



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

Evaluación del efecto antimicrobiano de *Allium sativum* (ajo)  
y *Cinnamomum zeylanicum* (canela) sobre bacterias multiresistentes a  
antibióticos aisladas de pie diabético

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LAURA MADRIGAL DELGADILLO**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** Profesor: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

**VOCAL:** Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

**SECRETARIO:** Profesor: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

**2do. SUPLENTE:** Profesor: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre**

---

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. en C. Raquel Ortega Muñoz**

---

### **SUSTENTANTE:**

**Laura Madrigal Delgadillo**

---

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>ABREVIATURAS DE ANTIBIÓTICOS</b> .....  | 5  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 6  |
| <b>CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO</b>   |    |
| 1.1. ANTIBIÓTICOS  |    |
| 1.1.1. Generalidades .....   | 7  |
| 1.1.2. Antibióticos de origen natural .....  | 8  |
| 1.1.3. Antibióticos de origen sintético .....  | 8  |
| 1.1.4. Mecanismo de acción de los antibióticos .....                                 | 9  |
| 1.2. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS  |    |
| 1.2.1. El comienzo de la resistencia a los antibióticos .....                        | 11 |
| 1.2.2. Mecanismos de resistencia .....   | 12 |
| 1.2.3. El fenómeno de multirresistencia .....  | 18 |
| 1.3. RESISTENCIA BACTERIANA VS INFECCIONES DE PIE DIABÉTICO                          |    |
| 1.3.1. Infecciones de pie diabético: una complicación común de la diabetes .....     | 20 |
| 1.3.2. Microbiología de las infecciones de pie diabético .....                       | 21 |
| 1.3.3. Tratamiento de las infecciones de pie diabético .....                         | 22 |
| 1.3.4. El problema de la multirresistencia en infecciones de pie diabético .....     | 23 |
| 1.4. ALTERNATIVAS PARA COMBATIR LA MULTIRRESISTENCIA EN INFECCIONES DE PIE DIABÉTICO |    |
| 1.4.1. Propiedades de <i>Allium sativum</i> (ajo) .....                              | 25 |
| 1.4.2. Propiedades de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela) .....                    | 29 |
| <b>CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>  |    |
| 2.1. Hipótesis .....   | 35 |
| 2.2. Objetivo general .....  | 35 |
| 2.3. Objetivos particulares .....  | 35 |
| <b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b>   |    |
| 3.1. Obtención de muestras de pie diabético .....                                    | 36 |
| 3.2. Aislamiento y caracterización de cepas .....                                    | 36 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos .....   | 37        |
| 3.4. Preparación de los extractos de ajo y canela .....  | 37        |
| 3.5. Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos de ajo y canela sobre<br>bacterias multirresistentes aisladas de infecciones de pie diabético ..... | 38        |
| <b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>CAPÍTULO VII. REFERENCIAS .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>ANEXOS.</b>   |           |
| ANEXO I. Estructura química de los antibióticos .....  | 54        |

## ABREVIATURAS DE ANTIBIÓTICOS

|            |                              |
|------------|------------------------------|
| <b>CLM</b> | Clindamicina                 |
| <b>E</b>   | Eritromicina                 |
| <b>PE</b>  | Penicilina                   |
| <b>TE</b>  | Tetraciclina                 |
| <b>GE</b>  | Gentamicina                  |
| <b>SXT</b> | Sulfametoxazol / Trimetoprim |
| <b>AM</b>  | Ampicilina                   |
| <b>CFX</b> | Cefotaxima                   |
| <b>CPF</b> | Ciprofloxacino               |
| <b>DC</b>  | Dicloxacilina                |
| <b>CF</b>  | Cefalotina                   |
| <b>VA</b>  | Vancomicina                  |
| <b>CB</b>  | Carbenicilina                |
| <b>CL</b>  | Cloranfenicol                |
| <b>AK</b>  | Amikacina                    |
| <b>NF</b>  | Nitrofurantoína              |
| <b>NET</b> | Netilmicina                  |
| <b>NOF</b> | Norfloxacino                 |

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, México ocupa el noveno lugar de prevalencia de diabetes a nivel mundial. Esta enfermedad se ha convertido en una epidemia global con altas tasas de mortalidad y elevada demanda de servicios médicos.<sup>[1]</sup> Se sabe que la diabetes mellitus es la segunda causa de muerte en México<sup>[2]</sup> y un factor importante que contribuye a su desarrollo es la obesidad. En vista de que México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en obesidad,<sup>[3]</sup> es necesario tomar acciones aportando nuevas soluciones que disminuyan el grave problema de la diabetes y sus diversas complicaciones.

Una consecuencia grave asociada a la diabetes es el pie diabético, el cual se define como cualquier lesión isquémica o infecciosa inframaleolar.<sup>[4]</sup> Se estima que el 20% de la población con diabetes desarrolla pie diabético. La microbiota del pie diabético es muy variada; sin embargo, hoy en día se encuentra bien tipificada. En general, la población de microorganismos dependerá de la fase en que se encuentre el pie diabético. En las lesiones iniciales, predominan bacterias Gram positivas tales como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp.* mientras que en úlceras crónicas se encuentran principalmente Enterococos, Enterobacterias y *Pseudomonas sp.*<sup>[4]</sup>

Las infecciones causadas por estas bacterias son de difícil tratamiento. Se ha descrito que la mala respuesta a este tratamiento está asociada al fenotipo de multirresistencia a antibióticos. La ineficaz respuesta a la antibioticoterapia aumenta aproximadamente 14 veces el riesgo de amputación de miembros inferiores. Alrededor del 15% de los casos con pie diabético requieren esta última medida.<sup>[5]</sup> Por esta razón, es necesario buscar nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones de pie diabético. Una propuesta interesante como fuente de compuestos que pueden lograr un eficaz efecto antimicrobiano sobre microorganismos multirresistentes son las especias, por ejemplo, *Allium sativum* (ajo) y *Cinnamomum zeylanicum* (canela).

En la literatura científica se pueden encontrar diferentes estudios que han demostrado las propiedades antimicrobianas que poseen las especias contra una variedad de microorganismos. Especias tales como el ajo, la cebolla, la pimienta, el tomillo, la canela, el comino, por mencionar algunas, son las que mejor efecto antimicrobiano han mostrado sobre cepas de bacterias tipo.<sup>[6]</sup>

Estudios previos en este laboratorio han demostrado que algunos extractos de especias presentan actividad antimicrobiana contra bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de diferentes fuentes. Por consiguiente, sería de gran interés evaluar el efecto antimicrobiano de las especias *Allium sativum* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de infecciones de pie diabético para su posible uso como tratamiento alternativo de estas infecciones.

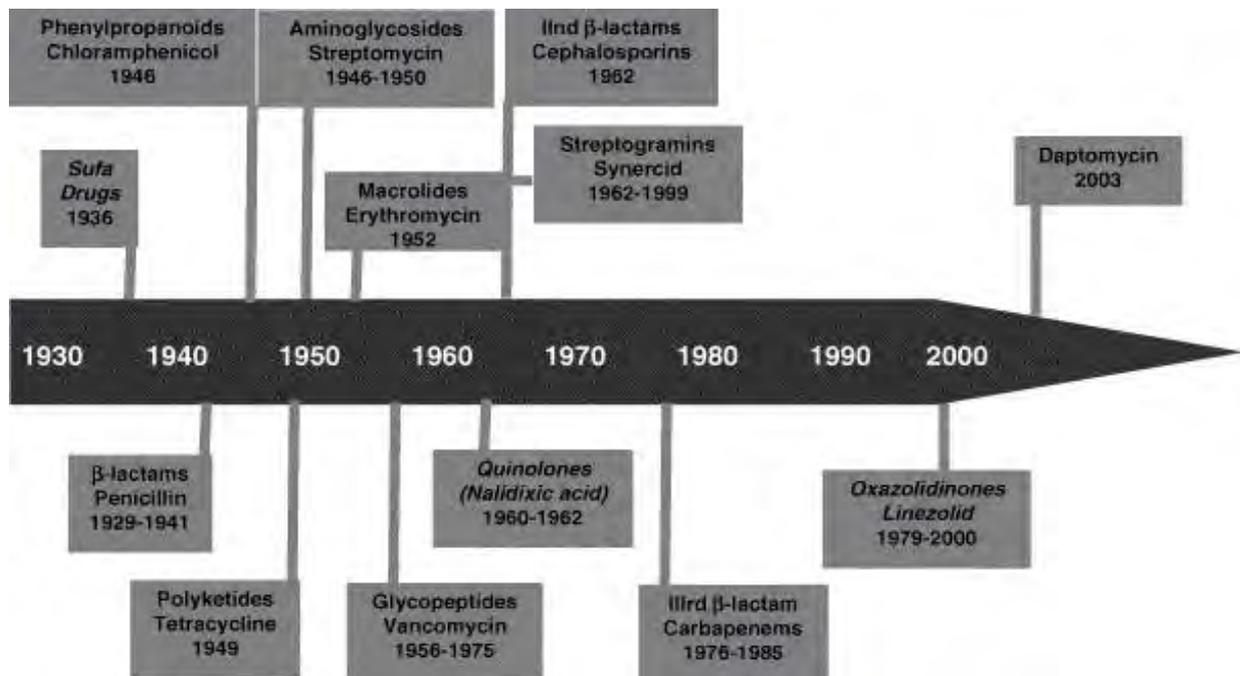
# CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

## 1.1. ANTIBIÓTICOS

### 1.1.1. Generalidades

El descubrimiento de los antibióticos ha sido uno de los acontecimientos más grandes en la medicina moderna. En los años de 1940 Selman Waksman, el descubridor de la estreptomina, acuñó el término antibiótico haciendo referencia a cualquier clase de molécula orgánica que inhibe o mata bacterias por interacciones específicas con sus blancos bacterianos. [7] El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, fue seguido por la búsqueda y producción comercial de muchos otros antibióticos durante la Segunda Guerra Mundial (Figura 1). Por sus esfuerzos en el descubrimiento y desarrollo de la penicilina, Fleming, Florey y Chain recibieron el Premio Nobel en 1945. [8]

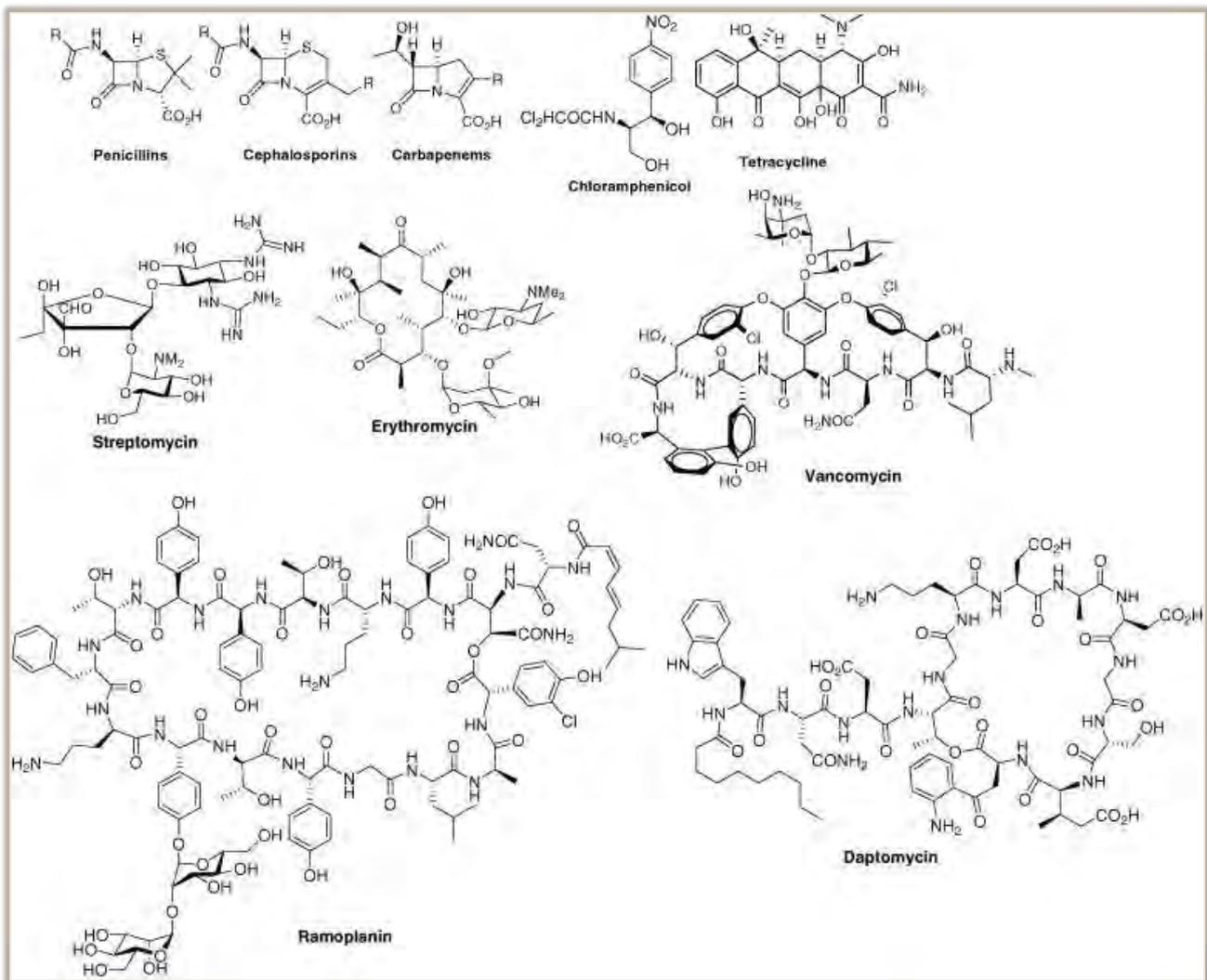
Existen dos fuentes de antibióticos: naturales y sintéticos. El primer grupo ha sido el principal suministro de muchos fármacos y también ha sido la plataforma química para el desarrollo de agentes antimicrobianos de origen sintético. [8]



**Figura 1.** Descubrimiento y desarrollo de los antibióticos de origen natural (fuente normal) y de origen sintético (fuente cursiva). [8]

### 1.1.2. Antibióticos de origen natural

Con el descubrimiento de la penicilina, comenzó la Edad de Oro en la búsqueda e investigación de nuevos antibióticos (1940 – 1962). La mayoría de los antibióticos que se han descrito son de origen natural y entre ellos se encuentran los fenilpropanoides (cloranfenicol), policétidos (tetraciclina), aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina), macrólidos (eritromicina), glicopéptidos (vancomicina), estreptograminas (quinupristina y dalfopristina) y los tres grupos de  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos) [Figura 2]. [8]

