



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS
ETANOLICOS Y ACUOSOS DE PIMIENTA GORDA
(*Pimenta dioica*) Y ALBAHACA (*Ocimum basilicum*) EN
BACTERIAS MULTIRRESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS.

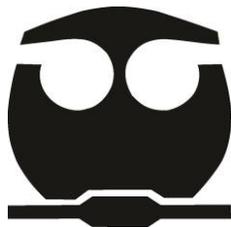
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

CARLOS DOMINGO OBREGÓN SÁNCHEZ



MEXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q.F.B. María Elsa Escudero García

VOCAL: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

SECRETARIO: M. en C. Lucía Cornejo Barrera

PRIMER SUPLENTE: M. en C. Norma Angélica Camacho De la Rosa

SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. Raquel Ortega Muñoz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Microbiología Molecular, Laboratorio 1-A anexo, edificio A, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz

SUSTENTANTE:

Carlos Domingo Obregón Sánchez

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis padres Yolanda Sánchez Cruz y Jorge Raúl Obregón Téllez por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este.

Me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

Han sido un verdadero apoyo en cada aventura que decido emprender, y espero lo sigan siendo....

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre , asesor de esta tesis, por haberse interesado en mi trabajo, por las sugerencias recibidas, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años, gracias.

También quisiera agradecer la ayuda recibida de mis compañeros José David Pérez Villa y J. C. Jiménez.

Gracias a la empresa Tate & Lyle por abrirme las puertas, especialmente a Claudia Correa por el impulso y apoyo tan grande que ha hecho a mi carrera profesional. Agradezco a mis compañeros de trabajo J. C. Adriano, R. Milla, O. García, O. Salinas, R. Zamudio y F. Rangel, por todos los consejos y apoyo.

Agradezco enormemente a Alejandra Escobedo, compañera de vida, por todos los consejos, apoyo incondicional y sobre todo, el cariño y amor de su parte.

Gracias a todas las personas que pasaron por mi vida y me dieron su apoyo y palabras de aliento, su abrazo, cariño y fuerza para que se lograra el objetivo de ser un gran profesional y una mejor persona.

Gracias a todos los que creyeron en mí, aquí se tiene el fruto de todas sus energías.

ÍNDICE	Página
CAPITULO 1. INTRODUCCION	1
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	2
2.1 Mecanismos de acción de los antibióticos.	2
2.2 Técnica de susceptibilidad antimicrobiana	7
2.3 Resistencia a antibióticos.....	7
2.4 Mecanismos de resistencia	9
2.5 Resistencia a vancomicina.....	13
2.6 Factores que aceleran la aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos	15
2.7 Uso de antibióticos en la alimentación animal	16
2.8 Especies	18
2.9 Propiedades antimicrobianas de especias	20
2.10 Extractos de especias	21
2.11 Pimienta gorda (<i>Pimenta dioica</i>)	22
2.12 Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>).....	24
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo General	26
3.2 Objetivos Particulares	26
3.3 Hipótesis	26

3.4 Justificación	26
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Aislamiento de bacterias multirresistentes	28
4.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos	29
4.3 Identificación bioquímica	30
4.4 Preparación de extractos etanólicos y acuosos de las especias.....	32
4.5 Prueba de los extractos etanólicos y acuosos	32
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	34
5.1 Aislamiento de bacterias multirresistentes	34
5.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos	36
5.3 Identificación bioquímica	37
5.4 Preparación de extractos etanólicos y acuosos de las especias.....	39
5.5 Prueba de los extractos etanólicos y acuosos	39
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	45
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	46

CAPITULO 1. INTRODUCCION

Las bacterias multirresistentes son microorganismos que presentan de forma natural resistencia a múltiples antimicrobianos de uso clínico habitual. Desde hace algunos años la resistencia de bacterias a los antibióticos disponibles viene aumentando. Debido al uso indiscriminado de los antibióticos en la actualidad, se ha generado una resistencia de los microorganismos a dichos agentes. Esto ha despertado el interés y la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamientos de la medicina natural, que sean más eficaces contra bacterias y hongos, que son los principales agentes que desencadenan infecciones en humanos. Las plantas medicinales de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1979), se define como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyo principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Oliveira, M., Velázquez, D. y Bermúdez, A., 2005). Su desarrollo depende de factores como el suelo, el agua, el clima, la altitud, latitud, humedad y temperatura.

Los extractos naturales provenientes de algunas plantas medicinales ejercen una acción antimicrobiana, por lo que se han hecho investigaciones probando la efectividad de los aceites de varias plantas y especias, y han demostrado una actividad antimicrobiana. En este trabajo, se comprobará el efecto inhibitorio de algunos de estos extractos en bacterias multirresistentes a antibióticos. El efecto inhibitorio de extractos naturales sobre bacterias multirresistentes, podría permitir la elaboración de compuestos para el tratamiento clínico de enfermedades ocasionadas por este tipo de bacterias frecuentemente presentes en alimentos de alto consumo.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismos de acción de los antibióticos.

Un antibiótico tiene que penetrar en la barrera superficial de la bacteria para luego ir a localizarse en el punto diana de acción del mismo para ser efectivo. En este contexto, los mecanismos moleculares que permiten la acción directa de un antibiótico sobre la estructura bacteriana son muy complejos y podemos resumirlos en los siguientes puntos (Nuñez, B., 2007):

- I. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEICA.
- II. INACTIVACIÓN FUNCIONAL DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA.
- III. INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS INACTIVADORAS DE ANTIMICROBIANOS.
- IV. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.
- V. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

I. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEICA

Los antibióticos actúan en cualquiera de las cuatro fases secuenciales de la síntesis proteica bacteriana (Kaczanowska, M. y Rydén-Aulin, M., 2007):

- Inhibidores de la activación. Solo actúan en bacterias Gram-positivas. La mupirocina es un bacteriostático que inhibe la isoleucil-ARNt sintetasa (Calvo, J. y Martínez, L., 2009).
- Inhibidores de la activación y formación del complejo inicial. Los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina, y estreptomycin) se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes. En primer lugar, estos se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al ARN mensajero (ARNm). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del ARNm. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la

interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros. Estas actividades por lo general ocurren de manera simultánea y el efecto total es bactericida (Cavallieri, S., 2005).

- Inhibidores de la fijación del complejo aminoacil-ARN-t al ribosoma. Por medio de este mecanismo, las tetraciclinas intervienen con la fijación del complejo aminoacil-ARN-t sobre el sitio aceptor A en el ribosoma. Puesto que no se pueden agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, la síntesis de proteínas es inhibida. La acción de las tetraciclinas es bacteriostática (Shlaes, D., 2006).
- Inhibidores de la transpeptidación. Mediante este mecanismo el cloranfenicol se fija en la subunidad ribosómica 50S e interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína en crecimiento. Los agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas de esta forma son bacteriostáticos (Calvo, J. y Martínez, L., 2009).
- Inhibidores de la Translocación. Por este mecanismo, los macrólidos (eritromicina, azitromicina y claritromicina) y las lincosamidas (clindamicina) se adhieren a la subunidad ribosómica 50S en el sitio P, provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos son primordialmente bacteriostáticos (Retsema, J. y Fu, W., 2001).

II. INACTIVACIÓN FUNCIONAL DE LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA

Los antibióticos de este grupo tienen efecto bactericida, pero no debe olvidarse que también tienen gran toxicidad sobre las células eucariotas. Actúan con diversos mecanismos sobre la membrana citoplasmática bacteriana:

- Ionóforos. Son antibióticos polipeptídicos cíclicos como la valinomicina o las tirocidinas A y B. Estos compuestos tienen una estructura circular peculiar, es hidrofóbica en el exterior e hidrofílica en el interior. Los ionóforos incorporan cationes monovalentes en su interior, permitiéndoles cruzar la bicapa lipídica. La penetración elevada de iones potasio altera el potencial

eléctrico y el gradiente químico existente en la membrana, alterando su función (Calvo, J. y Martínez, L., 2009).

- Formadores de Poros. Los antibióticos de este grupo, como la gramicidina y polimixina, provocan el paso selectivo de moléculas a través del canal abierto por ellos. Se difunden a través de la membrana externa y pared celular de células susceptibles hacia la membrana citoplásmica. Estas se unen a la membrana citoplásmica, la alteran y desestabilizan. Esto causa el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula lo que resulta en muerte celular (Cavallieri, S., 2005).
- Desestructuración de la membrana citoplasmática. Mediante este mecanismo los antifúngicos poliénicos se fijan a los esteroides de los hongos; por ejemplo, la daptomicina ejerce un efecto sobre la membrana que determina una pérdida del K⁺ intracelular (Kanafani, Z. y Corey, G., 2007).

III. INHIBICIÓN DE ENZIMAS INACTIVADORAS DE ANTIMICROBIANOS

Existe un grupo de fármacos que en sí mismo no tiene un efecto antibiótico, estos son los inhibidores de las beta-lactamasas como el sulbactam, el ácido clavulónico y el tazobactam. Estas sustancias actúan como moléculas suicidas que se fijan a las beta-lactamasas formadas por las bacterias, actuando de forma competitiva con los beta-lactámicos por su analogía estructural, permitiendo a éstos ejercer su mecanismo de acción ligándose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y de esta manera inhibiendo la formación de la pared celular (Georgopapadaku, N., 2004).

IV. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.

Los agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de la pared celular bloquean la síntesis del péptidoglicano y por tanto son activos contra bacterias en crecimiento. Estos agentes son considerados bactericidas (Cavallieri, S., 2005). Actúan inhibiendo cualquiera de los tres mecanismos de la biosíntesis de la pared celular:

- Inhibición de la fase citoplasmática. Actúan en el citoplasma bacteriano inhibiendo la síntesis de los precursores del pentapéptido N-acetil-murámico. En este proceso actúa la fosfomicina, la daptomicina, y la cicloserina (Cordiés, L., et al., 1998).
- Inhibición de la fase de transporte de precursores. Este mecanismo actúa dentro de la membrana citoplasmática impidiendo la d-fosforilación de sus precursores. La bacitracina es uno de los antibióticos que actúan en esta fase (Cordiés, L., et al., 1998).
- Inhibición de la organización estructural del péptidoglicano. Mediante este mecanismo se bloquea selectivamente la transferencia del polímero lineal a la pared celular existente, interfiriendo con la organización estructural definitiva del peptidoglicano y evitando su polimerización al ligarse a las Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP), como lo hacen todos los beta-lactámicos. Por otra parte, los glucopéptidos evitan la polimerización del péptidoglicano en la proximidad de la membrana citoplasmática bacteriana (Allen, N. y Nicas. T., 2003). En las bacterias Gram negativas, los antimicrobianos beta-lactámicos entran a la célula a través de los canales porínicos de la membrana externa. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las proteínas de unión de penicilina (PBPs) que son enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular. La unión de las moléculas beta-lactámicas a las PBPs, ubicadas en la superficie de la membrana citoplasmática, bloquea su función. Esto produce paredes celulares debilitadas o defectuosas y conduce a lisis celular y muerte.
- Puesto que las bacterias Gram positivas no poseen una membrana externa, los antimicrobianos beta-lactámicos se difunden a través de la pared celular. Los siguientes pasos son similares a aquellos para las bacterias Gram negativas. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las PBPs, lo que resulta en paredes celulares debilitadas y lisis celular (Cavallieri, S., 2005).

V. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

Los antibióticos que actúan en la transcripción y replicación del ADN, ejecutan su acción en varias fases de los complejos procesos en los que intervienen enzimas, sustratos activados y un molde de ADN sobre el que se originan cadenas complementarias de ARN o ADN (Calvo, J. y Martínez, L., 2009). De esta manera tenemos:

- Inhibidores de la síntesis de precursores. Lo hacen interfiriendo con la síntesis del ácido fólico con la consecuente inhibición de la síntesis de las bases púricas y pirimídicas. Con este mecanismo actúan las sulfonamidas y el trimetoprim. Para muchos organismos el ácido para-amino benzoico (PABA) es un metabolito esencial y está involucrado en la síntesis de ácido fólico, un importante precursor para la síntesis de ácidos nucleicos. Las sulfonamidas son estructuras análogas del PABA y compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato-sintetasa. El trimetoprim actúa en la ruta de síntesis del ácido fólico en un punto posterior al de las sulfonamidas. Este inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa. El trimetoprim y las sulfonamidas se pueden usar por separado o en conjunto. Cuando se usan en conjunto producen un bloqueo secuencial de la ruta de síntesis del ácido fólico y tienen un efecto sinérgico. Tanto el trimetoprim como las sulfonamidas son bacteriostáticas (Masters, P., et al., 2003).
- Inhibidores de la replicación del ADN bacteriano. Mediante este mecanismo de acción, las quinolonas se fijan con mayor afinidad a la subunidad A de la ADN girasa o topoisomerasa II. La ADN girasa ayuda a enrollar y desenrollar al ADN durante su replicación. La enzima se adhiere al ADN e introduce rupturas dobles en las cadenas que le permiten desenrollarse. Las quinolonas se unen al complejo ADN girasa-ADN y permiten a las cadenas de ADN rotas liberarse dentro de la célula lo que conduce a la muerte celular (Cavallieri, S., 2005).
- Inhibidores de la transcripción del ADN bacteriano. Actúan inhibiendo el crecimiento bacteriano al bloquear la síntesis del RNA mensajero y

ribosómico mediante la unión a la ARN polimerasa ADN dependiente, lo que bloquea la síntesis de ARN y resulta en la muerte de la célula. Las Rifamicinas como la rifampicina ejercen su acción mediante este mecanismo (Villain-Guillot, P., et al., 2007).

- Inhibidores de la polimerización de los ácidos nucleicos. Mediante este mecanismo, antibióticos como la actinomicina D se fijan al ADN impidiéndole ejercer su función como molde; y otros como los nitroimidazoles, alteran la estructura nativa del ADN provocando escisiones, puentes covalentes intercatenarios, o rupturas intracatenarias (Calvo, J. y Martínez L., 2009).

2.2 Técnica de susceptibilidad antimicrobiana

La actividad antibiótica de sustancias químicas se evalúa en la actualidad por diversos métodos. Uno de los más utilizados es la técnica de susceptibilidad antimicrobiana de difusión de disco en agar de Bauer-Kirby (Bauer, A., et al., 1966), método de difusión en disco que se basa fundamentalmente en incorporar al medio de cultivo, el antibiótico o el microorganismo en concentración conocida para que luego de solidificado el medio se adicione la contraparte y se pueda observar la inhibición del crecimiento o los halos de inhibición según la técnica utilizada. Este método también abarca la técnica llamada de discos de papel, en la cual el antibiótico a ensayar viene incorporado a discos de papel absorbente en concentración conocida, los cuales se colocan sobre la superficie de una caja de agar sembrado masivamente con el microorganismo en estudio; luego de incubar a la temperatura y el tiempo adecuados se pueden observar halos de inhibición de crecimiento (Arévalo, A., y Enciso, R., 1996).

2.3 Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable (OMS, 2013). Los organismos resistentes (bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) pueden resistir ataques de medicamentos antimicrobianos tales como antibióticos,

fungicidas, antivirales y antipalúdicos, de tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se ven expuestos a fármacos antimicrobianos, y es posible un intercambio de características de resistencia entre ciertos tipos de bacterias. El uso inapropiado de medicamentos antimicrobianos acelera ese fenómeno natural. Las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2001).

Con frecuencia, las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden al tratamiento ordinario, lo que da lugar a una enfermedad prolongada y a mayor riesgo de defunción. La tasa de mortalidad de pacientes con infecciones graves tratados en hospitales duplica, aproximadamente, la tasa de pacientes con infecciones provocadas por bacterias no resistentes (OMS, 2013).

La resistencia a los antimicrobianos reduce la eficacia del tratamiento, por lo que los pacientes permanecen infectados por un período más largo, y esto incrementa el riesgo de propagación de microorganismos resistentes a otras personas.

Existe el riesgo de que muchas enfermedades infecciosas se vuelvan intratables e incontrolables, lo que podría afectar los progresos realizados hacia la consecución de las metas fijadas por las Naciones Unidas para 2015 en el contexto de sus Objetivos de Desarrollo del Milenio (OMS, 2013).

Cuando las infecciones se vuelven resistentes a los medicamentos de primera línea es preciso utilizar terapias más costosas. La mayor duración de la enfermedad y su tratamiento, frecuentemente en hospitales, eleva los costos de atención sanitaria y la carga económica para las familias y las sociedades. La resistencia a los antimicrobianos supone un riesgo para los logros de la medicina moderna. Sin antimicrobianos eficaces para tratar y prevenir infecciones, se pondrían en peligro los éxitos de intervenciones tales como los trasplantes de órganos, la quimioterapia contra el cáncer y las operaciones de cirugía mayor.

El aumento del comercio mundial y los viajes internacionales permite que los microorganismos resistentes se propaguen rápidamente a países y continentes lejanos por medio de las personas y los alimentos.

2.4 Mecanismos de resistencia

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico, a saber (Sussmann, O., et al., 2001):

- DESTRUCCIÓN E INACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO.
- ALTERACIÓN DEL SITIO BLANCO DEL ANTIBIÓTICO.
- BARRERAS DE PERMEABILIDAD.

Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.

DESTRUCCIÓN E INACTIVACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico. Son ejemplos de esta la producción de B-lactamasa, B-lactamasa de amplio espectro, eritromicina estereasa y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloramfenicol, lincosamidas y estreptograminas (Sussmann, O., et al., 2001).

Sabemos que los antibióticos, B-lactámicos como penicilina, oxacilina, cefalosporinas, actúan inhibiendo la enzima D-alanil D-alanin carboxipeptidasa (PBPS) encargada de la síntesis de la pared. La B-lactamasa hidroliza el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo. Se trata de un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia frecuentemente producida por bacterias Gram negativas. Pueden clasificarse de acuerdo con su forma de producción en cuatro grupos (Sussmann, O., et al., 2001):

- Por localización genética (cromosomas o plásmidos).
- Por exposición genética (constitutiva o inducida).
- Por producción primaria (dependiente de microorganismo).

- Por sustrato mayor (depende de la clase de antibiótico).

Igualmente por su amplia difusión se deben reconocer algunas codificadas por plásmidos:

- Enzimas de amplio espectro que hidrolizan las bencilpenicilinas y cefaloridina.
- Oxacilinasas que degradan oxacilinas y similares (OXA-1, OXA-2) la tipo A producida por *Staphylococcus aureus*, enterobacterias (TEM-1, SMV-1) éstas últimas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* respectivamente) de alta importancia pues codifican la B-lactamasa de amplio espectro capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos.
- Carbecilinasas que hidrolizan penicilina.
- Betalactamasas de espectro extendido.
- Oximino B-lactamasa diferentes a las Betalactamasas de espectro extendido.
- Enzimas que hidrolizan cefamicinas y oximinobetalactámicos y son resistentes a la inhibición del clavulanato.
- Carbapenemasas.

Otra vía para inactivación del antibiótico es la “modificación enzimática” del mismo. Este es el caso de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos codificadas en plásmidos.

Entre las principales enzimas responsables de catalizar la modificación, están la acetil transferasa (AAC), fosfatidil transferasa (APH) y adenil transferasa (ANT o AAD). Cuando un aminoglucósido es inactivado ya no puede unirse a la subunidad 30s ribosomal y por lo tanto no pueden interferir en la síntesis de proteínas. El mecanismo de resistencia a eritromicina es común a lincosamidas y estreptograminas (grupo MLS). La producción de eritromicina esterasas, cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Se han descrito Estearasa I y II confinadas a Gram negativos. La modificación del cloranfenicol la realiza una enzima intracelular, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), existente tanto en

Gram positivos como en Gram negativos. Esta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S.

- BARRERAS DE PERMEABILIDAD

Incluye tres componentes básicos (Sussmann, O., et al., 2001):

- La estructura de la membrana externa de la bacteria.
- Las porinas. Canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular.
- Características fisicoquímicas del antimicrobiano. En el caso de los medicamentos hidrofílicos (imipenem) requieren presencia de porinas para su transporte al interior de la célula.

Existen fundamentalmente dos mecanismos de resistencia:

1. Entrada disminuida:

1.1. Permeabilidad de la membrana externa: claramente definida en los microorganismos Gram negativos que poseen una membrana lipídica externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de antibiótico.

1.2. Permeabilidad de la membrana interna: otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula. La presencia de la capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofílicos.

1.3. Porinas: son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria. De la modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antibiótico. Éste es el mecanismo empleado por *Salmonella typhimurium* (OmpC) contra cefalosporinas de primera generación, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* contra aminoglucósidos y carbapenem.

2. Expulsión activa: es debido a la presencia de proteínas especializadas de membrana.

Se disminuye no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. Confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol y B-lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario.

- ALTERACIÓN DEL SITIO BLANCO

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc. (Sussmann, O., et al., 2001).

De esta manera, la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, conferirán resistencia a los B-lactámicos, dado que es esta enzima su sitio de acción. La resistencia a las quinolonas de gérmenes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* obedece a la modificación por mutación de los genes GyrA y GyrB que codifican para las topoisomerasas II y IV. Característicamente, las mutaciones mencionadas se presentan como cromosómicas y no como plasmídicas. Un mecanismo similar se presenta para sulfonamidas y trimetoprim donde ocurren modificaciones de la sintetasa de hidopteorato y dihidrofolato reductasa. La rifampicina actúa sobre la subunidad 13 de la RNA polimerasa, inhibiendo la extensión del RNA durante su síntesis. La resistencia a rifampicina se presenta cuando cambios en un aminoácido de esta subunidad alteran la unión del antibiótico a la RNA polimerasa. Esta resistencia es común en enterobacterias y puede desarrollarse en *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

Respecto a las demás estructuras ribosomales encontramos modificaciones a nivel de subunidades como 30s y 50s que son sitios de acción de aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos y tetraciclinas. Por ejemplo: la

metilación del ARN ribosomal de la subunidad 50S es el mecanismo de resistencia de *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens* a tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. El mecanismo de resistencia (ribosomal) a gentamicina, tobramicina y amikacina es poco frecuente y consiste en la mutación del péptido S12 de la subunidad 30S (Sussmann, O., et al., 2001). Cabe destacar en este punto los mecanismos de meticilino resistencia por producción de una proteína ligadora de penicilina (PBP) y que es la base de la resistencia a penicilina por *Streptococcus pneumoniae* y de la resistencia a glicopéptidos por *Staphylococcus aureus*.

2.5 Resistencia a vancomicina

En 1955, científicos en Eli Lilly and company, descubrieron un nuevo actinomiceto, *Streptomyces orientalis* (actualmente *Amycolapsis orientalis*), que se aisló en muestras de suelo de Indonesia y la India, este compuesto fue llamado Vancomicina, derivado de la palabra “Vaquish” (vencedor). La aprobación de la Federación de Drogas y Alimentos (FDA) se obtuvo en 1958 (Levine, J., 1988).

