



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*Evaluación del posible efecto inhibitorio del
cinamaldehído y del eugenol en bacterias
multiresistentes a antibióticos aisladas de zonas
infectadas de pie diabético.*

TESIS

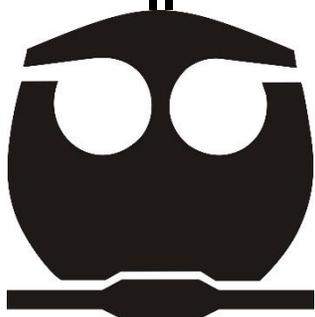
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FÁRMACO BIÓLOGO**

PRESENTA

JOSIMAR DE JESÚS CASASOLA BAUTISTA

México, CDMX.

2018





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: JOSÉ IGNACIO PARAMO RAMÍREZ**

SECRETARIO: **Profesor: ALEIDA MINA CETINA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: CRUCES MARTÍNEZ ANA LILIA**

2º 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:

Josimar de Jesús Casasola Bautista

Índice

Marco teórico.....	4
Capítulo I Canela.....	4
Capitulo II Antibióticos.....	18
Capitulo III Diabetes.....	34
Hipótesis.....	39
Objetivos.....	40
Materiales y métodos.....	41
Resultados.....	45
Discusión.....	55
Conclusiones.....	60
Apéndice 1.....	61
Referencias.....	63

Marco Teórico

Capítulo I

Canela

La humanidad le ha dado una función prioritaria a la canela durante miles de años; sus usos varían desde remedio tradicional para curar malestares del cuerpo, a saborizante y condimento en la parte alimentaria.

Existen ejemplos sobre el empleo que se le dio a la canela históricamente. En el antiguo Egipto esta especia junto con el anís, comino, orégano y otras especias exóticas se usaron para embalsamar cadáveres en el proceso de momificación; la Biblia describe la utilidad que tuvo la canela como remedio medicinal, algo que fue complementado por el “padre de la medicina china” el emperador Shen Nung alrededor del 1800 a.C.. En Grecia y en Roma se manejó con frecuencia para mejorar la digestión; el geógrafo e historiador Heródoto (484-425 a.C.) menciona en sus escritos el uso de esta especia procedente de Ceilán, actual Sri Lanka (*Cinnamomum zeylanicum*) y el uso de la canela de la China (*Cinnamomum cassia*). Se cree que esta especia, junto con la pimienta y el cardamomo, fueron las primeras que se usaron en la zona mediterránea. El consumo de la canela en Occidente estuvo restringido a las clases más ricas que eran las únicas que podían costear el precio de esta especia que debía de ser traída desde remotos lugares. Durante la Edad Media la mayor parte de su venta fue controlada por los comerciantes venecianos y genoveses que la obtenían a través de los musulmanes que controlaban las rutas de oriente^[1].

El mayor auge del comercio y uso que se le dio a la canela fue durante los siglos XVI y XVII, cuando los portugueses encontraron arboles de canela en Ceilán, quienes se encargaron de su comercialización. Los holandeses ocuparon Ceilán hasta el siglo XVII hasta que fue capturada por los británicos en 1796 apoderándose del comercio de esta especia por medio de la East India Company.^[2]

En la actualidad se conocen más de 250 especies del genero *Cinnamomum*. El más usado de estas especies es *Cinnamomum zeylanicum*, también conocido como *Cinnamomum verum*. Es un árbol perenne de la familia *Lauraceae*; puede llegar a medir hasta 20 metros de alto, su corteza es gruesa, por dentro es de un color rojizo y por fuera un marrón grisáceo; sus hojas recientes son de un color rosado que al madurar se vuelven verdes, sus flores son pequeñas y de color amarillo pálido, los frutos ovoides carnosos de alrededor de 1 cm de diámetro color morado oscuro o negro, con una sensación muy picante y no son comestibles. La raíz griega es: *kinnamon* (madera dulce) árbol originario de la isla Sri Lanka y del suroeste de India. ^[1]

La canela tiene un olor y sabor particular. Se perciben notas dulces en su olor, al gusto tiene notas astringentes y dulces, se considera su sabor como “picante” y es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria y química; como alimento se manipula principalmente a manera de saborizante. La obtención de la canela se da en temporada de lluvias, ya que esto ayuda que se retire la corteza externa del árbol y pueda extraerse el interior. Posteriormente, la corteza interna se corta, se enrolla y se rellena con fragmentos de corteza para después secarla.

Para finalizar el proceso y antes de que se comercialice, los rollos de canela sufren un proceso de blanqueamiento.^[2]

Principales usos de la canela.

Como especia se utiliza abundantemente en la cocina para pastas, pasteles, compotas, arroz, carne, ensaladas de frutas y verduras, frutas cocidas y asadas.

La industria manipula la canela por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, creando una gran variedad de sustancias relacionadas con la higiene bucal: dentífricos, enjuagues bucales, etc.

En farmacia el aceite esencial se emplea para la composición de jarabes y vaporizadores nasales que combatan enfermedades respiratorias fuertes o un resfriado.

La industria de la alimentación recurre al aceite esencial para la conservación de alimentos, por su riqueza en aromas y dar sabor así como olor a numerosos preparados, entre ellos refrescos de colas, chicles o numerosas bebidas alcohólicas.

Su riqueza en fragancias la hace muy adecuada en la industria de la perfumería, en la elaboración de perfumes, jabones, champús, etc.^[3]

Usos medicinales (tradicionales) del árbol de la canela.

Aparato digestivo: La canela posee propiedades carminativas, antiulcerosas, estomacales y antieméticas. Las propiedades digestivas de esta planta son

producidas por los aceites esenciales que contienen propiedades disgregadoras de los alimentos. Así mismo, estos aceites son responsables de estimular la salivación y los jugos gástricos facilitando la digestión.

Estas virtudes se utilizan para el tratamiento de anomalías del aparato digestivo como:

Aerofagia: Las propiedades carminativas y antiespasmódicas de esta especia son empleadas tradicionalmente para remediar las flatulencias o el exceso de gases acumulados en el aparato digestivo.

Digestiones difíciles: Sus componentes le permiten estimular los ácidos gástricos y favorecer la disgregación de los alimentos lo cual facilita la digestión.

Vómitos: El alcanfor le proporciona propiedades antieméticas ideales para el tratamiento de las náuseas o los vómitos.^[4]

Composición de aceite esencial de canela.

Las hojas, la corteza del tallo y en menor medida la raíz de *C. zeylanicum* contienen el aceite esencial. Se caracteriza por la presencia de monoterpenos como el alcanfor, alcanfeno, cuminaldehído, paracimeno, geraniol y su acetato, limoneno, linalol, nerol, acimeno, felandreno, alfa y beta-pineno, gama-terpineno y alfa-terpineol; los sesquiterpenos beta-cariofileno, farnesol, alfa-hunmuleno, beta-selaneno y alfa-yalangeno; y los componentes fenílicos cinamaldehído, acetato del ácido cinámico, alcohol cinámico, eugenol y su acetato. En proporción, el principal componente de aceite esencial en la corteza del *C. zeylanicum* es el cinamaldehído,

seguido del eugenol; mientras que en las hojas el principal componente del aceite esencial es el eugenol (cerca de un 81-85%). Puede mencionarse como ejemplo al aceite esencial de *Cinnamomum verum* que contiene aproximadamente 63% cinamaldehído, 8% limoneno, 7% eugenol, 5.5% propileno de cinamaldehído y <1-2% y una variedad de compuestos de terpenos (α -pinene, camphene) composición obtenida con un equipo acoplado cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas.^[4]

Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales presentan propiedades de inhibición a microorganismos. Esto es conocido desde hace muchos años a través de la medicina tradicional. Debido a los diferentes y variados componentes que presentan los aceites, estos se han clasificados de acuerdo a cuales tienen una mayor actividad antimicrobiana, de la siguiente forma fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos^[5]. Una gran cantidad de estudios han demostrado la sinergia al usar aceites esenciales en combinación con antibióticos y así producir un efecto inhibitor mayor de los microorganismos.^{[6][7]}

Aceite esencial de Canela.

Un gran número de estudios han probado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela, ya sea contra bacterias Gram positivas como Gram negativas^[7]. Estos estudios han demostrado poder inhibir cepas de *Streptococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas eaureginosa, *Clostridium perfringes*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria sp.* y *Candida albicans*^[8].

En el artículo Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) se identificaron nueve constituyentes que representan el 99,24% del aceite. El de mayor presencia es cinamaldehído (68.95%), benzaldehído (9.94%), (E)-acetato cinamico (7.44%), limoneno (4.42%) y eugenol (2.77%). Otros componentes analizados representan poco menos del 2%.

Un gran número de artículos coinciden con estas proporciones, confirmando al cinamaldehído como el de mayor presencia en el aceite esencial de corteza de canela, con sus demás constituyentes principales como el benzaldehído, limoneno y el eugenol ^[8].

Conjuntamente, otros reportes han probado y demostrado las propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antifúngicas, antibacterianas y cicatrizantes del cinamaldehído y eugenol. ^{[9][10][11][12]}

CINAMALDEHÍDO

Como se mencionó en el capítulo anterior, es el componente mayoritario de la canela y uno de los responsables de la mayor parte de sus propiedades. Además de su acción antimicrobiana, es capaz de disminuir la presión arterial mediante su interacción con los canales de calcio celulares, así como de reducir los niveles de glucosa en sangre gracias a un incremento de la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, lo más impactante es su desempeño en combatir enfermedades como el Alzheimer y en la viabilidad de células cancerosas. ^{[10][11]}

ESTRUCTURA QUÍMICA

De fórmula molecular C_9H_8O y masa molecular 136.2 g/mol, el cinamaldehído se encuentra presente en la naturaleza como trans-cinamaldehído, y está compuesto por un aldehído insaturado unido a un grupo fenilo; por ello, tiene aromaticidad. Tiene color amarillo pálido y presenta una baja solubilidad en agua, siendo muy soluble en aceites ^[8].

CINAMALDEHÍDO Y PRESIÓN SANGUÍNEA

Ya en el siglo pasado, en la década de los 70, se descubrió que el cinamaldehído provocaba una rápida disminución de la presión arterial, que se atribuyó a un efecto vasodilatador. Sin embargo, no fue posible demostrar cuál era la causa subyacente. Nuevos estudios demostraron la existencia de una dependencia entre la concentración de cinamaldehído y su efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata (sin presencia de endotelio) precontraídos mediante KCl o prostaglandina, y se planteó que su acción se debía al bloqueo de los canales de Ca^{2+} , lo que inducía

una inhibición directa de la contracción muscular. Además, se demostró que el cinamaldehído protegía contra la hipertensión asociada a la diabetes, argumentándose que la posible causa era el bloqueo de la elevada entrada de Ca^{2+} en células vasculares que se da en dicha patología, lo cual apoyaba la información anterior. Posteriormente se volvió a demostrar que la disminución de la presión sanguínea provocada por el cinamaldehído era independiente del endotelio, y se propuso que se debía a la inhibición de la afluencia de calcio y/o su liberación intracelular.