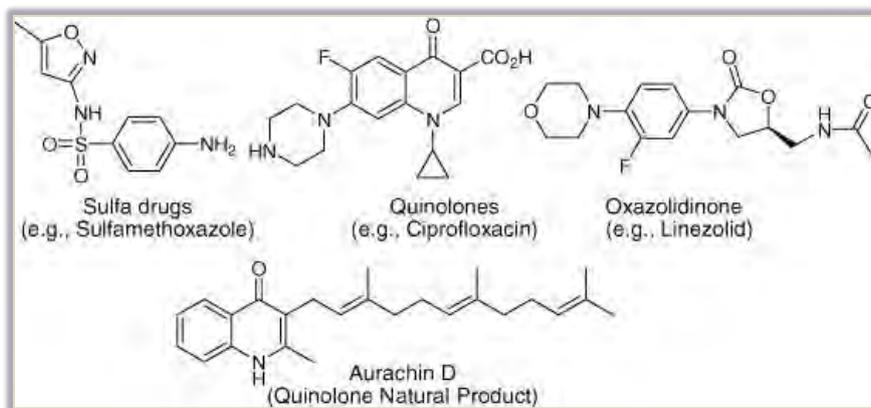


**Figura 2.** Estructura química de antibióticos de origen natural. [8]

### 1.1.3. Antibióticos de origen sintético

En 1930 se desarrollaron las sulfonamidas, los primeros antibióticos sintéticos que se introdujeron a la práctica clínica. En el año de 1962, se descubrió la segunda clase de antibióticos sintéticos denominados quinolonas, tales como el

ácido nalidíxico. Sin embargo, también se han logrado aislar algunas quinolonas de origen natural como auracina C y auracina D. [8] En las postrimerías de los años setenta, se descubrió una tercera clase de antibióticos sintéticos, las oxazolidinonas (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura química de antibióticos de origen sintético. [8]

#### 1.1.4. Mecanismo de acción de los antibióticos

Los mecanismos de acción de los antibióticos son muy complejos y a la fecha no están totalmente elucidados. Entre los mecanismos más importantes encontramos aquellos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, la inhibición de la síntesis de proteínas, la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, etcétera (Figura 4). [8]

En la Tabla 1 se muestran los mecanismos y blancos de acción de distintas clases de antibióticos, así como el efecto que producen. Por ejemplo, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos interfieren en la síntesis de la pared celular bacteriana (peptidoglicano) en distintos niveles. Las quinolonas inhiben las enzimas que participan en la replicación del ADN bacteriano. La rifampicina se une a la ARN polimerasa inhibiendo la transcripción. Grupos de antibióticos como macrólidos, tetraciclinas y aminoglucósidos detienen la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la subunidad 70S ribosomal. Las sulfonamidas y el trimetoprim inhiben la síntesis del ácido tetrahidrofólico, un precursor importante para la síntesis de ADN. Y las oxazolidinonas tienen un mecanismo de acción que inhibe la etapa de inicio de la síntesis de proteínas. [9]

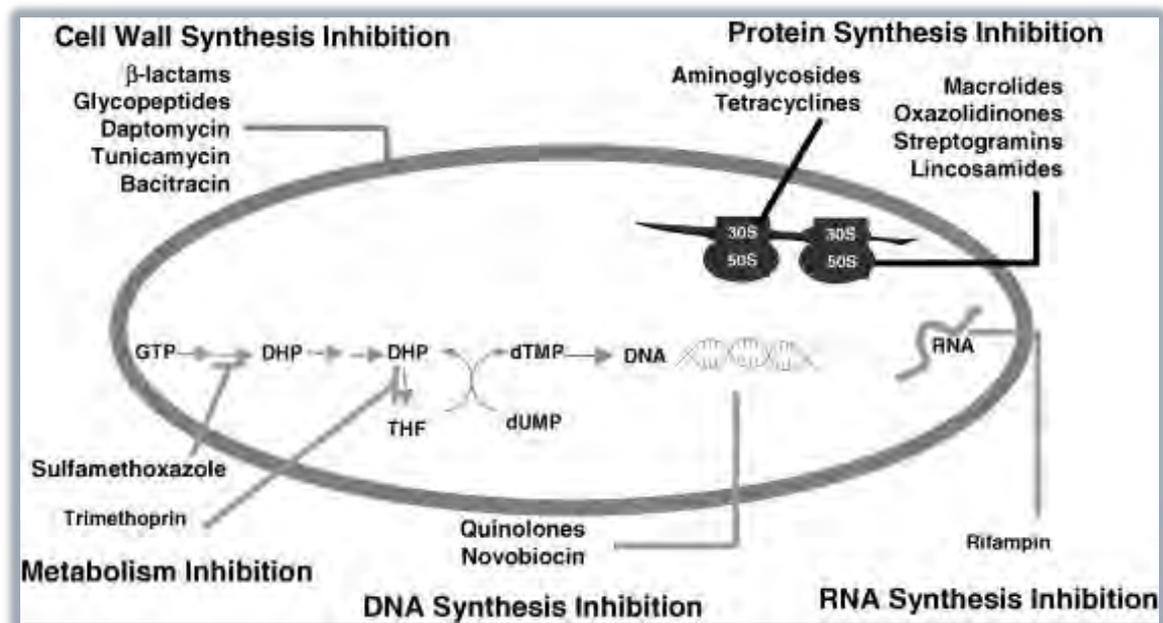


Figura 4. Mecanismos de acción de los antibióticos. [8]

| MECANISMO DE ACCIÓN                    | ANTIBIÓTICO   | SITIO DE ACCIÓN  | EFECTO   |
|--|---|--|--|
| Inhibición de la pared celular         | β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapanémicos, aztreonam) | Proteínas de unión a penicilina (PBPs)                                   | Inhibición del entrecruzamiento del peptidoglicano (transpeptidación)                                  |
|  | Vancomicina, teicoplanina, dalbavancina, telavancina                  | Terminal D-alanil-D-alanina del pentapéptido precursor de peptidoglicano | Inhibición de la polimerización de los precursores disacáridos del peptidoglicano (transglicosilación) |
| Inhibición de la síntesis de proteínas | Aminoglucósidos   | Subunidad ribosomal 30S  | Inhibición de la elongación de péptidos debido a la mala lectura del código genético                   |
|  | Tetraciclinas, gliciliclinas  | Subunidad ribosomal 30S  | Inhibición de la unión del ARN de transferencia  |
|  | Cloranfenicol   | Subunidad ribosomal 30S  | Bloqueo del acoplamiento de la enzima aminoacil-ARN transferasa  |
|  | Macrólidos, azálidos, cetólidos                                       | Subunidad ribosomal 50S  | Bloqueo de la transferencia de aminoácidos a la cadena peptídica                                       |
|  | Clindamicina  | Subunidad ribosomal 50S  | Bloqueo de la transferencia de aminoácidos a la cadena peptídica                                       |

|  |                             |   |  |
|--|-----------------------------|---|--|
|  | Quinupristina/dalfopristina | Subunidad ribosomal 50S                                   | Extrusión de las cadenas de péptidos   |
|  | Linezolid                   | Subunidad ribosomal 50S                                   | Bloqueo de la formación del complejo de iniciación 70S   |
| <b>Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos</b> | Rifampicina                 | Subunidad $\beta$ de la ARN polimerasa dependiente de ADN | Inhibición de la síntesis de ARN   |
|  | Metronidazol                | Ácidos nucleicos  | Ácidos nucleicos dañados   |
|  | Quinolonas                  | ADN girasa y topoisomerasa IV                             | Impide el desdoblamiento del ADN durante la replicación  |
| <b>Inhibición de la síntesis de ácido fólico</b>     | Sulfonamidas                | Dihidropteroato sintetasa                                 | Inhibición competitiva de la síntesis de dihidrofolato para el ácido p-aminobenzoico, pterato y ácido glutámico. |
|  | Trimetoprim                 | Dihidrofolato reductasa                                   | Inhibición en el proceso de reducción de dihidrofolato a ácido tetrahidrofólico                                  |

**Tabla 1.** Mecanismos de acción de los antibióticos y los efectos que producen. <sup>[10]</sup>

## 1.2. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

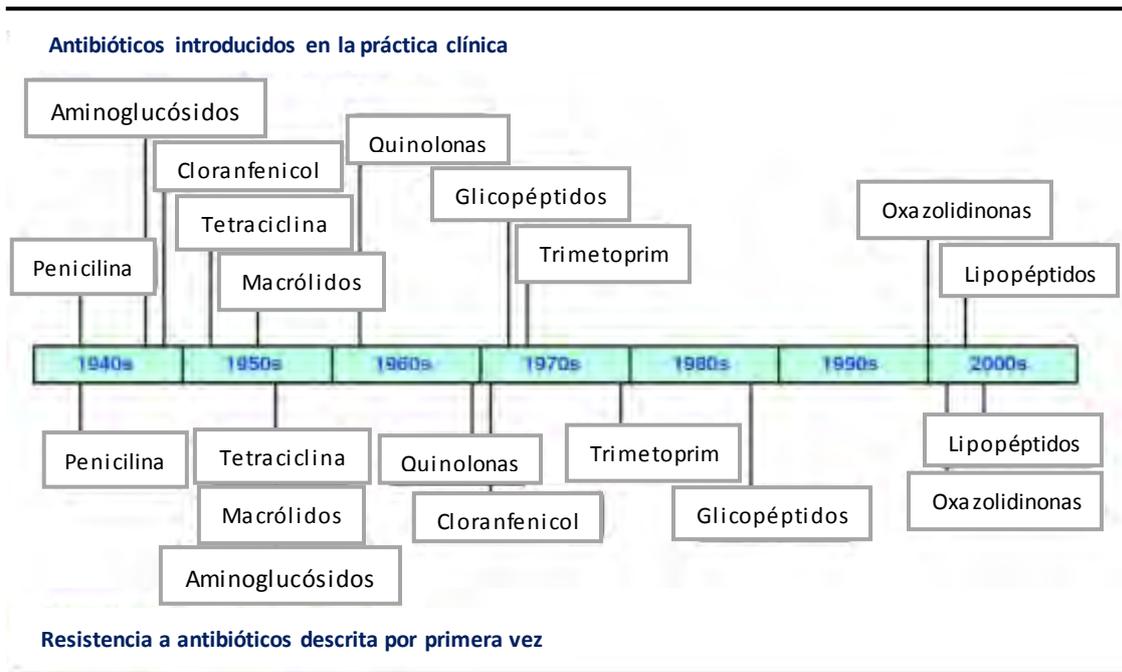
### 1.2.1. El comienzo de la resistencia a los antibióticos

La introducción de los antibióticos a mediados del siglo XX fue una de las intervenciones médicas más importantes en la historia de la medicina debido al número de vidas que fueron salvadas. Desafortunadamente, el uso excesivo de los mismos generó un rápido incremento de cepas resistentes.

Se estima que el uso de antibióticos en todo el mundo es entre 100,000 y 200,000 toneladas por año y en total, desde los años de 1940, se han generado más de un millón de toneladas. Este acontecimiento aceleró drásticamente el número de cepas patógenas resistentes, causando una disminución en las opciones de tratamiento contra diferentes infecciones. <sup>[11]</sup>

Hoy en día, el planeta está saturado de diversos agentes antimicrobianos que han contribuido significativamente a la selección de cepas resistentes generando una seria amenaza de salud pública a nivel mundial. La resistencia

a antibióticos ha sido resultado de la constante presión selectiva ejercida sobre las bacterias. [7] En 1945, Alexander Fleming advirtió que el uso inapropiado de los antibióticos podría llevar al desarrollo de resistencia, por lo que en la actualidad, la resistencia a los antibióticos no es sorpresa alguna. [12] Por otra parte, también es importante enfatizar que el fenotipo de resistencia a múltiples antibióticos es considerado un problema clínico y socioeconómico muy serio.



**Figura 5.** Breve historia del desarrollo de la resistencia a antibióticos. [12]

Para el año de 1937 se reportó por primera vez una cepa resistente a sulfonamidas (los primeros antibióticos introducidos a la clínica), seguido por el descubrimiento de una enzima bacteriana ( $\beta$ -lactamasa) en la década de los años 1940 que confería resistencia a penicilinas. En el caso de la estreptomicina, introducida en 1944, cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* fueron apareciendo durante el tratamiento de los pacientes. De este modo, tras la introducción de otros antibióticos a la práctica clínica eventos similares fueron surgiendo (Figura 5). [7]

Muchas bacterias patógenas se han vuelto resistentes a antibióticos y algunas generaron resistencia a múltiples antibióticos y a otros agentes quimioterapéuticos de manera simultánea (fenómeno de multiresistencia). [7]

### 1.2.2. Mecanismos de resistencia

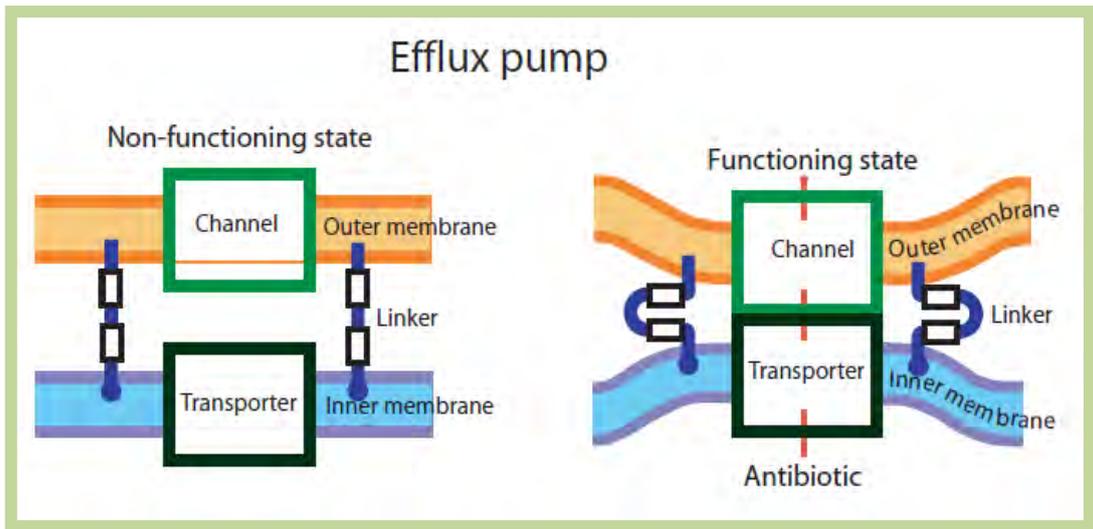
Los mecanismos de resistencia bacteriana pueden ser divididos en dos grupos: mecanismos intrínsecos y mecanismos adquiridos. Los primeros no se asocian a elementos de ADN móvil y son reconocidos como los principales contribuyentes a la multiresistencia en bacterias (por ejemplo, las bombas de expulsión). [14]