La vancomicina se desarrolló como un antimicrobiano activo frente a Gram positivos y, sobre todo, frente a los estafilococos productores de β -lactamasa, pero el desarrollo de los nuevos antibióticos con menos efectos indeseables limitó su uso a los casos de alergia a los β -lactámicos. La aparición, en los años 80, de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y el aumento en el número de pacientes susceptibles de presentar infecciones por microorganismos Gram positivos, favoreció de nuevo el uso de la vancomicina, en estos momentos con menor desarrollo de reacciones alérgicas, toxicidad ótica y renal. (Chavers, L., et al., 2003; Leclerc, R., et al. 1988).

No es hasta 1986, treinta años después de la introducción clínica de la vancomicina, cuando se aíslan las primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a los glucopéptidos (Klare, I., et al., 2003) y desde esta fecha el número de resistencias reportadas han ido en aumento tanto en bacterias como en países, llegando a representar un problema hospitalario para algunos de ellos,

principalmente en Europa y los Estados Unidos. En el caso de las cepas de *Staphylococcus aureus* la resistencia fue reportada por primera vez en 1996 en el Japón (Bartley, J., 2002) y se ha venido incrementando al igual que para los *Enterococcus*. Los posibles factores asociados a la aparición de resistencia a vancomicina son el uso de antibióticos en veterinaria y la adición de los mismos a los piensos animales como promotores de crecimiento y el aumento significativo en el uso de la vancomicina a causa de una mayor incidencia de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en la mayoría de los hospitales.

En la actualidad, el tipo de resistencia de la vancomicina en *Enterococcus* se asocia a tres fenotipos bien definidos: VanA, VanB y VanC, atendiendo al grado de resistencia, inducción y transferencia de resistencia. El fenotipo VanA confiere elevada resistencia a vancomicina y teicoplanina. La resistencia es inducible y puede localizarse en plásmidos y ser transferible, *in vitro*, a otros Gram positivos como estreptococos del grupo *viridans* y *Staphylococcus aureus*, implicando ello un riesgo de diseminación de este tipo de resistencia (Klare, I., et al., 2003).

En Estados Unidos, se detectó un paciente afectado de bacteriemia por SARM originada en un catéter, cuyo microorganismo era resistente a vancomicina y teicoplanina (concentración inhibitoria mínima [CIM] >128 mg/L). El paciente tenía una úlcera crónica infectada por SARM y *Enterococcus faecalis* el cual era resistente a la vancomicina (gen VanA); posteriormente se confirmó que el SARM aislado contenía el gen VanA de resistencia de enterococo, lo cual sugiere una transferencia del mecanismo de resistencia entre ambos microorganismos (Núñez, A., et al., 2006).

El fenotipo VanB confiere moderada resistencia a vancomicina (CIM, 32-64 mg/L), pero permanece la sensibilidad a teicoplanina. La resistencia es inducible, mediada por cromosomas y en algunas cepas puede ser transmitida por conjugación.

El fenotipo VanC, descrito fundamentalmente en *Enterococcus gallinarum* y en otras especies, presenta unos niveles bajos de resistencia a vancomicina

(CIM, 8-32 mg/L) pero mantiene la sensibilidad a teicoplanina. El gen VanC es cromosómico, constitutivo y no transmisible (Klare, I., et al., 2003).

Se han descrito otros fenotipos de resistencia (VanD, VanE, VanG) caracterizados por conferir bajos niveles de resistencia a vancomicina y sensibilidad a la teicoplanina. (Klare, I., et al., 2003).

En el caso de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (CIM, 8–16 mg/L), reportado en Japón inicialmente se denominaron VISA (Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*). Posteriormente este fenómeno se extendió a otros países y además disminuyendo la sensibilidad a otros glicopéptidos como la teicoplanina por lo que se introdujo el término GYSA (Glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*). El mecanismo de resistencia es mal conocido y no está relacionada con el gen vanA de los enterococos, en estas cepas resistentes se produce una alteración en la estructura del peptidoglucano que determina un secuestro de glucopéptido, impidiendo su unión sobre restos de D-alanina-D-alanina, diana de este tipo de antimicrobianos (Chang, S., et al., 2003).

2.6 Factores que aceleran la aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos

El desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural. No obstante, algunas actividades humanas ciertamente aceleran su aparición y propagación. La resistencia a los antimicrobianos es un problema complejo propiciado por muchos factores interrelacionados; por ello, las intervenciones separadas y aisladas tienen escaso efecto y, consecuentemente, se requieren medidas coordinadas (OMS, 2013).

Varios son los factores que han contribuido a su aparición (Sussmann, O., et al., 2001):

- Sistemas deficientes o inexistentes para la vigilancia y el seguimiento de la resistencia a los antimicrobianos.

- Sistemas inadecuados para asegurar la calidad y el suministro ininterrumpido de medicamentos.
- Uso inapropiado de medicamentos antimicrobianos, incluso en la cría de animales.
- Prácticas ineficientes para la prevención y el control de la infección.
- Falta de instrumentos de diagnóstico, prevención y tratamiento.
- La presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos o en animales.
- La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad.

2.7 Uso de antibióticos en la alimentación animal

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden, eventualmente, destruirlos. El anuncio del primer antibiótico sulfamídico en 1935 inició la era moderna de la terapéutica antimicrobiana, caracterizada por una enorme disminución de la morbilidad y de la mortalidad para muchas enfermedades infecciosas (Cancho, B., et al., 2000). El impacto de este tipo de sustancias sobre factores médicos, veterinarios, de sanidad pública, y económicos relacionados con los estados patológicos, no tiene paralelo en la historia de la terapéutica medicamentosa. Sin embargo, los antibióticos constituyen uno de los agentes farmacológicos peor usados, tanto a nivel médico como veterinario, siendo administrados en muchas ocasiones de forma irracional y en dosis inadecuadas. El empleo indiscriminado de estos productos puede acompañarse de complicaciones tales como reacciones alérgicas, superinfecciones, retrasos en la identificación del microorganismo causal; quizá, una de las complicaciones más importantes es la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos que a su

vez, crea la necesidad cada vez mayor de nuevos medicamentos (Cancho, B., et al., 2000).

La expansión e internalización de los microorganismos y las resistencias que provocan los agentes antimicrobianos es un problema global que está causando muertes y aumentando el gasto hospitalario pero que sin embargo, está todavía sin cuantificar.

Los antibióticos se incluyen dentro del amplio grupo de compuestos que forman parte de la composición del pienso animal, pudiendo actuar con dos fines claramente diferenciados (Cancho, B., et al., 2000):

- Como terapéuticos y/o profilácticos, ya que los piensos constituyen una de las vías de administración más usadas para suministrar los fármacos en el sector veterinario. Los antibióticos se incorporan a los piensos en forma de premezclas medicamentosas (sólidas o líquidas) a concentraciones relativamente elevadas.
- Como promotores de crecimiento, favoreciéndose de esta forma el control de la flora bacteriana del animal, lo que se traduce en un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable de peso. En este caso, se incorpora al pienso en forma de aditivo y a concentraciones subterapéuticas.

En los últimos años, el uso veterinario de antibióticos, especialmente los empleados como promotores de crecimiento animal, está siendo objeto de duras críticas y presiones legales. La razón se debe a que, al parecer, estos agentes podrían ser los causantes directos del incremento de casos de resistencia a los medicamentos antimicrobianos administrados en la medicina humana. Por un lado, los alimentos procedentes de animales tratados terapéuticamente con agentes antimicrobianos pueden contener trazas de éstos que se incorporan al organismo humano a través de la cadena alimentaria, fomentando igualmente la aparición de microorganismos resistentes en el hombre. Por otro lado, el consumo continuado de antibióticos promotores de crecimiento, aún a concentraciones

subterapéuticas, fomenta la aparición en los animales de cepas de microorganismos resistentes que por diferentes vías de transmisión, especialmente a través de la cadena alimenticia, pueden llegar al ser humano (Cancho, B., et al., 2000).

2.8 Especias

Especia es un término culinario, no una categoría botánica ya que no se refiere a un tipo específico de planta o parte de planta (Farrell, K., 1990). De hecho, las especias provienen de diversos arbustos leñosos, vides, árboles, líquenes aromáticos, raíces, flores, semillas y frutos de las plantas herbáceas. Sin embargo, las hierbas, que se definen botánicamente como plantas que no se desarrollan en arbustos leñosos con tejido persistente, se encuentran en su estado fresco, mientras que las especias en general, se secan. La sal es a veces considerada como una especia, pero es un mineral.

Las especias son productos vegetales aromatizantes utilizados en alimentos y bebidas. Durante miles de años, los materiales de plantas aromáticas se han utilizado en la preparación y conservación de alimentos, así como para embalsamar, en las zonas donde las plantas en cuestión son nativas, como Indostán (Govindarajan, V., 1985). Durante y después de la edad media, la gente de mar, tales como Marco Polo, Fernando de Magallanes y Cristóbal Colón emprendieron travesías peligrosas para establecer rutas hacia los puertos comerciales en las regiones productoras de especias (Parry, J., 1953).

El comercio de especias era tan crucial para las economías nacionales que los gobernantes promovieron varias expediciones costosas para atacar a países productores de especias y las luchas por el control de estos países precipitaron varias guerras. Cuando Alarich, un líder de los godos, puso sitio a Roma en el año 408, exigió como rescate varios metales preciosos y 3000 libras de pimienta (Scheiper, P., 1993).

Hoy en día, el uso de especias es omnipresente, pero las especias son mucho más importantes en algunas cocinas que en otras. La mayoría de las personas

han experimentado esta variabilidad de primera mano, al viajar en el extranjero, cenar en restaurantes de comida internacional, o la preparación de recetas exóticas en casa.

Cada especia tiene un aroma y sabor únicos, que se derivan de compuestos conocidos como fitoquímicos o "compuestos secundarios" (porque ellos son secundarios al metabolismo básico de la planta). Estos productos químicos evolucionaron en las plantas para protegerlas contra los insectos herbívoros y vertebrados, hongos, patógenos y parásitos (Fraenkel, G., 1959; Walker, J., 1994). La mayoría de las especias contienen docenas de compuestos secundarios.

2.9 Propiedades antimicrobianas de especias

A lo largo de la historia, las bacterias transmitidas por los alimentos, (especialmente especies de *Clostridium*, *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*) o sus toxinas han sido problemas serios de salud, y que todavía siguen siendo (Hui et al., 1994; OMS, 1996).

Los fitoquímicos que se encuentran en ciertas especias atacan a los microorganismos que causan enfermedades. El ajo, el orégano, el comino y la canela están en la primera fila de defensa contra las bacterias, de acuerdo con un estudio realizado por Jennifer Billing y Paul W. Sherman en 1998.