Por otra parte también se estudió cómo la inhibición de los canales de calcio de tipo L por parte del cinamaldehído es, en parte, responsable del efecto vasorrelajante del mismo, como puede observarse en la siguiente gráfica (Fig. 1), en la que se muestra la relación entre la concentración de cinamaldehído frente a su efecto vasorrelajante.^[9]

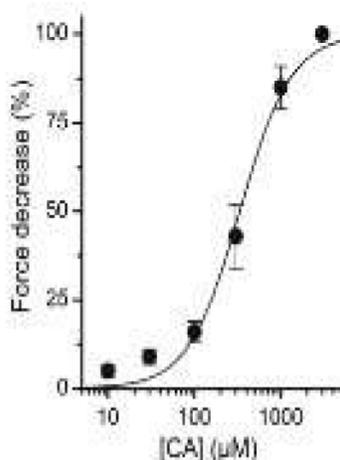


Fig. 1. Efecto vasorrelajante del cinamaldehído.^[9]

4. CINAMALDEHÍDO Y ALZHEIMER

La forma más común de demencia es el Alzheimer, una enfermedad neurodegenerativa debida al depósito de agregados proteicos, denominados amiloides y ovillos neurofibrilares formados como consecuencia de modificaciones anormales como hiperfosforilación u oxidación, en la proteína tau, la cual es de vital importancia para el ensamblaje, función y estabilidad de los microtúbulos^[10].

En un estudio se demostró que dos componentes de la canela reducen la agregación *in vivo* de proteínas tau, al ser menor la absorbancia a 305 nm de las muestras incubadas con cinamaldehído (ya que el agregado de tau aporta turbidez). En síntesis, los compuestos empleados fueron el cinamaldehído y la epicatequina en su forma oxidada, los cuales interaccionan con los dos residuos cisteinil de tau, reduciendo significativamente su agregación. Además, dichos componentes son capaces de proteger a la proteína tau de los daños oxidativos provocados por radicales libres y otros productos tóxicos. ^[10]

5. CINAMALDEHÍDO Y CÁNCER

En 2004 se realizó una evaluación de los efectos citotóxicos e inhibitorios del cinamaldehído sobre líneas celulares cancerosas humanas y otras no cancerosas. Los resultados (Fig. 2) fueron que el cinamaldehído presentaba un potente efecto inhibitor de la viabilidad celular en los cultivos tumorales a concentraciones de solamente 1 μ M; mientras que las líneas celulares normales no se veían afectadas, lo cual demuestra que la administración de dosis elevadas de cinamaldehído no debería presentar efectos secundarios aparentes.

Se planteó que la acción antitumoral del cinamaldehído se debía a sus efectos en la inhibición del desarrollo de células cancerosas, unido a la inducción de apoptosis en dichas células. Podría constituir un excelente tratamiento contra el cáncer, siendo capaz de actuar sobre el crecimiento y supervivencia de células tumorales de forma diferente a los actuales tratamientos hormonales y la quimioterapia, que presentan el inconveniente de la resistencia e hipersensibilidad a fármacos.^[11]

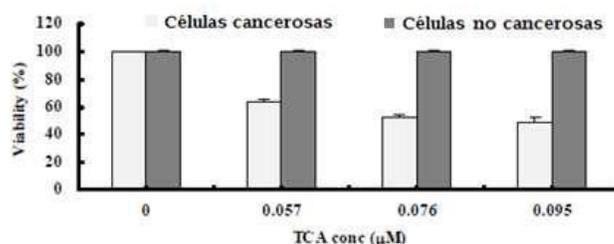


Fig. 2. Efecto del cinamaldehído en la viabilidad celular.^[11]

6. CINAMALDEHÍDO Y DIABETES

La obesidad y la diabetes son enfermedades crónicas en las que se manifiesta un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria, infartos, hipertensión, dislipidemia y fallo renal, entre otras. Los afectados por la diabetes se caracterizan por presentar elevados niveles de glucosa en sangre, junto a una moderada hiperlipemia. Esto se debe a una insensibilidad a la insulina, lo cual provoca una disminución del transportador GLUT4, proteína encargada de la entrada de glucosa desde el torrente sanguíneo a la célula, y cuya presencia/ausencia en la membrana plasmática es regulada por la insulina. Así, los compuestos que faciliten la translocación de GLUT4, o que incrementen la sensibilidad a insulina, pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la diabetes.^[12] Se comprobó en un estudio que si se trataban ratas diabéticas (previamente alimentadas con una dieta rica en grasas)

con extracto de canela, ésta producía efectos similares a la insulina, e incrementaba la sensibilidad hacia dicha hormona; además, la secreción de haptoglobina, proteína que aparece elevada en los casos de obesidad, experimentaba una reducción, mientras que la expresión de leptina, proteína lipolítica, se incrementaba. Las conclusiones fueron que el efecto anti-diabético del extracto de canela se debía al incremento de sensibilidad a insulina, la disminución de los niveles de glucosa en sangre y el aumento de la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos.^[12]

7. ACCIÓN ANTIMICROBIANA

Desde hace mucho tiempo la canela ha sido utilizada para preservar los alimentos debido a su acción antibacteriana. Se calcularon distintos parámetros del aceite esencial de canela relacionados con su actividad bactericida, su concentración mínima inhibitoria (CMI), es de unos 50 mg/L, y su concentración mínima bactericida (CMB), se sitúa alrededor de unos 150 mg/L.^[13]

EUGENOL

El eugenol es un miembro de los compuestos de la clase alilbencenos. Es un líquido oleoso de color amarillo pálido extraído de ciertos aceites esenciales, especialmente del clavo de olor, la nuez moscada y la canela. Es difícilmente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos. Tiene un agradable olor a clavo. ^[15]

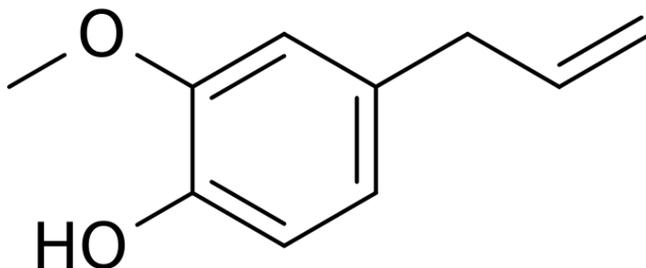


Figura. 3. Molécula de eugenol

Existen una gran cantidad de usos del eugenol, entre los principales están los siguientes: se emplea en perfumes, saborizantes, aceites esenciales y como antiséptico y anestésico local. Se utilizaba en la producción de isoeugenol para la fabricación de vainillina, pero actualmente es desplazado por el uso de petroquímicos. En odontología se utiliza como eugenato de zinc, obtenido al mezclarlo con óxido de zinc. Se usa como cemento dental para obturaciones temporales o provisionales (popularmente, por su olor característico es el clásico "olor a dentista"). Los derivados del eugenol o del metoxifenol se usan ampliamente en perfumería y como saborizantes, para formular atrayentes de insectos y absorbentes de radiación UV, analgésicos, biocidas y antisépticos. También se emplean para la fabricación de estabilizantes y antioxidantes para plásticos y hules.^[14]

Además, se utilizan como insecticidas. Se mencionan como componentes principales de los cigarrillos de clavo al eugenol y a la nicotina. Se usan como fuente de carbono para *Pseudomonas* y *Bacillus* (isoeugenol en el caso de *Bacillus*) para la obtención de vanilina (vainilla artificial).

Como se mencionó anteriormente, el eugenol tiene numerosas propiedades. Es ampliamente utilizado por los odontólogos para sus tratamientos, las propiedades atribuidas al eugenol es el alivio del dolor al aplicarlo en los dientes y encías. El eugenol es un bloqueador irreversible de la conducción nerviosa y en concentraciones bajas, es capaz de reducir la transmisión sináptica de la zona neuromuscular. Varios estudios han concluido que el eugenol inhibe a la ciclooxigenasa, favoreciendo el efecto analgésico y anestésico al lograr la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas. A bajas concentraciones, el eugenol inhibe la actividad nerviosa de forma reversible, como un anestésico local. Después de la exposición a altas concentraciones de eugenol, la conducción nerviosa es bloqueada irreversiblemente, indicando un efecto neurotóxico. El eugenol igualmente reduce la transmisión sináptica en la unión neuromuscular. Las fibras nerviosas sensoriales y sus funciones desempeñan un papel importante en la generación de la respuesta inflamatoria, ya que los nervios sensoriales en la pulpa dental contienen péptidos vasoactivos, como la sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, y otros. El hecho de que el eugenol inhiba la actividad nerviosa y los componentes vasculares de la respuesta inflamatoria, así como la relación entre estos elementos, puede estar vinculado con sus posibles efectos antiinflamatorios.^[14]

Los efectos provocados por especies reactivas de oxígeno son eventos moleculares relacionados con el daño tisular. Múltiples estudios han demostrado la capacidad antioxidante del eugenol y compuestos relacionados (como el isoeugenol), de inhibir la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas de oxígeno. Igualmente, inhibe la formación del radical superóxido en el sistema xantina-xantina oxidasa, así como la generación del radical hidroxilo, previniendo la oxidación de Fe^{2+} en la reacción de Fenton, la cual genera este radical que es uno de los más agresivos para los tejidos por todas las reacciones que desencadena^[15].

En altas concentraciones tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de las proteínas, lo que resulta en daño a la membrana celular, mientras que a bajas concentraciones tiende a estabilizar a las membranas celulares, lo cual previene la penetración de las bacterias a los conductos dentinarios. Los resultados sugieren que el eugenol inhibe el crecimiento de varios organismos fúngicos patógenos, ya sea solo o combinado (Eugenol - Timol, Eugenol - Carvacrol), que pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas orales. Igualmente se han estudiado los efectos antibacterianos del óxido de zinc-Eugenol y otros materiales contra bacterias aeróbicas y anaeróbicas.^[15]

Capítulo II

Antibióticos

En los primeros años del siglo XX, cuando Paul Ehrlich anunció la eficacia del *salvarsán* para el tratamiento de la sífilis, su “bala mágica”, se pensó que la lucha contra las enfermedades infecciosas había sido ganada. Lo adelantado de este descubrimiento no sirvió como inspiración al desarrollo de la investigación, porque en el año 1914 estalla la Primera Guerra Mundial y durante seis largos años las urgencias impiden que se piense en desarrollos futuros.

En esa época eran comunes las infecciones y también las muertes por estas; un ejemplo celebre de la época es Calvin Coolidge, hijo del trigésimo presidente de los Estados Unidos quién murió el 7 de julio de 1924 siendo la causa de su muerte una septicemia. Una semana antes el joven se había hecho una herida en el dedo de un pie que parecía poco importante; sin embargo, fue la puerta de entrada a su muerte. Los hechos se iniciaron un martes, el miércoles en la noche se quejó de fuertes dolores en la ingle, se pensó que era apendicitis, por lo que llamaron a los especialistas, quienes llegaron rápidamente al correcto diagnóstico el día jueves: septicemia. El día sábado ingresó al hospital y fue operado de urgencia debido a que la situación era crítica; el domingo empeoró la infección y para el lunes murió. La muerte había triunfado, no había herramientas para la lucha.^[16]

Doce años después (1936) se presenta una noticia casi idéntica: Franklin Delano Roosevelt Jr, hijo de otro presidente, estaba muy enfermo debido a una infección. Pero había más esperanzas, pues ya se contaba con un medicamento capaz de

matar microorganismos dentro de la corriente sanguínea y el joven se salvó. De esta manera se dió a conocer al público el *Prontosyl*, la primera sulfamida. ^[16]

En 1935 Domagk había presentado su primera monografía sobre eficacia del *Prontosyl*.^[16] Aunque el mayor descubrimiento en ese rubro y que trajo un cambio enorme a la historia de la humanidad fue el descubierto por Sir Alexander Fleming en 1928. Mientras trabajaba en con el virus de la influenza, observó que el moho que se había desarrollado accidentalmente en una placa de cultivo de estafilococos había creado un círculo libre de bacterias alrededor de sí mismo. Decidido a experimentar más, se encontró con que un cultivo de moho impedía el crecimiento de los estafilococos, incluso cuando se diluye 800 veces, llamando a la sustancia activa *penicilina*. Por sus esfuerzos en el descubrimiento y desarrollo de la penicilina, Fleming, Florey y Chain recibieron el Premio Nobel en 1945.^[17]

En los años siguientes, comenzaron a descubrirse nuevas drogas. En los años 1940 se desarrollaron la estreptomicina, el cloranfenicol y la clortetraciclina; para 1950 la eritromicina y vancomicina; en 1960, gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina; en 1970, cefalexina, carbenicilina, cefoxitina y cefaclor; 1980 cefotaxima, moxalactam, combinación ácido clavulánico-amoxicilina, combinación imipenem-cilastatina, aztreonam. En 1990 aparecen las fluoroquinolonas, nuevos macrólidos, nuevas cefalosporinas y agentes antivirales más efectivos. Luego del 2000 se registró la aparición de quinolonas de espectro ampliado.^[16]

Mecanismo de acción de los antibióticos.

