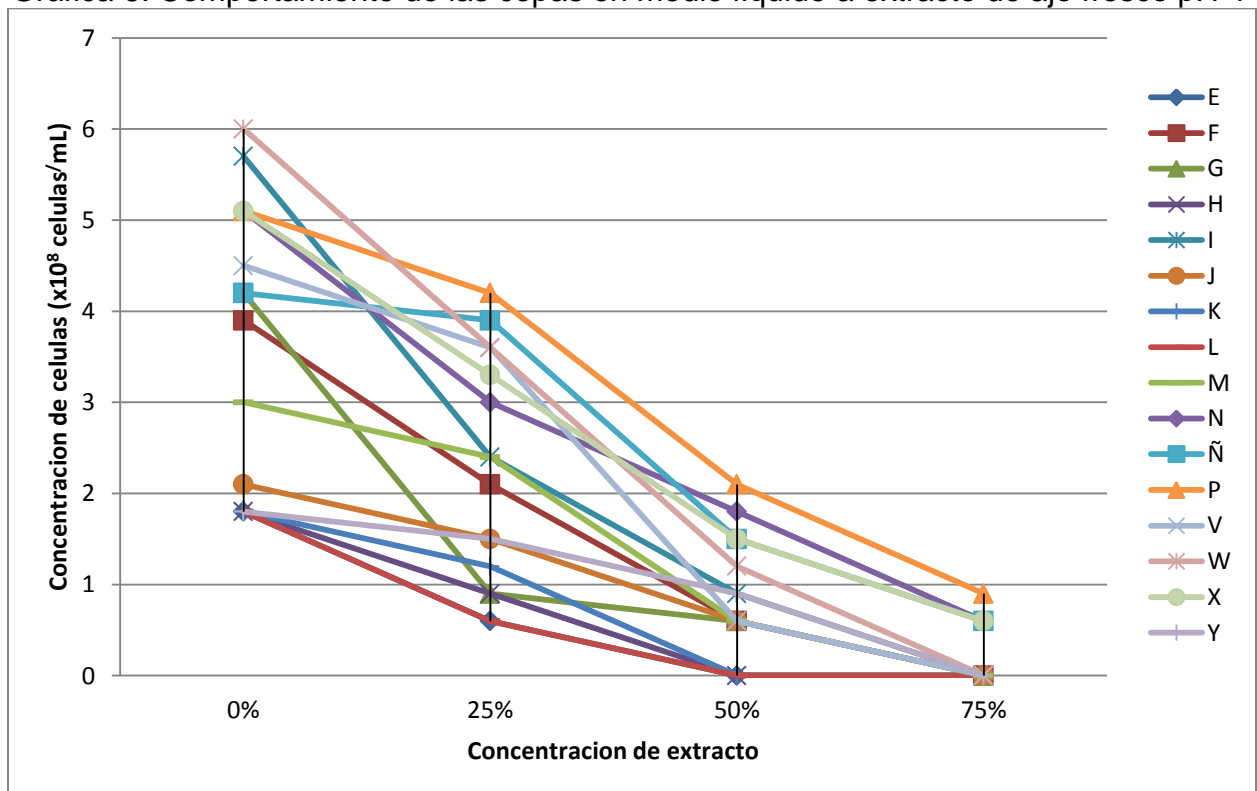
Gráfica 4. Comportamiento de las cepas en medio sólido a extracto de ajo fresco pH 7



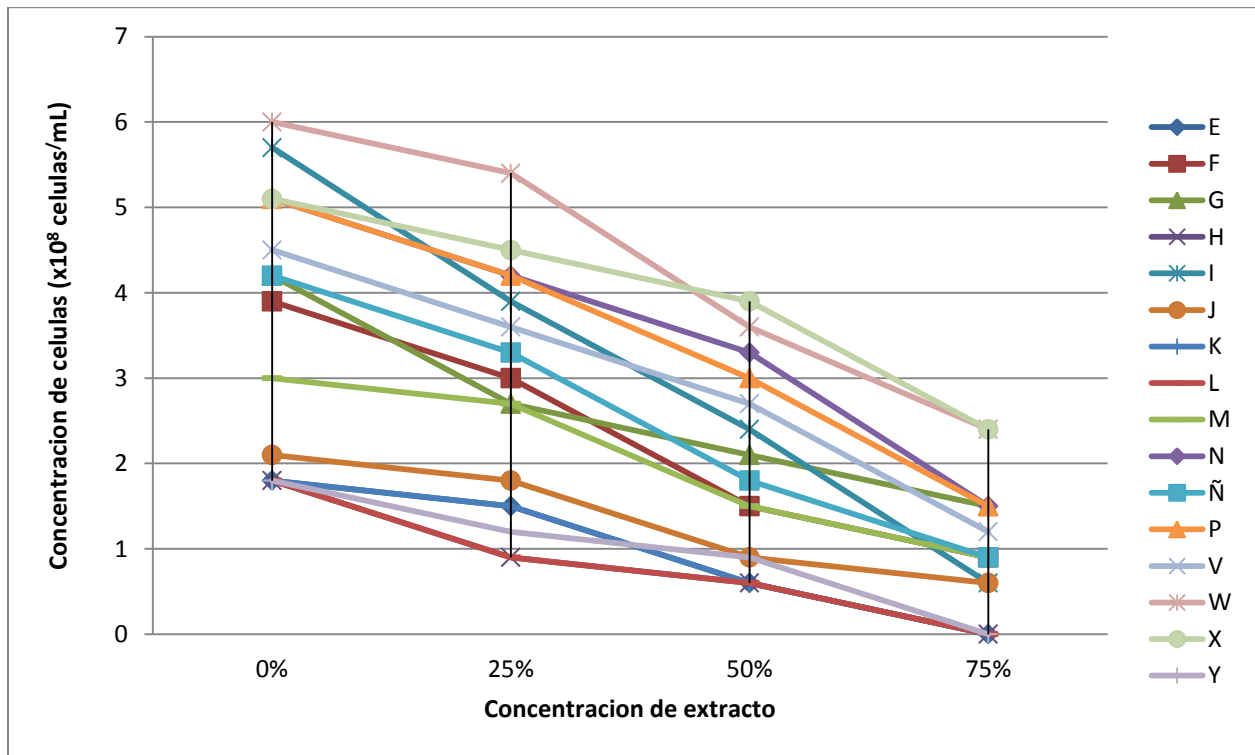
Gráfica 5. Comportamiento de las cepas en medio sólido a extracto de ajo fresco pH 10



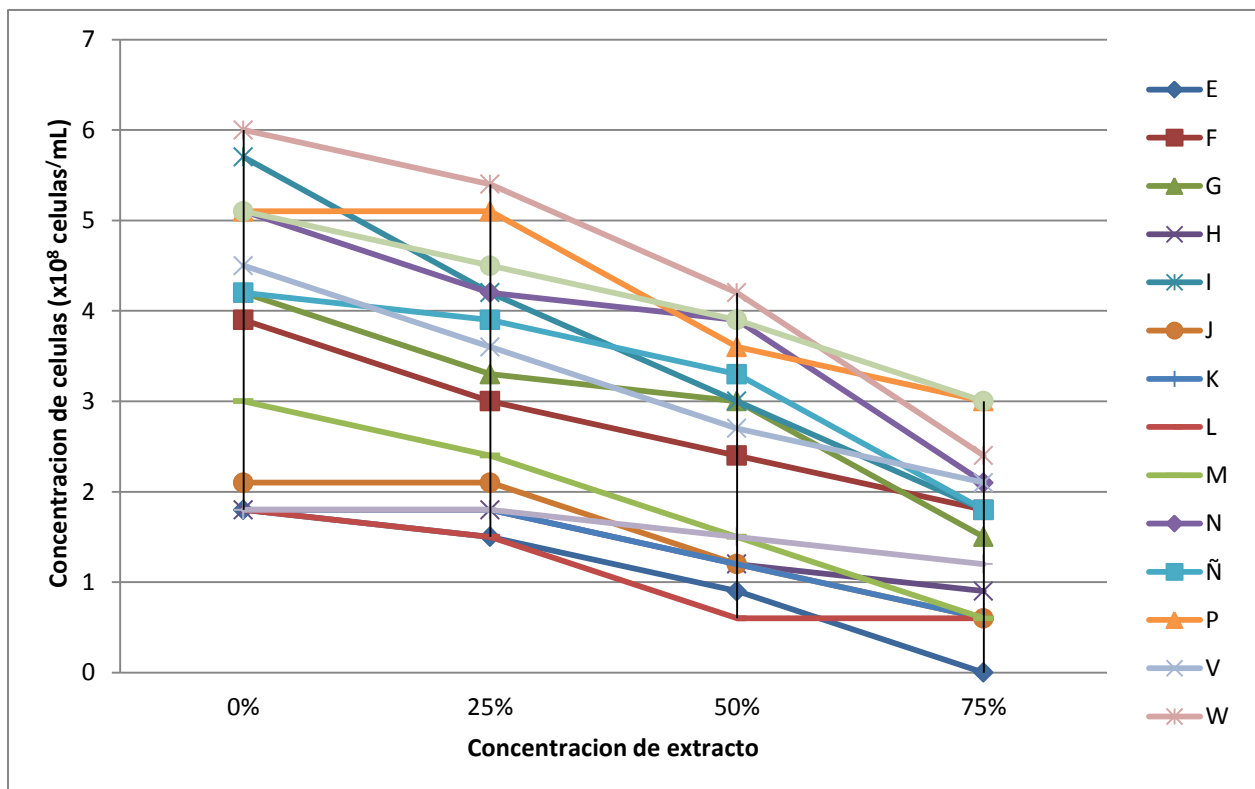
Gráfica 6. Comportamiento de las cepas en medio líquido a extracto de ajo fresco pH 4



Gráfica 7. Comportamiento de las cepas en medio líquido a extracto de ajo fresco pH 7



Gráfica 8. Comportamiento de las cepas en medio líquido a extracto de ajo fresco pH 10



#### 4.6.2 Otras especias frescas y procesadas

En las tablas 17,18, 19, 20 y 21 se presentan los datos en centímetros del diámetro del halo de inhibición. En la tabla 17 se puede observar un mayor tamaño de halo en el extracto de ajo fresco en comparación con el realizado de ajo procesado, así como también si la concentración del extracto disminuye, el diámetro también, de manera no proporcional, hasta un punto en que la inhibición decrece drásticamente. Estas tendencias se presentan nuevamente en las otras especias.