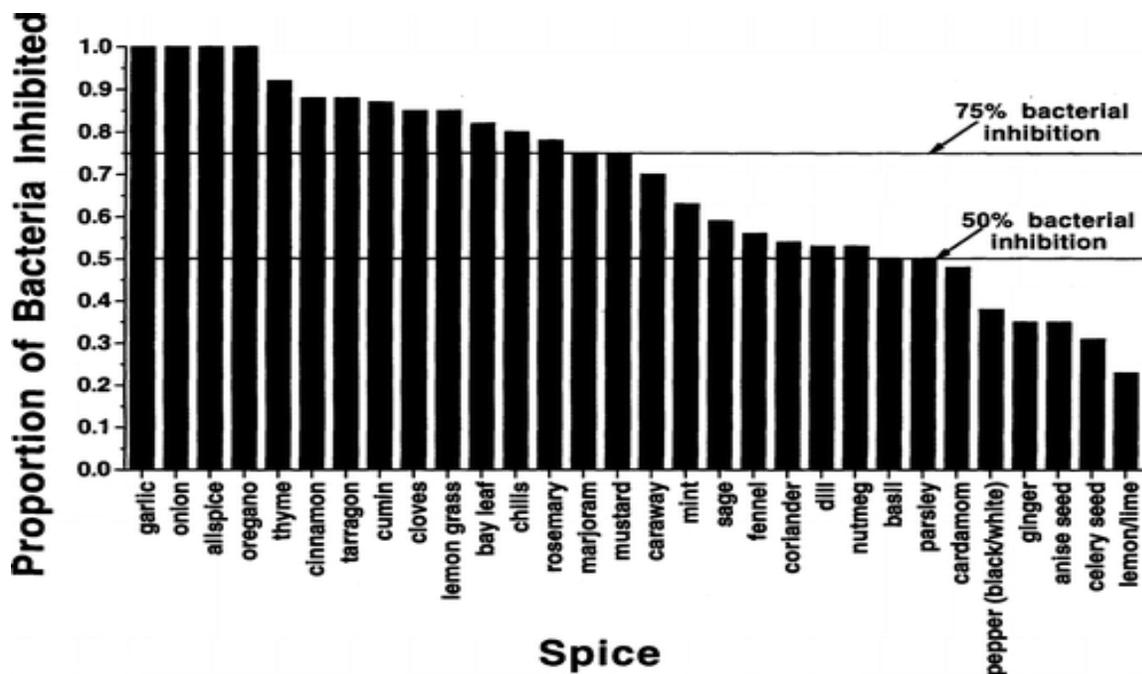


Figura 1. Propiedades antimicrobianas de 30 especias (Billing, J. y Sherman, P., 1988).

Las especias contienen un gran número de sustancias con propiedades inhibitorias para las bacterias, hongos filamentosos y levaduriformes. Estamos particularmente interesados en la capacidad de las especias para inhibir a las bacterias porque éstas están involucradas con mayor frecuencia en los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos que las levaduras u hongos (Varnam, A. y Evans, M., 1991; Todd, E., 1994).

2.10 Extractos de especias

Los extractos botánicos muestran propiedades de inhibición microbiana de distinta magnitud a distintas especies y variedades de microorganismos.

Los extractos de especias son concentrados obtenidos con solventes apropiados como agua, etanol o éter, de compuestos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y de sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruiz, G. y Susunaga, C., 2000). Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los compuestos encontrados en el material vegetal; por ejemplo, para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan solventes como éter de petróleo y cloroformo y para sustancias de mediana y alta polaridad acetato de etilo, etanol y acetona (Arévalo et al 1996).

Las sustancias antimicrobianas provenientes de especias son compuestos volátiles, por lo que poseen algunas características en general (Nychas, G., 1995):

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

Estas moléculas de alguna manera son sensibles a la temperatura debido a las instauraciones y/o los sustituyentes de los anillos, lo cual provoca que se modifiquen y, en consecuencia, la capacidad antimicrobiana disminuya o se pierda. Por la misma razón de la naturaleza de las moléculas, los extractos elaborados a partir de especias tendrán diferentes concentraciones de los

principios activos debido a la solubilidad en los diferentes disolventes de cada compuesto (Nychas, G., 1995).

2.11 Pimienta gorda (*Pimenta dioica*)

La pimienta gorda (*Pimenta dioica*) es una especie perteneciente a la familia *Myrtaceae*, originaria del hemisferio occidental en el continente americano. En inglés se llama «allspice» ('todas las especias') desde el siglo XVII, porque se creía que combinaba los aromas de varias especias, y ahora se suele describir como una combinación de clavo, canela y nuez moscada. Al igual que el clavo, es rico en alilbenceno, eugenol y otros compuestos fenólicos volátiles, con notas frescas, dulces y de madera, pero no tiene las sustancias volátiles de la canela. Forma parte de la composición de la selva tropical. Su fruta seca ha sido utilizada desde hace mucho tiempo por distintas comunidades indígenas. Actualmente se explota como recurso forestal no maderable y aporta un importante ingreso económico a los productores del centro y sureste de México. El árbol llega a medir hasta 25 metros de altura y tiene un diámetro de 40 centímetros; la corteza es lisa y muy olorosa, y se desprende en placas muy delgadas y alargadas de color café verdoso o amarillento (Rutilio, C., 2011).

En la república mexicana se encuentra en la vertiente del Golfo de México, desde el norte de Puebla y Veracruz, hasta el sur de la Península de Yucatán y la planicie costera del sureste; también en los estados de San Luis Potosí, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche y Quintana Roo.

La superficie nacional estimada de este cultivo es de 2,000 hectáreas. Su rendimiento medio es de 700 kilogramos por hectárea. Los estados con mayor producción son Veracruz, Tabasco y Chiapas y, en menor escala, se produce en Campeche, Quintana Roo, Puebla e Hidalgo (Rutilio, C., 2011).

El uso principal del fruto es como preservador de carne, aunque también se destaca como condimento en el arte culinario. Por sus aceites volátiles se le utiliza también en la industria para perfumes y jabones, así como en la obtención de eugenol y vainillina.

Diversos estudios han demostrado la capacidad de los aceites esenciales de especias como la pimienta gorda (*Pimenta dioica*), de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. (Burt, S., 2004).

Algunos compuestos identificados como antimicrobianos en la pimienta gorda son: piperina, pineno, limoneno, linalol y eugenol (Figura 3).

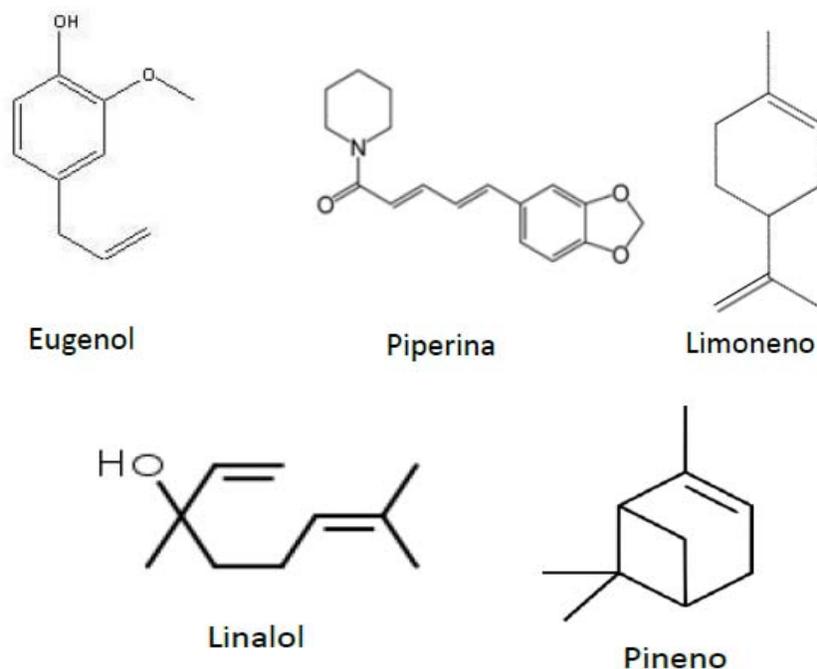


Figura 3. Estructuras moleculares de los compuestos antimicrobianos de la pimienta gorda.



Figura 4. Pimienta gorda (*Pimenta dioica*) seca molida y fruto con arbol de pimienta.

2.12 Albahaca (*Ocimum basilicum*)

Ocimum basilicum denominada vulgarmente como albahaca o alhábega, es una hierba aromática anual de la familia de las lamiáceas nativa de Irán, India y otras regiones tropicales de Asia, que lleva siendo cultivada varios milenios.

La albahaca es una hierba anual, cultivada como perenne en climas tropicales, de crecimiento bajo (entre 30 y 130 cm), con hojas opuestas de un verde lustroso, ovales u ovadas, dentadas y de textura sedosa, que miden de 3 a 11 cm de longitud por 1 a 6 cm de anchura. Emite espigas florales terminales, con flores tubulares de color blanco o violáceo las cuales, a diferencia de las del resto de la familia, tienen los cuatro estambres y el pistilo apoyados sobre el labio inferior de la corola.

Esta planta es muy sensible a las heladas. Se cultiva únicamente por semillas, que se pueden sembrar en semilleros o macetas en un invernadero a principios o mediados de la primavera. Requiere una posición soleada, aunque en climas de veranos muy calurosos agradece algo de sombra y suelos fértiles, permeables y húmedos.

Es una planta aromática que contiene aceites esenciales ricos en diferentes constituyentes, tales como linalol, geraniol, citral, alcanfor, eugenol y timol, entre otros y representan un inmenso valor para la industria de perfumería, cosméticos, alimentaria y la farmacéutica (Sánchez, E., et al., 2000).

Su acción farmacológica se define como antiinflamatoria, antiséptica, antiespasmódica y analgésica. Es utilizado en medicina tradicional para tratar afecciones respiratorias, gastrointestinales y reumatismo. Tópicamente es usado en baños para tratar afecciones de la piel y se ha comprobado actividad antimicótica *in vitro* (Chalala, M. et al., 2002).

Estudios han demostrado que esta hierba tanto fresca como seca presenta actividad antimicrobiana inclusive sobre especies como *Staphylococcus aureus* (Colivet, J., et al., 2011).

Algunos compuestos identificados como antimicrobianos en la albahaca son el linalol y eugenol (estructuras moleculares en la figura 3).



Figura 5. Albahaca (*Ocimum basilicum*) seca y fresca.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Aislar, purificar e identificar cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos, a partir de muestras de quesos frescos, evaluando su comportamiento frente a extractos etanólicos de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) y albahaca (*Ocimum basilicum*).

3.2 Objetivos Particulares

Aislar bacterias cultivables a partir de quesos frescos de diferente tipo: cotija, panela, manchego, de morral, botanero con y sin chile.

Identificar a los microorganismos aislados y estudiar su fenotipo de resistencia a diferentes antibióticos.

Comparar la respuesta de los microorganismos multirresistentes a antibióticos seleccionados frente a agentes antimicrobianos sintéticos y naturales.

Observar la diferencia en capacidad antimicrobiana de las especias de pimienta gorda y albahaca.

3.3 Hipótesis

Alimentos de origen animal como quesos frescos preparados de manera artesanal pueden estar contaminados por microorganismos multiresistentes a antibióticos.

Estas bacterias pueden ser sensibles al efecto antibacteriano de los extractos etanólicos y acuosos de pimienta gorda (*Pimineta dioica*) y albahaca (*Ocimum basilicum*).