Las enormes diferencias que existen entre las células bacterianas y las células de los mamíferos facilitan que los blancos de los antimicrobianos en una bacteria no existan en las células del hospedador, o en todo caso, que esos blancos sean suficientemente distintos como para que las diferencias en afinidad sean tan marcadas que expliquen la acción selectiva sobre la bacteria. Los mecanismos de acción de los antibióticos son demasiado complejos y en la actualidad no han sido dilucidados por completo.

Se tienen hasta el momento 4 mecanismos generales: los 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 y la inhibición de la membrana bacteriana (figura 4).

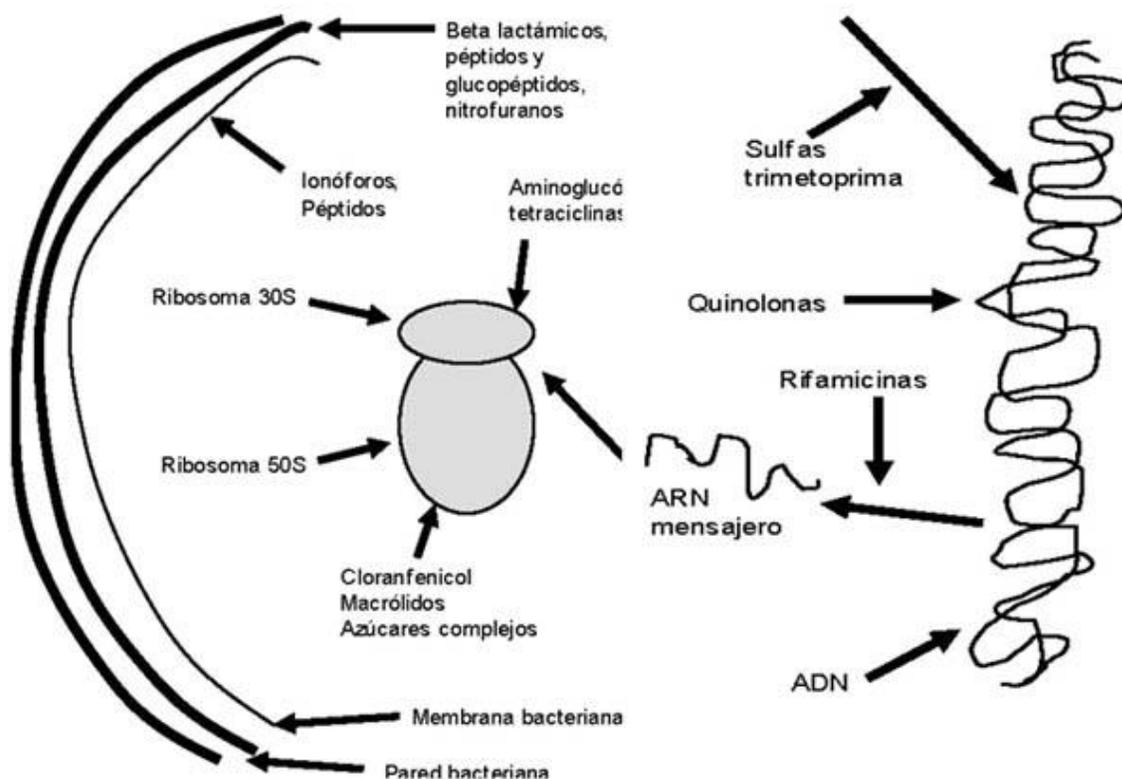


Figura 4: Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con algunos ejemplos de antimicrobianos que actúan a esos niveles. [16]

Entre los mecanismos de los antibióticos, las drogas que atacan la pared bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis. Interfieren con la síntesis de peptidoglicanos, elementos esenciales de la constitución de la pared, como por ejemplo: los beta lactámicos, glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina), bacitracina y estreptograminas (virginiamicina, quinupristina-dalfopristina). Los fosfolípidos en la membrana celular bacteriana son el sitio de acción de las polimixinas (polimixina B y colistín). Son detergentes catiónicos y su mecanismo de acción supone la interacción con los fosfolípidos de la membrana celular y la alteración de su estructura. Los antibióticos que interfirieren con la

síntesis de proteínas a diversos niveles del orgánulo encargado de su elaboración, el ribosoma, constituyen un cúmulo de agentes, a saber: aminoglucósidos y aminociclitolos, tetraciclinas, cloranfenicol y sucedáneos, lincosamidas y macrólidos. Los agentes que actúan a nivel de los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción diversos. Entre ellos tenemos a las sulfamidas y trimetoprima cuya acción como antimetabolitos impidiendo la síntesis de purinas los distingue del resto. Las fluoroquinolonas y la novobiocina actúan a nivel de las cadenas de ADN, impidiendo el superenrollamiento por inhibición de una topoisomerasa, la girasa de ADN. Los nitroimidazoles, como el dimetridazol, metronidazol y tinidazol dan lugar a la disrupción de las cadenas de ADN, impidiendo su reparación. Los nitrofuranos tienen participación de sus metabolitos intermedios originando la rotura de la cadena del DNA bacteriano. Adicionalmente, se menciona que alteran tanto la respiración bacteriana como la función ribosomal.^{[16][18]}. En la tabla 1 podemos ver algunos ejemplos de la clasificación química de los antimicrobianos.

Grupo	Miembros	Modo de acción	Espectro
Beta lactámicos: Penicilinas	Penicilina G	inhiben síntesis de pared	Bacterias G+
	Penicilina V	Ídem	Ídem
	Cloxacilina	Ídem	Estafilococos productores de penicilinasa
	Ampicilina	Ídem	Bacterias G+ y G-
	Carbenicilina	Ídem	P. aeruginosa
Beta lactámicos: Cefalosporinas	Cefaloridina	Inhiben síntesis de pared	Bacterias G+ y G-

	Cefalexina	Idem	Idem agregando actividad frente a Estafilococos productores de penicilinas
	Cefuroxima	Ídem	Ídem con menos actividad frente a G+ y más frente a G-
	Moxalactam	Ídem	Bacterias G+ Enterobacterias
	Ceftiofur	Ídem	Ídem
	Cefoperazona	Ídem	Pseudomonas aeruginosa
	Cefepima	Ídem	Estafilococos y enterobacterias
Beta lactámicos: Inhibidores de la Beta lactamasa	Ácido clavulánico	Se une a la beta lactamasa inactivándola	Gérmenes productores de beta lactamasa
	Sulbactam	Ídem	Ídem
	Tazobactam	Ídem	Ídem
Beta lactámicos: Carbapenems	Imipenem-cilastatina	Inhiben síntesis de pared	G+ y G- aerobios y anaerobios
Beta lactámicos:	Aztreonam	Ídem	Gram negativos aerobios
Monobactams Aminoglucósidos	Estreptomina	Inhiben síntesis proteica porción 30 S ribosomal	Bacterias G-
	Kanamicina	Idem	Idem
	Neomicina	Idem	Idem
	Gentamicina	Idem	Idem
Aminociclitolos	Espectinomicina	Idem	Bacterias G- y micoplasmas
Azúcares complejos o Lincosamidas	Lincomicina	Inhiben síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+, anaerobios y micoplasmas
	Clindamicina	Ídem	Ídem
	Pirlimicina	Ídem	Ídem
Rifamicinas	Rifampicina	Inhib e ARN polimerasa	Bacterias Gram positivas micobacterias
Péptidos	Polimixina B	Desorganizan membrana	Pseudomonas aeruginosa
	Colistín	Idem	Idem
Glucopéptidos	Vancomicina	Inhibe síntesis de pared	Bacterias G+ y G-

	Teicoplanina	Idem	Idem
	Avoparcina	Idem	Idem
Estreptograminas	Virginamicina	Inhibe peptidil transferasa	Bacterias G+ aerobias y anaerobias
Macrólidos	Eritromicina	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G-
	Oleandomicina	Idem	Idem
	Tilosina	Idem	Idem
	Espiramicina	Idem	Idem
	Tilmicosina	Idem	Idem
Fenicoles	Cloranfenicol	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G- rickettsias y chlamydias
	Tianfenicol	Idem	Idem
	Florfenicol	Idem	Idem
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Inhibe síntesis proteica porción 30S ribosomal	Bacterias G+ y G-, Rickettsias, chlamydias y algunos protozoos
	Doxiciclina	Idem	Idem
	Minociclina	Idem	Idem
Sulfonamidas	Sulfanilamida	Interfieren síntesis de ácido fólico	Bacterias G+, G- y coccidios
	Sulfadiazina	Idem	Idem
	Sulfatiazol	Idem	Idem
	Ftalilsulfatiazol	Idem	Idem
Diaminopirimidinas	Trimetoprima	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Bacterias G+, G- aerobias
	Baquiloprima	Idem	Idem
Fluoroquinolonas	Enrofloxacina	Inhiben ADN girasa	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
	Danofloxacina	Idem	Idem
	Marbofloxacina	Idem	Idem
	Sarafloxacina	Idem	Idem
Ionóforos	Monensina	Alteran flujo de membrana	Coccidiosis, promoción del crecimiento
	Salinomicina	Idem	Idem
Nitrofuranos	Nitrofurazona	Previenen traducción ARN mensajero	Bacterias Gram positivas y Gram negativas

	Furazolidona	Idem	Idem
Nitroimidazoles	Metronidazol	Disrupción del ADN	Anaerobios
	Dimetridazol	Idem	Idem

TABLA 1. Clasificación química de los antimicrobianos, algunos ejemplos, modo de acción y espectro simplificados. ^[17]

Resistencia a antibióticos.

Desde los años cuarenta, el desarrollo de fármacos eficaces y seguros para tratar las infecciones bacterianas ha revolucionado el tratamiento médico y ha disminuido notablemente la morbilidad y mortalidad de las enfermedades microbianas. Lamentablemente, el desarrollo de antibacterianos eficaces se ha acompañado de la aparición de microorganismos resistentes a los mismos. Esto no es inesperado, ya que un principio evolutivo dice que gracias a su corto tiempo de duplicación, muchas especies bacterianas pueden presentar una rápida adaptación evolutiva. El fenómeno de resistencia impone graves restricciones a las opciones disponibles para el tratamiento médico de numerosas infecciones bacterianas. ^[17]

La resistencia es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas (tabla 2). Sin embargo, el proceso se ve acelerado por el mal uso y el abuso de los antimicrobianos. En muchos lugares hay un abuso y mal uso de los antibióticos tanto en las personas como en los animales, y es frecuente que se administren sin supervisión de un profesional. Como ejemplos de uso incorrecto se pueden citar su administración para tratar infecciones víricas, como los resfriados o la gripe, así como también como promotores del crecimiento del ganado y los peces.