Tabla 17. Tamaño del halo de inhibición en cm de extracto de AJO fresco y procesado a diferentes concentraciones para cada cepa

Cepa	0%	25%		50%		75%		100%	
	C	F	P	F	P	F	P	F	P
E	0	2.5	0	3.7	1.1	3.8	1.5	4	1.8
F	0	1.5	0	2.8	0	2.8	0	2.8	0
G	0	2	0	2.5	0	3	0	3.1	1
H	0	2.2	0	3.2	1.3	3.5	1.6	3.5	1.9
I	0	1.5	1	2.2	1.2	3	1.5	3.4	2.1
J	0	2.1	0	2.4	0	2.5	0.9	2.8	0.9
K	0	2.5	0	3.3	1.2	4	1.4	4	1.6
L	0	2.5	0	3.5	0.9	3.8	1.2	3.8	1.5
M	0	2.4	0	3.1	0	3.6	1	3.7	1.3
N	0	1.5	0	2.3	0	3	0	3.2	0
Ñ	0	0	0	2.3	0	3	0.9	3.3	1.2
P	0	2	0	2.5	0.9	2.6	1	3	1.2
V	0	2	0	3	0	3.2	0	3.4	0
W	0	2	0	2.4	0	2.6	0	2.8	0
X	0	2	0	2.6	0	3.1	0	3.1	0
Y	0	2.3	0	3.3	0	3.6	0	4	1

C=Control; F= Especia fresca; P= Especia procesada



Tabla 18. Tamaño del halo de inhibición en cm de extracto de ALBAHACA fresco y procesado a diferentes concentraciones para cada cepa

Cepa	0%	25%		50%		75%		100%	
	C	F	P	F	P	F	P	F	P
E	0	0.9	0	1.3	0	2	0	2.4	1
F	0	1.3	0	1.5	0	1.8	0	2	1
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0.9	0	1.2	0	2.2	1
I	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0
J	0	0	0	0	0	1	0	1.2	0
K	0	0	0	0	0	0	0	1.1	0
L	0	0	0	0	0	1.4	1	1.6	1
M	0	0	0	1.2	0	1.6	0	2	0
N	0	0	0	0	0	1.2	0	1.5	0
Ñ	0	0	0	0	0	1.2	0	1.5	0
P	0	0	0	1.2	0.7	1.3	1	2.1	1
V	0	0	0	0	0	0.9	0	1	0
W	0	0	0	0	0	1	0	1.1	0
X	0	0	0	0	0	0	0	0.9	0
Y	0	0	0	1	0	1.2	0	1.4	0

C=Control; F= Especia fresca; P= Especia procesada

Tabla 19. Tamaño del halo de inhibición en cm de extracto de COMINO fresco y procesado a diferentes concentraciones para cada cepa

Cepa	0%	25%		50%		75%		100%	
	C	F	P	F	P	F	P	F	P
E	0	0	0	1.6	1.7	2.6	2.3	4	3.1
F	0	0	0	0	0	0.7	0	1	0
G	0	0	0	0.8	0	1	0	1.2	0
H	0	0	0	0	0	1.2	0	2.1	1
I	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0
J	0	0	0	0	0	0.9	0	1.3	0
K	0	0	0	0.8	0	1.2	0	1.6	0
L	0	0	0	0.7	0	1	0	1.5	0

M	0	0	0	0	0	0.8	0	1.1	0
N	0	0	0	0	0	0.9	0	1	0
Ñ	0	0	0	0	0	1.6	0	2.3	0.8
P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0.6	0	0.9	0	1.6	0
W	0	0	0	0	0	0.8	0	1.2	0
X	0	0	0	1	0	1	0	1	0
Y	0	0	0	0	0	0.7	0	1.1	0

C=Control; F= Especia fresca; P= Especia procesada

Tabla 20. Tamaño del halo de inhibición en cm de extracto de OREGANO fresco y procesado a diferentes concentraciones para cada cepa

Cepa	0%	25%		50%		75%		100%	
	C	F	P	F	P	F	P	F	P
E	0	0	0	1.1	1.1	1.5	1.5	2	2
F	0	0	0	0	0	1.2	1.2	1.4	1.6
G	0	0	0	0	0	1.2	1	1.6	1.3
H	0	1	1	1.3	1.2	1.6	1.5	2.4	1.9
I	0	0	0	0	0	0	0	1.4	1.2
J	0	0	0	1	0.8	1.4	1	2.2	1.4
K	0	0	0	0	0	1.2	1.2	1.6	1.4
L	0	0	0	1	1	1.5	1.6	2	2.1
M	0	1	1.1	1.2	1.3	1.6	1.3	1.9	1.5
N	0	0	0	0.8	0.8	1.2	1.2	1.4	1.4
Ñ	0	0	0	0.9	0.8	1.1	1.1	1.4	1.4
P	0	0.9	1	1.2	1	1.2	1.3	1.5	1.6
V	0	0	0	0	0	1.1	1	1.4	1.3
W	0	0	0	0	0	1	0.9	1.5	1.1
X	0	0	0	0	0	1	1.2	1.4	1.3
Y	0	0	0	0	0	1.4	1.1	2.1	1.6

C=Control; F= Especia fresca; P= Especia procesada

Tabla 21. Tamaño del halo de inhibición en cm de extracto de PIMIENTA fresco y procesado a diferentes concentraciones para cada cepa

Cepa	0%	25%		50%		75%		100%	
	C	F	P	F	P	F	P	F	P
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ñ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C=Control; F= Especia fresca; P= Especia procesada

Como se observó en las graficas anteriores, los extractos realizados a partir de especias procesadas generalmente presentan un menor efecto inhibitorio en comparación con los realizados de especias frescas. También se puede observar que algunas cepas son mucho más resistentes que otras pero en general presentan la misma tendencia.

Por otra parte, los comportamientos en medio líquido de cada cepa se presentan de las gráficas 22 a 37. Se puede observar como reaccionaron cada una de las cepas de trabajo, sin embargo, la tendencia de las gráficas es similar, al ser inhibidas de manera parecida por los distintos tipos de especias y tratamientos térmicos.

Tabla 22. Comportamiento de la cepa "E" (*Streptococcus porcinus*) frente a extracto de especias

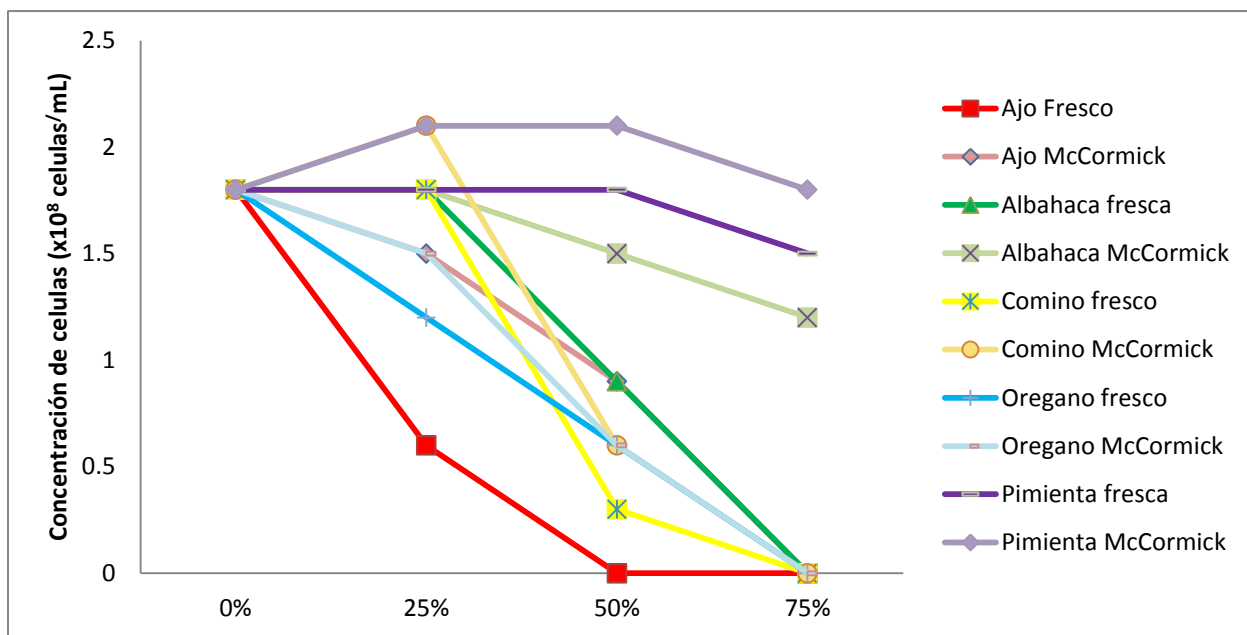


Tabla 23. Comportamiento de la cepa "F" (*Staphylococcus aureus*) frente a extracto de especias

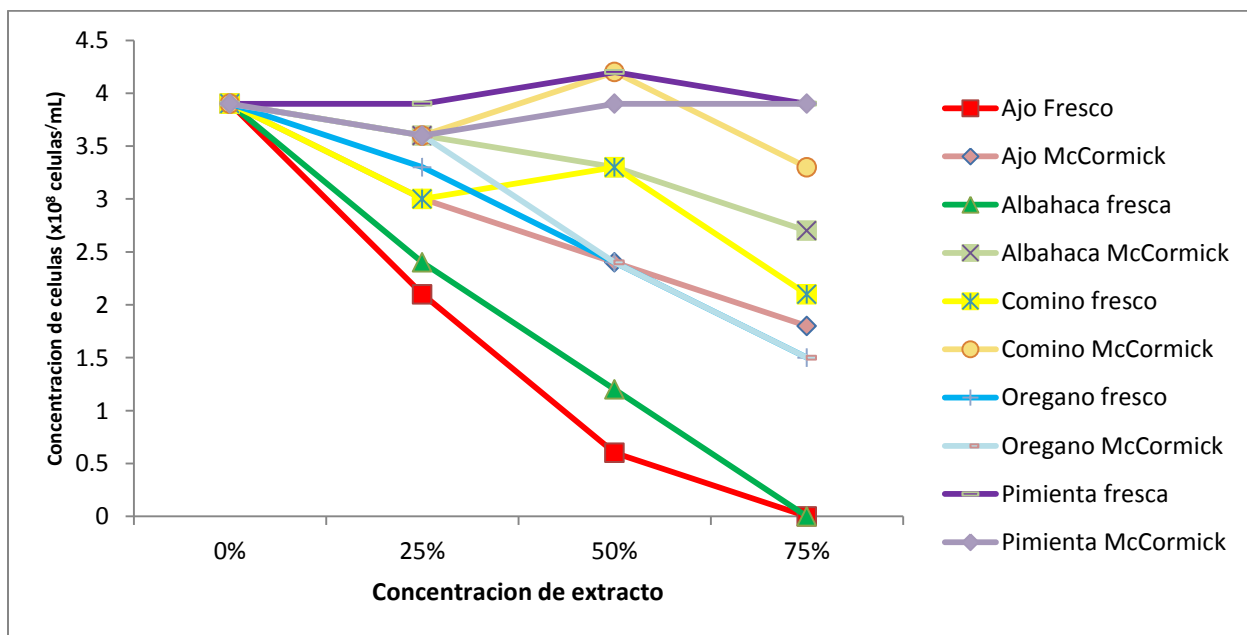


Tabla 24. Comportamiento de la cepa "G" (*Staphylococcus epidermis*) frente a extracto de especias