3.4 Justificación

Revisando la literatura científica se encuentran muchos estudios que reportan que en los últimos años, el uso veterinario de antibióticos, especialmente los empleados como promotores de crecimiento animal, podrían ser los causantes directos del incremento de casos de resistencia a los medicamentos

antimicrobianos administrados en la medicina humana. Por un lado, los alimentos procedentes de animales tratados terapéuticamente con agentes antimicrobianos pueden contener trazas de éstos que se incorporan al organismo humano a través de la cadena alimentaria, fomentando igualmente la aparición de microorganismos resistentes en el hombre. Por otro lado, el consumo continuado de antibióticos promotores de crecimiento, sobre todo a concentraciones subterapéuticas, fomenta la aparición en los animales de cepas de microorganismos resistentes que por diferentes vías de transmisión, especialmente a través de la cadena alimenticia, pueden llegar al ser humano. También las prácticas ineficientes para la prevención y el control de la infección en los humanos han provocado la aparición de bacterias multirresistentes (OMS, 2001). Paralelamente, estudios de extractos de pimienta gorda y albahaca reportan actividad antimicrobiana sobre bacterias multirresistentes y podrían ser una alternativa favorable para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por este tipo de microorganismos.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento de bacterias multirresistentes

Se pesaron 10 gramos de queso fresco en un recipiente o bolsa plástica estéril de tamaño adecuado en condiciones de asepsia y se homogeneizaron con 90 mL de solución diluyente de agua peptonada estéril en un homogeneizador peristáltico (Stomacher) durante dos minutos. A continuación se tomaron 10 mL de homogeneizado y se depositaron en un matraz con 90 mL de medio de cultivo (Infusión cerebro-corazón con azida de sodio) y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó una tinción de Gram para observar la presencia o ausencia de bacterias Gram positivas. Posteriormente, se tomaron 2 mL de caldo y se depositaron en un tubo de 22 x 165 cm con 18 mL de caldo BHI con azida de sodio y 35.55 µg/mL de vancomicina (Vancocin® (Fracción VI del artículo 226 de la Ley General de Salud, 2014)), con el fin de obtener una concentración final de 32 µg/mL y se incubaron nuevamente a 37°C durante 24 horas. La vancomicina utilizada fue la marca comercial Vancocin®, la cual está registrada en el gobierno y actualmente se encuentra en la lista de medicamentos de venta con receta.

A término del tiempo de incubación se tomaron 100 µL de caldo y se depositaron en cajas Petri estériles y se adicionaron de 15 a 20 mL de medio fundido (Agar BHI + azida de sodio) y 32 µg/mL de vancomicina, los cuales fueron extendidos con una varilla de vidrio en forma de "L", estéril. El cultivo fue incubado a 37°C durante 24 horas. Se realizaron tinciones de Gram a partir de colonias aisladas para verificar la pureza y morfología de las bacterias Gram positivas. Solo se utilizaron las cepas que presentaron crecimiento en medio sólido o en medio líquido en presencia de vancomicina.

Se suspendió 1 colonia en un tubo con 10 mL de caldo BHI con azida de sodio y 32 µg/mL de vancomicina e incubó durante 24 horas a 37°C. Después del periodo de incubación se realizó tinción de Gram para observar la pureza y morfología de

las bacterias. Al no presentar contaminación, se tomó 1 mL de caldo y se depositó en un tubo Eppendorf, el cual se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante un minuto, posteriormente se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL más, se homogeneizó y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió 3 veces más. Una vez obtenido el centrifugado de células, se agregó 1.5 mL de una solución al 70% de caldo BHI con azida de sodio y 32 µg/mL de vancomicina y 30% de glicerol y se homogeneizó. De esta manera se obtuvieron 2 tubos Eppendorf de cada cepa, los cuales se almacenaron en un ultracongelador a -72°C para su posterior uso.

4.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos

Una vez que se aislaron varias cepas, se descongelaron las que se mantenían almacenadas. Se tomó una alícuota de 50 µL del caldo descongelado y se depositó en un tubo con 3 mL de caldo BHI con azida de sodio y 32 µg/mL de vancomicina y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Los tubos Eppendorf se conservaron nuevamente en el ultracongelador a -72°C. Con las cepas resultantes de la incubación se resembraron nuevamente tubos con el mismo medio de cultivo y se incubaron con las mismas condiciones, con el fin de utilizar cepas recuperadas en su totalidad en los posteriores experimentos.

Para determinar la multirresistencia a antibióticos se inocularon cajas con agar Mueller-Hinton con alícuotas de 100 µL de las cepas aisladas y se extendieron sobre la superficie del medio con una varilla en “L” y se trabajó con multidiscos de la marca Biorad® para gram positivos en cajas Petri de acuerdo con el método Bauer-Kirby (Bauer, A., et al., 1966). Posteriormente las cajas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Al término del periodo de incubación se observó la presencia o ausencia del halo de inhibición alrededor de las muestras de antibiótico de los multidiscos y, en caso de presentarlo, se registró su tamaño.

4.3 Identificación bioquímica

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas a cada una de las cepas aisladas y probadas:

- **Prueba de bilis-esculina**

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

- **Prueba de catalasa**

Se inocularon las cepas en cajas con agar BHI por cuadrante radial y se incubaron a 37°C durante 24 horas. A una colonia aislada se le agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30%. Se consideró como positiva la prueba si se observó un burbujeo inmediato, indicando la degradación del H₂O₂ en agua y oxígeno por acción de la enzima catalasa.

- **Prueba de coagulasa**

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

- **Prueba de oxidación de carbohidratos**

Se inocularon las cepas en tubos con caldo rojo de fenol, con diferentes carbohidratos (Glucosa, Lactosa, Arabinosa, Manitol, Maltosa, Sacarosa, Inulina, Sorbitol, Fructosa, Galactosa, Manosa, Trehalosa) y campana Durham en el interior. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se consideró positiva la prueba al observarse un vire del medio a color amarillo por acción del indicador indicando la disminución del pH debido a la degradación del carbohidrato. La presencia de gas dentro de la campana Durham indica la producción de gas a partir del uso del carbohidrato.

- **Prueba de hemólisis de sangre**

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

- **Prueba de Nitrato**

Se inocularon las cepas de prueba en caldo nitrato, y se incubaron a 37°C durante 24h. Las pruebas fueron reveladas de la siguiente manera: Se registró la producción de burbujas de gas dentro del tubo Durham, se agregaron 5 gotas de reactivo A (α -Naftilamina) y 5 gotas de reactivo B (ácido sulfanílico) para prueba de nitratos, se agitó el tubo con suavidad y se dejó reposar durante 2 minutos. Se consideró como resultado positivo para la producción de nitrito, el desarrollo de una coloración rosa a rojo en el medio de cultivo. En caso de haber obtenido un resultado negativo, se continuó con la prueba, agregando una pequeña cantidad de zinc al medio, la aparición de una coloración rosada o roja confirma la negatividad de la reacción; en caso de que esto no suceda, significa que los nitratos han sido reducidos a N_2 gaseoso.

- **Prueba de Ornitina**

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

- **Prueba de Rojo de metilo**

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

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

- **Prueba de Ureasa**

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

- **Prueba de Voges-Proskauer**

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

4.4 Preparación de extractos etanólicos y acuosos de las especias

En un matraz Erlenmeyer se adicionaron 100 mL de etanol al 95% ó agua destilada estéril y 20 g de pimienta gorda o albahaca seca previamente molida en una licuadora y se mantuvo en agitación constante durante cuatro días. La solución se filtró al vacío hasta observar la menor cantidad de sólidos insolubles en etanol, empleando papel filtro, embudo Büchner y matraz Kitasato. La solución se esteriliza con ayuda de un equipo Millipore.

4.5 Prueba de los extractos etanólicos y acuosos

Se inocularon en zona aséptica por difusión en placa con varilla de vidrio en cajas Petri con agar luria, a una concentración de cepa de 0.5 de Mc Farland. Una vez que el medio absorbió a la cepa, se hacen orificios de 5 mm de diámetro con ayuda de pipetas Pasteur estériles. Se agregaron 50 μ L de extracto etanólico

o acuoso en su respectivo orificio. El mismo volumen se agregó a un orificio adicional empleando etanol al 95% o agua destilada estéril como control. Posteriormente las cajas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Al término del periodo de incubación se observó la presencia o ausencia del halo de inhibición alrededor de las muestras de los orificios con extractos y, en caso de presentarlo, se registró su tamaño.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de bacterias multirresistentes

Cepa	Tipo de queso	Procedencia	Morfología microscópica
A	Cotija	Establo San Miguel	Cocos Gram + agrupados en forma de racimos.
B	Cotija	Establo San Miguel	Cocos Gram + agrupados en forma de racimos.
C	Panela	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
D	Manchego	Establo San Miguel	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
E	De Morral	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
F	Botanero con chile	Casa láctea “Teya” (Tultitlan)	Cocos Gram + agrupados en forma de racimos.
G	Oaxaca	Artesanal comercializado en Mega Comercial Mexicana Coacalco	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena
H	Manchego	Establo San Miguel	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
I	Oaxaca	Frankly	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
J	Botanero con chile	Casa láctea “Teya” (Tultitlan)	Cocos Gram + agrupados en forma de racimos.
K	De Morral	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
L	Botanero	Casa San Juan (Tultitlan)	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
M	Oaxaca	Cafetería Coacalco	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
N	Oaxaca	Frankly	Cocos Gram + agrupados en forma de cadena.
O	Oaxaca	Casa San Juan (Tultitlan)	Cocos Gram + agrupados en forma de racimos.
P	Panela	Mercado “Villa de las flores” (Coacalco)	Cocos Gram + agrupados en forma de racimos.

Tabla I. Características de las cepas

Nota: De 22 cepas aisladas solo se seleccionaron 16 cepas ya que eran las que presentaron resistencia a mayor número de antibióticos.

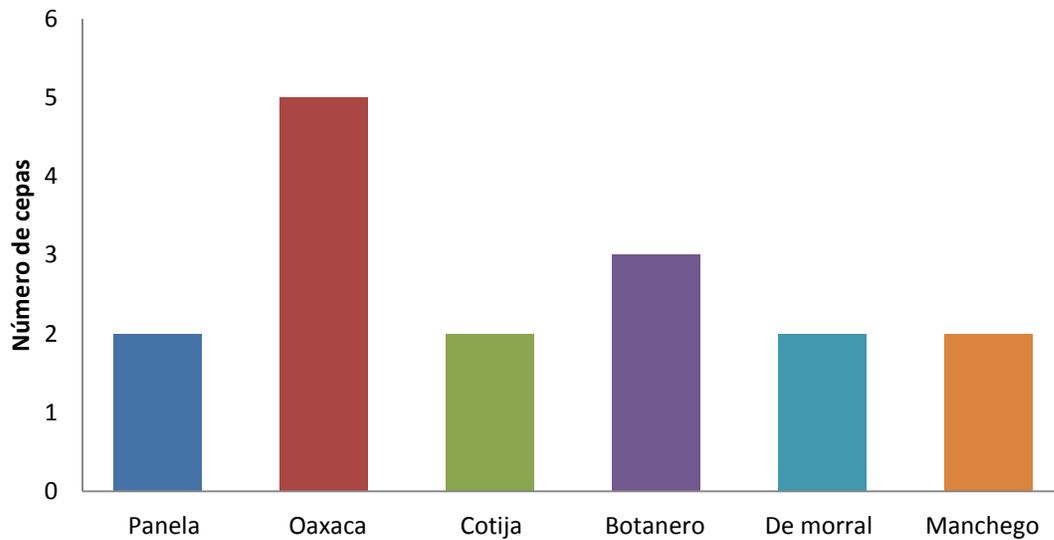


Gráfico 1. Numero de cepas aisladas en los diferentes tipos de quesos frescos. Panela: C y P; Oaxaca: G, I, M, N y O; Cotija: A y B; Botanero: F, J y L; De morral: E y K; Manchego: D y H.