Droga	Descubrimiento	Uso clínico	Resistencia clínica
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

TABLA 2. Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos.^[18]

Los microorganismos resistentes a los antimicrobianos están presentes en las personas, los animales y el medio ambiente (agua, suelo y aire), que pueden transmitirse de persona a persona o entre las personas y los animales. El mal control de las infecciones, las condiciones sanitarias deficientes y la manipulación inadecuada de los alimentos fomentan la propagación de la resistencia a los antibióticos.^[19]

Esto es aún más grave debido a que el problema de resistencia se vuelve más complejo al tener cepas multirresistentes, no solo a uno o dos, si no en casos extremos hasta más de 10 familias de antibióticos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) nos acercamos a una era post-antibióticos análoga a la era pre-antibiótica. El tema ha sido tratado reiteradamente por la OMS y por el British Medical Journal, emitiendo un llamado sobre esta amenaza desde mediados de 1990. La revista británica de medicina Lancet acaba de hacer un llamado a la acción. La red ReAct (Action on Antibiotic Resistance) la más insistente en este empeño, considera el acceso a la prevención y al tratamiento de las infecciones como parte del derecho a la salud hoy y para las generaciones venideras.^[20]

Mecanismo de resistencia.

La resistencia bacteriana se puede dividir en dos subtipos, aquella que se encuentra intrínsecamente en la célula, y la que es adquirida tomando elementos genéticos de otro tipo de bacterias, ya sea de su misma especie u otra.

Resistencia natural o intrínseca.

La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* pueden crear una biopelícula o biofilm, desarrollando una barrera que las hace menos susceptibles a los antibióticos, esto es un grave problema en personas con cateterismo o en las infecciones pulmonares y en personas con fibrosis quística. El mecanismo real detrás de esta resistencia natural está lejos de ser clara. Se ha argumentado que los antibióticos pueden tener dificultades para penetrar en la matriz organizada que rodea a las bacterias en las biopelículas.^[21]

Más ejemplos de resistencia intrínseca puede ser el tipo de los genes que codifican para β -lactamasas, los múltiples sistemas de expulsión de fármacos, las porinas en bacterias Gram negativas y la permeabilidad de las membranas celulares.^[21]

Resistencia Adquirida.

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética. Nuevos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o en elementos genéticos móviles

como plásmidos, transposones e integrones que pueden ser adquiridos mediante tres mecanismos que se explicarán más adelante.

La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en las siguientes categorías:

- **Inactivación enzimática:** El principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas y los betalactámicos, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos.
- **Modificaciones en el sitio blanco:** en algunos casos hay una reducción de la afinidad del receptor por la molécula de antimicrobiano. Una mutación de la girasa de ADN, por ejemplo, puede dar lugar a una menor afinidad de las quinolonas por la citada enzima. Otro ejemplo, es el cambio de las enzimas involucradas en la síntesis de ácido paraaminobenzoico, lo que da lugar a resistencias a sulfas y trimetoprima.
- **Alteraciones de la permeabilidad:** Las alteraciones de las membranas bacterianas se ve fundamentalmente en Gram negativos, donde la membrana externa de la envoltura celular es rica en lípidos e impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembrana con función de porinas. Existen algunas moléculas de antibiótico, como penicilina y vancomicina, que por su tamaño son incapaces de pasar a través de las porinas de bacilos Gram negativos. La disminución de la expresión de

dichas porinas puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico. Se considera que en este caso los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico

- Expulsión del antibiótico por mecanismos activos. Las resistencias a las tetraciclinas pueden ser debidas a este tipo de mecanismos.^[21]

Las células bacterianas pueden adquirir material genético de manera horizontal, estos mecanismos confieren resistencia a diversos tipos de antibióticos. Los tres mecanismos amplios que median el desplazamiento eficiente del DNA entre las células son: conjugación, transducción y transformación.

A. Transformación

La transformación consiste en la captación directa de DNA “desnudo” del donador por la célula receptora, lo cual puede ser natural o forzado (figura 5). La captación directa de DNA extrínseco por las bacterias receptoras depende de su competencia para la transformación. La competencia natural es poco común entre bacterias y algunas de estas cepas son transformables sólo en presencia de factores de competencia que se producen en un punto específico en el ciclo de crecimiento. Otras cepas sufren transformación natural con rapidez.^[22]

B. Transducción

En la transducción el DNA del donador se transporta en un fago cubierto y se transfiere al receptor por un mecanismo utilizado para la infección por bacteriófagos (figura 5). La transducción es una recombinación genética en las bacterias mediada por bacteriófagos. En términos simples, una partícula de transducción puede considerarse como el ácido nucleico bacteriano en un fago cubierto. Incluso una población de fagos líticos puede contener algunas partículas en las cuales la cubierta del fago está encapsulando al DNA derivado de la bacteria más que del propio fago. Tal población se ha utilizado para transferir genes de una bacteria a otra. [22] [23]

C. Conjugación

La conjugación requiere que la célula donadora y receptora se encuentre en contacto para la transferencia de una sola cadena de DNA (figura 5). El receptor completa la estructura del DNA bicatenario mediante la síntesis de la cadena que complementa a la cadena adquirida del donador. Los plásmidos son los elementos genéticos que más a menudo se transfieren por conjugación. Las funciones genéticas necesarias para la transferencia están codificadas por los genes *tra*, que son transportados por plásmidos autotransmisibles. Estos últimos pueden movilizar otros plásmidos o porciones del cromosoma para su transferencia. En algunos casos se logra la movilización porque los genes *tra* proporcionan las funciones necesarias para la transferencia de un plásmido por lo demás no susceptible de transmisión. [22]

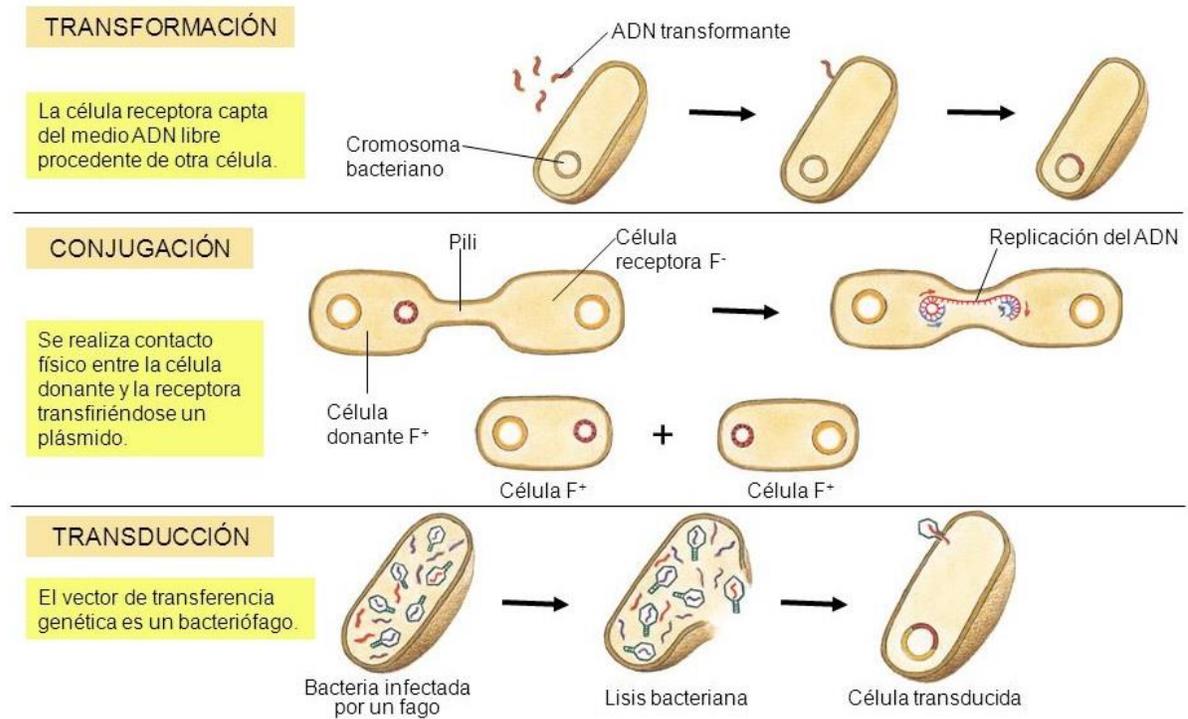


Figura 5. Procesos de adquisición de resistencia, un gen de resistencia puede pasar horizontalmente mediante los mecanismos de transformación, transducción y conjugación.^[26]

Este material genético intercambiado puede contener genes de resistencia, pero a su vez estos genes pueden ir codificados en los siguientes elementos: ^[24]

- A. Los plásmidos son porciones circulares de ADN extracromosómico que pueden codificar para resistencia a un determinado antibiótico. Cuando codifican para resistencias se les denomina plásmidos R. Los plásmidos son autorreplicantes, independientemente del ADN cromosómico. En general codifican características que mejoran los rasgos de supervivencia de las bacterias, sin ser imprescindibles para la misma.
- B. Transposones: Los ya clásicamente conocidos como genes saltarines. Son cadenas cortas de ADN que saltan de cromosoma a plásmido, en uno u otro sentido, entre plásmidos o entre plásmidos y bacteriófagos. La característica

más saliente de este tipo de material es la de integrarse con facilidad a cadenas de ADN diferente del original. A diferencia de los plásmidos, los genes saltarines no son autorreplicantes, deben mantenerse dentro de una estructura autorreplicante para replicarse. Un rasgo central y peligroso de los transposones es la posibilidad de que varios de ellos, codificando resistencias a múltiples drogas, estén incluidos dentro de un mismo plásmido, lo que permite por transferencia de este último, la adquisición de multiresistencia por parte de la bacteria receptora.

C. Integrones y casetes genéticos: Diferentes de los transposones pero con mecanismos de propagación parecidos. Se recombinan en un sitio específico y cada casete codifica resistencia a un solo antibiótico. Junto con los transposones, son los sistemas que más actúan en la adquisición de resistencias por parte de los plásmidos. Constan de tres regiones, dos invariables y una central variable, que es la que porta el casete de resistencia. El denominado casete es un elemento que incluye un gene y un sitio recombinante.

Se han identificado más de cuarenta casetes y la mayoría porta genes de resistencia. Figura 6. [24]

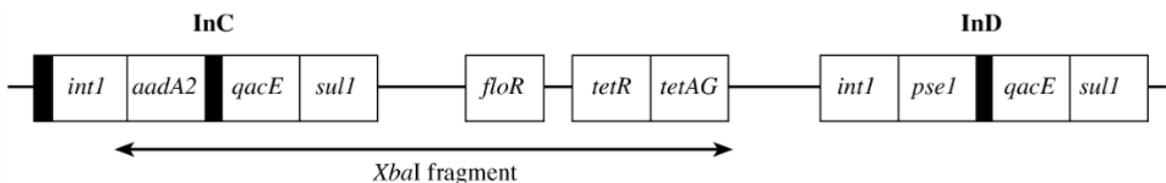


Figura 6. Ejemplo de integron de *Salmonella Typhimurium DT104*. Representación esquemática de genes de resistencia entre InC e InD. *int1* especifica la integrasa. [25]

Multirresistencia a antibióticos.

El problema de la resistencia se incrementa al tener cepas no solo resistentes a un antibiótico, si no, en casos verdaderamente preocupante, hasta grupos de 10 familias de antibióticos. Otro factor a considerar es que no solo las bacterias patógenas presentan el fenómeno de la multirresistencia. Se ha encontrado multiresistencia a antibióticos en bacterias no patógenas lo que cobra importancia porque ello puede ser una fuente de genes de resistencia a partir de la cual podría haber dispersión constante hacia bacterias patógenas.^[27]

Capítulo III

PIE DIABETICO

Diabetes

La *diabetes mellitus*, o como usualmente se le conoce, diabetes, es un trastorno metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas que resultan de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambos.^[25] En 2010 había un total estimado de 285 millones de personas alrededor de mundo con *diabetes mellitus* y de estas el 90% con el tipo 2. El número de personas con *diabetes mellitus* proyectado para 2030 es de cerca de 439 millones.^[29] Este desorden metabólico se caracteriza por hiperglicemia y metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas alterado, entre otros. En México, desde el año 2000 es la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres. Para el año 2025, se espera que cerca de 11,7 millones de mexicanos tengan diabetes.^[30] Esto se convierte en un problema de salud pública que requiere ser abordado multidisciplinariamente por los profesionales de la salud. Además, la diabetes desencadena un sin número de complicaciones en los pacientes tales como amputaciones, disfunción renal, enfermedades cardiovasculares, retinopatía y neuropatía, entre otras, que pueden perjudicar gravemente la salud y calidad de vida de los pacientes diabéticos.