#### **Resistencia intrínseca**

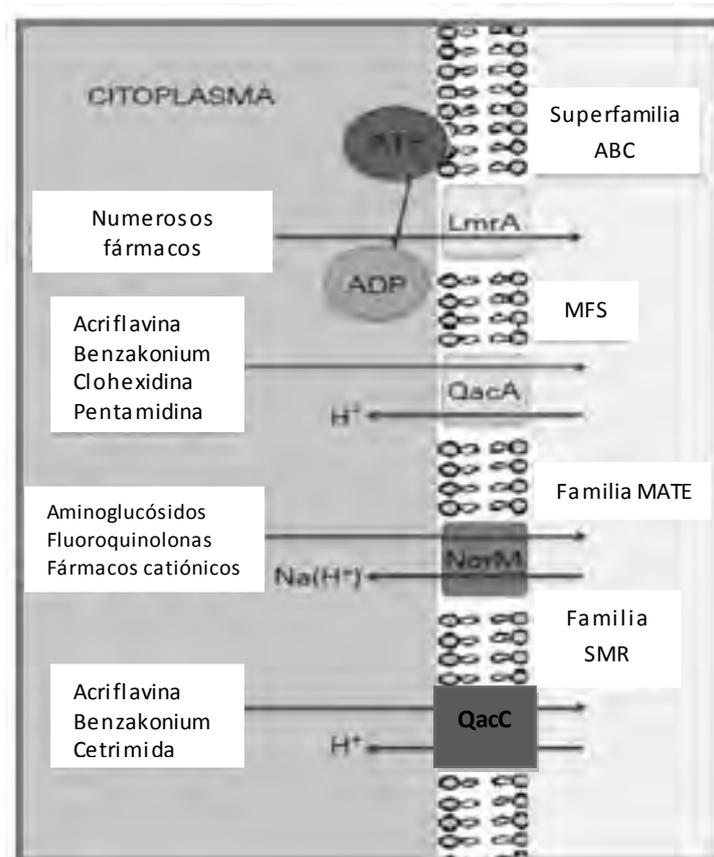
Los mecanismos intrínsecos son aquellos que se encuentran de manera natural en el cromosoma bacteriano. Se tratan de genes que pueden generar un fenotipo de resistencia tales como los genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas, los múltiples sistemas de expulsión de fármacos, las porinas en bacterias Gram negativas y la permeabilidad de las membranas celulares. [14] Un ejemplo es el caso de *P. aeruginosa* que muestra una alta resistencia intrínseca y, por lo tanto, una baja susceptibilidad a antibióticos hidrofóbicos (como los macrólidos) debido a la dificultad para penetrar la membrana externa de los microorganismos. Además, esta especie es capaz de expresar una diversidad de sistemas de bombas de expulsión multiespecíficos que exportan al exterior de la célula no sólo antibióticos, sino también una gama de colorantes, detergentes, desinfectantes y solventes orgánicos. [9]

Las bombas de expulsión están presentes en la mayoría de las bacterias aunque muchas no proporcionan una resistencia intrínseca. Sin embargo, algunas bombas de expulsión pueden estar sobre-expresadas permitiendo el desarrollo del fenotipo de resistencia (Figura 6). [9]

Las bombas de expulsión se pueden dividir en cinco familias distintas: Resistance-nodulation-cell division (RND), Major facilitator superfamily (MFS), Staphylococcal/small multidrug resistance (SMR), ATP-binding cassette (ABC) y Multidrug and toxic compound extrusion (MATE). Las bombas de expulsión de las familias RND, SMR, MFS y MATE son impulsadas por una fuerza motriz  $H^+/Na^+$ , mientras que la familia ABC funciona con la hidrólisis de ATP. [14]



**Figura 6.** Bombas de expulsión en bacterias Gram negativas. Los tres componentes de la bomba son un transportador en la membrana interna, una proteína canal en la membrana externa y una proteína de enlace periplásmica. En el estado funcional de la bomba, la proteína de enlace se pliega sobre sí misma para permitir al transportador ser llevado hacia la proteína canal permitiendo la expulsión de fármacos al exterior de la célula directamente a través de ambas membranas. <sup>[9]</sup>



**Figura 7.** Bombas de expulsión en bacterias Gram positivas. <sup>[15]</sup>

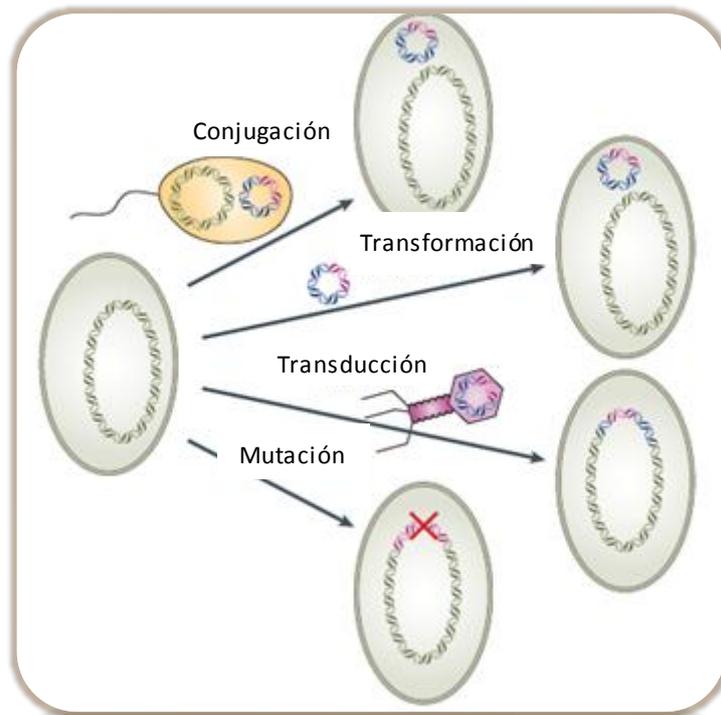
Las bombas de expulsión también pueden ser clasificadas en dos grandes grupos. El primer grupo, tiene un estrecho perfil de sustratos, actuando sobre unos pocos agentes o múltiples agentes dentro de la misma clase de fármacos. Los transportadores de antibióticos como las tetraciclinas y los macrólidos son un claro ejemplo de este grupo. El segundo grupo, tales como los miembros de la familia RND, requieren dos proteínas adicionales para conferir resistencia pero son capaces de unirse a múltiples compuestos estructuralmente no relacionados y confieren fenotipos de resistencia amplios. <sup>[14]</sup>

Las principales bombas de expulsión relevantes que se encuentran en bacterias Gram negativas pertenecen a la familia RND. En cambio, en bacterias Gram positivas generalmente se presentan las bombas que pertenecen a las familias MFS, MATE, SMR o ABC (Figura 7). <sup>[16]</sup> Asimismo, las dos familias más importantes por el número de antibióticos que pueden transportar son MFS y RND.

### **Resistencia adquirida**

Los mecanismos adquiridos pueden ocurrir por mutaciones tales como mutaciones puntuales, deleciones, inversiones o inserciones dentro del cromosoma bacteriano o por transferencia horizontal de genes (THG). <sup>[9]</sup> De manera clásica, la resistencia a antibióticos se ha atribuido a mutaciones, aunque es más común y frecuente que se relacione a elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones que pueden ser adquiridos mediante THG. <sup>[14]</sup> La THG es un proceso en donde el material genético puede ser transferido entre bacterias de la misma especie o incluso entre diferentes especies por medio de tres vías: conjugación, transformación y transducción (Figura 8). <sup>[12]</sup>

La velocidad de aparición de bacterias resistentes podría estar determinada por la combinación de los tres procesos de THG. Los mecanismos asociados a la THG incluyen la modificación del fármaco, la protección del blanco, sustitución de blancos susceptibles al fármaco, etc. La resistencia también está asociada con la amplificación de genes, la expresión reducida del blanco del antibiótico y la modificación enzimática del fármaco. <sup>[11]</sup>



**Figura 8.** Mecanismos de adquisición de resistencia. Un gen de resistencia a antibióticos (rosa) puede ser transferido por transferencia horizontal de genes mediante varias vías: conjugación, transformación por ADN desnudo que es liberado por células muertas o transducción mediada por fagos. La resistencia también puede originarse por mutaciones *de novo* (tache rojo). <sup>[11]</sup>

Las bacterias pueden volverse resistentes mediante mutaciones que hacen que la proteína blanco sea menos susceptible al agente. Ejemplo de este proceso es la resistencia a fluoroquinolonas. <sup>[13]</sup> Otro ejemplo de resistencia atribuida a modificación del blanco es la conferida por el gen *erm*, el cual generalmente está codificado por un plásmido y produce la metilación de una adenina en la posición 2058 del ARNr 50S causando resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas. <sup>[13]</sup>

Existe un mecanismo de resistencia característico para los antibióticos de origen natural, tales como aminoglucósidos (kanamicina, tobramicina y amikacina) que resultan inactivados por fosforilación enzimática, acetilación o adenilación. Además, algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos son inactivados mediante hidrólisis enzimática por  $\beta$ -lactamasas. Los genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas usualmente son transportados en plásmidos. <sup>[13]</sup> Existen cuatro grupos de  $\beta$ -lactamasas, las enzimas de clase A, C y D que son proteínas con

un residuo serina en su sitio activo y las de clase B que son metaloenzimas dependientes de zinc. [14]

### ***Elementos genéticos móviles***

El material genético que puede ser transferido mediante THG para permitir el intercambio de información genética entre especies bacterianas consta primordialmente de segmentos de ADN móvil como plásmidos, transposones o integrones. El ADN transferido horizontalmente generalmente codifica funciones que ofrecen ventajas selectivas a los microorganismos tales como resistencia a antibióticos. [9]

Los plásmidos contienen genes para resistencia y otras características. Poseen orígenes de replicación propios que les permiten replicarse de manera autónoma al cromosoma hospedero (Figura 9). Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden existir dentro de plásmidos, integrarse a otros transposones o al cromosoma hospedero. Estos segmentos de ADN codifican para una transposasa sitio-específica que les permite incorporarse en regiones cromosómicas específicas. Los integrones contienen colecciones de genes (cassettes) que poseen la secuencia para una proteína (integrasa) que permite su recombinación y son clasificados de acuerdo a la secuencia de esta proteína. Además, tienen la capacidad de integrarse de manera estable en otros ADN donde liberan, mediante un intercambio único, múltiples nuevos genes que suelen codificar para resistencia (Figura 10). [9,14]

Los integrones frecuentemente pueden encontrarse dentro de los transposones, y tanto integrones como transposones generalmente son transportados en plásmidos.

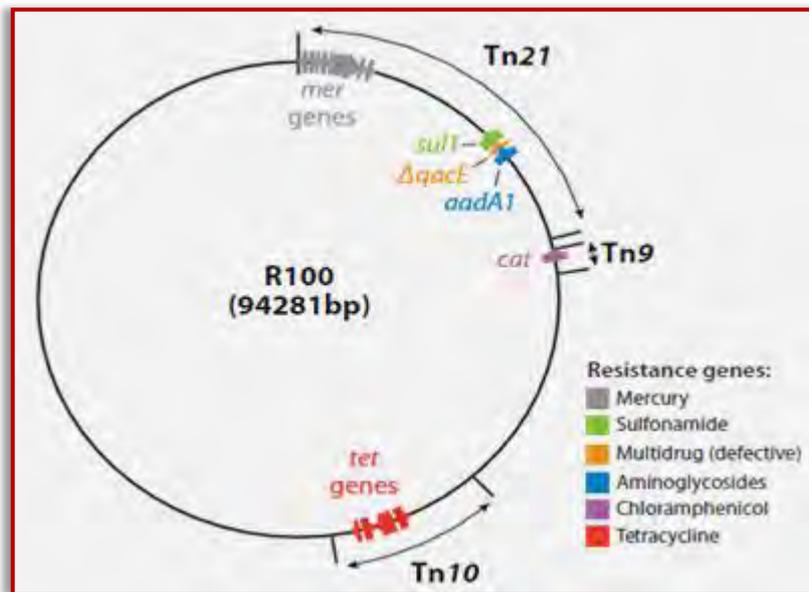


Figura 9. Mapa del plásmido R100. [13]

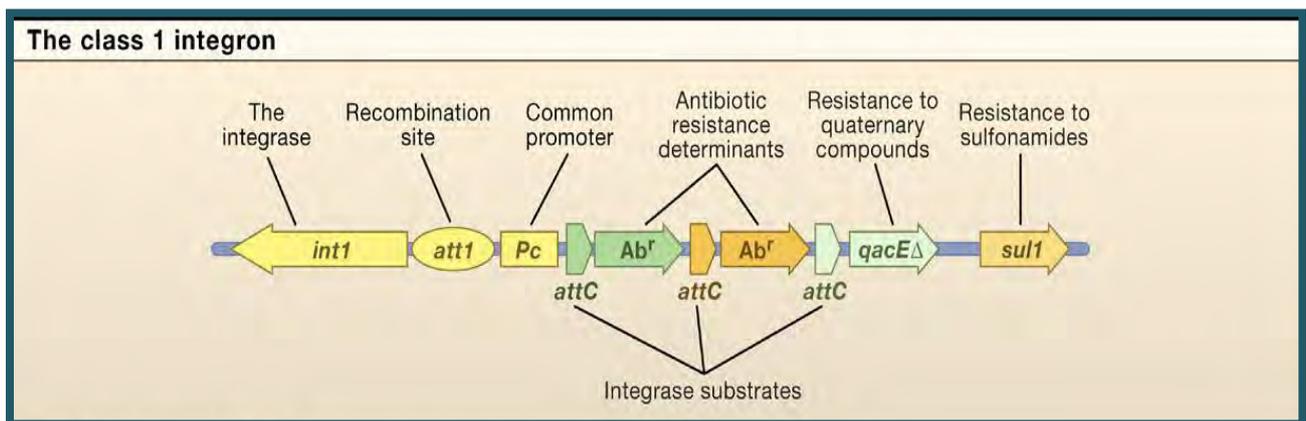


Figura 10. Integrón de clase 1. *int1* especifica la integrasa, *att1* es el sitio de recombinación primaria, *attC* es un segmento de 59 pb que es sustrato de la integrasa y *Pc* es un promotor común que permite la expresión de altos niveles de determinantes de resistencia a antibióticos tales como aminoglucósidos, β-lactámicos, cloranfenicol y trimetoprim. Los genes *qacEΔ* y *sul1* especifican para resistencia a sales cuaternarias de amonio y sulfonamidas, respectivamente. Estos dos genes sólo se encuentran en integrones clase 1. [14]

### 1.2.3. El fenómeno de multirresistencia

La mayoría de las bacterias patógenas han evolucionado a formas multirresistentes a causa del uso irracional de antibióticos. Las opciones terapéuticas para estos casos son reducidas y las estancias hospitalarias se vuelven prolongadas y muy costosas. Esto último, incrementa la morbilidad y mortalidad en los pacientes infectados. Además, en algunos casos las cepas multirresistentes incrementan su virulencia. [7]

Recientemente, *Staphylococcus aureus* se ha convertido en el principal patógeno multirresistente causante de infecciones nosocomiales. En 1959, cuando se introdujo la meticilina a la clínica, se creía que este antibiótico era una defensa segura contra las penicilinasas puesto que fue el primer antibiótico semi-sintético diseñado para resistir la inactivación por  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, la pronta aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) dentro de tres años posteriores a su uso, condujo a otras variantes multirresistentes a antibióticos. [7] Las cepas de MRSA no sólo son resistentes a meticilina sino también lo son a aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, anfenicoles, lincosamidas y a desinfectantes. La opción de tratamiento para MRSA es la vancomicina pero, desafortunadamente, en 2002 se encontraron cepas MRSA resistentes a vancomicina (VRSA). [13]

Actualmente se sabe que la resistencia a antibióticos tiene un costo biológico para el microorganismo, como pueden ser una disminución en la tasa de crecimiento bacteriano y disminución de la virulencia. Este conocimiento sugiere que si el uso de antibióticos se reduce, entonces habría una disminución en la frecuencia de bacterias resistentes por selección natural. Sin embargo, las bacterias resistentes pueden mejorar estos costos de resistencia por la adquisición de mutaciones compensatorias. [11, 12] Sería importante enfatizar que el elevado costo genético (en términos de energía) que representan las mutaciones, no hace viable que la célula acumule una serie de mutaciones que le permita tolerar grandes números de antibióticos. Por consiguiente, deben existir otros mecanismos inherentes a la célula que permiten expresar el fenotipo de multirresistencia tales como las bombas de expulsión.