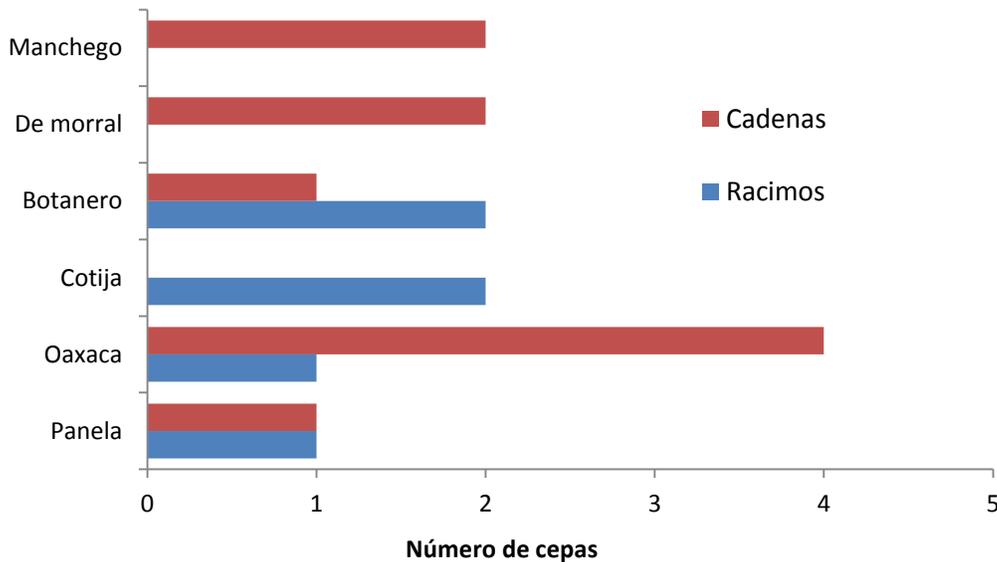


Gráfico 2. Morfología microscópica de los microorganismos aislados en los diferentes tipos de quesos. Bacterias Gram positivas agrupadas en forma de cadenas o racimos.

5.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos

Antibiótico \ Cepa	Cepa															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Pefloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacina	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Cefotaxima	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Sulfametoxazol/Trimetoprima	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Ampicilina	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Dicloxacilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Tetraciclina	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S
Ceftazidima	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Vancomicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Total	11	11	7	8	7	7	9	8	7	7	7	7	7	7	11	7

Tabla II. Antibiograma de las cepas aisladas. R=Resistencia, S= Sensibilidad.

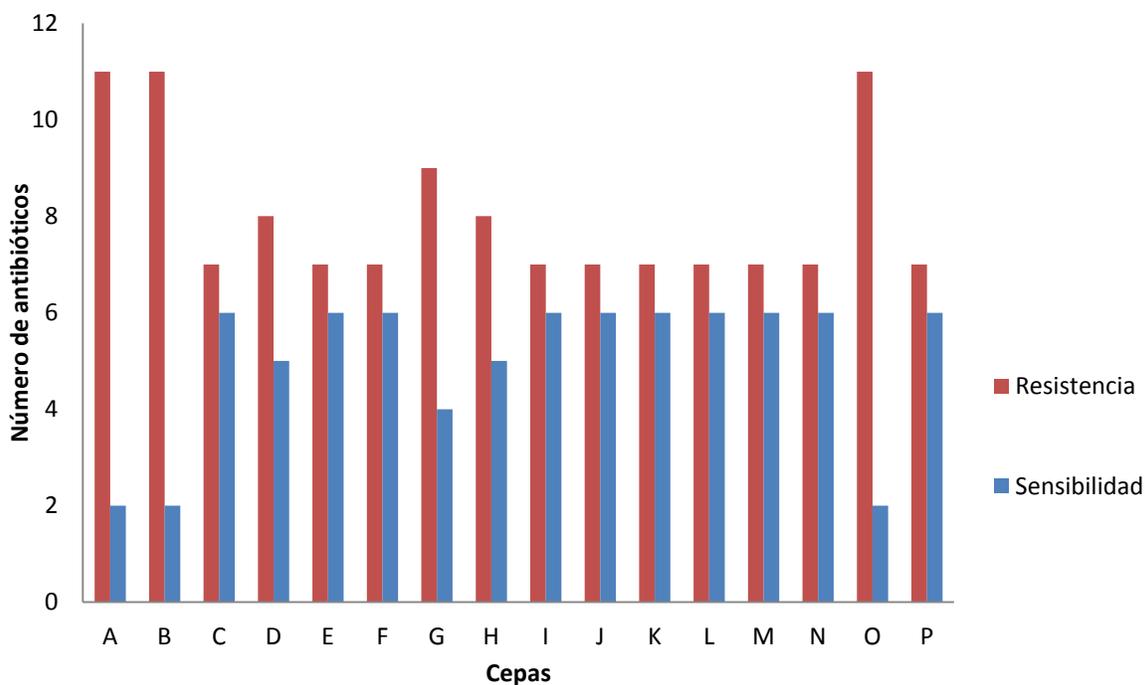


Gráfico 3. Total de antibióticos resistidos y sensibles para los microorganismos aislados.

5.3 Identificación bioquímica

Pruebas	Cepas															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Esculina	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Catalasa	+	+				+				+					+	+
Coagulasa	+	+				-				-					+	-
Arabinosa	-	-				-				-					-	-
Fructosa	-	-				-				-					-	-
Galactosa	+	+				+				+					+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina			+	-	-		+	-	-		-	+	-	-		
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+				+				+					+	+
Manitol	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Manosa	+	+				+				+					+	+
Rafinosa	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
Sacarosa	+	+				+				+					+	+
Sorbitol			-	+	-		+	+	-		-	-	+	-		
Trehalosa	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Hemoglobina			γ	β	γ		γ	β	γ		γ	γ	β	γ		
NO ₂	+	+				+				+					+	+
Ornitina descarboxilasa	-	-				+				+					-	+
Rojo de Metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	+	+				+				+					+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla III. Resultados de las pruebas bioquímicas.

Cepa	Identidad del microorganismo	Total de antibióticos resistidos
A	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
B	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
C	<i>Streptococcus salivarius</i>	7
D	<i>Streptococcus porcinus</i>	8
E	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7
F	<i>Staphylococcus epidermis</i>	7
G	<i>Streptococcus mutans</i>	9
H	<i>Streptococcus porcinus</i>	8
I	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7
J	<i>Staphylococcus epidermis</i>	7
K	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7
L	<i>Streptococcus salivarius</i>	7
M	<i>Streptococcus porcinus</i>	7
N	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7
O	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
P	<i>Staphylococcus epidermis</i>	7

Tabla IV. Género y especie de las cepas aisladas y número de antibióticos a los que son resistentes.

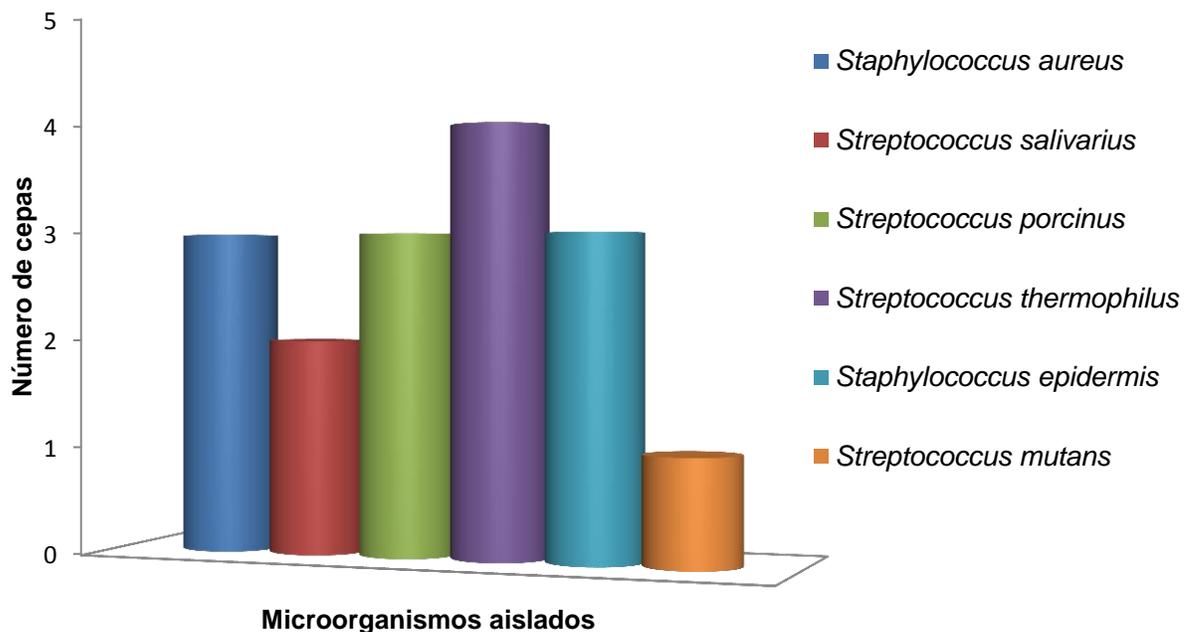


Gráfico 4. Identidad de los microorganismos aislados que presentaron multirresistencia.

5.4 Preparación de extractos etanólicos y acuosos de las especias

Extracto	Descripción
Pimienta gorda (etanólico)	Líquido translucido de color café oscuro
Pimienta gorda (acuoso)	Líquido turbio de color café
Albahaca (etanólico)	Líquido transparente de color verde brillante
Albahaca (acuoso)	Líquido transparente de color verde

Tabla V. Descripción física de los extractos acuosos y etanólicos de pimienta gorda y albahaca.

5.5 Prueba de los extractos etanólicos y acuosos

Cepa	Pimienta gorda Etanólico (cm)	Pimienta gorda Acuoso (cm)	Albahaca Acuoso (cm)	Albahaca Etanólico (cm)
A	2.3	0	0.7	1.0
B	2.3	0	0.7	1.0
C	2.5	0	0.8	1.2
D	2.4	0	0.9	1.3
E	2.2	0	1.0	1.6
F	2.4	0	0.8	1.2
G	2.5	0	1.0	1.0
H	2.3	0	1.0	1.6
I	2.0	0	1.1	1.5
J	2.2	0	1.0	1.4
K	2.0	0	0.8	1.1
L	2.5	0	1.0	1.4
M	2.4	0	0.7	1.1
N	2.0	0	1.0	1.4
O	2.3	0	1.0	1.4
P	2.2	0	1.0	1.6

Tabla VI. Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de especias sobre bacterias multirresistentes. Los resultados se expresan como halos de inhibición de crecimiento en centímetros. Se realizó un control etanólico (etanol 95%) y uno acuoso (agua destilada esteril) con valores de inhibición de 0 cm (Todas las pruebas se realizaron por duplicado y se registraron los valores promedio).