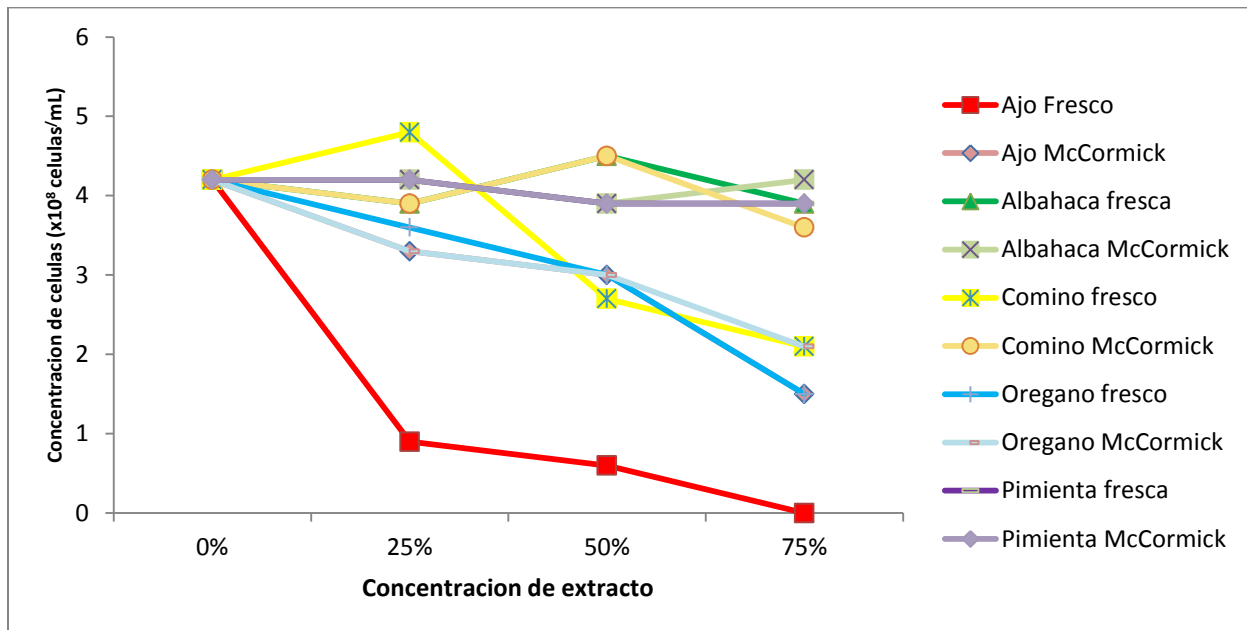


Tabla 25. Comportamiento de la cepa "H" (*Streptococcus salivarius*) frente a extracto de especias

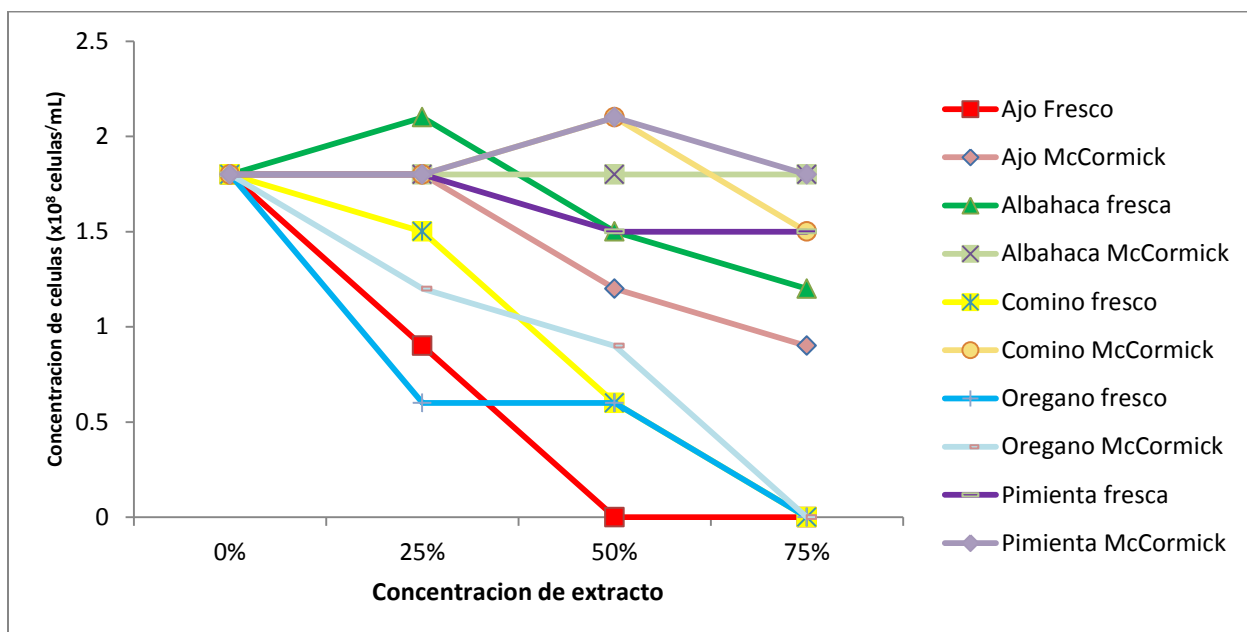


Tabla 26. Comportamiento de la cepa "I" (*Streptococcus mitis*) frente a extracto de especias

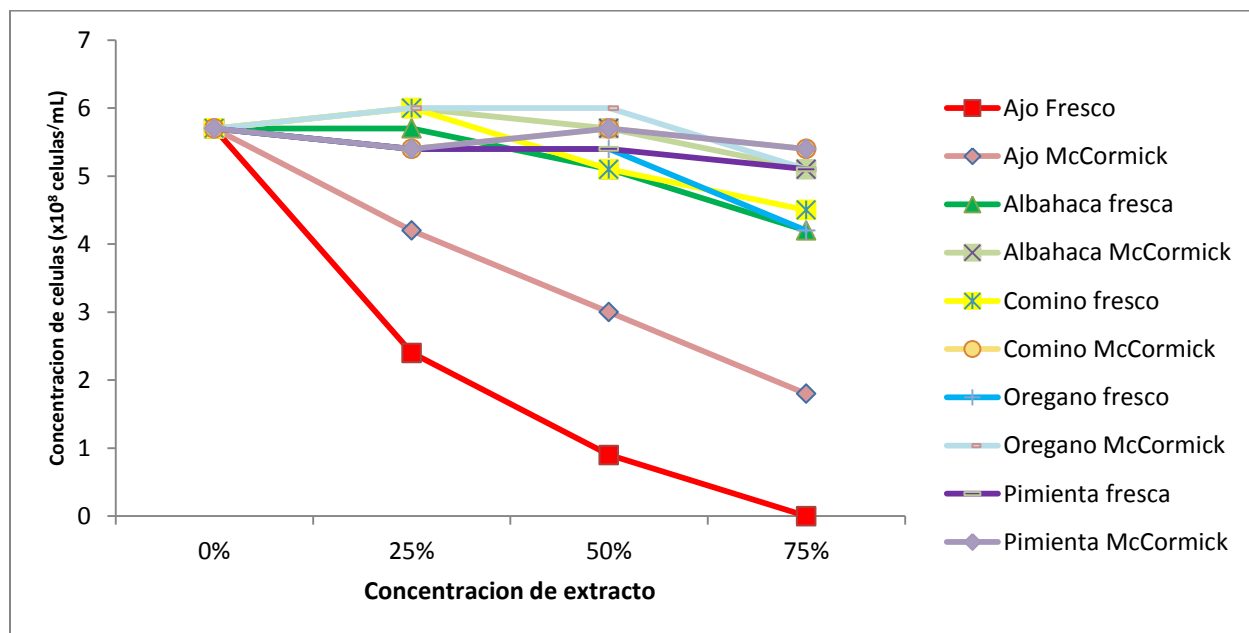


Tabla 27. Comportamiento de la cepa "J" (*Staphylococcus auricularis*) frente a extracto de especias

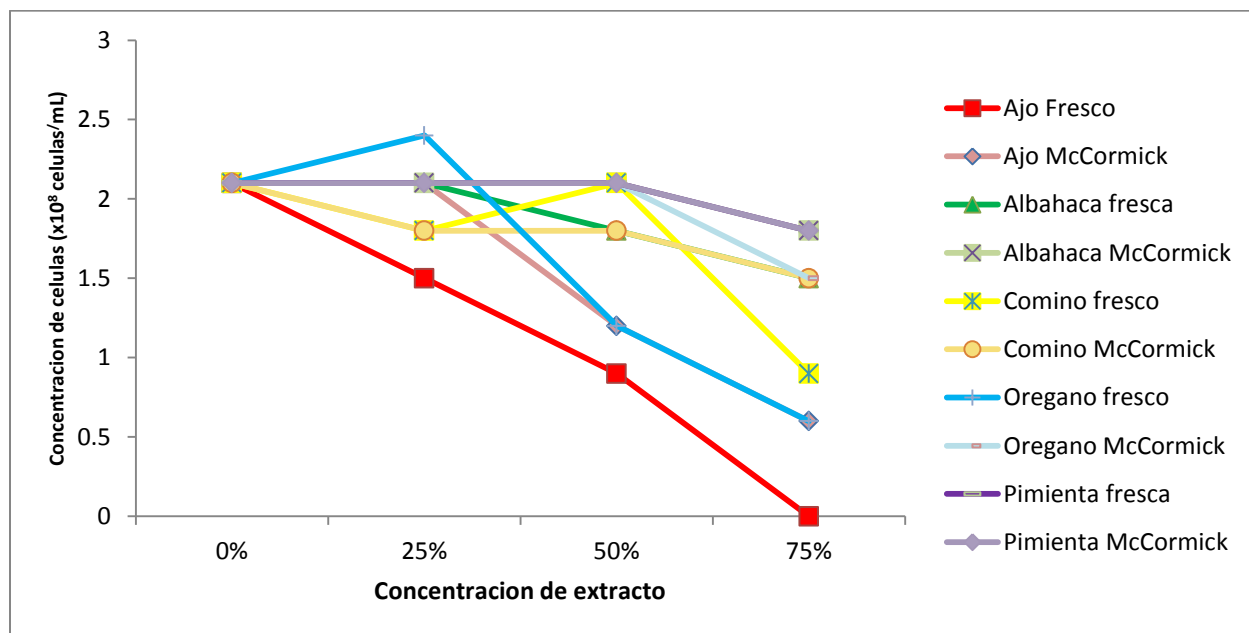


Tabla 28. Comportamiento de la cepa "K" (*Streptococcus salivarius*) frente a extracto de especias