Complicaciones de la diabetes, el pie diabético

La diabetes presentan un sin número de complicaciones ya sean agudas o crónicas. Se da especialmente la propensión a infecciones, ulceraciones y necrosis de los pies que integran el “pie diabético”. Este se define como cualquier lesión isquémica o infecciosa por debajo de la rodilla, que afecta a una persona con diabetes. [29] El riesgo de que una persona con diabetes desarrolle una ulcera en algún pie podría ser tan alta como 25%, (Tabla 3) y se cree que cada 30 segundos una extremidad inferior se pierde en algún lugar del mundo como una consecuencia de la diabetes.[32]

	Year	n	Prevalence		Incidence	
			Ulcers	Amputations	Ulcers	Amputations
Population (community) based studies						
UK	2002	9710	1.7	1.3	2.2	..
Greece	2002	821	4.8
Netherlands	2002	665	2.1	0.6
Slovakia	1997	1205	2.5	..	0.6	0.6
USA	1999	8965	1.9	0.3
Clinic-based studies						
Algeria	1998	865	11.9	6.7
India	1998	11300	3.6

Tabla 3. Epidemiología de la ulceración del pie y amputaciones por país. [30]

Las infecciones de pie diabético se caracterizan por ser una complicación muy costosa por las ulceraciones. Estas se presentan tanto en piel, tejido suave y/o estructuras óseas y representa una causa importante de morbilidad y mortalidad.[32] Las infecciones del pie diabético son la principal causa de hospitalización relacionada con diabetes y una de las principales para la amputación de miembros inferiores.[34]

Los factores que contribuyen a la enfermedad del pie son la neuropatía periférica y la enfermedad vascular. Estas se encuentran presentes en más del 10% de las personas en el momento de que son diagnosticadas con diabetes tipo 2. ^[31]

La neuropatía diabética es la más común de las complicaciones microvasculares de la *diabetes mellitus*, siendo causa importante de morbilidad y mortalidad asociada a la enfermedad^[35]. La prevalencia del desorden aumenta notablemente conforme pasan los años del diagnóstico de diabetes: según Sima y Sugigoto la prevalencia es cercana a 100% si se considera la neuropatía subclínica no sintomática^[36]. A pesar de tratarse de un complejo heterogéneo de padecimientos, las causas son multifactoriales y están relacionados con la hiperglucemia y la deficiencia de insulina.^[37] Su génesis se relaciona con complejas interacciones metabólicas, vasculares, neurotróficas y autoinmunitarias que generan inflamación, mal funcionamiento y finalmente daño permanente de las fibras nerviosas periféricas, lo que produce una baja sensibilidad en las extremidades del paciente. 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,^[37] lo cual incrementa el riesgo de ulceración que posteriormente puede llegar a infectarse y, aunado a que el sistema inmune del paciente diabético está comprometido, es propenso a sufrir infecciones que son difíciles de combatir.

Debido a la patología del paciente, las infecciones de pie diabético son difíciles de tratar debido al desorden metabólico en su cuerpo, como la hiperglicemia, su estado

inmunocomprometido, la circulación microvascular afectada y la neuropatía, entre otros. El mal progreso de la infección puede llevar a no responder a la antibioticoterapia y esto a su vez llevar a la amputación de alguna extremidad inferior.

Microbiología de la infección.

Se han elaborado múltiples estudios para aislar y tipificar a los microorganismos presentes en el pie diabético y se han utilizado diferentes métodos para toma de muestras: hisopados de exudado, aspiración de material purulento o biopsias tisulares.

La gran mayoría de infecciones de pie diabético se caracterizan por ser multibacterianas, es decir, presentan más de un tipo de bacteria aislada, con una media de 3 especies bacterianas. En las infecciones moderadas o graves del pie diabético son predominantes los cocos aerobios Gram positivos, con frecuencia asociados a bacilos gramnegativos y a veces a anaerobios.

Los estudios reportados concuerdan en los microorganismos aislados, donde se encuentra con mayor frecuencia, del grupo Gram positivo, al *Staphylococcus aureus*, seguido en frecuencia por *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp.* (9%) y *Entamoeba coli* (8%). Para microorganismos anaerobios los peptoestreptococos fueron los microorganismos predominantes. Por otra parte, los bacilos Gram negativos más comunes son *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.* y *Morganella morganii*.^[37]

Tratamiento de las infecciones.

La resolución de las úlceras infectadas del pie diabético requiere la consideración de distintos aspectos clínicos, como optimización del control glucémico, cirugía (desbridamiento, drenaje o revascularización) y el tratamiento de infecciones asociadas de tejidos blandos o de osteomielitis.^[39]

La terapia antibiótica en un principio tiene que llevarse a cabo de manera empírica; el tratamiento tiene que utilizar antibióticos de amplio espectro y también estar enfocado en cocos gram positivos, que son los que más comúnmente se encuentran. Los antibióticos a elegir pueden ser algunos de estos: amoxicilina/ácido clavulánico y cefalosporinas de primera generación por vía oral. Para pacientes alérgicos a penicilinas, la clindamicina puede ser un agente efectivo. La terapia definitiva depende de los resultados del antibiograma y de la respuesta clínica.^[38]

Además del tratamiento de infecciones severas con la administración de antibióticos, es de vital importancia realizar desbridamientos quirúrgicos del tejido necrosado teniendo así un mejor manejo de la infección.

Hipótesis

El cinamaldehído y el eugenol puros, principales componentes presentes en los extractos de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), mostrarán un efecto inhibitorio sobre bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de lesiones infectadas de pié diabético y recalcitrantes a la antibiótico-terapia habitual.

OBJETIVOS

Objetivo General

Observar el efecto del cinamaldehído y del eugenol puros sobre bacterias aisladas de úlceras infectadas de pié diabético y resistentes a diferentes antibióticos.

Objetivos Particulares

- ❖ Aislar, tipificar y evaluar la multirresistencia a antibióticos en las células bacterianas presentes en las muestras de pie diabético.
- ❖ Encontrar un adyuvante en la terapia de pacientes con pie diabético.

Material y Métodos

Obtención de muestras:

Las muestras fueron tomadas de 3 pacientes con infección de pie diabético. Estas se recolectaron a través de tomas con hisopo estéril, para posteriormente transportarlas al laboratorio y ahí rehabilitar las cepas en caldo BHI. La edad de los pacientes osciló entre los 40 a 45 años. Cabe resaltar que las muestras fueron tomadas siguiendo los protocolos del tratado de Helsinki.^[41]

El aislamiento de las cepas se realizó de la siguiente manera:

1. Se transfirieron las cepas a caldo luria y se les nombro de acuerdo al paciente aislado como PD1, PD2 y PD3.
2. Se procedió a sembrar en medios selectivos para Gram negativos (Agar Mac Conkey), así como para Gram positivos (agar MSA).
3. Las cepas aisladas de cada una de las muestras fueron tipificadas mediante tres técnicas: 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.

Una vez aisladas y tipificadas las cepas, se realizaron pruebas de sensibilidad siguiendo el método Kirby-Bauer^{[42][43]}, utilizando multidiscos con 12 antibióticos para bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.

Para probar el posible efecto antimicrobiano del eugenol y del cinamaldehído sobre las bacterias aisladas de cada una de las muestras de pie diabético se siguió

el método de difusión en agar en pozos ^[43]. Se inocularon alícuotas de las muestras equivalentes a 0.5 de la escala McFarland con bacterias con 24 horas de crecimiento en una caja de agar Mueller-Hinton y después de realizar pozos sobre la superficie del agar se colocaron diferentes cantidades de eugenol y/o cinamaldehído 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 de eugenol y cinamaldehído fueron 2, 5, 10 y 15 μL y 20, 30 y 45 μL respectivamente, y las cantidades de aceite esencial de canela utilizadas fueron 30 μL .

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. En todos los casos se utilizó un control negativo de aceite mineral estéril para los experimentos.



Imagen 1. Metodología de la toma de muestra, aislamiento y tipificación de las células bacterianas.

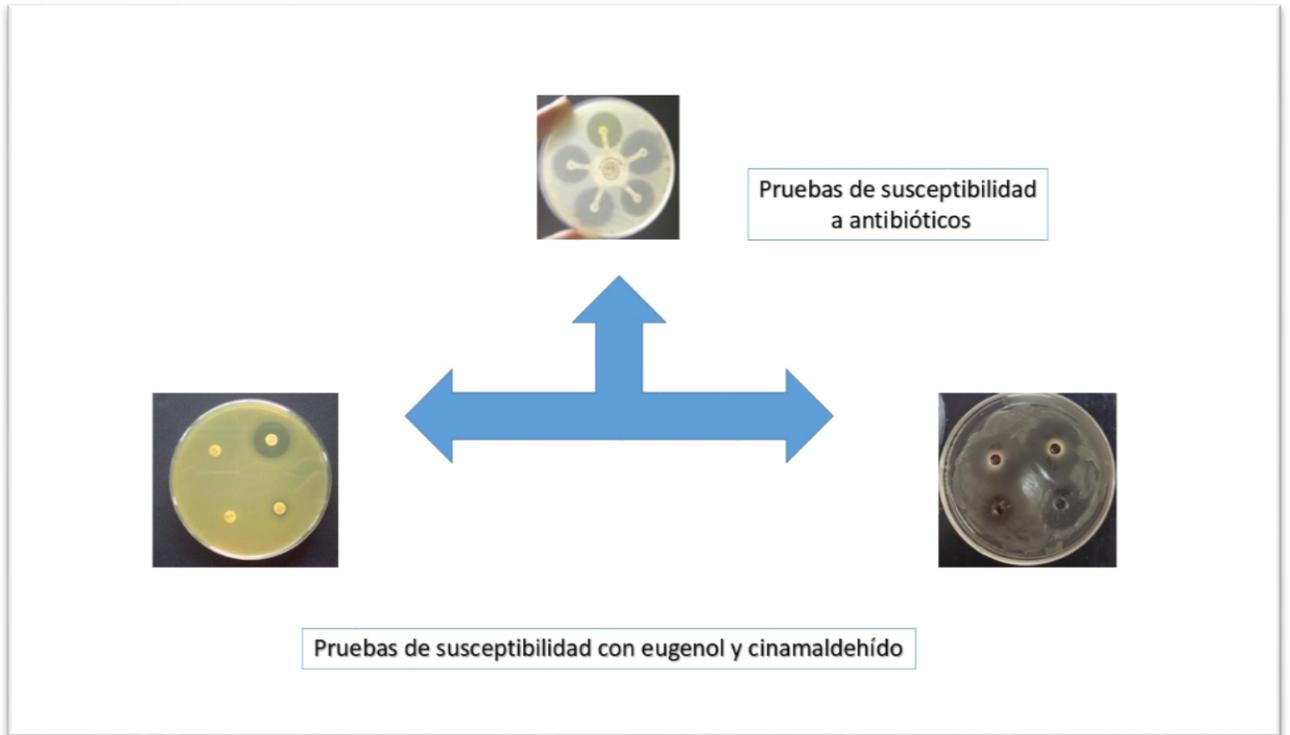


Imagen 2. Metodología, una vez tipificadas y aisladas la cepas puras se procedió a realizar las pruebas de susceptibilidad a antibióticos, una vez comprobada su multirresistencia se evaluó el efecto inhibitorio de eugenol y cinamaldehído.