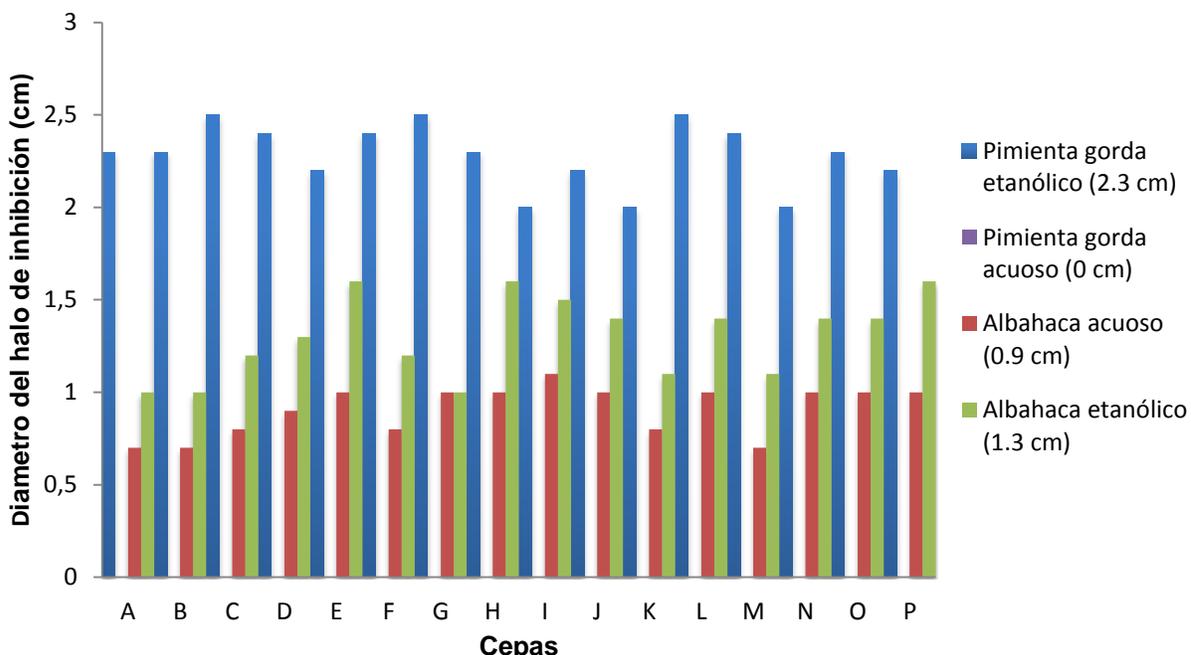


Gráfico 5. Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acuosos de especias sobre las bacterias multirresistentes aisladas. El promedio de la actividad antimicrobiana se reporta en paréntesis para cada extracto.

Cepa	Pimienta gorda Etanólico (cm)	Pimienta gorda Acuoso (cm)	Albahaca Etanólico (cm)	Albahaca Acuoso (cm)
A	Fuerte	Nula	Ligera	Nula
B	Fuerte	Nula	Ligera	Nula
C	Fuerte	Nula	Ligera	Nula
D	Fuerte	Nula	Ligera	Nula
E	Fuerte	Nula	Moderada	Ligera
F	Fuerte	Nula	Ligera	Nula
G	Fuerte	Nula	Ligera	Ligera
H	Fuerte	Nula	Moderada	Ligera
I	Fuerte	Nula	Ligera	Ligera
J	Fuerte	Nula	Ligera	Ligera
K	Fuerte	Nula	Ligera	Nula
L	Fuerte	Nula	Ligera	Ligera
M	Fuerte	Nula	Ligera	Nula
N	Fuerte	Nula	Ligera	Ligera
O	Fuerte	Nula	Ligera	Ligera
P	Fuerte	Nula	Moderada	Ligera

Tabla VII. Tipo de actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acuosos para cada cepa. 0-0.9 cm: actividad antibacteriana nula. 1.0-1.5 cm: actividad antibacteriana ligera; 1.6-2.0 cm actividad antimicrobiana moderada; >2.0 cm: actividad antimicrobiana fuerte (Saodic, O., et al., 2005).

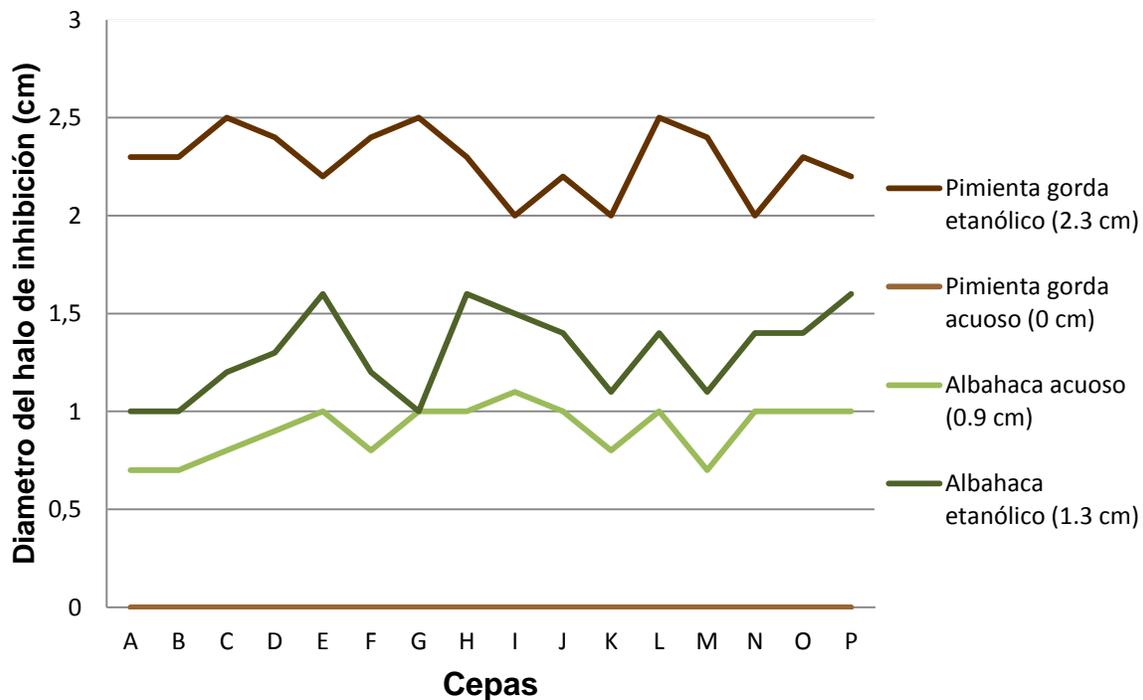


Gráfico 6. Comportamiento de los extractos acuosos y etanólicos en microorganismos aislados. El promedio de la actividad antimicrobiana se reporta en paréntesis para cada extracto.

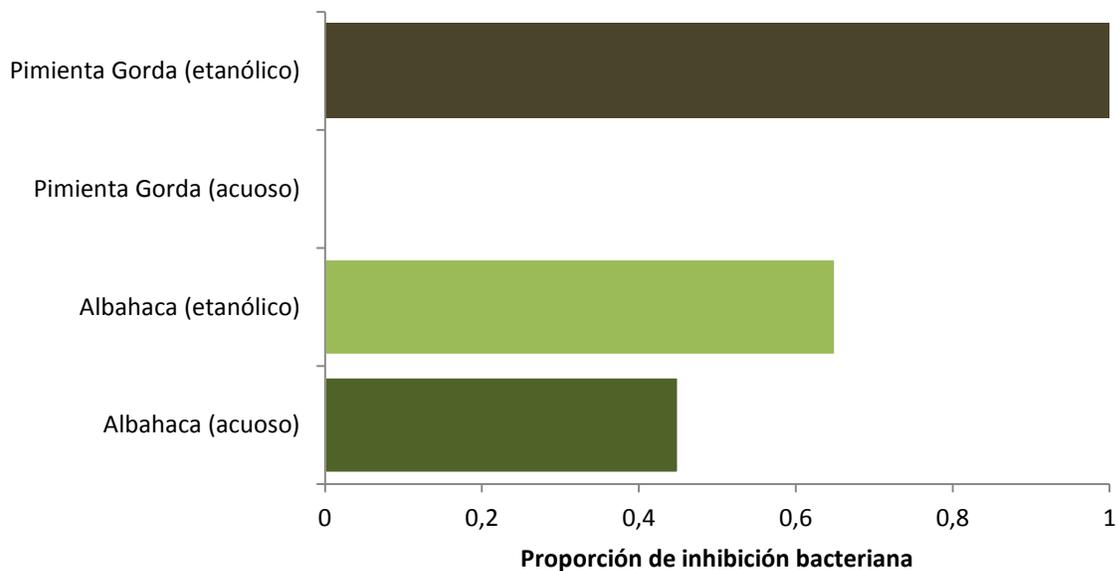


Gráfico 7. Proporción de inhibición bacteriana de los extractos etanólicos y acuosos para los microorganismos multirresistentes aislados. El cálculo de proporción de inhibición bacteriana se realizó tomando como 1.0 (100%) el valor de 2.0 cm de diámetro del tamaño del halo de inhibición de cada extracto (Saodic, O., et al., 2005).

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla I, se obtuvieron cocos Gram positivos agrupados en forma de cadenas y racimos a partir de quesos frescos de diferentes establecimientos del Estado de México. La mayor cantidad de aislamientos fue a partir de queso Oaxaca (Gráfico 1).

La morfología microscópica que predomina en las bacterias en este estudio son cocos Gram positivos agrupados en racimos (Gráfico 2).

En la tabla II observamos que todas las bacterias aisladas presentaron resistencia en común a los antibióticos: Penicilina, Pefloxacina, Dicloxacilina y Vancomicina, además de que fueron resistentes a un mínimo de 7 antibióticos de los 13 estudiados (Gráfico 3) en las pruebas de sensibilidad a antibióticos. Con estos resultados confirmamos la presencia de bacterias multirresistentes a antibióticos en alimentos para consumo humano, específicamente en quesos frescos.

Las cepas que tuvieron resistencia a mayor número de antibióticos son las cepas A, B y O con 11 antibióticos resistidos, seguidos de las cepa G con 9 de los 13 antibióticos probados.

De acuerdo a las características microscópicas de las cepas y con la ayuda de la literatura consultada (Mc Faddin, J., 1990) se realizaron las pruebas bioquímicas (Tabla III) para la identificación de los microorganismos en estudio.

El resultado de las pruebas bioquímicas demuestra que se aislaron cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus epidermis* y *Streptococcus mutans* (Tabla IV) pero en su mayoría se aislaron cepas de *Streptococcus thermophilus* (Gráfico 4).

A pesar de que se identificaron varias cepas de la misma especie, es posible afirmar que no son las mismas bacterias, ya que se aislaron de diferentes muestras y establecimientos (Tabla I), además de que presentan resistencia a diferentes antibióticos (Tabla II).

Las posibles causas de la contaminación de los alimentos por estas bacterias podrían haber sido el manejo rudimentario en la crianza, engorda o mantenimiento del animal productor, en la colecta y manejo de la materia prima, la producción del queso, su manejo posterior, almacenamiento, condiciones e instalaciones inapropiadas y uso de antibióticos en los animales o en la materia prima (leche).

El consumo de estos alimentos implica la ingesta de una diversidad de microorganismos que, aunque varios de ellos no sean patógenos, podrían funcionar como reservorio de genes de resistencia en el tracto gastro-intestinal del ser humano, contribuyendo además a su diseminación en el medio ambiente.

El alto uso de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable a la selección de bacterias que soportan los efectos tóxicos de los antimicrobianos. La gran capacidad adaptativa de las bacterias es el resultado del efecto combinado de rápidos índices de crecimiento, de mutaciones genéticas y de la selección de las mismas, así como de su habilidad para intercambiar material genético horizontalmente (Beaber, J., et al., 2004).

El aumento de la resistencia a antibióticos de bacterias patógenas causantes de infección o intoxicaciones comunitarias e intrahospitalarias es el problema más reportado en México relacionado con el uso inapropiado de los fármacos (Dresler, A. et al, 2008).