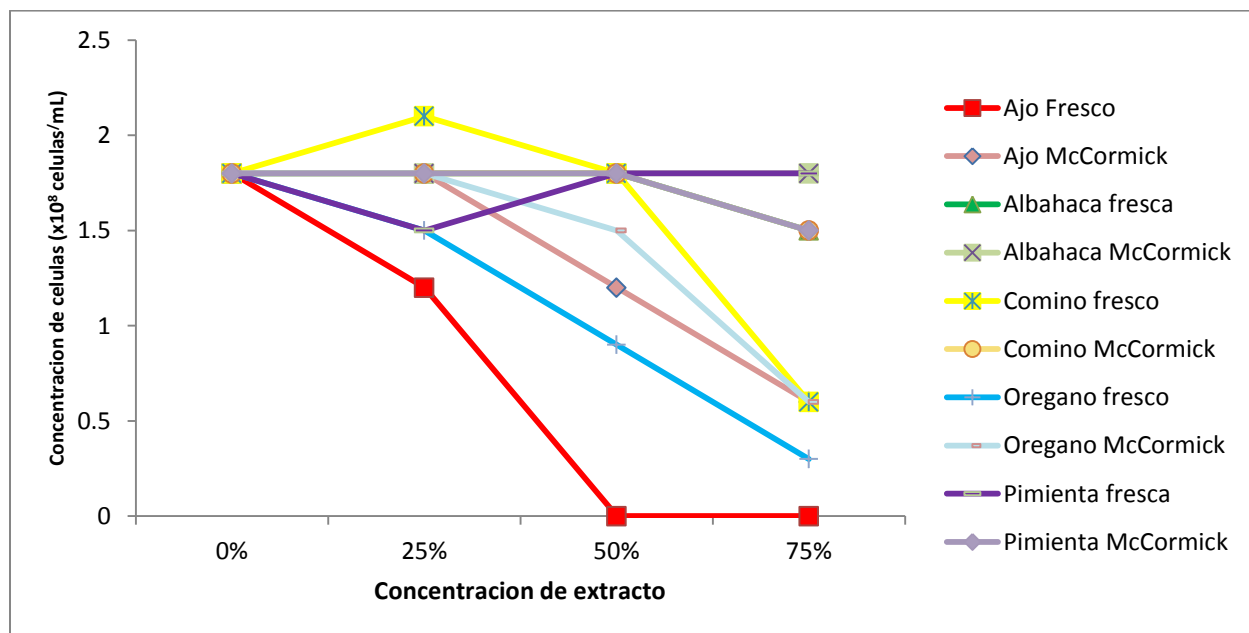


Tabla 29. Comportamiento de la cepa "L" (*Streptococcus mutans*) frente a extracto de especias

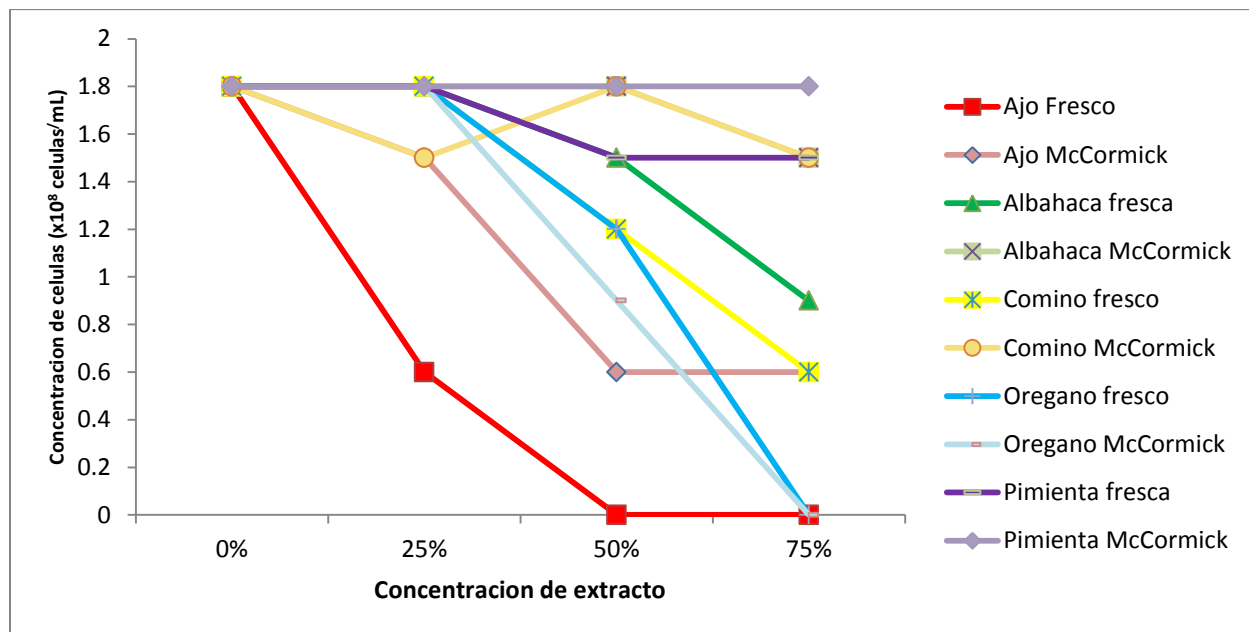


Tabla 30. Comportamiento de la cepa "M" (*Staphylococcus aureus*) frente a extracto de especias

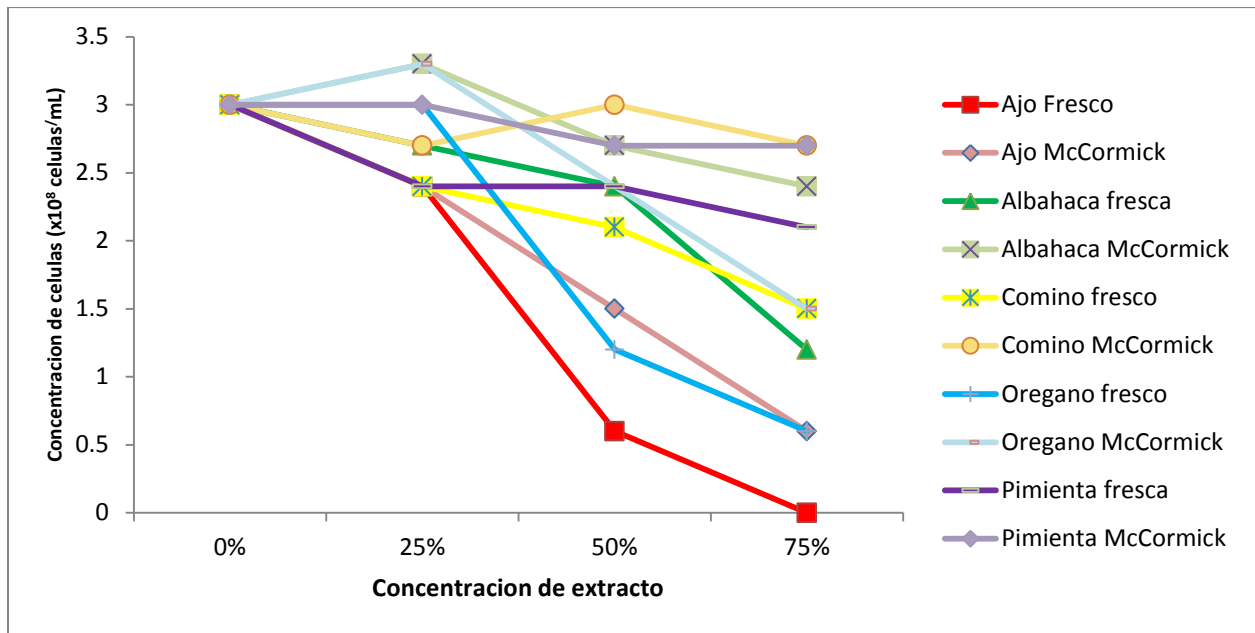


Tabla 31. Comportamiento de la cepa "N" (*Streptococcus thermophilus*) frente a extracto de especias

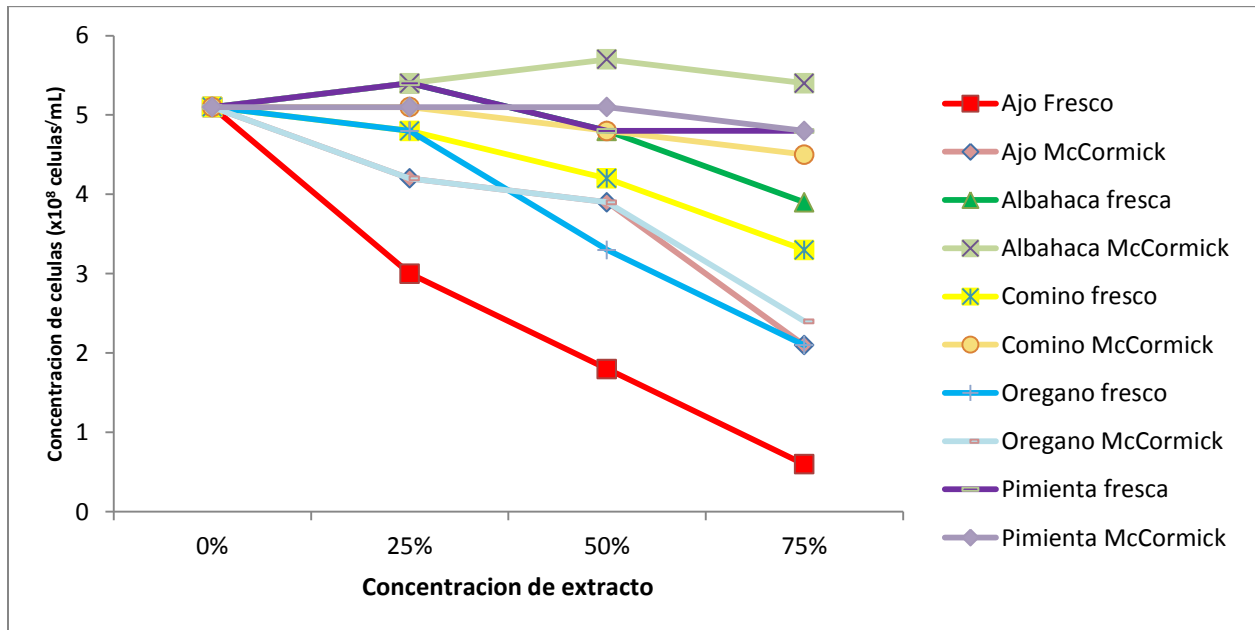




Tabla 32. Comportamiento de la cepa "Ñ" (*Staphylococcus epidermis*) frente a extracto de especias