Materiales

El material utilizado fue en su mayoría el manejado en el laboratorio microbiológico, así como los insumos. Entre ellos cajas Petri, asas bacteriológicas, autoclave, parrilla eléctrica, micropipetas de varias medidas, material de vidrio como matraces y vasos de precipitado, tubos de ensayo de diferentes tamaños, etc. El eugenol y trans-cinamaldehído son de la marca Sigma-Aldrich con número de catálogo E51791 y C80687 respectivamente.

Resultados

Identificación de la población bacteriana.

Se aislaron las cepas procedentes de las muestras tomadas de pacientes con pie diabético. En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas convencionales realizadas a las tres cepas Gram positivas aisladas de las infecciones de pie diabético.

Cepa aislada	Crecimiento en MSA	Catalasa	Oxidasa	Bilis-Esculina	Citrato	Urea	Hemólisis
MSA1	+	-	-	+	-	-	-
MSA2	+	-	-	+	-	-	-
MSA3	+	-	-	+	-	-	-

Tabla 4. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas. Estas son las pruebas bioquímicas convencionales usadas en el Manual de Microbiología de la Facultad de Química.

Posteriormente, se realizaron las pruebas bioquímicas con el sistema api® 20E. En la siguiente tabla se tienen los resultados de las pruebas realizadas con el sistema api® 20E, para poder tipificar a las cepas aisladas.

Sistema api® 20E			Cepas Gram negativas			
Prueba	Sustrato	Reacciones	MC+1	MC-1	MC-2	MC-3
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	-	+	+	+
H₂S	Tiosulfato de sodio	Producción de H ₂ S	-	-	-	-
ARE	Urea	Ureasa	-	+	-	+
TDA	L-triptófano	Triptófano 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	-	-	+	+
MC+1: Escherichia coli MC-1: Morganella morganii MC-2: Pseudomonas aeruginosa MC-3: Pseudomonas aeruginosa						

Tabla 5. Resultados de tira api® 20E. Es un sistema de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos, mediante 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas.

Con base a los resultados de las tablas 4 y 5, se tipificaron las muestras en las siguientes cepas que se muestran en la tabla 6.

Muestra	cepa	Microorganismo
PD1	MSA1	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MC+1	<i>Escherichia coli</i>
	MC-1	<i>Morganella morganii</i>
PD2	MSA2	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MC-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PD3	MSA3	<i>Enterococcus faecalis</i>
	MC-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabla 6. Microorganismos aislados en las muestras. Estos se obtuvieron de las 3 muestras tomadas (PD1, PD2 y PD3)

PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

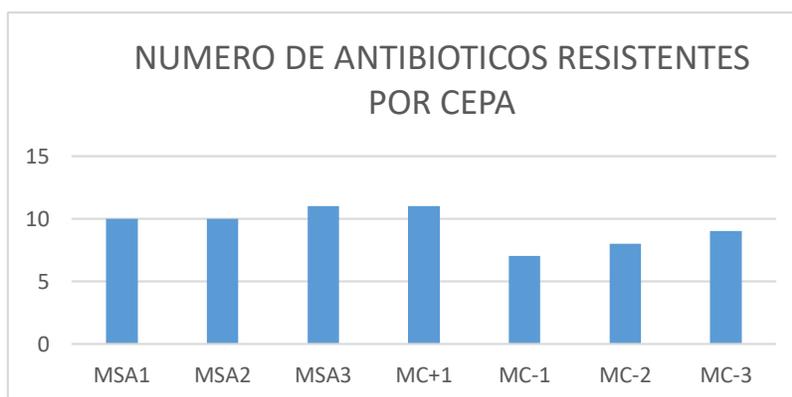
Una vez tipificadas y aisladas las cepas, se realizaron las pruebas de susceptibilidad, para evaluar el fenotipo de multirresistencia.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los antibiogramas realizados con los multidiscos MULTIBAC-ID sobre las muestras de pie diabético.

MUESTRA	NUMERO DE ANTIBIOTICOS NO EFECTIVOS	NUMERO DE ANTIBIOTICOS EFECTIVOS
PD1	11	1
PD2	11	1
PD3	10	2

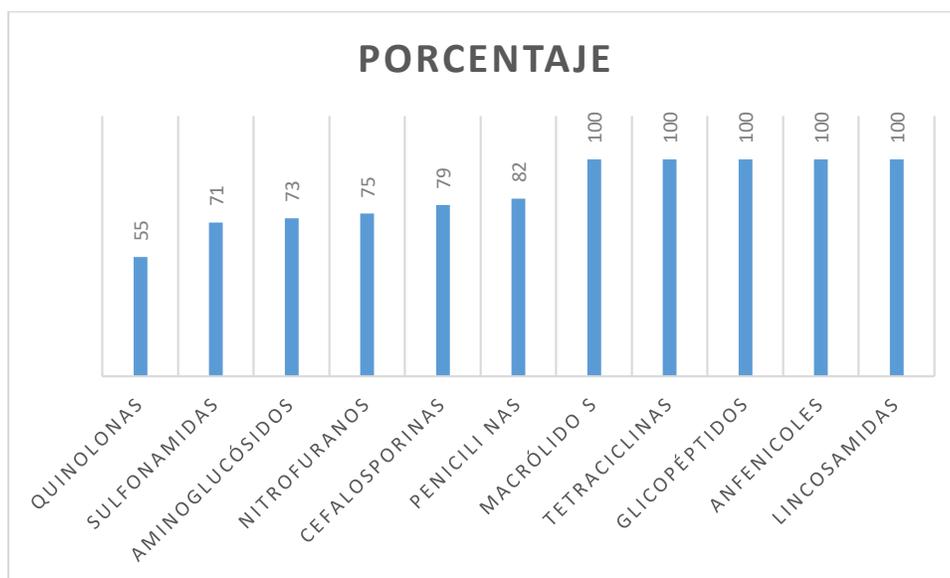
Tabla 7. Resultados de los antibiogramas de las muestras de pie diabético. Se considera antibiótico efectivo al que presenta un halo de inhibición mayor a 15 mm de diámetro

En la siguiente gráfica se muestran el número de antibióticos a los que las cepas aisladas fueron resistentes.



Gráfica 1. Resistencia de las cepas aisladas. Se considera antibiótico efectivo al que presenta un halo de inhibición mayor a 15 mm de diámetro.

Se realizó el análisis de las cepas de acuerdo a su resistencia a los grupos de antibióticos utilizados y se obtuvieron los siguientes porcentajes de resistencia por clase de antibióticos utilizados en los antibiogramas.



Gráfica 2. Porcentajes de resistencia de las cepas aisladas por clase de antibióticos utilizando los multidiscos MULTIBAC-ID.

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EUGENOL Y CINAMALDEHIDO SOBRE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES AISLADAS DE INFECCIONES DE PIE DIABÉTICO.

Se evaluó el efecto inhibidor con eugenol utilizando el método con discos impregnados

Cantidad	2 µL	5 µL	10 µL	15 µL	Ac Canela
Cepa	Halo de inhibición (cm)				
MSA1	1.1	1.1	1.3	1.4	1.3
MSA2	1.0	1.0	1.1	1.1	1.3
MSA3	1.1	1.2	1.3	1.3	1.3
MC+1	0.7	0.8	1.0	1.1	1.0
MC-1	0.8	1.0	1.1	1.3	0.9
MC-2	0.8	0.8	0.9	1.0	0.9
MC-3	0.7	0.7	0.8	0.8	0.9

Tabla 8. Resultados con discos impregnados de eugenol, utilizando el método de discos. (Ac Canela=aceite esencial de canela)

Posteriormente se evaluó el efecto del cinamaldehído, esta vez utilizando el método de pozos. Los resultados de muestran en la siguiente tabla:

Cantidad	20 μ L	30 μ L	45 μ L	Ac Canela (30 μ L)
Cepa	Halo de inhibición (cm)			
MSA1	1.6	2.2	2.3	1.1
MSA2	1.6	2.1	2.2	1.1
MSA3	1.9	2.3	2.4	1.1
MC+1	2.5	2.8	3.0	1.5
MC-1	3	3.25	3.3	1.6
MC-2	1.6	2	2	0.8
MC-3	1.5	1.9	2.2	1.4

Tabla 9. Resultados de cinamaldehído, utilizando el método de pozos. (Ac Canela=aceite esencial de canela). Se utilizaron cantidades de 20, 30 y 45 μ L de cinamaldehído y 30 μ L de aceite esencial de canela.

A continuación se puede observar en la imagen 3 los halos de inhibición producidos por la acción del cinamaldehído.

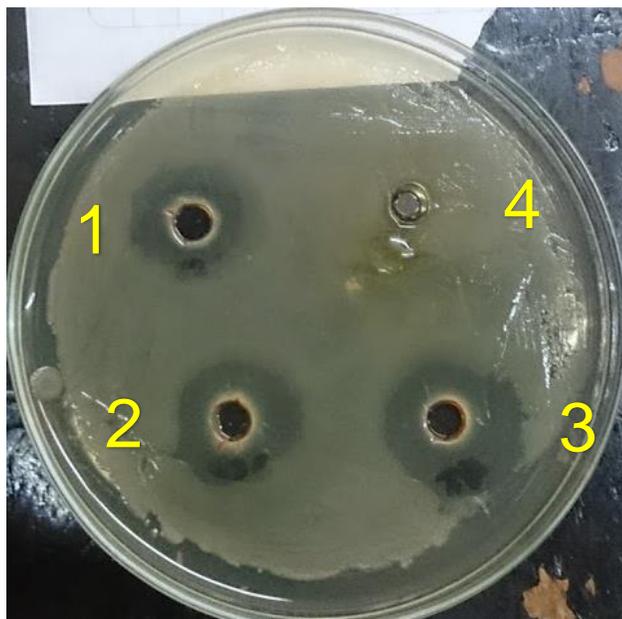


Imagen 3. Halos de inhibición por trans-cinamaldehído en la muestra MC-3, método de difusión en pozos. Los números 1,2 y 3 corresponden a las cantidades de 20, 30 y 45 μ L, el numero 4 a aceite esencial de canela con la cantidad de 30 μ L.

Como prueba adicional se realizó el método de discos con cinamaldehído En la imagen 4 se pueden observar los halos producidos por el cinamaldehído con el método de discos.