### **1.3. RESISTENCIA BACTERIANA VS INFECCIONES DE PIE DIABÉTICO**

La resistencia bacteriana es un serio problema de salud pública que está presente en las infecciones de pie diabético. Estas infecciones son consecuencia de la diabetes mal controlada y se consideran la primera causa de amputaciones no traumáticas de extremidades inferiores.

La diabetes mellitus es un desorden metabólico crónico con altas tasas de morbilidad y mortalidad que van en aumento en casi todo el mundo. Se estima que para el año 2030 habrá 439 millones de adultos afectados por este desorden que se caracteriza por hiperglicemia y metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas alterado. <sup>[17, 18]</sup> A causa de que México ocupa el noveno lugar mundial en prevalencia de diabetes y se espera que para el año 2030 ocupe el séptimo, este problema de salud requiere de una atención multidisciplinaria ya que los esfuerzos y recursos asignados para su resolución no han sido suficientes para detener su incremento. <sup>[1]</sup> Además, la diabetes mellitus tiene muchas complicaciones tales como amputaciones, disfunción renal, enfermedades cardiovasculares, retinopatía y neuropatía, entre otras, que pueden perjudicar gravemente la salud de los pacientes diabéticos. <sup>[18, 19]</sup>

### 1.3.1. Infecciones de pie diabético: una complicación común de la diabetes

El pie diabético se define como cualquier lesión isquémica o infecciosa inframaleolar que afecta al paciente diabético. Debido a la pérdida de sensibilidad en los pies que sufren los pacientes diabéticos mal controlados, cualquier contusión que presenten aunada a la falta de cuidado del paciente, representan una seria exposición para el desarrollo de una úlcera que puede llegar a infectarse. La propensión a ulceraciones, infecciones y necrosis de los pies son complicaciones muy comunes de la diabetes. <sup>[4]</sup> Se estima que del 15 al 25% de los pacientes diabéticos desarrollan úlceras en sus pies a lo largo de su vida, las cuales preceden cerca del 85% de las amputaciones en extremidades inferiores en pacientes con diabetes mellitus. Además, esto incrementa el riesgo de muerte de 2 a 4 veces comparado con pacientes diabéticos sin úlceras. <sup>[20, 21]</sup> Las infecciones de pie diabético involucran piel, tejido suave y/o estructuras óseas y representan una complicación costosa de las úlceras de pie diabético. Estas infecciones son la causa más común de admisión hospitalaria relacionada a diabetes y continúa siendo una de las principales causas que conduce a la amputación de extremidades inferiores. <sup>[22]</sup>

Algunos factores que predisponen a los pacientes diabéticos a desarrollar infecciones en los pies son la neuropatía, la vasculopatía y la inmunopatía. <sup>[23]</sup>

La neuropatía diabética produce daño en los nervios de las extremidades inferiores, con lo cual las funciones somatosensoriales y autonómicas de los pacientes se ven disminuidas o completamente perdidas. Los vasos sanguíneos que transportan la sangre en las piernas se estrechan debido a la inflamación o daño al tejido deteriorando el flujo sanguíneo. Con el aumento de la presión en la planta de los pies, la pérdida de sudor y de las glándulas sebáceas, el pie diabético se vuelve seco y queratinizado, lo cual incrementa el riesgo de ulceración que posteriormente puede llegar a infectarse. A consecuencia de que los pacientes diabéticos se encuentran inmunocomprometidos, no es posible que el sistema inmunológico controle la infección adecuadamente y ésta a su vez, afecta el control de la diabetes. Este ciclo repetitivo conlleva a una hiperglicemia descontrolada que también afecta la respuesta del paciente a la infección. [20, 23]

Las infecciones de pie diabético generalmente son más difíciles de tratar debido al daño en la circulación microvascular, la neuropatía, las alteraciones anatómicas y la capacidad inmune dañada que se presenta en los pacientes diabéticos. [24] La mala evolución de la infección que no responde a la antibioticoterapia puede llevar a la amputación de alguna extremidad inferior. Se estima que entre 6% y 30% de los amputados son sometidos a una segunda amputación dentro de los tres primeros años de su amputación inicial. [5]

### 1.3.2. Microbiología de las infecciones de pie diabético

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones alrededor del mundo para determinar las especies microbianas presentes en las infecciones de pie diabético. Existen diferentes tipos de muestreo que han sido empleados para realizar estos estudios microbiológicos como son: hisopados de exudado, aspiración de material purulento o biopsias tisulares.

La mayoría de las infecciones de pie diabético son de naturaleza polimicrobiana con un promedio de tres especies bacterianas por muestra. En los procesos iniciales de las infecciones de pie diabético predominan cocos aerobios Gram positivos, principalmente estafilococos y estreptococos. En

cambio, en úlceras crónicas infectadas predominan enterococos, enterobacterias, *Pseudomonas spp.* y anaerobios. [4, 23]

Gran parte de los estudios realizados al respecto, concuerdan en que los microorganismos Gram positivos aislados con mayor frecuencia de infecciones de pie diabético son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus sp.* Por otra parte, los bacilos Gram negativos más comunes son *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.* y *Morganella morganii*. Entre los microorganismos anaerobios aislados con frecuencia se encuentran *Peptostreptococcus sp.* (cocos Gram positivos) y *Bacteroides sp.* (bacilos Gram negativos). [23, 25, 26, 27]

### 1.3.3. Tratamiento de las infecciones de pie diabético

El tratamiento inicial de las infecciones de pie diabético requiere de la administración empírica de antibióticos antes de que se obtengan los resultados microbiológicos. Después de realizar las pruebas de susceptibilidad de los aislamientos clínicos de la herida, se puede cambiar la terapia de acuerdo a estos resultados. [24]

Las infecciones leves de los pies deben ser tratadas empíricamente con antibióticos que cubran estafilococos y estreptococos tales como amoxicilina/ácido clavulánico y cefalosporinas de primera generación por vía oral. Para pacientes alérgicos a penicilinas, la clindamicina puede ser un agente alternativo efectivo. [24]

El tratamiento empírico para infecciones moderadas y/o severas incluye agentes activos contra estafilococos, estreptococos, bacilos Gram negativos y anaerobios. Los antibióticos de primera elección para estos casos incluyen agentes  $\beta$ -lactámicos en combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas tales como piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulánico o ampicilina/sulbactam. Inicialmente, los antibióticos son administrados por vía parenteral y después deben ser cambiados a antibióticos por vía oral para continuar la terapia. Los casos de osteomielitis por MRSA deben ser tratados con vancomicina o minociclina. Los agentes de amplio espectro usados con mayor

frecuencia son los carbapenémicos o combinaciones  $\beta$ -lactámicos/inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Alternativamente, clindamicina o metronidazol más una quinolona. [24]

Además del tratamiento de infecciones severas con la administración de antibióticos, también es importante realizar desbridamientos quirúrgicos del tejido desvitalizado o necrótico. Esto es esencial para el control adecuado de la infección. [24]

#### 1.3.4. El problema de la multirresistencia en infecciones de pie diabético

Las bacterias multirresistentes a antibióticos presentes en infecciones de pie diabético son un grave problema que compromete la evolución favorable del paciente, además de que son un factor que aumenta la incidencia de amputaciones en extremidades inferiores. Existen tres aspectos que se asocian a una alta tasa de aparición de microorganismos multirresistentes: [27]

- 1) Curso crónico de la herida
- 2) Tratamientos inadecuados
- 3) Hospitalización (largas estadías)

En un estudio efectuado en España por De Alcalá et al, se encontró resistencia a penicilina en todas las especies aisladas de *S. aureus*. Además, el 38% de estos aislamientos fueron MRSA y el 46% resistentes a ciprofloxacino. La bacteria Gram negativa *E. coli* resistente a ampicilina (en 71% de los aislamientos) y resistente a amoxicilina/ác. clavulánico y a ciprofloxacino (en 30% de los casos) destacó en este estudio. [27]

En un estudio publicado en 2009, Cabeza-de-vaca et al encontraron que el 86% de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes mexicanos fueron resistentes a ampicilina, 71% a ciprofloxacino y 62% a trimetoprim/sulfametoxazol. Por si esto fuera poco, el 7% de las enterobacterias aisladas fueron productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Cuando la tasa de resistencia a un antibiótico es mayor al 30%, éste se convierte en una opción pobre para el tratamiento empírico inicial. [4]

Goldstein E. et al, evaluaron la actividad de 10 antibióticos orales contra bacterias aisladas de infecciones de pie diabético llegando a la conclusión de que esparfloxacino y levofloxacino fueron los agentes con mayor actividad contra los microorganismos aislados. Sin embargo, de 32 a 36% de los aislamientos presentaron resistencia. Amoxicilina/ác. clavulánico mostraron buena actividad pero con un alto porcentaje de resistencia (en 48% de los aislamientos), principalmente en MRSA y *Pseudomonas sp.* Los nuevos agentes  $\beta$ -lactámicos (loracarbef y cefprozil) no fueron efectivos contra las bacterias aisladas. [28]

#### **1.4. ALTERNATIVAS PARA COMBATIR LA MULTIRRESISTENCIA EN INFECCIONES DE PIE DIABÉTICO**

Por milenios, las especias han jugado un papel muy importante en la cocina, la cosmética, la perfumería, la medicina y la economía. El uso terapéutico y culinario de las especias aún está presente en nuestros días. [29] Algunas especias han sido empleadas en la medicina tradicional como antibacterianos y vermícidias. Especias como el ajo, el jengibre, la canela y algunos chiles se han utilizado por siglos para tratar malestares como disentería, cálculos renales, artritis e hipertensión. Los componentes fitoquímicos de las especias juegan un papel de defensa de la planta gracias a sus propiedades antimicrobianas, antivirales y antioxidantes. [6]

En 1999, Sherman P.W. y Billing J. publicaron un estudio muy interesante sobre el uso de las especias, llegando a la conclusión de que el uso de éstas no es aleatorio, sino que ha sido consecuencia de una selección natural. Las especias producen efectos benéficos para los consumidores debido a que poseen compuestos antimicrobianos. [6] En este estudio se demostró el efecto antimicrobiano de diferentes especias contra las especies bacterianas comunes causantes del deterioro de los alimentos. Entre las especias que presentaron un mayor efecto antimicrobiano contra los microorganismos probados destacan (de mayor a menor) el ajo, la cebolla, la pimienta gorda, el orégano, el tomillo, la canela, el comino y el clavo, entre otras. [6]

A lo largo de la historia, los productos naturales (plantas y hierbas) han sido fuente inagotable de compuestos activos con actividad farmacológica que pueden ser utilizados en la clínica. Actualmente se necesita investigar más sobre estos compuestos ya que sólo se han demostrado científicamente las propiedades medicinales de una mínima cantidad de plantas.

#### 1.4.1. Propiedades de *Allium sativum* (ajo)

*Allium sativum*, mejor conocida como ajo, es una planta perteneciente a la familia *Alliaceae* a la que también pertenecen la cebolla y los puerros. Consta de un tallo alto y floreado que llega a medir hasta poco más de medio metro y de un bulbo enterrado que puede estar formado de 4 a 20 dientes que poseen sabor picante. Sus hojas son alargadas y sus flores se encuentran dentro de unas cabecitas color blanco con lila. Esta planta es originaria de Asia central, China y la zona del Mediterráneo (Figura 11).<sup>[30, 31]</sup>



**Figura 11.** Planta de *Allium sativum*.

El ajo es considerado una especia con propiedades antimicrobianas que ha sido usada desde la antigüedad tanto en la medicina tradicional como para fines culinarios, siendo el bulbo la parte más empleada de esta planta.<sup>[32]</sup> La literatura más antigua que narra el uso del ajo data de los años 2600 – 2100 a.C. en la población sumeria. El papiro egipcio *Codex Ebers* contenía 800 formulaciones médicas, de las cuales 22 mencionaban el ajo. Por otra parte, el ajo también fue muy valioso para la cultura romana. El naturalista romano Plinio el Viejo, describió los usos del ajo para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, mordeduras de serpientes, picaduras de escorpiones, demencia, convulsiones y tumores. Dentro de las civilizaciones babilónica y griega, Hipócrates, el padre de la medicina, fomentó el empleo del ajo como un diurético y para el tratamiento de tumores uterinos. Aristóteles atribuyó al ajo una cura para la rabia. Además el ajo es comúnmente usado en Europa y Asia por sus beneficios medicinales en la cicatrización.<sup>[30, 33]</sup>

## Propiedades medicinales del ajo

Históricamente, el ajo se ha utilizado por siglos en todo el mundo por varias sociedades para combatir enfermedades infecciosas ya que posee actividad antimicrobiana contra un amplio rango de microorganismos. Louis Pasteur fue el primero en describir el efecto antibacteriano de los jugos de ajo y cebolla. [34] Algunas propiedades que se han atribuido al ajo a lo largo de la historia son como estimulante, antiséptico, expectorante, antihelmíntico, antihipertensivo, diurético, carminativo, antiasmático, analgésico, insecticida, antitrombótico, antioxidante y anticancerígeno. [32]

La actividad biológica de un extracto de ajo depende de su modo de preparación. El ajo es una de las plantas medicinales más estudiadas. De 1960 a 2007 se publicaron más de 3,000 artículos sobre los efectos biológicos del ajo y preparaciones de ajo. La mayoría están enfocados a los efectos cardiovasculares, antimicrobianos y anticancerígenos del ajo. [30]

Balaji Meriga et al, evaluaron las actividades insecticidas, antimicrobianas y antioxidantes de extractos del bulbo de *Allium sativum*. Demostraron la actividad insecticida de los extractos metanólico y acuoso contra *Spodoptera litura*. El extracto acuoso mostró actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) y bacterias Gram negativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) así como actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Los extractos de hexano, cloroformo y acetato de etilo no mostraron actividad antimicrobiana alguna. [32]

En 2012 se publicó el artículo de Karuppiyah et al, en el que se demostró el efecto antibacteriano del extracto etanólico de ajo sobre bacterias multirresistentes a entre 7 y 14 antibióticos (por ejemplo, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Proteus sp.* y *Klebsiella sp.*) provenientes de infecciones de vías urinarias. [35]