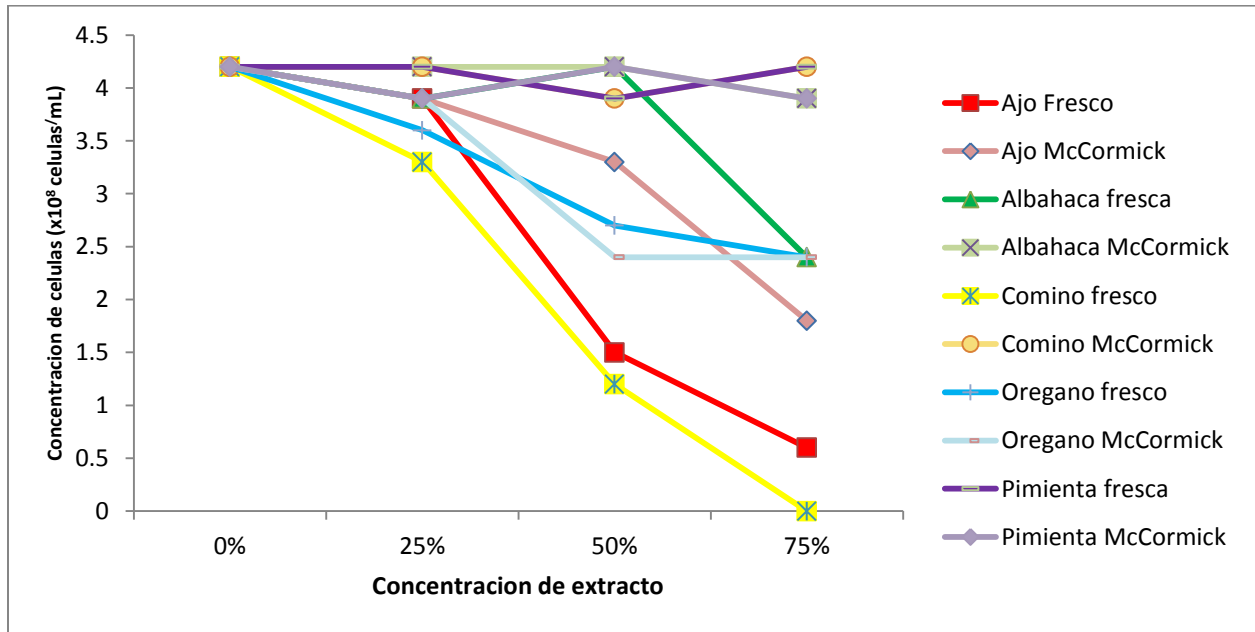


Tabla 33. Comportamiento de la cepa "P" (*Staphylococcus aureus*) frente a extracto de especias

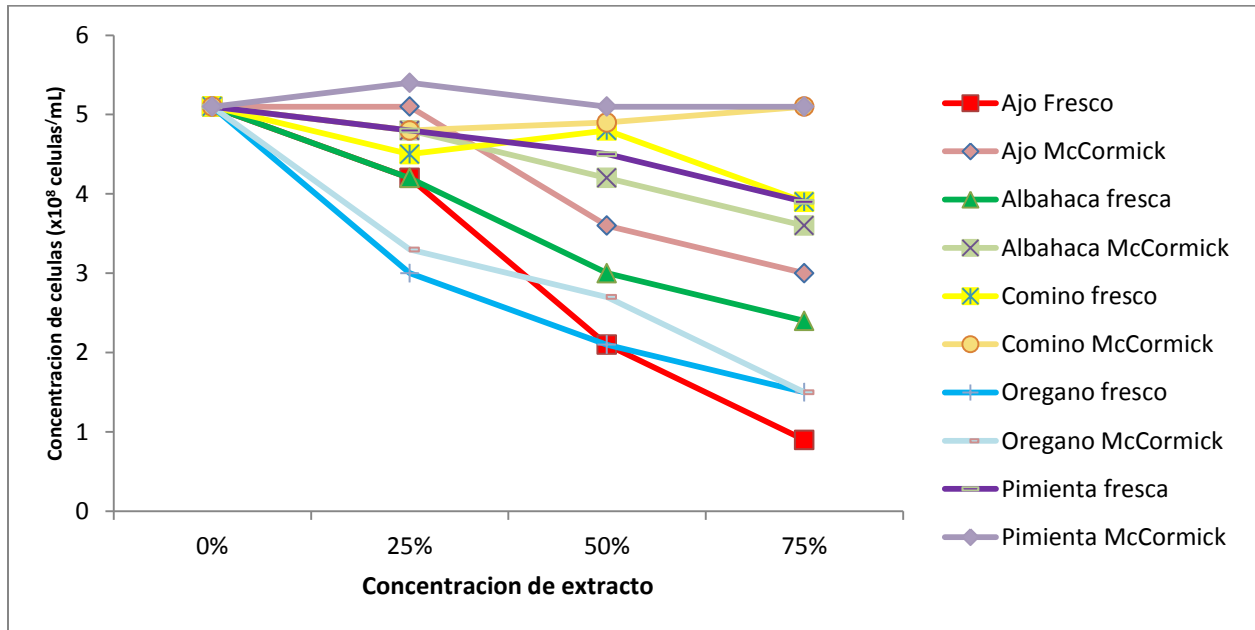


Tabla 34. Comportamiento de la cepa "V" (*Staphylococcus haemolyticus*) frente a extracto de especias

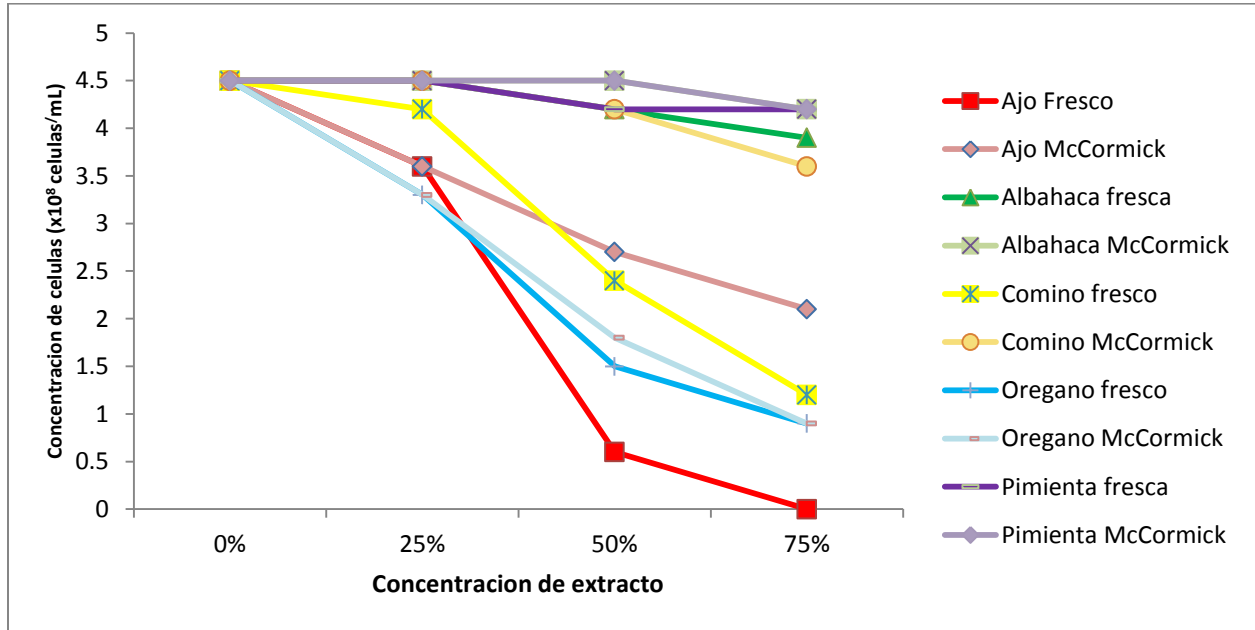


Tabla 35. Comportamiento de la cepa "W" (*Streptococcus porcinus*) frente a extracto de especias

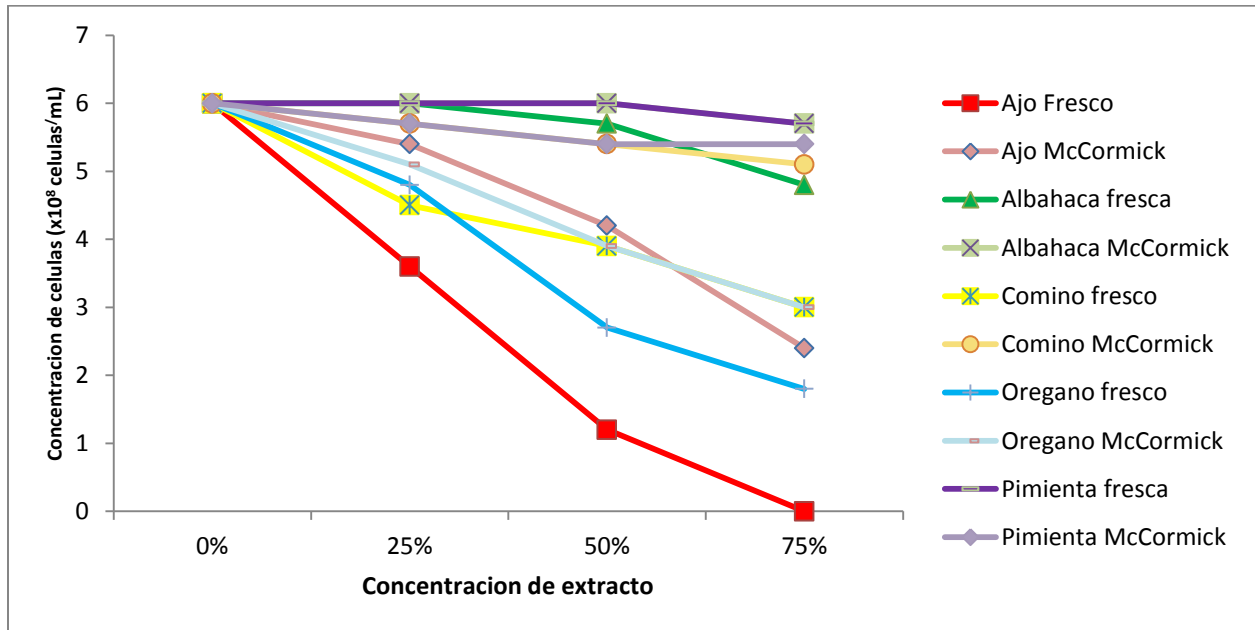


Tabla 36. Comportamiento de la cepa "X" (*Streptococcus mutans*) frente a extracto de especias