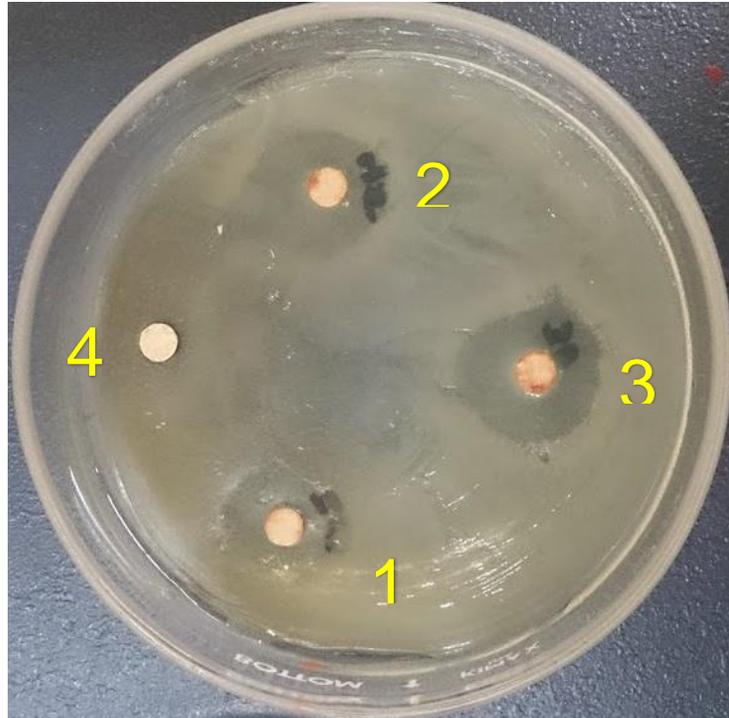


Imagen 4. Halos de inhibición por trans-cinamaldehído en la muestra MC-2, método de difusión con discos. Los números 1,2 y 3 corresponden a las cantidades de 20, 30 y 45 μL , el numero 4 a aceite esencial de canela con la cantidad de 30 μL

En la siguiente tabla se muestran los resultados de cepas MSA1, MSA2, MC-1 y MC+3 en combinación con diferentes cantidades de eugenol y cinamaldehído mezcladas en diferentes proporciones:

Cepas	Halo de inhibición (cm)			
	cinamaldehído 30 μ L	cinamaldehído 30 μ L	cinamaldehído 20 μ L	cinamaldehído 40 μ L
	eugenol 20 μ L	eugenol 30 μ L	eugenol 40 μ L	eugenol 0 μ L
MSA1	3.0	2.5	2.0	3.0
MSA2	3.0	2.2	2.0	2.8
MC-1	1.5	2.0	2.0	1.5
MC+3	3.0	2.5	2.5	3.0

Tabla 10. Resultados de las pruebas con diferentes cantidades mezcladas de eugenol y cinamaldehído.

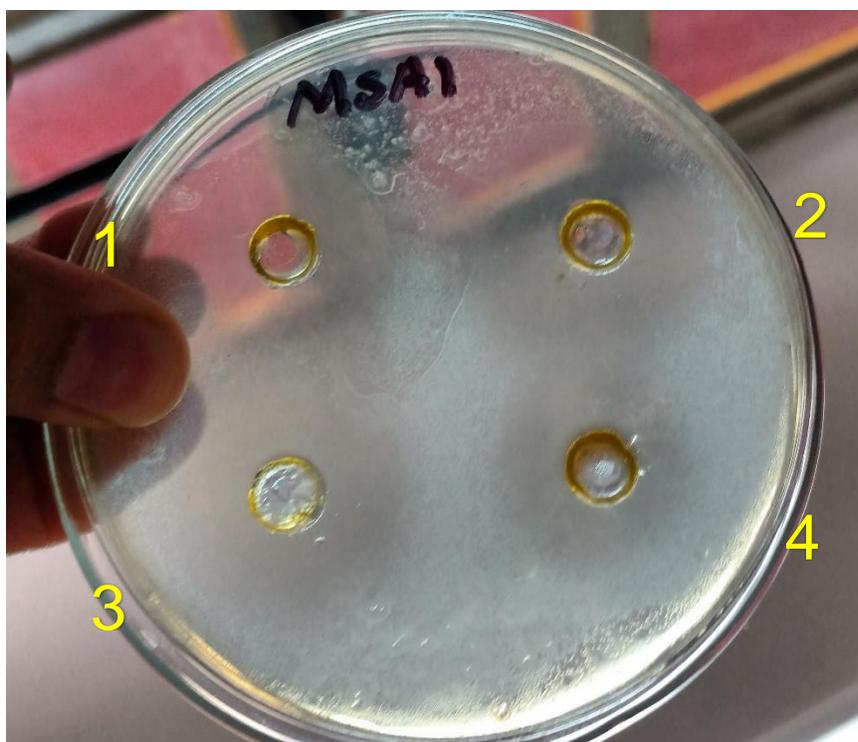


Imagen 5. Cepa MSA1, se pueden apreciar los halos de inhibición con las diferentes combinaciones de eugenol y cinamaldehído, los numero 1, 2, 3 y 4 corresponden con las cantidades utilizadas en las columnas de la tabla 10.

En la imagen 6 se observa los halos producidos por la combinación de diferentes cantidades de eugenol y cinamaldehído con la cepa MSA2 como lo indica la tabla 10.

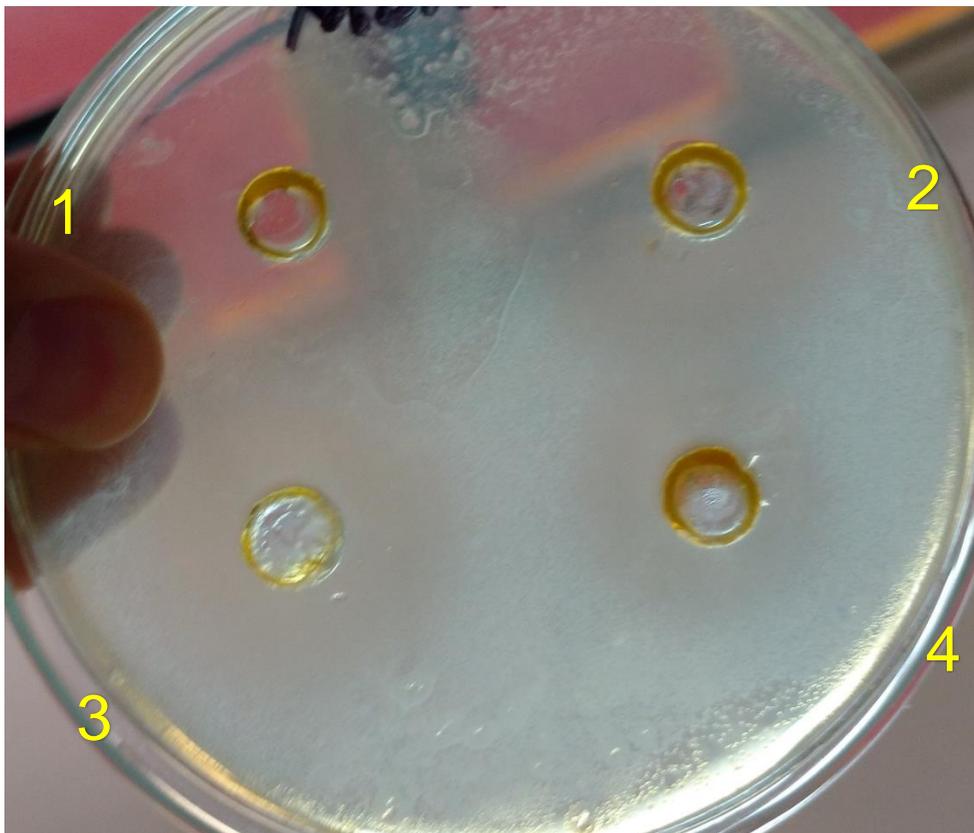


Imagen 6. Cepa MSA 2, se pueden apreciar los halos de inhibición con las diferentes combinaciones de eugenol y cinamaldehído. Los numero 1, 2, 3 y 4 corresponden con las cantidades utilizadas en las columnas de la tabla 10.

Discusión.

Se ha observado durante todo el proceso de investigación el posible papel de la canela para tratar afecciones de pie diabético. La tabla 4 describió que se aislaron un total de 7 cepas de las 3 muestras obtenidas de pacientes con pie diabético; dichas muestras fueron aisladas y tipificadas con los métodos de pruebas bioquímicas ordinarias, así como con la utilización del sistema Api® 20E. El microorganismo común encontrando en todas las muestras es *Enterococcus faecalis*, bacteria Gram positiva que habita en el tracto gastrointestinal de humanos y algunos mamíferos; explicando el por qué fue la bacteria más común y la aislada en las 3 muestras.

De las muestras 2 y 3 se aisló la cepa *Pseudomonas aeruginosa* y la muestra 1 fue la única que presento bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Morganella morganii*). Con base a los artículos especializados en el tema y de los que se basó esta investigación se determinó que todas las cepas aisladas son parte de la microbiota comúnmente recluidas en este padecimiento. Además, en este tipo de padecimientos es muy frecuente encontrar una gran variedad de bacterias, sin exclusividad de especie, donde se reportan de 2 a 5 tipos; lo que concuerda con los microorganismos aislados en este trabajo.

Los resultados de las tablas de antibiogramas muestran que las cepas aisladas son resistentes a al menos 10 tipos de antibióticos. En dos casos fueron a 11 de ellos; el único antibiótico efectivo fue el ciprofloxacino. Con este ejemplo puede verse el grave problema de salud pública que representa la multirresistencia en infecciones y más aún en infecciones de pie diabético, haciéndose cada vez más difícil tener un

tratamiento farmacológico oportuno, efectivo e incrementado consecuentemente el número de amputaciones de miembros afectados.

De las cepas individualmente tratadas, al menos 7 de ellas fueron resistentes a antibióticos y en el caso de las cepas denominadas MSA3 y MC+1 se observó resistencia simultánea a 11 antibióticos. Las cepas Gram positivas presentaron sensibilidad a trimetoprim/sulfametoxazol y ampicilina, mientras que las Gram negativas a amikacina, ciprofloxacino, norfloxacino y cefotaxima.

En la primera gráfica se muestra el número de resistencia a antibióticos por cepa; el número de las Gram positivas es muy similar entre ellas, 10 y 11 respectivamente. Todas estas son *Enterococcus faecalis*, mientras que entre las Gram negativas la cepa más resistente aislada es *Escherichia coli* la cual mostró resistencia a 11 antibióticos.

En la segunda gráfica se observan los porcentajes de resistencia de cada una de las muestras aisladas. Estos porcentajes fueron obtenidos de los antibiogramas realizados con los discos MULTIBAC-ID. Todas las muestras de Gram negativas fueron resistentes en un ciento por ciento a los siguientes grupos de antibióticos: macrolidos (eritromicina), tetraciclinas (tetraciclina) y lincosamidas (clindamicina). El gran problema de salud pública es evidente debido a la multiresistencia que presentan las cepas, por lo tanto las opciones terapéuticas para este tipo de padecimiento disminuyen. En la gráfica se observa que el grupo de antibióticos más eficiente en este tipo de infecciones son las quinolonas (ciprofloxacino); este grupo fue eficaz en un 55% seguido de las sulfonamidas en un 71% y los aminoglucósidos en un 73%.

Posteriormente, se utilizó eugenol y cinamaldehído como posibles agentes antimicrobianos. Se ha mencionado que el cinamaldehído es el compuesto con mayor porcentaje en el aceite esencial de canela *Cinnamomun zeylanicum*, seguido a su vez por el eugenol que demostró ser un eficaz antimicrobiano como se observa en la tabla 9. El método que se utilizó para el eugenol fue de difusión en discos y el de difusión en pozos para el cinamaldehído. Ambos revelaron una actividad antimicrobiana en todas las muestras, siendo más práctico el eugenol en las cepas Gram positivas, mientras que el más efectivo en inhibir a la población multirresistente fue el cinamaldehído.

En la tabla 8 se observa que el eugenol desarrolló el mayor efecto inhibitorio con la cantidad de 15 μ L, aunque el mayor halo presentado fue solo de 1.4 cm en la cepa MSA1. Esto puede deberse a la poca cantidad ocupada para impregnar el disco, ya que la distancia mínima para que la cepa se considere inhibida es de 1.5 cm. Es necesario evaluar una mayor cantidad para tener la certeza de que el compuesto pueda inhibir estas cepas, aunque cabe resaltar que para la baja cantidad utilizada se observa una buena capacidad inhibitoria. Uno de los mayores problemas con este compuesto es su naturaleza física, ya que es un aceite muy viscoso lo que dificulta su absorción en el disco y por el método de pozos es muy difícil que se difunda en el agar debido a su naturaleza hidrofóbica.