## Componentes químicos del ajo

El ajo está compuesto principalmente de agua, carbohidratos, alcaloides, esteroides y de 1 – 3 % de compuestos organosulfurados (los cuales son sus

compuestos de mayor importancia médica). En 1944, Cavallito y Bailey llevaron a cabo el primer estudio definitivo sobre la química del ajo. Empleando diferentes métodos de extracción aislaron e identificaron el dialil disulfuro del aceite de ajo, la alicina de extractos etanólicos y acuosos de ajo a temperatura ambiente y la aliina de extractos con etanol en frío. [32, 33]

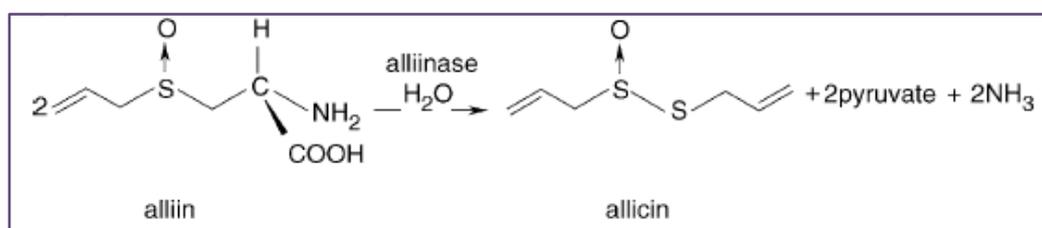
Los dientes de ajo contienen sólo unos pocos compuestos activos. El principal constituyente de los dientes de ajo es el aminoácido aliina. Sin embargo, cuando son triturados, se libera una enzima vacuolar (aliinasa) que rápidamente produce el compuesto responsable del fuerte olor del ajo, la alicina. El ajo contiene al menos 100 compuestos azufrados con propiedades medicinales. La alicina (alil 2-propentiosulfonato o dialiltiosulfonato) representa del 70 – 80 % de los tiosulfatos formados. Otros tiosulfatos liberados son moléculas reactivas que pueden sufrir numerosas transformaciones dependiendo de la temperatura, pH y solventes. Los principales productos formados después de incubación de tiosulfatos en agua son dialil trisulfuro, dialil disulfuro y alil metil trisulfuro. La incubación de alicina o alil metano tiosulfato en solventes de baja polaridad produce principalmente 1,3-vinilditina, 1,2-vinilditina y menor cantidad de ajoeno y sulfuros. [30] En la Tabla 2 se muestran algunos de los compuestos activos aislados del ajo y sus correspondientes actividades biológicas.

| <b>Compuesto activo</b>      | <b>Efecto farmacológico</b>  |
|------------------------------|--|
| <b>Aliina</b>                | Hiperlipidémico, antiagregante plaquetario   |
| <b>Alicina</b>               | Antibiótico, antifúngico, hiperlipidémico, antiagregante plaquetario, anticancerígeno, pesticida |
| <b>Alixina</b>               | Anticancerígeno  |
| <b>Alil metil trisulfuro</b> | Antiagregante plaquetario, anticancerígeno   |
| <b>Ajoeno</b>                | Antibiótico, antifúngico, antiagregante plaquetario, anticancerígeno, pesticida                  |
| <b>Dialil disulfuro</b>      | Antibiótico, hiperlipidémico, antiagregante plaquetario, anticancerígeno, pesticida              |
| <b>Metil alil trisulfuro</b> | Antiagregante plaquetario  |

**Tabla 2.** Compuestos activos de *Allium sativum* y sus actividades farmacológicas. [29]

### Alicina: principal compuesto antimicrobiano del ajo

El dialiltiosulfinato, o alicina, es el principal compuesto antibacteriano del ajo y fue identificado por Cavallito en 1944. La alicina no está presente en los dientes de ajo pero su precursor sí. La aliina (S-aliil-L-cistein sulfóxido) es el precursor estable de la alicina. Al triturar los dientes de ajo, se rompen las membranas a consecuencia del daño mecánico, lo cual permite la liberación de la aliina y la aliinasa que se encuentran en diferentes compartimentos celulares. Este último proceso permite que la aliina y la aliinasa reaccionen entre sí de manera espontánea, dando como resultado la formación de un compuesto muy reactivo, volátil y de olor picante conocido como alicina. Esta reacción es rápidamente completada en aproximadamente 30 s a temperatura ambiente. [36, 37] (Figura 12).



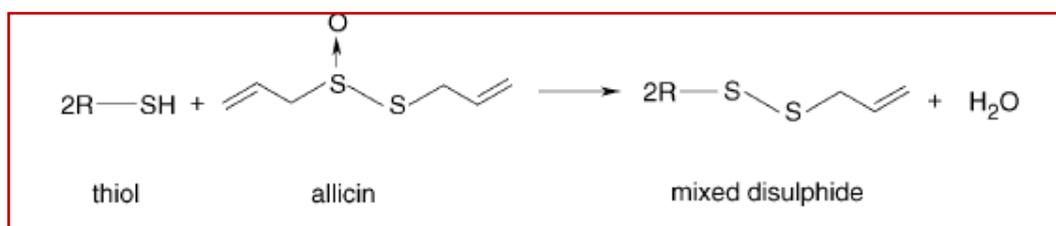
**Figura 12.** Producción de alicina a partir de aliina por la enzima aliinasa. [37]

Numerosos estudios han demostrado la actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral de la alicina. La alicina ha demostrado tener una amplia actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas incluyendo especies como *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Helicobacter pylori*. Además, varias especies multirresistentes a antibióticos como MRSA, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* fueron también sensibles al efecto de la alicina. Sin embargo, algunas especies mucoides como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* del grupo de β- hemolíticos y *Enterococcus faecium* son resistentes a la acción de la alicina. [36]

### Mecanismo de acción de la alicina

Se cree que la inhibición de enzimas microbianas que contienen grupos tiol por la rápida reacción con los tiosulfatos es el principal mecanismo implicado en

el efecto antimicrobiano de la alicina. <sup>[36]</sup> La alicina produce una serie de reacciones de intercambio tiol-disulfuro y puede reaccionar con los grupos tiol libres de las proteínas (Figura 13). Por ejemplo, se ha encontrado que en amibas, la alicina (a concentraciones menores de 10  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibe fuertemente las enzimas alcohol deshidrogenasa, cistein proteasa y tioredoxin reductasa, las cuales son críticas para mantener el equilibrio redox del parásito. La alicina también inhibe de manera irreversible la papaína y la alcohol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  de *Thermoanaerobium brockii*, una bacteria anaeróbica. Además, la alicina puede inhibir específicamente otras enzimas bacterianas tales como la acetato cinasa y la fosfotransacetil-CoA sintetasa. <sup>[36]</sup> En concentraciones mayores a 100  $\mu\text{g/mL}$ , se ha visto que la alicina es tóxica para cultivos de células animales. Sin embargo, la alicina muestra una mayor sensibilidad y selectividad hacia las células microbianas, ya que en las células animales los altos niveles de glutatión actúan como protección contra cualquier daño oxidativo, reduciendo cualquier enlace disulfuro. <sup>[36]</sup>



**Figura 13.** Reacción general entre la alicina y grupos tiol. <sup>[37]</sup>

Por otro lado, también se ha encontrado que la alicina interfiere con las síntesis de ácidos nucleicos. En *Salmonella Typhimurium*, la alicina muestra una inhibición parcial de la síntesis de ADN pero un efecto inmediato sobre la síntesis de ARN. La ARN polimerasa de *E. coli*, en la subunidad  $\alpha$ , contiene un grupo sulfhidrilo que ha mostrado ser reactivo con derivados monomercúricos de fluoresceína (un reactivo específico para grupos tiol). Por lo que se sugiere que la ARN polimerasa debe ser un blanco de acción de la alicina. <sup>[36]</sup>

#### 1.4.2. Propiedades de *Cinnamomum zeylanicum* (canela)



**Figura 14.** *Cinnamomum zeylanicum*.  
a) árbol, b) fruto, c) canela.

*Cinnamomum zeylanicum*, comúnmente conocida como canela, ha sido una especia ampliamente usada por miles de años. Actualmente se conocen más de 250 especies de *Cinnamomum* en todo el mundo. *C. zeylanicum* (también llamado *Cinnamomum verum*) es un árbol que pertenece a la familia *Lauraceae* que llega a medir hasta 20 m de altura. Su corteza es gruesa, rojiza por dentro y pálida por fuera.

Sus hojas jóvenes son color rosado y posteriormente se vuelven verdes, sus pequeñas flores son de color amarillo pálido y sus frutos ovoides carnosos de color morado oscuro (Figura 14). Su nombre viene de la raíz griega *kinnamon* (madera dulce). Este árbol es originario de la isla Sri Lanka (Ceylán) y del suroeste de India. <sup>[38, 39]</sup>

La canela tiene un delicado aroma dulce y sabor picante, por lo que es ampliamente utilizada en preparaciones farmacéuticas, condimentos, cosméticos, alimentos, bebidas y en la industria química. <sup>[42]</sup> La canela se obtiene de la corteza interna del árbol durante la temporada de lluvias, lo que facilita retirar la corteza exterior. Posteriormente, la corteza interna se corta, se enrolla y se rellena con fragmentos de corteza para entonces secarla. Antes de ser comercializados, los rollos de canela sufren un proceso de blanqueamiento. <sup>[40]</sup>

Hacia el año 2800 a.C. el Emperador Shen Nung, padre de la medicina China, describió los primeros usos de la canela en un escrito de hierbas. En Egipto, especias como la canela, el comino, el anís, el orégano y otras especias exóticas fueron utilizadas como ingredientes en los procesos de momificación. El uso de las especias (incluyendo la canela) fue introducido a Europa durante la invasión romana. La canela alcanzó su mayor valor entre los siglos XVI y XVII. La corteza interior del árbol ha sido empleada en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo y como condimento para alimentos en Europa y en México. Actualmente, China es el principal país productor de canela. <sup>[38]</sup>

## **Principales usos de la canela**

Entre los usos tradicionales de la canela encontramos sus aplicaciones como astringente, germicida y antiespasmódico. Además, es utilizada para el tratamiento de trastornos digestivos (cólico, dolor, diarrea), vómito, disnea, inflamación del ojo, leucorrea, vaginitis, reumatismo, neuralgia, heridas y dolor de muelas. Asimismo, la canela fue uno de los primeros tratamientos para la bronquitis crónica. <sup>[39, 40]</sup> Recientemente, diferentes estudios han demostrado que los extractos de canela poseen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, insecticidas, antioxidantes y antimutagénicas. <sup>[41]</sup> Además, se han demostrado los efectos de la canela como agente hipoglucemiante, hipocolesterolemia y como cicatrizante. <sup>[40]</sup>

## **Composición química del aceite de canela**

Las hojas y corteza de *Cinnamomum zeylanicum* son las principales fuentes de aceite de canela. La mayoría de los constituyentes químicos de los aceites esenciales de canela son monoterpenos (alcanfor, alcanfeno, cuminaldehído, geraniol, limoneno, linalol, alfa y beta-pineno, etc.), sesquiterpenos (beta-cariofileno, farnesol, beta-selano, etc.) y compuestos oxigenados como el cinamaldehído, el ácido cinámico, el alcohol cinámico y el eugenol. <sup>[39, 40]</sup> El principal constituyente del aceite de corteza de canela es el cinamaldehído, mientras que el eugenol es el principal constituyente del aceite de hojas de canela. La composición aproximada de una muestra comercial de aceites esenciales de *C. zeylanicum* es de 63% cinamaldehído, 8% limoneno, 7% eugenol, 5.5% cinamaldehído propileno y entre 1 y 2% son compuestos terpenoides. <sup>[40]</sup>

## **Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales**

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales son conocidas desde hace muchos años. El rango de actividad antimicrobiana de los componentes de los aceites esenciales es el siguiente: fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos. <sup>[43]</sup> Diferentes estudios han demostrado el efecto sinérgico entre los aceites esenciales y los antibióticos con el objetivo de producir un efecto más potente que los antimicrobianos convencionales. Por ejemplo, Rosato et al, demostraron el efecto sinérgico

entre el aceite de *Pelargonium graveolens* (rosa geranio) y norfloxacinó contra *S. aureus* y *B. cereus*. Pyun y Shin demostraron que la combinación entre *Allium sativum* (ajo) y ketoconazol presentó un efecto sinérgico sobre tres especies de *Trichophyton*.<sup>[44]</sup>

#### Aceite esencial de canela

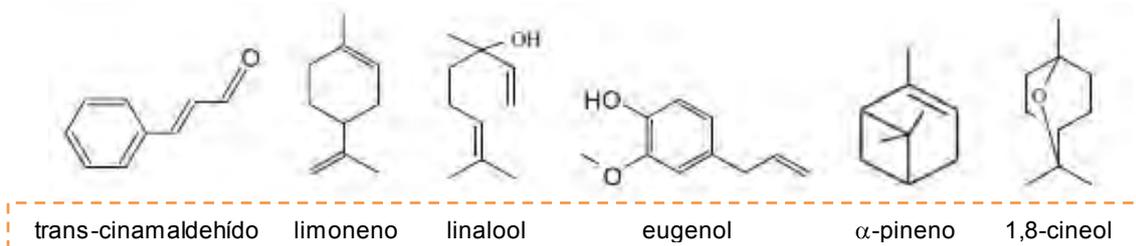
Diferentes estudios han evaluado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela contra bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Se ha demostrado un efecto eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria sp.* y *Candida albicans*.<sup>[41, 45]</sup>

Mehmet Unlu et al, realizaron un análisis de cromatografía de gases para determinar la composición química del aceite esencial de corteza de *C. zeylanicum*. Se identificaron nueve compuestos que representaban el 99.24% del aceite total (Tabla 3). Los principales compuestos del aceite fueron (E)-cinamaldehído o *trans*-cinamaldehído (68.95%), benzaldehído (9.94%), (E)-cinamil acetato (7.44%), limoneno (4.42%) y eugenol (2.77%). Otros compuestos analizados representaron 0.76% del aceite. Numerosos reportes realizados sobre la composición química del aceite esencial de corteza de *C. zeylanicum* también han confirmado que el *trans*-cinamaldehído es el componente principal de este aceite. Otros constituyentes principales que han sido reportados son  $\alpha$ -pineno, benzaldehído, limoneno, linalol y eugenol (Figura 15).<sup>[41]</sup>

|   | <b>Compuestos</b>   | <b>%</b> |
|---|---------------------|----------|
| 1 | $\alpha$ -Pineno    | 1.64     |
| 2 | Benzaldehído        | 9.94     |
| 3 | 1,8-Cineol          | 1.55     |
| 4 | Limoneno            | 4.42     |
| 5 | Linalool            | 1.38     |
| 6 | (E)-Cinamaldehído   | 68.95    |
| 7 | Eugenol             | 2.77     |
| 8 | (E)-Cinamil acetato | 7.44     |
| 9 | (E)-ácido cinámico  | 1.15     |
|   | Total               | 99.24    |