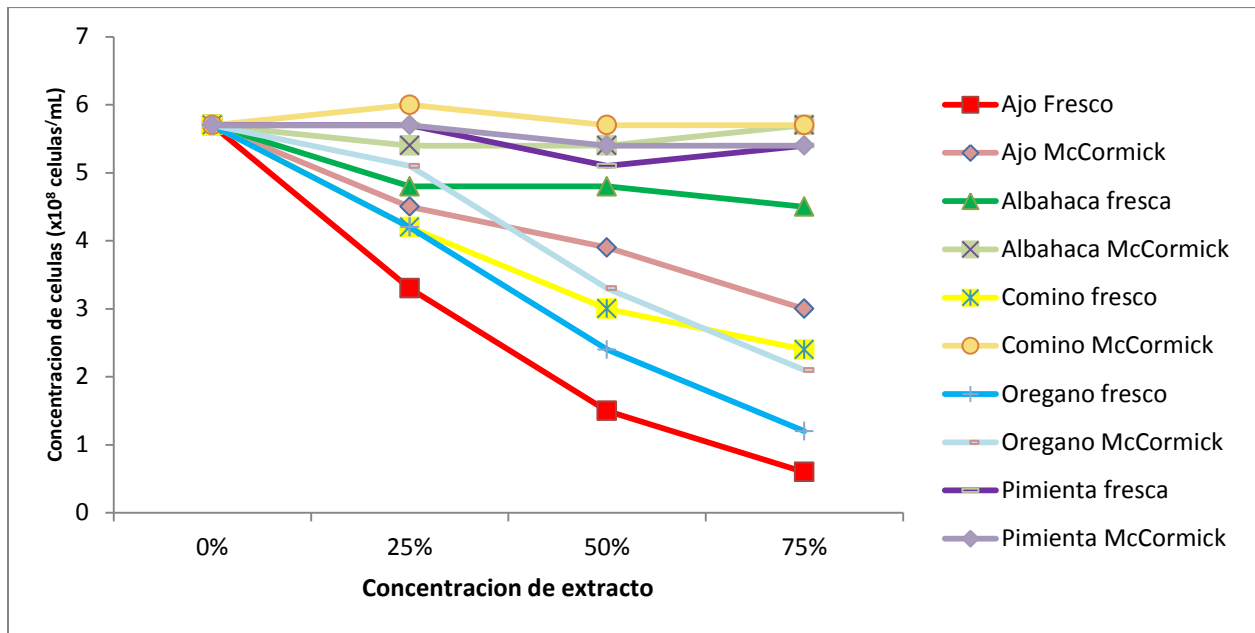
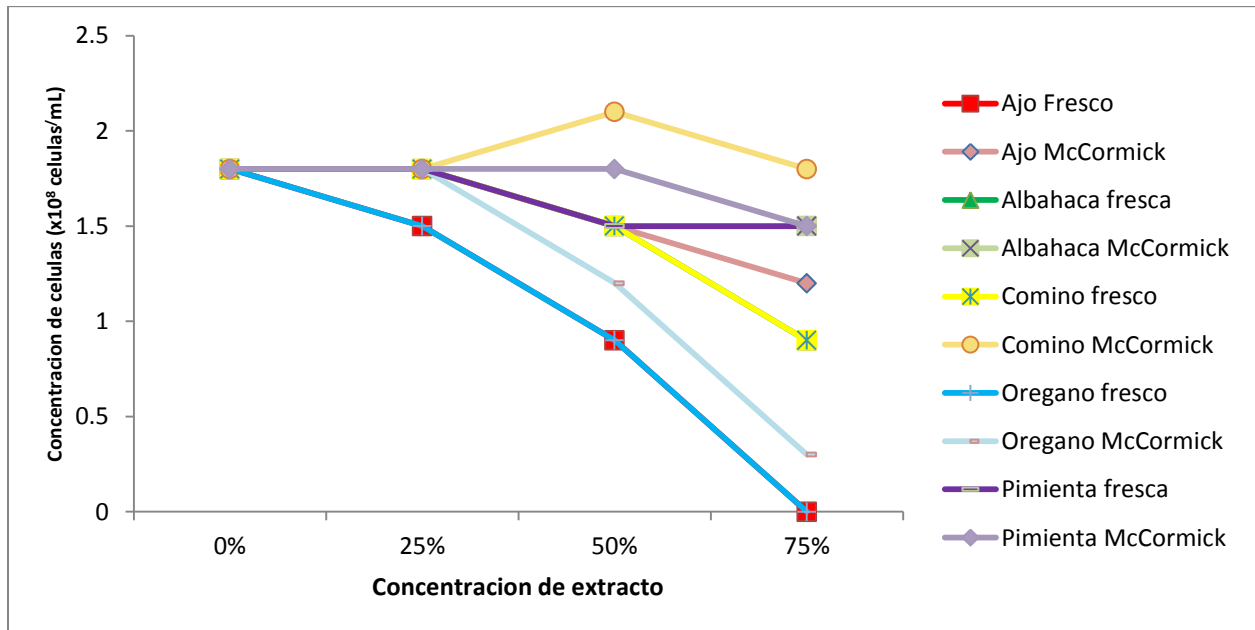


Tabla 37. Comportamiento de la cepa "Y" (*Streptococcus mutans*) frente a extracto de especias



## Capítulo 5. DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla 12, se obtuvieron bacterias Gram positivas de cada una de las 30 muestras analizadas y 22 de ellas (73.33% de las cepas totales) presentaron resistencia a la vancomicina, lo cual es equivalente al. Así también, 20 cepas son de quesos de origen artesanal y solamente 2 de marcas comerciales lo cual equivale al 90.9% y 9.1% respectivamente de las bacterias resistentes aisladas. Esto indica que sí existe una diferencia sanitaria notable en la producción y manejo de dichos quesos. Eso probablemente se pueda extrapolar a la cantidad de bacterias Gram negativas.

En la tabla 13 se muestran los antibiogramas de las 22 cepas. Todas las cepas fueron sensibles a eritromicina, mientras que la mayoría fueron resistentes a penicilina, peflotaxima, y/o dicloxicilina. Solamente 16 cepas fueron resistentes a mas de 5 antibióticos, lo cual es un 72.72% de las cepas resistente a vancomicina y 53.33% de las muestras analizadas. Este dato es muy alto y alarmante, sin embargo se esperaba un porcentaje mayor, debido a que la vancomicina es aceptada en México como promotor de crecimiento, además es muy común su uso en animales y por lo tanto también su resistencia.

Una vez que se obtuvieron cepas resistentes, se procedió a la identificación de las mismas, ya que es necesario para poder suponer cual fue la procedencia / fuente de contaminación de la cepa en el producto. Se pueden resumir las fuentes de contaminación en 2 grandes rubros, los cuales son:

Malas prácticas de manufactura: Todos los procesos hasta la obtención del alimento terminado que se pueden mejorar (ej. Implementando Buenas Prácticas de Manufactura) para contribuir a obtener un producto con una mejor calidad.

Contaminación post-proceso: Manejo inadecuado del alimento que provoca que disminuya la calidad microbiológica, física y/o química del producto

La tabla 22 presenta una hipótesis de la contaminación de las bacteria en el queso, dependiendo de su género y especie identificada.

Tabla 22. Género y especie de las bacterias aisladas y su probable fuente de contaminación

Cepa	Nombre	Hipótesis de contaminación
E	<i>Streptococcus porcinus</i>	Malas prácticas de manufactura
F	<i>Staphylococcus aureus</i>	Malas prácticas de manufactura, Contaminación post-proceso
G	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Contaminación post-proceso
H	<i>Streptococcus salivarius</i>	Malas prácticas de manufactura, Contaminación post-proceso
I	<i>Streptococcus mitis</i>	Contaminación post-proceso
J	<i>Staphylococcus auricularis</i>	Contaminación post-proceso
K	<i>Streptococcus salivarius</i>	Malas prácticas de manufactura, Contaminación post-proceso
L	<i>Streptococcus mutans</i>	Contaminación post-proceso
M	<i>Staphylococcus aureus</i>	Malas prácticas de manufactura, Contaminación post-proceso
N	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Malas prácticas de manufactura
Ñ	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Contaminación post-proceso
P	<i>Staphylococcus aureus</i>	Malas prácticas de manufactura, Contaminación post-proceso
V	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Malas prácticas de manufactura, Contaminación post-proceso
W	<i>Streptococcus porcinus</i>	Malas prácticas de manufactura
X	<i>Streptococcus mutans</i>	Contaminación post-proceso
Y	<i>Streptococcus mutans</i>	Contaminación post-proceso

Se identificaron varias cepas de la misma especie, entonces se podría sugerir realizar una tipificación. Es posible afirmar que no son las mismas bacterias, ya que se aislaron de diferentes muestras de diferentes establecimientos (Tabla 12), además de que presentan resistencia a diferentes antibióticos (Tabla 13).

Cualquiera que sea la causa, el manejo rudimentario, ya sea en la crianza, engorda y mantenimiento del animal productor, en la colecta y manejo de la materia prima, la producción del queso, su manejo posterior, almacenamiento, etc, son las causas principales de contaminación de los productos, ya que no se fabrican con las

condiciones e instalaciones apropiadas y el productor trata de disminuir los costos de cualquier manera, aunque sea utilizando sustancias no aprobadas en México.

Esto se debería de regular y vigilar con mayor rigor, ya que la normatividad, tanto nacional como internacional existe, sin embargo no se cumple en dichos establecimientos. Por ejemplo, en Dinamarca, el uso de avoparcina en el ganado fue prohibido en 1995 y se observó una reducción del 60% a menos del 5% de cepas resistentes a dicho antibiótico en el 2000. Otro ejemplo en el mismo país en la virgamicina, ya que en el mismo periodo de tiempo, su resistencia disminuyó del 65% al 30% (Aarestrup et al, 2001).

En México es escasa la información para poder analizar el impacto del uso inapropiado de antibióticos en términos económicos, de salud y de riesgo sanitario. La creciente resistencia a antibióticos en bacterias patógenas causantes de infección o intoxicaciones comunitarias e intrahospitalarias es el problema más reportado en México relacionado con el uso inapropiado de los fármacos (Dreses, A. et al, 2008).

Cabe resaltar un factor de contaminación del producto final, el manejo del comercializador y del consumidor final, ya que los instrumentos o utensilios con los que corta, rebana, raya, etc el alimento para su venta o consumo pueden estar mal lavados o provocar una contaminación cruzada por haber cortado algo distinto antes sin haberlo lavado adecuadamente. Esto provoca la presencia de células de nuevas cepas de diversos orígenes en el alimento, las cuales pueden sobrevivir y reproducirse. Por el origen del alimento del cual se aisló la cepa, se podría decir que “V” es un ejemplo de contaminación cruzada, ya que el queso es una marca comercial el cual fue rayado en el establecimiento de comercialización para su venta, siendo así el instrumento o la manipulación del personal las posibles vías.

Catorce de las 16 cepas encontradas fueron resistentes a una concentración muy alta de vancomicina ( $\geq 1000$  mg/mL) y no se observa una disminución en la concentración de células ni presencia de halo de inhibición. La cepa “N” fue afectada bruscamente a la concentración más alta (88% de reducción), mientras que la cepa “V” fue afectada

desde la primer concentración (70% de reducción) y fue inhibida totalmente a 600 mg/mL.

Las cepas N y X son las más sensibles a vancomicina, sin embargo, no dejan de mostrar cierto grado de resistencia. Esto se puede observar claramente en la Grafica 2, donde solamente se presentó un halo de inhibición en dichas cepas. En concordancia con la Grafica 1, la cepa X fue la más sensible, ya que presentó un halo de inhibición en medio sólido y disminuyó la cantidad de células en medio líquido desde la concentración más baja. La cepa N en caldo no mostró afectado su crecimiento a 600mg/mL de vancomicina, sin embargo, en medio solido sí hubo un halo de inhibición. Esto se puede explicar a que en medio sólido las células son inhibidas en un espacio físico que ocasiona que las células estén inmóviles, por lo que los lugares sin crecimiento inicial quedará vacío, mientras que en medio líquido todas las células están móviles y pueden aprovechar todos los nutrientes, por lo que crecen homogéneamente en toda la dispersión.