El trans-cinamaldehído mostró el mayor efecto inhibitorio. Se observa en la tabla 9 que el cinamaldehído presenta inhibición mayor a 15 mm desde la cantidad de 20 μ L, siendo todas las cepas sensibles a este compuesto. Dicho compuesto presenta una inhibición mayor al antibiótico ciprofloxacino (con un 55% de inhibición), además

de que muestra una gran inhibición tanto en las cepas Gram negativas como en las positivas. La cepa más sensible fue MC-1 con un halo de inhibición de 3.3 cm con una cantidad de 40 μ L. La diferencia de inhibición entre las cantidad de 30 μ L y 40 μ L son mínimas de manera de que se intuye que una cantidad de 30 μ L podría ser óptima para la inhibición de cepas multirresistentes.

El eugenol requiere de una cantidad mayor, posiblemente de 30 μ L para corroborar si aumenta su capacidad inhibitoria, pero la naturaleza del compuesto hace difícil su aplicación a diferencia del cinamaldehído que se encuentra en forma de aceite no tan viscoso y muestra capacidad para difundirse en el agar; por ello fue posible utilizar volúmenes mayores. El eficaz efecto antimicrobiano del cinamaldehído, además de su capacidad más manipulable lo muestra como un claro candidato para un medicamento alternativo en el tratamiento de pie diabético. Se necesitaría proponerlo en una forma farmacéutica más eficaz para ser utilizado como un remedio final. Dicho proceso podría extenderse al eugenol, tal vez modificando sus propiedades físicas con algún excipiente de manera de que pudiera ser un candidato para utilizarse como tratamiento en contra de las infecciones de pie diabético.

En la tabla 10 se observa como ejemplo una forma de vinculación en los compuestos mostrando un comportamiento sinérgico al encontrarse juntos. Esto podría ayudar a mejorar la terapia con cinamaldehído y eugenol en una cantidad 60-40 respectivamente, por lo que se advierte mayor poder inhibitor hacia las cepas multiresistentes. Esto tal vez se podría explicar de acuerdo a la proporción que se encuentra en el aceite esencial. El cinamaldehído es el compuesto con una mayor

proporción con respecto al eugenol y con la adecuada proporción se podría generar un candidato adecuado para tener un adyuvante en el tratamiento de infecciones de pie diabético.

Conclusiones

- Se aislaron bacterias multirresistente a antibióticos de pacientes con úlceras de pié diabético.
- Para evaluar el fenotipo de multirresistencia se utilizaron multidiscos MULTIBAC-ID. Las 7 cepas seleccionadas para ser estudiadas fueron resistentes a macrólidos, tetraciclinas, glicopéptidos, anfenicoles y lincosamidas. Aunque en un porcentaje menor los fueron a penicilinas, cefalosporinas, nitrofuranos, aminoglucosidos, sulfonamidas y quinolonas.
- Al probar al eugenol y al cinamaldehído, principales componentes de la canela, contra bacterias multiresistentes a antibióticos aisladas de úlceras de pié diabético, ambos mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de dichas bacterias.
- El cinamaldehído presentó una mayor capacidad de inhibición respecto al eugenol debido posiblemente a sus características fisicoquímicas las cuales le permiten una mayor difusión en el agar.
- Se observó una forma de interacción de los compuestos mostrando un comportamiento aditivo al encontrarse juntos. El mayor efecto se observó con una proporción 60-40 cinamaldehído-eugenol. Esta proporción es similar a la observada de manera natural en el aceite esencial de canela. Por ello se propone la utilización de los dos como adyuvante en el tratamiento del pié diabético al mostrar un mayor efecto inhibitorio juntos.

Apéndice I

Propiedades fisicoquímicas de los compuestos evaluados

Trans-Cinamaldehído

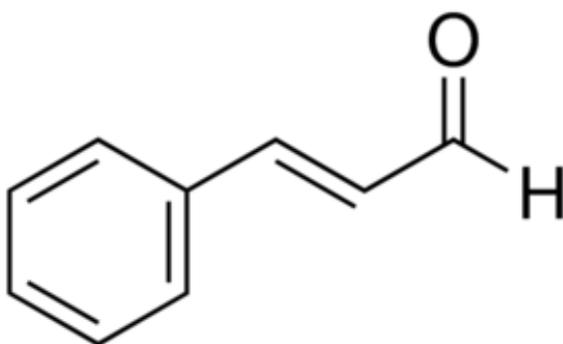


Figura 7. molecula de trans-Cinamaldehído^[42]

trans-Cinamaldehído

99% pureza Sinónimo: trans-3-Phenyl-2-propenal

Formula: C₉H₈O Peso molecular: 132.16 g/mol

Propiedades	unidades
Densidad de vapor	4.6 (vs aire)
Pureza	99%
Índice de refracción	<i>n</i> _{20/D} 1.622(lit.)
Punto de ebullición	250-252 °C
Punto de fusión	-9--4 °C
Densidad	1.05 g/mL at 25 °C
LD ₅₀	3400 mg/kg (rat, oral)

Eugenol

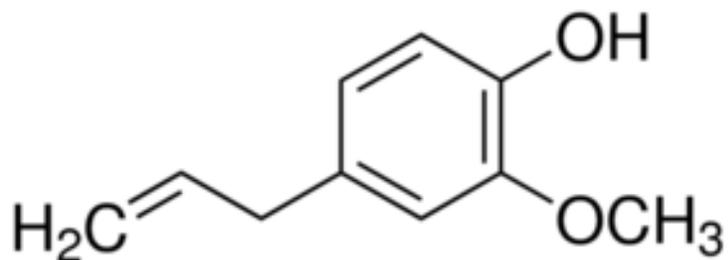


Figura 8. Molécula de eugenol.^[43]

Eugenol Sinónimos: 2-Metoxi-4-(2-propenil)fenol, 4-Alil-2-metoxifenol, 4-Alilguayacol

Formula: C₁₀H₁₂O₂ Peso molecular: 164.20 g/mol

Propiedad	unidades
Pureza	99%
forma	liquida
Índice de refracción	<i>n</i> _{20/D} 1.541
Punto de ebullición	254 °C
Punto de fusión	-12--10 °C
densidad	1.067 g/mL at 25 °C

Referencias

1. Lee R and Balick MJ. Sweet wood, Cinnamon and its importance as a spice and medicine. *Ethnomedicine*. 2005; 1: 61 – 64
2. Barceloux DG. Cinnamon (*Cinnamomum* Species). *Dis Mon*. 2009; 55: 327 – 3
3. http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,543,m,2719&r=ReP-20557-DETALLE_REPORTAJESPADRE# consultada el 23 de mayo de 2017
4. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Canela&id=7331> consultado el 19 de enero de 2017
5. Kalembe D and Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 2003; 10: 813 – 2
6. Goñi, P, López P, Sánchez C. Antimicrobial activity in the vapor phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. 2009; 116: 982–989.
7. Titik N, Henny C, Van Der M, Henk J. Effect of Cinnamon Oil on *icaA* Expression and Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2009; 75: 6850–6855
8. Itsaraporn U, Surassmo S, Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 16:1-7
9. Alvarez-Collazo J. and Alonso-Carbajo L. Cinnamaldehyde inhibits L-type calcium channels in mouse ventricular cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2014; 466: 2089-99
10. Roshni C., Lew J and Donald J. Interaction of Cinnamaldehyde and Epicatechin with Tau Implications of Beneficial Effects in Modulating Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013; 36. 21-40
11. Shih-Hua F, Yerra K. Cytotoxic Effect of trans-Cinnamaldehyde from *Cinnamomum osmophloeum* Leaves on Human Cancer Cell Lines. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 2004; 2: 136-147
12. Soliman M. Biomedical Effects of Cinnamon Extract on Obesity and Diabetes Relevance in Wistar Rats. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2012; 2: 133-145

13. Gende B, Floris I. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus* larvae from Argentina, *Bulletin of Insectology*, 2008; 61: 1-4.
14. Markowitz K, Moynihan L, Kim K. Biologic properties of Eugenol and Zinc oxide-eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 73:729-39.
15. González E, Raimara. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología*, 2002. 39(2), 139-156. Recuperado en 27 de enero de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200005&lng=es&tlng=es.
16. Errecalde J. Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *FAO PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL* 2004; 62: 1-67
17. "Alexander Fleming - biográfica" Nobelprize.org Nobel Media AB 2014. Web... 26 de Oct de 2016. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html
18. Rang H, Dale M. *Farmacología*, Elsevier 2008; 6: 661-677
19. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> consultada en 27 de octubre de 2016
20. Laurell A. Hacia la era post antibiótica. <http://www.jornada.unam.mx/2013/12/14/opinion/a03a1cie> consultada en 31 de octubre de 2016
21. Henriques B and Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Int Med* . 2002; 252: 91-106
22. Brooks F, Carroll C. *Microbiología Médica LANGE*. McGraw-Hill. 2010; 25: 97-117
23. B.G. Kelly, Vespermann A, Bolton The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 17: 951-968
24. Baron S. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. 1996; 4: 17-41
25. Randall L, Cooles S, Osborn M. Antibiotic resistance genes, integrons, and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 53: 208–216

26. <http://davidsanchez1996.blogspot.mx/2015/06/recombinacion-de-acidos-nucleicos-en-la.html> consultada en 5 de marzo de 2018
27. Zavala M. Estudio microbiológico de la filosfera de la Ciudad de México: aislamiento de bacterias multirresistentes a antibióticos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM. México, 2014
28. Definition, Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus* and its Complications, Report of a WHO Consultation 1999, World Health Organization Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva.
29. Chen L, Dianna J. Magliano and Zimmet P. The worldwide epidemiology of type 2 *diabetes mellitus*—present and future perspectives, *Nat Rev Endocrinol*. 2011; 8: 228-236
30. Rull J and Aguilar C. Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexico. *Archives of Medical Research*. 2004; 36: 188-196
31. Cabeza-de-Vaca F et al. “Microbiología del pie diabético determinada por estudio de biopsia”. *Revista de Investigación Clínica*. 2009; 61: 281 – 85.
32. Andrew J, Boulton M, Vileikyte L. The global burden of diabetic foot disease. *The Lancet* 2005; 366: 1719–24
33. Lavery L and Armstrong D. Evaluating the prevalence and incidence of foot pathology n Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort. *Diabetes Care*. 2003; 26:1435–8
34. Lipsky B, Berendt A, Deery H, et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2004; 39:885–910.
35. Vinik A, Park T, Stansberry K, Pittenger G. Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 2000;43:957-973
36. Sima A and Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy. *Diabetologia*1999; 42:773-788.
37. Martínez F, Paredes F, Zacarías R. Neuropatía diabética». *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*.2002; 5: 7-23.
38. De Alcalá D et al. Infecciones del pie diabético. Prevalencia de los distintos microorganismos y sensibilidad a los antimicrobianos. *Enferm Infec Microbiology Clin*. 2009; 27(3): 17-21
39. Nelson EA, O’Meara S, Craig D, Iglesias C, Golder S, Dalton J, et al. A series of systematic reviews to inform a decision analysis for sampling and treating infected diabetic foot ulcers. *Health Technol Assess*. 2006; 10: 3-10.

40. Cunha BA. Antibiotic selection for diabetic foot infections: A review. J Foot & Ankle Surgery. 2000; 39: 253 – 57
41. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial consultada de http://www.conamed.gob.mx/prof_salud/pdf/helsinki.pdf el día 23 de mayo de 2017
42. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=1639&lang=en consultada el 30 de julio de 2017.
43. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002; 22: 27-28
44. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c80687?lang=es®ion=MX> consultada en 31 de julio de 2017
45. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/e51791?lang=es®ion=MX> consultada el 31 de julio de 2017