Como un método alternativo para la destrucción de las cepas multiresistentes a antibióticos, se probaron dos especias que se utilizan en la condimentación de alimentos. La descripción física de los extractos de especias (Tabla V) nos proporciona información de la solubilidad de los compuestos en la albahaca y pimienta gorda, ya que la descripción física del extracto acuoso de pimienta gorda muestra que es un líquido turbio a diferencia de los demás extractos. De ello podemos deducir que los compuestos presentes en esta especia no son solubles en agua, sin embargo, lo son en etanol. Los extractos acuosos y etanólicos de albahaca contienen compuestos solubles en ambos disolventes.

El resultado de las pruebas de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y acuosos (Tabla VI) demuestra que la pimienta gorda en medio etanólico presenta mayor actividad antimicrobiana que en medio acuoso, con lo cual confirmamos que los componentes antimicrobianos en esta especia son más solubles en etanol, ya que en medio acuoso no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre estos microorganismos (Gráfico 5). Para el caso de los extractos de albahaca, también hubo mayor actividad antimicrobiana en medio etanólico que en medio acuoso (Gráfico 5).

La actividad antimicrobiana que presentó el extracto etanólico de pimienta gorda se consideró fuerte para la mayoría de bacterias aisladas (Tabla VII) mientras que en medio acuoso se consideró nula, de acuerdo con la bibliografía consultada (Saodic, O., et al., 2005).

En el extracto acuoso de albahaca la actividad antimicrobiana fue nula y ligera, pero en medio etanólico fue ligera y moderada.

El comportamiento general o promedio de los extractos sobre todas las bacterias aisladas (Gráfico 6), nos muestra que la pimienta gorda en medio etanólico tuvo un valor promedio de inhibición de crecimiento de 2.3 cm por lo que se puede considerar de actividad antimicrobiana fuerte pero en medio acuoso nula (Saodic, O., et al., 2005). El extracto de albahaca en medio acuoso tuvo un valor promedio de 0.9 cm y en etanol de 1.3 cm (Gráfico 6). En estos casos la actividad antimicrobiana se consideraría nula en medio acuoso y ligera en medio etanólico para los microorganismos en estudio (Saodic, O., et al., 2005). La proporción de inhibición bacteriana es mayor con el extracto de pimienta gorda en medio etanólico en comparación con los extractos de albahaca en ambos medios y pimienta gorda en medio acuoso (Gráfico 7). Estos resultados nos confirman que los compuestos antimicrobianos presentes en estas especias son más solubles en etanol. De acuerdo a las estructuras de los posibles compuestos antimicrobianos presentes en este tipo de especias (Figura 3) observamos que el resultado es congruente ya que son compuestos que son más solubles en etanol que en agua, observamos que los compuestos presentes en ambas especias son similares; sin

embargo, la concentración de estos compuestos en cada especia es diferente y esto se comprueba con el resultado de la mayor actividad antimicrobiana de la pimienta gorda (etanólico). Posiblemente para la extracción de otros compuestos antimicrobianos en otras especias, se podría elegir el etanol como mejor disolvente para obtener este tipo de compuestos.

Los resultados demuestran el fuerte efecto inhibitorio del extracto etanólico de pimienta gorda sobre bacterias multirresistentes; esto podría permitir la elaboración de productos a partir de este extracto para el tratamiento clínico de enfermedades ocasionadas por este tipo de bacterias presentes en alimentos de alto consumo. Sin embargo, los extractos de albahaca en medio etanólico también podrían ser una alternativa de tratamiento para otro tipo de bacterias.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- Existe presencia de bacterias multirresistentes a antibióticos en los quesos frescos elaborados artesanalmente y procedentes de distintos lugares del Estado de México.
- Se comprueba que existe evidencia del uso indiscriminado de antibióticos en la actualidad por la multirresistencia que presentan los microorganismos aislados.
- La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de pimienta gorda fue fuerte y la de albahaca fue ligera y moderada.
- El comportamiento promedio de los extractos acuosos de pimienta gorda y albahaca tuvieron actividad antimicrobiana nula.
- El alcohol es el mejor disolvente para la extracción de los compuestos antimicrobianos en las especias de pimienta gorda y albahaca.
- Este trabajo corrobora la multirresistencia a antibióticos de bacterias en alimentos pero también el efecto inhibitorio del extracto de pimienta gorda sobre estos microorganismos por lo que este estudio tendría como beneficio a la sociedad permitir la elaboración de compuestos a base de este extracto para el tratamiento clínico de enfermedades ocasionadas por este tipo de bacterias, presentes en alimentos de alto consumo.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

- Allen, N. y Nicas, T. Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiology Review*. 26: 511-532, 2003.
- Arévalo, A., y Enciso, R. Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de Espeletias encontradas en el páramo de Guasca. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregado. Bogotá, D.C. Pág. 14,16-18, 21-25. 1996.
- Bartley, J. First case of VRSA Identified in Michigan. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 23:480. 2002.
- Bauer, A., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. Pathol.* 45: 493-6, [Depts. Microbiology and Medicine, Univ. Washington, Sch. Med., Seattle. WA]. 1966.
- Beaber, J., et al. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*. 427: 72-74, 2004.
- Billing, J. y Sherman, P. Antimicrobial functions of spices: Why some like it hot. *Quarterly Review of Biology* 73: 3–49. 1998.
- Burt, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. of Food Microbiol.* 94: 223-253. 2004.
- Calvo, J. y Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27:44-52, 2009.
- Cancho, B., et al. EL USO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL: PERSPECTIVA ACTUAL, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3:1, 39-47. 2000.
- Cavallieri, S., et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. University of Washington. Seattle, Washington, 2005.
- Chalala, M., et al. Lavado y desinfección de *Ocimum basilicum* L. var. *lactucaefolium*. I. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 7(2):84-88. 2002.
- Chang, S., et al. Infection with Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. *N Engl J Med*; 348:1342–7. 2003.

- Chavers, L., et al. Vancomycin Resistant Enterococci: 15 Years and Counting. *J Hosp Infect*; 53:159–71. 2003.
- Colivet, J., et al. Efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum L.*) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2 (2): 313-320. Julio-Diciembre, 2011.
- Cona, E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev Chil Infect*; 19 supl 2: 77 – 81. 2002.
- Cordiés, L., et al. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*. 8(1): 13-27, 1998.
- Darwinian Gastronomy: Why We Use Spices. Paul W. Sherman and Jennifer Billing *BioScience*, Vol. 49, No. 6, pp. 453-463. 1999.
- Dreser, A., et al. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud pública de México*. 50(4): S480-S487, 2008.
- Farrell, K., *Spices, Condiments, and Seasonings*. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 1990.
- Fraenkel, G., The raison d'etre of secondary plant substances. *Science* 129: 1466–1470. 1959.
- Georgopapadakou, N. Beta-lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 13: 1307-1318, 2004.
- Gonzalez, A. y Pino, J. "Efecto del envejecimiento del árbol de *Pimenta dioica L.*, sobre el rendimiento y composición del aceite esencial de la fruta", *Investigaciones*, Habana, Cuba. vol. 30, no2, pp. 277-281. 1990.
- Govindarajan, V. *Capsicum production, technology, chemistry, and quality*. Part I: History, botany, cultivation, and primary processing. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 22: 109–176. 1985
- Hui, Y., et al. *Foodborne Disease Handbook*. Vol. 1: Diseases Caused by Bacteria. New York: Marcel Dekker. 1994.

- Kaczanowska, M. y Rydén-Aulin, M. Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71: 477-494, 2007.
- Kanafani, Z. y Corey, G., Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections. *Expert Review of Anti Infective Therapy*. 5: 177-184, 2007.
- Klare, I., et al. Occurrence and Spread of Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol*; 88:269–90. 2003.
- Leclerc, R., et al. Plasmid Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*; 319:157–61. 1988.
- Levine, J. Actualización Sobre Antibióticos, Vancomicina: Un Repaso. *Clin Med Nort*; 1201–11. 1988.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J., *Brock Biology of microorganisms*, 9th edition, New Jersey, Prentice Hall, 2000.
- Masters, P., et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. 2003.
- Mc Faddin, J., *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, México, Ed. Panamericana, Pág. 512,513, 526 y 527. 1990.
- Núñez, A., et al. Vancomicina. Un Vencedor Vencido. *MEDICRIT, Revista de medicina interna y medicina crítica*; 3(6):136-138. 2006.
- Núñez, B., et al. Programa: Uso racional de antibióticos, Bristol-Myers Squibb. 2007.
- Nychas, G., *Natural antimicrobials from plants. New methods of food preservations*. G.W. Gould (Ed.). AN Aspen Publication, pp 58-73, 1995.
- Oliveira, M., Velázquez, D. y Bermúdez, A. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América.*, Vol. 30, No. 8, Pág. 453-459. 2005.
- OMS. *The Selection of Essential Drugs*. WHO Technical Report Series 641: 1-44. 1979.
- OMS. *World Health Report. The State of World Health*. Geneva: World Health Organization. 1996.

- OMS. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. 2001.
- OMS, Resistencia a los antimicrobianos, Organización mundial de la salud, Mayo, 2013.
- Osuna, T., Tapia, P. y Aguilar C., Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, 2005.
- Parry, J. The Story of Spices. New York: Chemical Publishers. 1953.
- Retsema, J. y Fu, W. Macrolides: structures and microbial targets. International Journal of Antimicrobial Agents. 18: S3-S10, 2001.
- Ruiz, G. y Susunaga, C. Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies de *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens* (Burseraceas), frente a microorganismos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia caratovora*, *Fusariumoxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrys cinérea*. Carrera Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javerian. Trabajo de grado. Bogotá. 40p. 2000.
- Rutilio, C., Paquete Tecnológico. Pimienta Gorda (*Pimenta dioica* L. Merrill). Volumen 1. Pag. 2. Número de páginas: 15. 2011.
- Sánchez, E., et. al., Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (Albahaca blanca). Revista Cubana de Farmacia. 34(3):187-195. 2000.
- Saodic, O. et al., “Efecto de Algunos Extractos de Especies en la Inhibición Bacteriana, Mundo Alimentario, pp.16-23. Marzo/Abril, 2005.
- Scheiper, R. Hot Spice. Contact 57. Springfield (NJ): Haarman and Reimer. 1993.
- Shlaes, D., An update on tetracyclines. Current Opinion in Investigational Drugs. 7:167-171, 2006.
- Stobart, T., Herbs, Spices and Flavourings, Penguin books, 1977.
- Suree. Nanasombat and Pana Lohasupthawee, “Antibacterial Activity of Crude Ethanolic Extracts and Essential Oils of Spices Against Salmonellae and Other Enterobacteria”, Science Technology Journal, Vol. 5 (3). pp. 527-538. 2005.
- Sussmann, O., et al. Resistencia antibacteriana. Facultad de Medicina, Hospital Universitario San Ignacio. Colombia, 2001.

- Todd, E. Surveillance of foodborne disease. Pages 461–536 in Hui YH, Gorham JR, Murrell KD, Cliver DO, eds. Foodborne Disease Handbook. Vol. 1: Diseases Caused by Bacteria. New York: Marcel Dekker. 1994.
- Tortora, G., Funke, B. and Case, C., Microbiology an Introduction, 7th edition, USA, Addison Wesley Logman, 2001.
- Varnam, A. y Evans, M., Foodborne Pathogens. London: Mosby-Year Book. 1991.
- Villain-Guillot, P., et al. Progress in targeting bacterial transcription. Drug Discovery Today. 12: 200-208, 2007.
- Walker, J., Antimicrobial compounds in food plants. Pages 181–204 in Dillon VM, Board RG, eds. Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation. Wallingford (UK): CAB International. 1994.