**Tabla 3.** Composición química del aceite esencial de corteza de *C. zeylanicum*.<sup>[41]</sup>

Además, otros estudios han demostrado las propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antifúngicas, antibacterianas y cicatrizantes del cinamaldehído y eugenol aislados de canela. [38]



**Figura 15.** Estructura química de compuestos presentes en el aceite esencial de canela.

### Cinamaldehído

El cinamaldehído (3-fenil-2-propen-1-al) es un líquido amarillo claro que tiene una nota aromática picante. Este aldehído aromático es el principal componente del aceite esencial de canela y es el que proporciona el aroma característico de esta especia. En Estados Unidos, la Food and Drug Administration (FDA) ha reconocido a esta molécula como segura y ha aprobado su uso en alimentos. El cinamaldehído ha mostrado ser activo contra bacterias patógenas transmitidas por alimentos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, hongos y virus. [46]

### **Mecanismo de acción de los aceites esenciales**

Debido a que los aceites esenciales poseen una diversidad de compuestos, su acción antimicrobiana puede ser atribuida al efecto de diferentes componentes, pudiendo presentar diferentes mecanismos de acción en diferentes sitios celulares. La naturaleza hidrofóbica de los aceites esenciales les permite interactuar con la membrana fosfolipídica de las bacterias, teniendo como resultado la fuga de componentes intracelulares así como el reflujó de iones potasio, lo que eventualmente conduce a la muerte celular. [47]

Por otro lado, la composición química de los aceites esenciales o sus compuestos volátiles ha contribuido de gran manera a elucidar sus mecanismos antimicrobianos. Los compuestos volátiles no sólo actúan sobre un sitio blanco en la célula sino que también pueden unirse a proteínas

celulares. Se ha encontrado que algunos aceites esenciales son responsables de la inhibición de proteínas enzimáticas en algunas bacterias patógenas. [47] Los aceites esenciales actúan mediante varios mecanismos incluyendo ataque a la bicapa fosfolipídica de la membrana celular y alteración de sistemas enzimáticos comprometiendo el material genético de la bacteria. [45]

Con base a lo anterior, es claro que el uso de los antibióticos para el tratamiento de infecciones de pie diabético es poco eficiente en la mayoría de los casos a causa de los complejos mecanismos de resistencia que pueden permitir a las bacterias incluso ser multirresistentes a diez o más antibióticos de manera simultánea. Esto se convierte en un serio problema de salud pública que aumenta las tasas de mortalidad, además de que tiene importantes repercusiones económicas, sociales, laborales y emocionales. Por consiguiente, ha crecido el interés en buscar nuevas alternativas naturales de tratamiento para las infecciones de pie diabético que sean más potentes y eficientes contra cepas multirresistentes a los antibióticos convencionales. Debido a que algunas especias representan una fuente de compuestos antimicrobianos potenciales contra bacterias multirresistentes tales como el ajo (*Allium sativum*) y la canela (*Cinnamomum zeylanicum*), éstas podrían ser buenos candidatos para el tratamiento efectivo de las infecciones de pie diabético.

## CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

Posiblemente el extracto acuoso de ajo y el aceite esencial de canela presenten un potente efecto antimicrobiano contra bacterias multirresistentes aisladas de infecciones de pie diabético.

### 2.2. Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano de las especias *Allium sativum* (ajo) y *Cinnamomum zeylanicum* (canela) sobre bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de infecciones de pie diabético.

### 2.3. Objetivos particulares

- ✓ Aislar y caracterizar bacterias multirresistentes a antibióticos presentes en muestras de pie diabético.
  
- ✓ Realizar perfiles de susceptibilidad a antibióticos (antibiogramas) tanto a la población total como a las diferentes cepas aisladas de las muestras.
  
- ✓ Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de ajo y del aceite esencial de canela sobre las bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de muestras de pie diabético.

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA



*Figura 16.* Diagrama general de trabajo.

### 3.1. Obtención de muestras de pie diabético

Las muestras fueron recolectadas de tres pacientes con infecciones de pie diabético en agosto de 2012 mediante un hisopado de la herida. Los hisopos de algodón posteriormente fueron colocados en caldo BHI como medio de transporte para su envío al laboratorio de microbiología. Previamente al muestreo, uno de los pacientes había recibido limpieza aséptica de la herida con yodo (muestra PD 1). La edad aproximada de los pacientes fue entre 40 – 45 años. Todas las muestras fueron recolectadas siguiendo los tratados de Helsinki.

### 3.2. Aislamiento y caracterización de cepas

Las muestras transportadas al laboratorio fueron transferidas a tubos con caldo Luria y se designaron PD1, PD2 y PD3 (PD, abreviación de pie diabético). Posteriormente, PD1, PD2 y PD3 fueron sembradas en los medios selectivos y diferenciales MSA y Mac Conkey para el aislamiento de bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, respectivamente. Las cepas aisladas de

cada muestra fueron identificadas mediante tres metodologías: 1) pruebas bioquímicas convencionales, 2) utilizando tiras api® 20E de bioMérieux S.A de C.V. y 3) mediante el equipo automatizado Vitek® 2 de bioMérieux S.A de C.V.

### 3.3. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Se realizaron pruebas de susceptibilidad a antibióticos siguiendo el método de Kirby-Bauer para todas las muestras (PD1, PD2 y PD3) y para las diferentes cepas aisladas de las muestras utilizando multidiscos con 12 antibióticos para bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Tabla 4). La estructura química de estos antibióticos se muestra en el ANEXO I.

| Tipo de bacterias | Antibiótico                  | Clase                             |
|-------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| Gram positivas    | Clindamicina                 | Lincosamidas                      |
|                   | Eritromicina                 | Macrólidos                        |
|                   | Penicilina                   | Penicilinas                       |
|                   | Tetraciclina                 | Tetraciclinas                     |
|                   | Gentamicina                  | Aminoglucósidos                   |
|                   | Sulfametoxazol / trimetoprim | Sulfonamidas                      |
|                   | Ampicilina                   | Penicilinas                       |
|                   | Cefotaxima                   | Cefalosporinas de 3ra. Generación |
|                   | Ciprofloxacino               | Quinolonas de 2da. Generación     |
|                   | Dicloxacilina                | Penicilinas                       |
|                   | Cefalotina                   | Cefalosporinas de 1ra. Generación |
|                   | Vancomicina                  | Glicopéptidos                     |
| Gram negativas    | Carbenicilina                | Penicilinas                       |
|                   | Cefalotina                   | Cefalosporinas de 1ra. Generación |
|                   | Cloranfenicol                | Anfenicoles                       |
|                   | Amikacina                    | Aminoglucósidos                   |
|                   | Gentamicina                  | Aminoglucósidos                   |
|                   | Sulfametoxazol / trimetoprim | Sulfonamidas                      |
|                   | Ampicilina                   | Penicilinas                       |
|                   | Cefotaxima                   | Cefalosporinas de 3ra. Generación |
|                   | Ciprofloxacino               | Quinolonas de 2da. Generación     |
|                   | Nitrofurantoína              | Nitrofuranos                      |
|                   | Netilmicina                  | Aminoglucósidos                   |
|                   | Norfloxacino                 | Quinolonas de 2da. Generación     |

**Tabla 4.** Multidiscos de antibióticos MULTIBAC-ID S.A.

### 3.4. Preparación de los extractos de ajo y canela

El extracto acuoso de ajo fue preparado mediante una modificación de la técnica empleada por Fani MM et al, 2007. [48] Por otro lado, el aceite esencial de canela se obtuvo por el método de hidrodestilación según el manual de prácticas de Química Orgánica I de la Facultad de Química, UNAM. [49]

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

Se pesaron 150 g de dientes de ajo pelados y se homogeneizaron en una licuadora con 150 mL de agua destilada estéril. El homogeneizado fue filtrado en gasas para retirar los fragmentos grandes; el filtrado obtenido fue ajustado a un pH de 4 con ácido clorhídrico. Este último filtrado fue pasado por filtros Whatman No. 1, 2 y 5, respectivamente. El nuevo filtrado fue centrifugado a 2000 rpm y el sobrenadante recuperado finalmente fue pasado a través de filtros Millipore de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ .

### **Aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)**

Para obtener aceite esencial de canela se utilizó la técnica de hidrodestilación. Se pesaron 60 g de canela (previamente trozada en licuadora en seco) y se colocaron en un matraz bola con 320 mL de agua. Se destilaron por 2.5 h a una temperatura de 60°C. Finalmente, las fases del producto destilado fueron separadas con acetato de etilo y el aceite obtenido se dejó tres días a temperatura ambiente para que se evaporara el disolvente.

### **3.5. Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos de ajo y canela sobre bacterias multirresistentes aisladas de infecciones de pie diabético**

Para probar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) y del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre la población bacteriana de cada una de las muestras de pie diabético se siguió el método de difusión en agar en pozos. Se inocularon alícuotas de las muestras equivalentes a 0.5 de la escala McFarland en una caja de agar nutritivo y después de realizar pozos sobre la superficie del agar se colocaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto a probar en los pozos. Después de incubar de 18 a 24h se prosiguió a medir los halos de inhibición de cada extracto.

Más adelante se siguió con esta metodología pero con la variante de difusión en discos, utilizando en vez de pozos, discos de papel filtro estériles sobre los que se absorbieron diferentes cantidades de los extractos a probar. Las

cantidades utilizadas del extracto acuoso de ajo fueron 15, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{L}$  y las cantidades de aceite esencial de canela utilizadas fueron 5, 10 y 20  $\mu\text{L}$ .

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. En todos los casos se utilizó un control negativo, siendo agua destilada estéril para los experimentos con el extracto acuoso de ajo y aceite mineral estéril para los experimentos con aceite esencial de canela.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1. Identificación de la población bacteriana de las muestras

Se aislaron un total de siete cepas diferentes de las tres muestras de pie diabético (Tabla 5).

| Muestra | Cepa aislada | Microorganismo identificado   |
|---------|--------------|-------------------------------|
| PD 1    | MSA 1        | <i>Enterococcus faecalis</i>  |
|         | PD1 L+       | <i>Escherichia coli</i>       |
|         | PD1 L-       | <i>Morganella morganii</i>    |
| PD 2    | MSA 2        | <i>Enterococcus faecalis</i>  |
|         | PD2 L-       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PD 3    | MSA 3        | <i>Enterococcus faecalis</i>  |
|         | PD3 L-       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

**Tabla 5.** Bacterias aisladas de las muestras de pie diabético.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales realizadas a las tres cepas Gram positivas aisladas de las infecciones de pie diabético.

| Resultados de las pruebas bioquímicas convencionales de las cepas Gram positivas |                    |          |         |                |         |      |           |
|--|--------------------|----------|---------|----------------|---------|------|-----------|
| Cepa aislada   | Crecimiento en MSA | Catalasa | Oxidasa | Bilis-Esculina | Citrato | Urea | Hemólisis |
| MSA 1 *  | +                  | -        | -       | +              | -       | -    | No        |
| MSA 2 *  | +                  | -        | -       | +              | -       | -    | No        |
| MSA 3 *  | +                  | -        | -       | +              | -       | -    | No        |

\* *Enterococcus faecalis*

**Tabla 6.** Pruebas bioquímicas de cepas Gram positivas.

Por otro lado, en la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas de las cuatro cepas Gram negativas aisladas de las infecciones de pie diabético, que se llevaron a cabo utilizando las tiras api® 20E.

| Sistema api® 20E |  |  | Resultados de las cepas Gram negativas |                     |                     |                     |
|------------------|--|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|
| Prueba           | Sustrato   | Reacciones   | PD1 L+ <sup>1</sup>                    | PD1 L- <sup>2</sup> | PD2 L- <sup>3</sup> | PD3 L- <sup>4</sup> |
| ONPG             | 2-nitrofenil-βD-galactopiranosido                    | β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa) | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| ADH              | L-arginina   | Arginina-dihidrolasa                                     | -                                      | -                   | +                   | +                   |
| LDC              | L-lisina   | Lisina descarboxilasa                                    | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| ODC              | L-ornitina   | Ornitina descarboxilasa                                  | +                                      | +                   | -                   | -                   |
| CIT              | Citrato trisódico                                    | Utilización de citrato                                   | -                                      | +                   | +                   | +                   |
| H <sub>2</sub> S | Tiosulfato de sodio                                  | Producción de H <sub>2</sub> S                           | -                                      | -                   | -                   | -                   |
| URE              | Urea   | Ureasa   | -                                      | +                   | -                   | +                   |
| TDA              | L-triptófano   | Triptofano desaminasa                                    | -                                      | +                   | -                   | -                   |
| IND              | L-triptófano   | Producción de indol                                      | +                                      | +                   | -                   | -                   |
| VP               | Piruvato de sodio                                    | Producción de acetoina                                   | -                                      | -                   | -                   | -                   |
| GEL              | Gelatina bovina                                      | Gelatinasa   | -                                      | -                   | +                   | +                   |
| GLU              | D-glucosa  | Fermentación-oxidación de glucosa                        | +                                      | +                   | +                   | +                   |
| MAN              | D-manitol  | Fermentación-oxidación                                   | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| INO              | Inositol   | Fermentación-oxidación                                   | -                                      | -                   | -                   | -                   |
| SOR              | D-sorbitol   | Fermentación-oxidación                                   | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| RHA              | L-ramnosa  | Fermentación-oxidación                                   | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| SAC              | D-sacarosa   | Fermentación-oxidación                                   | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| MEL              | D-melibiosa  | Fermentación-oxidación                                   | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| AMY              | Amigdalina   | Fermentación-oxidación                                   | -                                      | -                   | -                   | -                   |
| ARA              | L-arabinosa  | Fermentación-oxidación                                   | +                                      | -                   | -                   | -                   |
| OX               | Diclorhidrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamina | Citocromo-oxidasa  | -                                      | -                   | +                   | +                   |

<sup>1</sup> *Escherichia coli*  
<sup>2</sup> *Morganella morganii*  
<sup>3</sup> *Pseudomonas aeruginosa*  
<sup>4</sup> *Pseudomonas aeruginosa*

**Tabla 7.** Pruebas bioquímicas de cepas Gram negativas.

#### 4.2. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los antibiogramas realizados con los multidiscos MULTIBAC-ID sobre las muestras de pie diabético.

| Muestra | Número de antibióticos no efectivos | Número de antibióticos efectivos |
|---------|-------------------------------------|----------------------------------|
| PD 1    | 11                                  | 1                                |
| PD 2    | 11                                  | 1                                |
| PD 3    | 10                                  | 2                                |

**Tabla 8.** Resultados de los antibiogramas de las muestras de pie diabético.

**Nota:** Se considera antibiótico efectivo al que presenta un halo de inhibición mayor a 15 mm de diámetro.

En la Figura 17 se observan los perfiles de multiresistencia de las siete cepas aisladas de las muestras.