Todas las cepas encontradas resistentes a vancomicina y multiresistentes a antibióticos tienen concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) muy altas y, por este factor, son tan peligrosas como bacterias encontradas en casos clínicos en humanos terminales o muy problemáticos, tales como los VRSA en Michigan, USA en 2002 y 2004 donde su MIC fue de 1024 mg/mL y 256 mg/mL respectivamente; Pensilvania, USA en 2004 donde su MIC fue 64 mg/mL y otros de los cuales no se determinó su MIC (Appelbaum, P., 2006).

Como un método alternativo para la destrucción de las cepas multiresistentes a antibióticos, se probaron especias que se utilizan en alimentos. Se prepararon extractos acuosos, debido a que la preparación de los alimentos se desarrolla prácticamente en medio acuoso, a pesar que no es el medio más favorable para la extracción y disolución de los agentes antimicrobianos de las especias.

Como se puede observar en la tabla 16, la humedad de las especias es un factor importante para que al momento de la preparación se agregue una determinada cantidad de agua, para lograr que los extractos preparados contenga la misma cantidad

de sólidos iniciales y así eliminar un error sistemático. Esto puede afectar el resultado, aunque los compuestos antimicrobianos no son los mismos, y no se encuentren en la misma cantidad en las diferentes especias. Se estandarizó el porcentaje de sólidos agregados con el fin de comparación.

El pH es un factor importante, ya que algunos de los compuestos antimicrobianos pueden degradarse o precipitarse, esto dependerá de su estructura química, tal como la alicina en ajo, lo cual se puede observar claramente en las graficas 3 a la 8. En medio sólido y medio líquido se presentó la misma tendencia la cual fue una mayor inhibición en pH 4 respecto a pH 7 y esta a su vez mayor a pH 10. Cabe resaltar que no presentó inhibición alguna frente a ninguna cepa, por lo que hace pensar que las moléculas de alicina fueron degradadas parcialmente a pH 7 y totalmente a pH 10, siendo pH 4 la condición física más viable probada en medio líquido para la conservación del compuesto antimicrobiano en el experimento. De todas las especias y sus respectivos compuestos antimicrobianos probados, la alicina del ajo es la más sensible por su estructura química, por lo que la condición física del pH 4 fue utilizada para todas las especias.

Como se puede observar en las tablas 17, 18, 19 y 20, el proceso de conservación como afecta las propiedades antimicrobianas, ya que disminuyen su capacidad inhibitoria. Otro factor importante es el solvente con el que se realizó la extracción de los compuestos antimicrobianos, ya que la pimienta contiene piperina, la cual es insoluble en disolventes muy polares como el agua (Cabello, M., 2009) y por lo tanto, la capacidad inhibitoria del extracto acuoso de dicha especia tanto fresca como comercial fue nula, como se observa en la tabla 21.

La cepa "P" fue la más resistente al extracto de comino y al ajo, mientras que la cepa "G" al extracto de albahaca, la cepa "I" a orégano y la pimienta no presento inhibición alguna.

La cepa "E" fue la más sensible al extracto de ajo, albahaca y comino, mientras que la cepa "H" al extracto de orégano.

El efecto de la dilución de los extractos se puede resumir en 3 tipos de tendencias:



1. Una clara disminución en la inhibición de los microorganismos al reducir la concentración de extracto.
2. Un aumento brusco de la inhibición en alguna concentración.
3. La inhibición es nula o muy similar en 2 o más concentraciones.

La primera tendencia la presentan cepas como “E” y “Y” en los extractos de ajo, albahaca, comino y orégano frescos, así como la cepa “P” en orégano fresco. Esto puede significar que una concentración mínima de las sustancias presentes en las especias es suficiente para inhibirlas, y si estos compuestos aumentan en concentración destruyen más células por ser estas muy sensibles.

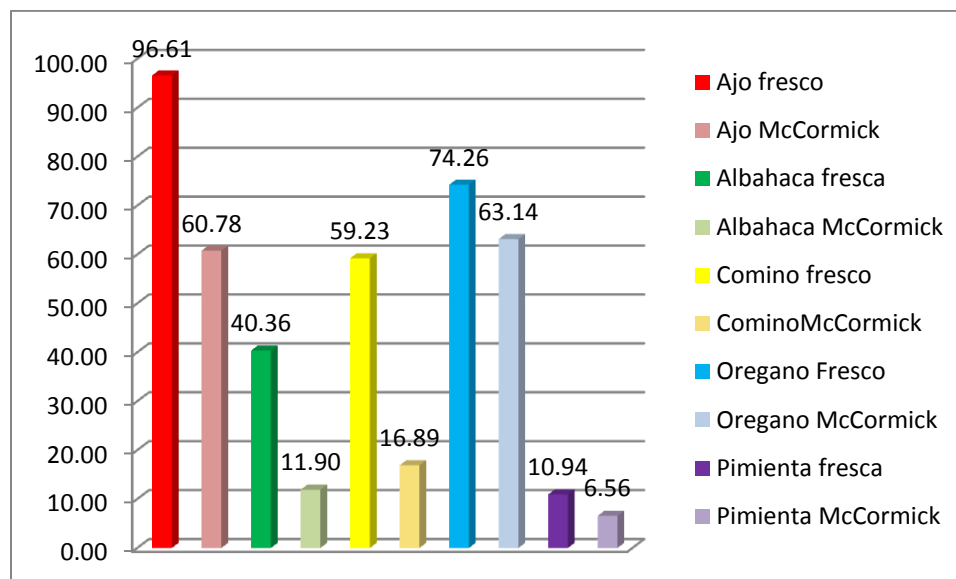
La tendencia número 2 la presentan las cepas “Ñ” en los extractos de ajo y comino fresco y “H” en orégano fresco. Este comportamiento se debe a que las bacterias no son sensibles a concentraciones muy bajas de los antimicrobianos presentes y al aumentar ésta, las bacterias no son capaces de reproducirse y mueren.

El mejor ejemplo para representar a la tercera tendencia es la cepa “X” en los extractos de albahaca fresca, y se debe a que la cepa solamente es sensible a cierta concentración de los antimicrobianos, fuera de los cuales la bacteria podría activar algún tipo de enzima o adoptar algún comportamiento el cual disminuya la actividad de los compuestos.

La cepa “F” es un buen ejemplo para visualizar que una cepa puede presentar tendencias diferentes en los distintos extractos, ya que las especias con las que se prepararon son distintas; por lo tanto, no contienen los mismos compuestos que causan la inhibición provocando que la bacteria no se comporte de manera similar, debido a que puede ser sensible o resistente al conjunto de compuestos en una especia y a los de las otras no.

En la gráfica 38 se comparan los promedios de las inhibiciones de todas las cepas por los extractos de especias. En ella se observa claramente la diferencia en el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de las especias, siendo así el ajo el que tiene mayor efectividad, seguido del orégano, posteriormente el comino, después la albahaca y al último, con una actividad muy baja, la pimienta.

Grafica 38. Promedio de la inhibición de las cepas de las especias



En la grafica anterior podemos ver que el ajo tanto en forma fresca y procesada inhibió el 96.61% de la totalidad de las cepas, que comparado a el ajo procesado, es 37.07% más efectivo. En la tabla 23 se comparan las inhibiciones relativas de los extractos de especias frescas con el ajo fresco y los extractos de especias procesadas con su respectivo extracto fresco.

Tabla 23. Comparación de las inhibiciones de las especias frescas y procesadas

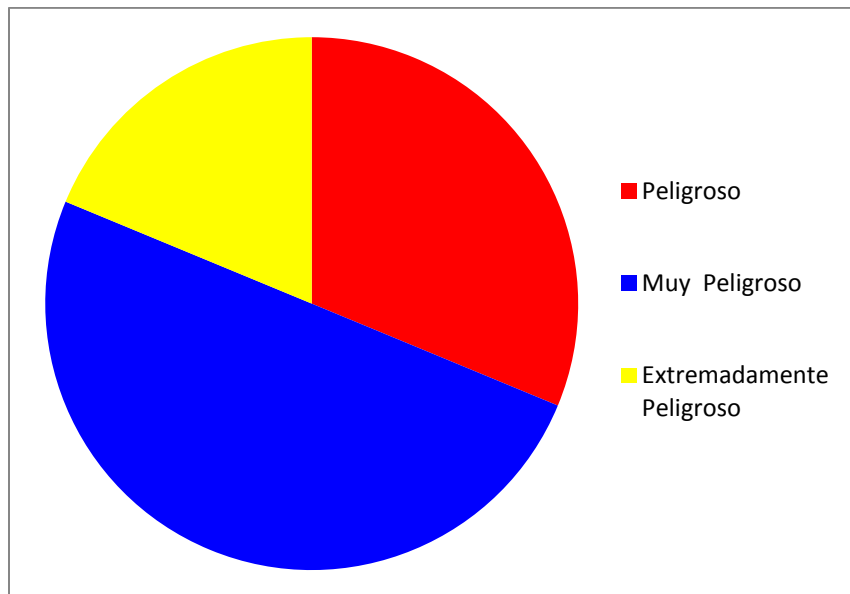
	Inhibición	Disminución de inhibición
Ajo fresco	100 %	---
Ajo procesado	---	37.39 %
Albahaca fresca	41.78 %	---
Albahaca procesada	---	70.52 %
Comino fresco	61.31 %	---
Comino procesado	---	71.49 %
Orégano fresco	76.87 %	---
Orégano procesado	---	14.98 %
Pimienta fresca	11.32 %	---
Pimienta procesada	---	40.04 %

Analizando las graficas de todas las cepas se ve claramente que las tendencias que tienen los extractos de especias procesadas son muy similares a las de especias frescas, la diferencia es que tiene menor capacidad de inhibición, debido probablemente a que los compuestos antimicrobianos son termolábiles, por lo que la concentración de estos en el producto es menor que en su forma fresca. Por lo tanto, al preparar los extractos con la misma cantidad inicial de sólidos totales se puede comparar dicho dato.

Basados en los datos de multiresistencia a antibióticos (tabla 13), la resistencia a vancomicina (gráfica 1) y la sensibilidad a las especias analizadas (gráficas 22 a 37) las bacterias aisladas podrían dividirse en 3 grupos:

- Cepas potencialmente peligrosas
- Cepas potencialmente muy peligrosas
- Cepas extremadamente peligrosas

Grafica 39. Clasificación de las bacterias aisladas por peligrosidad



Las cepas dentro de la clasificación “peligrosas” son E, L, M, N y V, las cepas “muy peligrosas” son G, H, I, K, Ñ, P, W y Y. Las cepas “extremadamente peligrosas” son las que tienen una menor sensibilidad a los extractos y una mayor resistencia a antibióticos, estas son F, J y X.

## Capítulo 6. CONCLUSIONES

Como cualquier ser vivo, las bacterias desarrollan resistencia contra factores que afectan su crecimiento. Tal es el caso de los antibióticos, los cuales desde su inicio no fueron aplicados adecuadamente, lo cual provocó una rápida aparición de dicha resistencia.