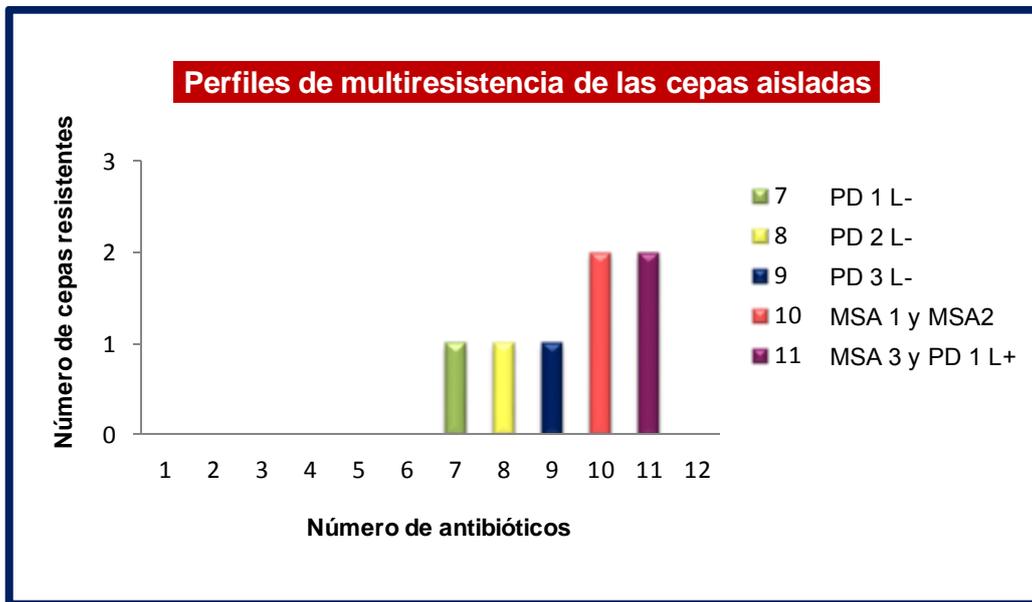


Figura 17. Perfiles de multiresistencia de las cepas aisladas de muestras de pie diabético.

En la Figura 18 se presentan los porcentajes de resistencia de las cepas aisladas por clase de antibióticos utilizados en los antibiogramas.

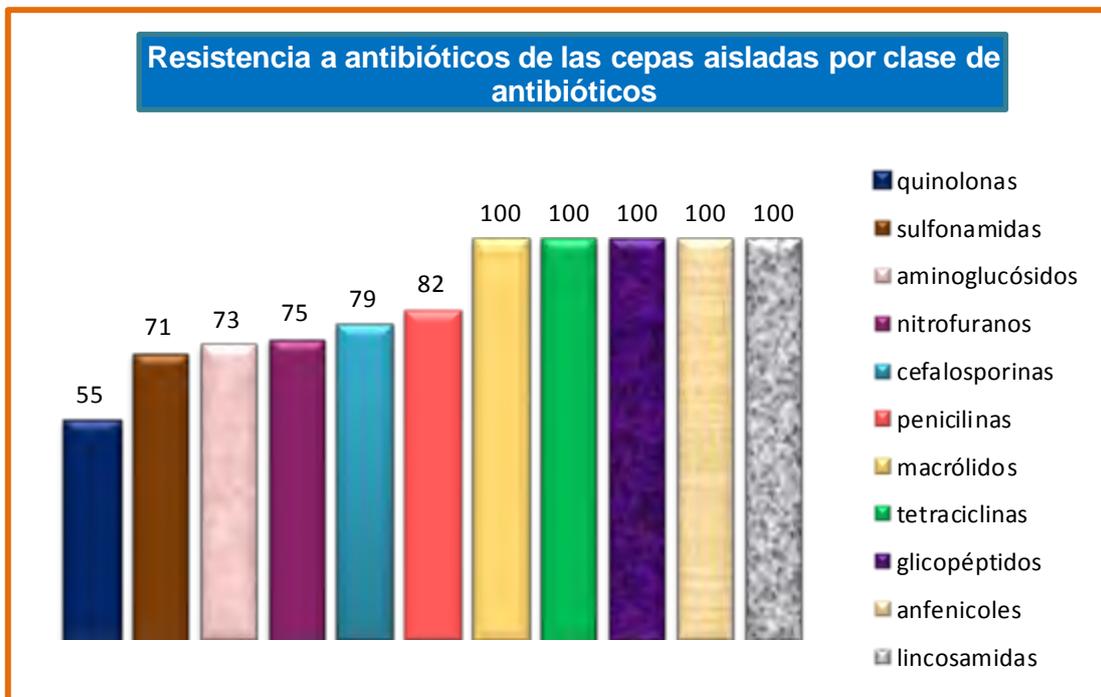


Figura 18. Porcentajes de resistencia de las cepas aisladas por clase de antibióticos.

#### 4.3. Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) y del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre bacterias multirresistentes aisladas de infecciones de pie diabético

En la Tabla 9 se presentan los resultados del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de ajo y del aceite esencial de canela por el método de difusión en agar en pozos sobre la población bacteriana de cada muestra.

| Diámetro del halo de inhibición (mm) |                        |                           |
|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Pozos con 50 µL                      |                        |                           |
| Muestra                              | Extracto acuoso de ajo | Aceite esencial de canela |
| PD 1                                 | 18                     | 18                        |
| PD 2                                 | 11                     | 18                        |
| PD 3                                 | 11                     | 21                        |

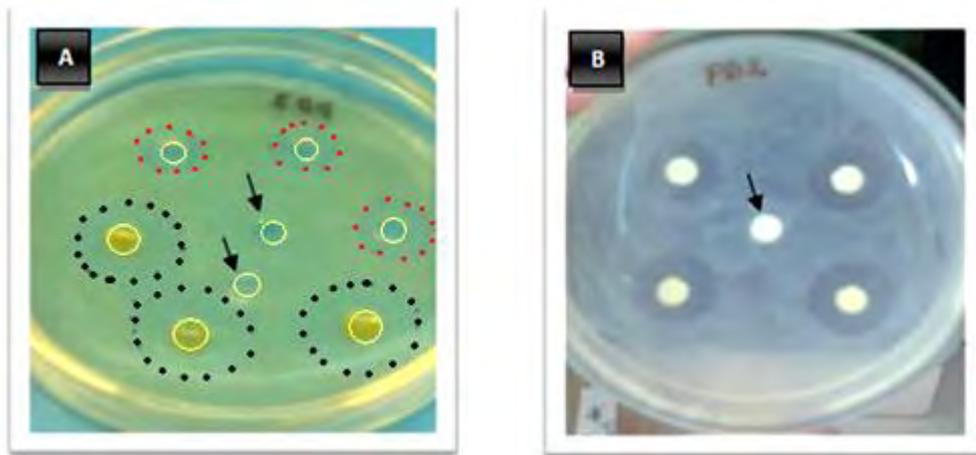
**Tabla 9.** Diámetro promedio de los halos de inhibición del extracto acuoso de ajo y del aceite esencial de canela por el método de difusión en pozos.

En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de ajo y del aceite esencial de canela por el método de difusión en discos sobre la población bacteriana de cada muestra.

| Diámetro del halo de inhibición (mm) |                        |       |                           |       |                           |
|--------------------------------------|------------------------|-------|---------------------------|-------|---------------------------|
| Muestra                              | Extracto acuoso de ajo |       | Aceite esencial de canela |       | Antibiótico de referencia |
|                                      | 20 µL                  | 50 µL | 5 µL                      | 10 µL | (CPF)<br>5 µg             |
| PD 1                                 | 10                     | 15    | 18                        | 23    | 17                        |
| PD 2                                 | 8                      | 10    | 17                        | 19    | 17                        |
| PD 3                                 | 7                      | 10    | 17                        | 19    | 25                        |

**Tabla 10.** Diámetro promedio de los halos de inhibición del extracto acuoso de ajo y del aceite esencial de canela por el método de difusión en discos.

En la Figura 19 se muestran imágenes del efecto antimicrobiano de *Allium sativum* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre la población bacteriana de las muestras con ambas metodologías: difusión en pozos y difusión en discos.



**Figura 19.** Efecto antimicrobiano de *Allium sativum* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre bacterias multirresistentes de pie diabético. A) Método de difusión en pozos con 50 $\mu$ L de extracto, las líneas punteadas indican el tamaño del halo de inhibición (rojas para ajo y negras para canela), los círculos amarillos indican el diámetro del pozo y las flechas negras señalan los controles (agua destilada y aceite mineral para ajo y aceite de canela, respectivamente). B) Método de difusión en discos con 5 $\mu$ L (discos superiores) y 10 $\mu$ L (discos inferiores) de aceite esencial de canela. La flecha negra señala el disco control (aceite mineral).

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Como se observa en la Tabla 5, se lograron aislar y caracterizar un total de siete diferentes cepas bacterianas de las tres muestras de pie diabético (PD 1, PD 2 y PD 3). Todas las muestras presentaron tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas. El microorganismo Gram positivo común en las tres muestras fue *Enterococcus faecalis*, mientras que de las muestras PD 2 y PD 3 se aisló la especie Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Sólo la muestra PD 1 presentó dos especies Gram negativas (*Escherichia coli* y *Morganella morganii*). Con base a la literatura especializada [23, 25, 26, 27], podemos decir que todas las cepas aisladas son parte de la microbiota presente usualmente en infecciones de pie diabético. Además, se sabe que estas infecciones frecuentemente son polimicrobianas, llegando a encontrarse desde dos a cinco especies distintas por muestra, lo cual concuerda con los microorganismos aislados en las tres muestras de estudio.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de cepas se muestran en las Tablas 6 y 7. Los resultados obtenidos mediante la galería api® 20E y las pruebas bioquímicas convencionales fueron congruentes con los obtenidos en el sistema automatizado Vitek® 2 de bioMérieux.

En los resultados de los antibiogramas (Tabla 8) se observó claramente que la mayoría de la población bacteriana de las muestras fue resistente a diez y once de los antibióticos de manera simultánea. El único antibiótico que resultó efectivo contra la población bacteriana en todas las muestras fue ciprofloxacino. Esto nos refleja la grave situación del fenotipo de multirresistencia en infecciones de pie diabético debido a que las opciones de tratamiento para eliminar a los microorganismos implicados en estas infecciones son muy escasas. Además, este fenotipo incrementa de manera significativa el riesgo de amputaciones en extremidades inferiores. Por otra parte, recordando que se realizó una limpieza aséptica previa a la toma de la muestra PD 1, ésta presentó bacterias multirresistentes a antibióticos al igual que las otras muestras. Por lo tanto, las limpiezas asépticas efectuadas en la zona de la infección de pie diabético no contribuyen de gran manera en la

disminución de la carga microbiana. Las siete cepas aisladas fueron resistentes al menos a siete antibióticos de manera simultánea y dos de estas cepas fueron resistentes hasta once antibióticos. De los antibióticos que resultaron eficaces contra las cepas Gram positivas aisladas se encuentra la ampicilina y la combinación sulfametoxazol/trimetoprim, mientras que contra las cepas Gram negativas cuatro antibióticos fueron eficaces: cefotaxima, amikacina, ciprofloxacino y norfloxacino.

En la Figura 17 se muestran los perfiles de multiresistencia de todos los aislamientos de pie diabético. Se observó que las cepas que presentaron resistencia a más antibióticos de manera simultánea fueron las Gram positivas MSA 1, MSA 2 y MSA 3 (todas ellas *Enterococcus faecalis*), mientras que *Escherichia coli* fue la bacteria Gram negativa más resistente. Estos aislamientos mostraron ser multiresistentes a entre diez y once antibióticos.

La Figura 18 muestra los porcentajes de resistencia de las siete cepas aisladas por clase de antibióticos utilizados en los antibiogramas. Todas las cepas Gram positivas aisladas fueron resistentes a los macrólidos (eritromicina), tetraciclinas (tetraciclina), lincosamidas (clindamicina) y glicopéptidos (vancomicina) contenidos en los multidiscos utilizados. Como se mencionó anteriormente, el problema de la multiresistencia en bacterias disminuye las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones y según estos resultados, parece ser que entre las mejores opciones contra estas bacterias multiresistentes causantes de infecciones de pie diabético se encuentran las quinolonas (como ciprofloxacino). En este sentido, cabe mencionar que la vancomicina es considerada la última opción de tratamiento contra infecciones causadas por bacterias Gram positivas y como se observa en la Figura 18, el 100% de los aislamientos Gram positivos fueron resistentes a vancomicina.

Después de probar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de ajo y el aceite esencial de canela por el método de difusión en pozos sobre la población bacteriana de cada muestra (Tabla 9), ambos extractos presentaron inhibición sobre el crecimiento bacteriano de las muestras, siendo más efectivo en todos los casos el efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela.

El extracto acuoso de ajo presentó una mayor actividad antimicrobiana sobre la población de la muestra PD 1 (*E. faecalis*, *E. coli* y *M. morganii*) comparado con las otras muestras. Las cepas *E. faecalis* y *P. aeruginosa* presentes en las muestras PD 2 y PD 3 fueron más resistentes al efecto de este extracto. Cabe mencionar que en la revisión sobre la alicina de Ankri y Mirelman, [36] se menciona que existen algunas especies mucoides de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* y Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos que son resistentes a la acción de esta molécula. Después de realizar experimentos a mayores concentraciones de extracto acuoso de ajo en pozos ( $\leq 130 \mu\text{L}$ ) contra la población bacteriana de las muestras, no se observó un efecto mayor al obtenido con los  $50 \mu\text{L}$  de extracto. En cambio, el aceite esencial de canela mostró un mayor efecto antimicrobiano sobre las bacterias multirresistentes presentes en todas las muestras ya que además logró inhibir el crecimiento de las cepas *E. faecalis* y *P. aeruginosa* resistentes al extracto acuoso de ajo.

Se ha demostrado que la alicina es el principal compuesto antimicrobiano presente en *Allium sativum*, [36] aunque la presencia de otros tiosulfatos y compuestos (como el ajoeno) pueden participar para lograr este efecto. Sin embargo, vemos que las cepas encontradas en muestras de pie diabético muestran cierta resistencia al efecto de estos compuestos. Por otra parte, existen diferentes estudios que han determinado la composición química del aceite esencial de canela, entre los que se encuentran los realizados por Unlu M. [41], Yan-qun Li [42] y algunas revisiones como la de Burt S. [50]. Todas estas investigaciones han confirmado que el principal componente del aceite de corteza de canela es el *trans*-cinamaldehído, el cual también posee actividad antimicrobiana contra una diversidad de patógenos (como *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, hongos y virus). [46] Debemos recordar que debido a que el aceite esencial es una mezcla de muchos otros compuestos, el efecto antimicrobiano observado sobre las cepas aisladas de pie diabético puede ser consecuencia del efecto sinérgico de los mismos. No obstante, el mayor efecto antimicrobiano observado en el aceite esencial de canela es principalmente atribuido al cinamaldehído.