No fue hasta los años 90 cuando se empezaron a tomar medidas correctivas y de “prevención” aunque la resistencia bacteriana a los antibióticos fue poco tiempo después de su introducción al mercado (Alekhun, M., 2007).

Los productores a microescala mexicanos, por ejemplo, ganaderos con una cantidad pequeña de vacas, cuidan su ganado con los recursos que tienen a la mano administrando lo más económico y accesible para obtener leche y de la misma producir, almacenar, transportar y vender derivados lácteos. Por desgracia no siempre cuentan con la higiene más adecuada lo que provoca la contaminación de los productos con bacterias de diferentes orígenes y entre ellas bacterias resistentes a antibióticos, las cuales sobreviven en el producto y pasan al comensal.

Esta situación deriva en la recomendación a las autoridades competentes de tomar las medidas necesarias para evitar estas condiciones, ya que el 53.33% de las muestras analizadas tuvieron la presencia de bacterias resistentes a 5 o más antibióticos, entre ellos la vancomicina.

Las especias tienen compuestos antimicrobianos que afectan el crecimiento de las bacterias, incluyendo las resistentes a los antibióticos, siendo el ajo el más efectivo con el 100% de inhibición, seguido del orégano, comino, albahaca y finalmente la pimienta con 76.87%, 61.31%, 41.79% y 11.32% de inhibición respectivamente. Sin embargo,

disminuyen su efectividad después de pasar por un tratamiento térmico, la cual varía dependiendo de la especia y de la estructura molecular del compuesto antimicrobiano.

El uso de las especias en los productos lácteos, como el queso, puede ayudar a los productores a microescala a desarrollar nuevos productos para comercializarlos y con eso aumentar sus ventas; lo cual, aunado con el efecto antimicrobiano, una mejor higiene y una vigilancia por parte de las autoridades competentes se podrán obtener productos con una mejor calidad e inocuidad sin representar un mayor gasto directo al productor.

Por último, se recomienda realizar estudios posteriores a las mismas bacterias analizadas en este trabajo experimental pero utilizando otras especias y disolventes, ya que el agua con el que se prepararon los extractos no es el mejor disolvente para extraer los compuestos poco polares. Además, efectuar estudios moleculares para detectar la presencia de integrones, clusters o genes que confieran la resistencia a la vancomicina o a otros antibióticos y puedan o no recombinarse con otros microorganismos.

## REFERENCIAS

1. **Acuerdo por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos** de la NOM-064-ZOO-2000.
2. Albado, E. et al. **Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano)**. Revista médica Hered. **12**(1): 16-19, 2001.
3. Alekshun, M., Levy, s., **Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance**, Cell **128**: 1037-1050, 2007.
4. Ankri, .S, Mirelman, D. **Antimicrobial properties of allicin from garlic**. Microbes and Infection **2**: 125-129, 2001.
5. Appelbaum, P., **The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistenat *Staphylococcus aureus***, Clin Microbiol Infect **12**(1): 16-23, 2006.
6. Bano, S., **Chemistry of natural products**, Experimental, Jamia Hamdard, Faculty of Science, New Delhi, India.
7. Borges- Walmsley, I., **Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs**, J. Biochem **376**(1): 313-338, 2003.
8. Cabello, M., Belloso, G., **Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos, etanólico clorofórmico de de *Piper nigrum* L. (pimienta) sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas** Revista UDO Agrícola **9**(3): 700-704, 2009.
9. Cabello, M., Belloso, G., **Comparación de dos equipos por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuosos, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L.** Revista UDO Agrícola **9**(3): 700-704, 2009.
10. Cancho, G., et al, **El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual**, Ciencia y tecnología alimentaria **3**(1): 30-47, 2000.
11. Codex Alimentarius, **Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los**

- animales destinados a la producción de alimentos**, Codex Alimentarius, 2009.
12. Cogan, M., **Susceptibility of cheese and yogurt starter bacteria to antibiotic**. Applied Microbiology. **23**(5): 960-965, 1972.
  13. Cordies, L., et al. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana**. Acta Médica. **8**(1): 13-27, 1998.
  14. De M, **Actividad antimicrobiana de Cuminum cyminum L**), Ars, pharmaceutica, **44**(3): 257-269, 2003.
  15. Dibner, J. J., Richards, J. D. **Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action**. Journal of poultry science. **84**: 634-643, 2005.
  16. Dreser, A., et al. **Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas**. Salud pública de México. **50**(4): S480-S487, 2008.
  17. Erreclade, J. **Uso de antimicrobianos en animales de consumo, Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública**. FAO, Producción y sanidad animal, 2004.
  18. Fani, M., et al., **Inhibitory activity of garlic (Allium sativum) extract on multidrug-resistant Streptococcus mutans**, Journal of Indian society of pedodontics and preventive dentistry. **25**: 164-168, 2007.
  19. Fenwick, G. R., Hanley, A. B. **The genius Allium**. Food science and nutrition. **22**: 199-377, 1985.
  20. Fuchs, L. Y., et al. **Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana**. Salud pública de México. **36**: 428-438, 1994.
  21. Fujisawa, H., et al. **Thermostability of allicin determined by chemical and biological assays**, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **72**(11): 2877-2993, 2008.
  22. García, R. **Agentes bactericidas/bacteriostáticos a partir de sorbato de potasio, carvacrol y timol**. Experimental, Universidad de las Américas, Puebla, México.
  23. Harris, J.C. et al. **Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic)**. Applied Microbiology and Biotechnology. **57**:282-286, 2001.

24. Henriques, B, Normark, S., ***Evolution and spread of antibiotic resistance***, Journal of internal medicine **252**(1): 91-106, 2002.
25. Hernandez, L., Rodriguez, M., ***Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba***, Revista Cubana de plantas medicinales, **2001**(2), 2001.
26. ***Instructivo técnico del cultivo de la albahaca (Ocimum basilicum) en Cuba***, FAO.
27. Iwalokun, B., et al. ***In vitro Antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and Candida species from Nigeria***. Journal of medicinal Food. **7**(3): 327-333, 2004.
28. Jonkers, D., et al, ***Effect of garlic on Vancomycin-Resistant Enterococci***, Antimicrobials agents and chemotherapy **43**(12): 3045, 1999.
29. La amenaza de los microbios. Información Veterinaria, Abril 1999, pp 17-21.
30. Lanosa, R., ***Enfoque diagnóstico del paciente séptico***. Archivos de Medicina Interna. **19**:27-34, 1997.
31. Ley general de Salud, Relación de antibióticos; considerados dentro de la fracción IV del Artículo 226, pp 23.
32. Martinez, J., ***Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments***, Science. **321**: 365-367, 2008.
33. Mazel, D., Davies, J. ***Antibiotic resistance in microbes***. Cellular and Molecules life sciences. **56**: 742-754, 1999.
34. Miron, T., et al. ***A spectrophotometric assay for allicin, alliin and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfonates***. Analytical Biochemistry. **307**: 76-83, 2002.
35. Nikaido, H. ***Multidrug Efflux pumps of Gram-negative bacteria***, Journal of bacteriology, **178**(20): 5853-5859, 1996.
36. Noa, M., Ruvalcaba, S., Morales, H., ***Frecuencia de residuos de antibióticos en leche cruda en Jalisco***. Agrociencia 2009.
37. Noa, N., et al, ***Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México***, Salud Animal **31**(1): 29-33, 2009.



38. Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, **Control de residuos tóxicos en carne grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos.**
39. Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999, **Especificaciones zoonosológicas de los productos alimenticios para consumo animal.**
40. Norma Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-2000, **Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos.**
41. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. **Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.**
42. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2011, **Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.**
43. Nychas, G. J. **Natural antimicrobials from plants.** New methods of food preservations. G.W. Gould (Ed.). AN Aspen Publication, pp 58-73, 1995.
44. OMS, **Compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del Codex,** Organización Mundial de la Salud, EUA, 2006.
45. OMS, **Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos,** Organización mundial de la salud, 2001.
46. OMS, **Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food,** Organización Mundial de la Salud. Genova, Suiza, 2000
47. OMS, **Resistencia a los antimicrobianos: una amenaza para la seguridad sanitaria mundial,** Organización Mundial de la Salud, 2005
48. Paulsen, I., **Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution.** Current opinion in microbiology **6:**446-451,2003
49. Pichersky E, Lewinsohn E, Croteau R. **Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in Clarkia breweri.** Arch. Biochem. Biophys. **316** (2): 803–7, 1995
50. Piddock, L. **Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance.** Nature. **4:**629-636, 2006.

51. Plaus, A., et al, **Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano)**, Revista Médica Hered **12**(1): 16-19, 2001
52. Poole, K., **Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms**, Journal of Molecular. Microbiology and Biotechnology **3**(2): 255-264, 2001.
53. Protocolos de Tratamiento elaborados por la comisión clínica de profilaxis y terapéutica antibiótica, Ed. Instituto Nacional de Saude Hospital Juan Canalejo, A Coruña, 1990.
54. Real Decreto 109/1995, sobre **medicamentos veterinarios**.
55. Real Decreto 157/1999, sobre **piensos medicamentosos: condiciones de preparación, puesta en el mercado y utilización**.
56. Reuter, H. D., Koch, H.P., Lawson, L. D., **Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations**. In Garlic: The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 136-213, 1996.
57. Rodríguez, E., **Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas**, Ra Ximhai **7**(1): 153-170, 2011
58. Roe, M., Pillai, S., **Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria**, Journal of poultry science. **82**(1): 622-626, 2003.
59. Roldan, L., **Evaluación del uso de los aceites esenciales como alternativa al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en pollos en engorde**, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina veterinaria y de zootecnia, Bogotá, Colombia, 2010.
60. Samaeena, B. **Chemistry of natural products**. Departamento de química, Facultad de ciencias, Jamia Hamdars, Nueva Delhi, 2007.
61. Sotelo, P., et al, **Inhibición de patógenos relacionados con alimentos, por orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y sal, y su aplicación producción lácteos**, Revista de Salud pública y nutrición, edición especial **1**(1), 2008

62. Tortora, G. ***Microbial genetics***, Microbiology: an introduction, 9<sup>th</sup> edition, Ed. Pearson, 2007, pp 240-247.
63. Vipraja V., et al. ***Garlic: Source of the Ultimate Antioxidants—Sulfenic Acids*** Angew. Chem. Int. **48**(1), 157 –160, 2009
64. Watson, D.H., Food Chemical Safety. ***Chapter 6."Veterinary drug residues"*** pp.109-120. Cambridge, England. ISBN: 1-85573-563-6, 2001.
65. Wien-Xian, D., et al. ***Storage Stability and antibacterial activity against Escherichia coli O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods***, Journal of agricultural and food chemistry, **56**(9): 3082-3088, 2008.
66. Wolfgang M, et al. ***PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in pilated Neisseria gonorrhoeae***. Mol Microbiol. **29**(1): 321-33.
67. Yin, M., Chang, H., Tsao, S., ***Inhibitory effects of aqueous garlic extract, garlic oil and four diallyl sulphides against four enteric pathogens***, Journal of Food and Drug analysis, **10**(2): 120-126, 2002.