La Tabla 10 muestra los resultados del efecto antimicrobiano de *Allium sativum* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre la microbiota de las muestras mediante el método de difusión en discos. El extracto acuoso de ajo, continuó mostrando un efecto menos eficaz que el observado con el aceite de canela. Comparando los resultados obtenidos con 50  $\mu\text{L}$  de extracto acuoso de ajo en discos con los obtenidos en pozos con la misma cantidad (Tabla 9), se nota claramente que el efecto en pozos fue más efectivo. En el caso del aceite de canela en discos, se observa que con la mínima cantidad de 5  $\mu\text{L}$ , los halos de inhibición formados sobre el agar de todas las muestras son mayores a 15 mm de diámetro y con la cantidad de 10  $\mu\text{L}$  de aceite de canela el efecto antimicrobiano es mucho mayor al observado con un antibiótico de referencia (ciprofloxacino) para las muestras PD 1 y PD 2. Cabe mencionar que este antibiótico de referencia (ciprofloxacino) fue el que presentó los mayores halos de inhibición sobre las muestras al realizar los antibiogramas. Por otro lado, es probable que el aceite de canela difunda de mejor forma a través del agar mediante la técnica de discos, ya que utilizando aceite de canela en pozos, gran parte del aceite no logró difundir debido a su hidrofobicidad y se quedaba en el pozo como se observa en la Figura 19 A. El eficaz efecto antimicrobiano que presentó el aceite esencial de canela sobre la microbiota de las muestras de pie diabético lo postula como un buen candidato para el tratamiento alternativo de infecciones de pie diabético.

Actualmente, la multirresistencia a antibióticos limita considerablemente el uso de estos agentes antibacterianos y amenaza su eficacia a largo plazo. [9, 12] Por lo tanto, teniendo en cuenta el panorama actual sobre la problemática y complicaciones de las infecciones de pie diabético debido a la presencia de bacterias multirresistentes, [4, 25] es importante buscar nuevas alternativas de tratamiento para estas infecciones agresivas que pueden llegar incluso a comprometer la vida del paciente diabético debido a la ineficacia de la antibioticoterapia disponible. Además, como parte del manejo para controlar las infecciones, los pacientes son sometidos a continuas limpiezas de sus heridas, a desbridamientos quirúrgicos y a los efectos adversos de la antibioticoterapia provocando una disminución en la calidad de vida de los pacientes con infecciones de pie diabético. Por consiguiente, es de gran importancia

implementar opciones de tratamiento más eficaces y potentes contra bacterias que muestren el fenotipo de multirresistencia a fin de lograr disminuir el índice de amputaciones.

Finalmente, el aceite esencial de canela puede ser un excelente candidato para el tratamiento alternativo de las infecciones de pie diabético debido a que ha demostrado una excelente eficacia y potencia *in vitro* contra bacterias multirresistentes a antibióticos involucradas en esta patología. Por lo tanto, es probable que el uso del aceite esencial de canela a través de un vehículo adecuado permita controlar este tipo de infecciones agresivas causadas por microorganismos multirresistentes.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Se aislaron y caracterizaron bacterias multirresistentes a antibióticos que forman parte de la microbiota de las infecciones de pie diabético en pacientes mexicanos.

Se observó que las bacterias presentes en las muestras de pie diabético presentaron un fenotipo de multirresistencia a más de diez antibióticos de manera simultánea.

Se demostró que el extracto acuoso de ajo presenta actividad antimicrobiana sobre ciertas cepas multirresistentes aisladas de pie diabético, principalmente contra *E. faecalis*, *E. coli* y *M. morganii*.

Se demostró que el aceite esencial de canela presentó un mejor efecto antimicrobiano sobre todas las cepas multirresistentes aisladas de las infecciones de pie diabético (*E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *M. morganii*). Por lo tanto, podría esperarse que esta especia pudiera ser una opción terapéutica efectiva en el tratamiento de estas infecciones.

### **Perspectivas**

Implementar nuevas medidas que permitan abatir el número de bacterias multirresistentes a antibióticos involucradas en las infecciones de pie diabético. Se espera utilizar en un futuro próximo el aceite esencial de canela (mediante alguna formulación farmacéutica) para el tratamiento de las infecciones de pie diabético.

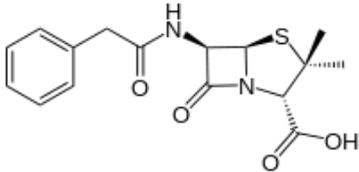
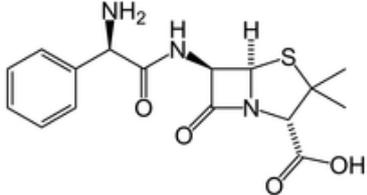
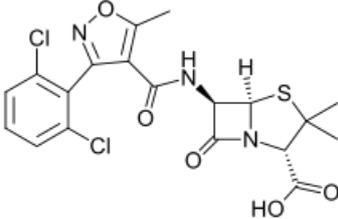
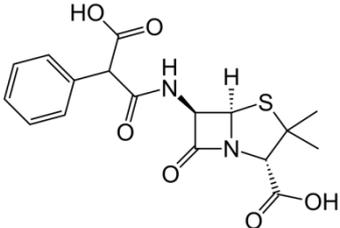
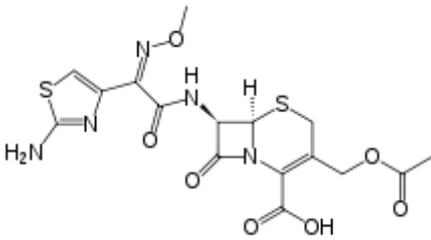
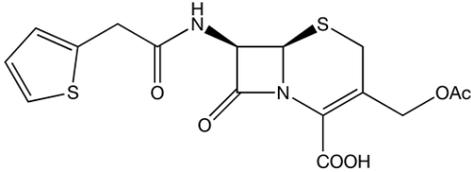
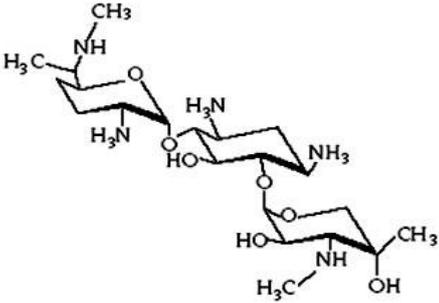
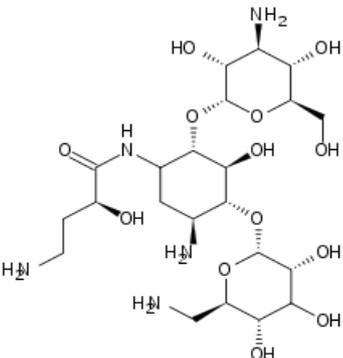
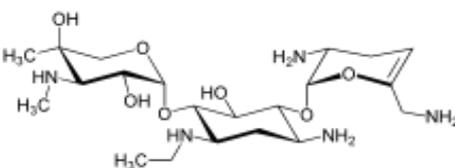
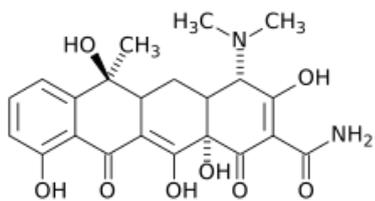
## CAPÍTULO VII. REFERENCIAS

1. Arredondo A and De Icaza E. Costos de la diabetes en América Latina: evidencias del caso mexicano. *Value in Health*. 2011; 14: S85 – 8.
2. INEGI. Causas de mortalidad total 2011. Consultado el 30 de enero de 2013 en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
3. UNICEF México. Salud y nutrición. El doble reto de la malnutrición y la obesidad. Consultado el 12 de diciembre de 2013 en <http://www.unicef.org/mexico/spanish/17047.htm>
4. Cabeza-de-vaca F et al. Microbiología del pie diabético determinada por estudio de biopsia. *Revista de Investigación Clínica*. 2009; 61: 281 – 85.
5. Otiniano ME et al. Lower extremity amputations in diabetic Mexican American elders incidence, prevalence and correlates. *J Diabetes Complications*. 2003; 17: 59 – 65.
6. Sherman PW and Billing J. Darwinian gastronomy: Why we use spices. *BioScience*. 1999; 49: 453 – 63.
7. Davies J and Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74: 417 – 33.
8. Singh SB and Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71: 1006 – 15.
9. Henriques Normark B and Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Int Med*. 2002; 252: 91 – 106.
10. Goldman L and Schafer AI. *Goldman's Cecil Medicine*. 24a ed. Elsevier Health Scie. 2011; 1803 – 15.
11. Andersson DI and Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8: 260 – 71.
12. Diaz Högberg L et al. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31: 509 – 15.
13. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*. 2009; 78: 119 – 46.
14. Alekshun MN and Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007; 128: 1037 – 50.
15. Becerra G et al. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf Inf Microbiol*. 2009; 29: 70 – 6.
16. Li X-Z and Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2009; 69: 1555 – 623.
17. Shaw JE et al. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 87: 4 – 14.
18. Patel DK et al. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. *Asian Pac J Trop Dis*. 2012; 239 – 50.

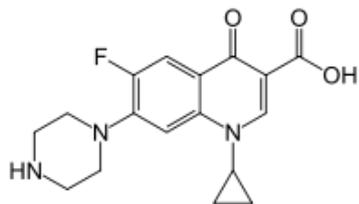
19. Zhang P et al. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87: 293 – 301.
20. Yudovsky D et al. Hyperspectral imaging in diabetic foot wound care. *J Diabetes Sci Technol.* 2010; 4: 1099 – 113.
21. Yekta Z et al. Comparison of demographic and clinical characteristics influencing health-related quality of life in patients with diabetic foot ulcers and those without foot ulcers. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2011; 4: 393 – 99.
22. Crouzet J et al. Diabetic foot infection: a critical review of recent randomized clinical trials on antibiotic therapy. *Int J Infect Dis.* 2011; 15: e601 – 10.
23. Hobizal KB and Wukich DK. Diabetic foot infections: current concept review. *Diabetic Foot & Ankle.* 2012; 3: 1 – 8.
24. Cunha BA. Antibiotic selection for diabetic foot infections: A review. *J Foot & Ankle Surgery.* 2000; 39: 253 – 57.
25. Richard JL et al. Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. *Diabetes & Metabolism.* 2008; 34: 363 – 69.
26. Zubair M et al. Clinico-microbiological study and antimicrobial drug resistance profile of diabetic foot infections in North India. *The Foot.* 2011; 21: 6 – 14.
27. De Alcalá D et al. Infecciones del pie diabético. Prevalencia de los distintos microorganismos y sensibilidad a los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27: 317 – 21.
28. Goldstein E et al. Diabetic foot infections: Bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. *Diabetes care.* 1996; 19: 638 – 41.
29. Low T. A reason to season: The therapeutic benefits of spices and culinary herbs. *Diet and nutrition.* 2006; 2: 446 – 49.
30. Singh VK and Singh DK. Pharmacological effects of Garlic (*Allium sativum* L.). *Annu Rev Biomed Sci.* 2008; 10: 6 – 26.
31. *Allium sativum* en la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ajo&id=7184>  
Consultado el 03 de Enero de 2013.
32. Meriga B et al. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pac J Trop Med.* 2012; 391 – 95.
33. Harris JC et al. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 57: 282 – 86.
34. Durairaj S et al. *In vitro* antibacterial activity and stability of garlic extract at different pH and temperature. *e J Bio.* 2010; 6: 92 – 7.

35. Karuppiyah P and Rajaram S. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. Asian Pac J Trop Biomed. 2012; 597 – 601.
36. Ankri S and Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microb Infect. 1999; 2: 125 – 29.
37. Curtis H et al. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiol Mol Plant Pathol. 2004; 65: 79 – 89.
38. Lee R and Balick MJ. Sweet wood — Cinnamon and its importance as a spice and medicine. Ethnomedicine. 2005; 1: 61 – 4.
39. *Cinnamomum zeylanicum* en la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Canela&id=7331>  
Consultado el 03 de Enero de 2013.
40. Barceloux DG. Cinnamon (*Cinnamomum* Species). Dis Mon. 2009; 55: 327 – 35.
41. Unlu M et al. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). Food Chem Toxicol. 2010; 48: 3274 – 80.
42. Li Yan-qun et al. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. Ind Crop Prod. 2013; 41: 269 – 78.
43. Kalemba D and Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003; 10: 813 – 29.
44. Van Vuuren SF et al. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. Lett Appl Microbiol. 2009; 48: 440 – 46.
45. Tajkarimi MM et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 2010; 21: 1199 – 218.
46. Wei Qing-Yi et al. The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids. Int J Food Microbiol. 2011; 150: 164 – 70.
47. Bajpai VK et al. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. Food Res Int. 2012; 45: 722 – 34.
48. Fani MM et al. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. J Indian Soc Pedod Prevent Dent. 2007; 164 – 68.
49. Facultad de Química, UNAM. Manual de prácticas de Química Orgánica I. 2010: 80 – 5.
50. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94: 223 – 53.

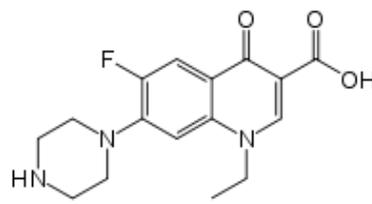
## ANEXO I. Estructura química de los antibióticos

|  |  |
|--|--|
| <p>Penicilina</p>     | <p>Ampicilina</p>      |
| <p>Dicloxacilina</p>  | <p>Carbenicilina</p>  |
| <p>Cefotaxima</p>    | <p>Cefalotina</p>     |
| <p>Gentamicina</p>  | <p>Amikacina</p>     |
| <p>Netilmicina</p>  | <p>Tetraciclina</p>  |

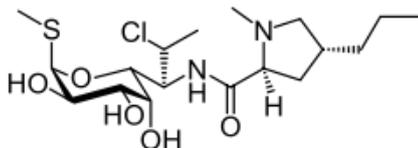
Ciprofloxacina



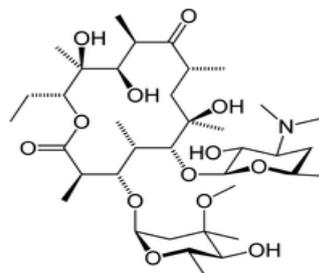
Norfloxacina



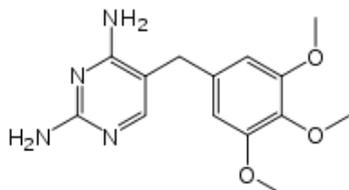
Clindamicina



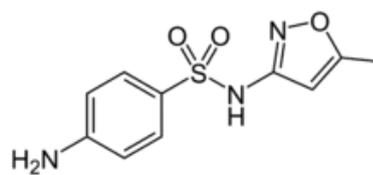
Eritromicina



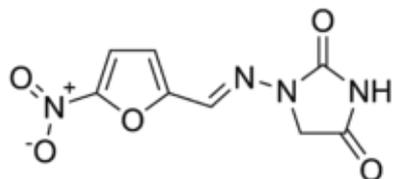
Trimetoprim



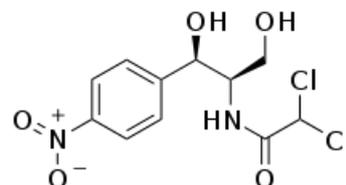
Sulfametoxazol



Nitrofurantoina



Cloranfenicol



Vancomicina

