



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA
(*Cinnamomum zeylanicum*) SOBRE BACTERIAS MULTIRESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

VIRIDIANA MARIEL RAMÍREZ AGUILAR



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre
VOCAL: Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez
SECRETARIO: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez
1er. SUPLENTE: Profesor: Aleida Mina Cetina
2° SUPLENTE: Profesor: Raquel Ortega Muñoz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

Asesor del tema: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Supervisor técnico: M. en C. Raquel Ortega Muñoz
Sustentante: Viridiana Mariel Ramírez Aguilar

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	4
1.1. Antibióticos	4
1.2. Orígenes de la resistencia a antibióticos	10
1.3 <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	22
1.3.1 Historia	23
1.3.3. Química del aceite esencial de canela.....	25
1.3.4 Mecanismos de acción	28
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	31
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Selección de cepas multirresistentes.....	33
3.2. Purificación de las cepas.....	33
3.3. Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	33
3.4. Pruebas Bioquímicas.....	33
3.5. Obtención del aceite esencial de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).....	34
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	38
4.1. Purificación de cepas	38
4.2. Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	38
4.3. Caracterización e identificación bioquímica	40
4.4. Obtención de destilados.....	41
4.5 . Compuestos del aceite esencial de canela (<i>C. zeylanicum</i>) que se obtuvieron de la cromatografía de gases acoplado a masas	41
4.6. Pruebas de sensibilidad con aceite esencial de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).....	44
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	48
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55
ANEXOS	58

Resumen.

Las enfermedades infecciosas transmitidas por el consumo de diferentes alimentos en especial diferentes tipos de carne como el pollo y la res han ido en aumento ya que son una matriz compleja en cuanto a su composición y, por lo tanto, un ambiente adecuado para la supervivencia de diferentes microorganismos. En el presente estudio se trabajó con cepas previamente aisladas de carne de pollo a las cuales se les determinó si son resistentes a por los menos 5 antibióticos. Encontrar estas bacterias multirresistentes a antibióticos en alimentos muestra el grave problema para tratar a las enfermedades transmitidas por los mismos. Este estudio también pretende investigar una alternativa natural para la inhibición de estas bacterias utilizando aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* especie conocida comúnmente como canela. Se seleccionaron al azar 10 cepas previamente aisladas de carne de pollo las cuales se encontraban congeladas. Las cepas se reactivaron inoculándolas en caldo Luria. Una vez reactivadas se resembraron en medios de cultivos selectivos y diferenciales como agar Mc Conkey y agar MSA para su purificación encontrando sólo bacterias Gram negativas. Al conjunto de cepas puras se les realizó antibiograma por el método de Bauer-Kirby para poder determinar la multirresistencia a antibióticos. Se seleccionaron las cepas que presentaban resistencia a por lo menos 5 antibióticos quedando 5 cepas totales para su estudio. Al mismo tiempo se realizó en muestras de corteza de canela dos tipos de destilaciones 1) arrastre por vapor, 2) hidrodestilación encontrando que en este último método se obtuvo una mayor cantidad de aceite esencial (1mL por cada 60 g de canela). El aceite obtenido por hidrodestilación se probó en las 5 cepas por la metodología de Bauer-Kirby utilizando volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μL . Se encontró que el 100% de las cepas fueron sensibles al aceite esencial de canela incluso utilizando el volumen más pequeño (5 μL) y encontrando que entre más cantidad de volumen de aceite esencial se utilice mayor será su efecto inhibitorio. Finalmente el aceite esencial de canela se mandó a analizar a la USAI (Facultad de Química, UNAM) a través de una cromatografía de gases acoplada a masas, para determinar que compuestos químicos son los principales constituyentes de

esta muestra de canela encontrando que el cinamaldehído, el bencenopropanal, el eugenol y el linalool se encontraban en mayor proporción y que quizá podrían ser los causantes de la inhibición de estas bacterias; además, no se podría descartar que los compuestos encontrados en menor proporción también ayuden a dicha inhibición.

Introducción.

Uno de los más grandes acontecimientos en el área clínica a nivel mundial ha sido la introducción de la penicilina por Alexander Fleming en 1928. Desde entonces la búsqueda, síntesis y uso de nuevas moléculas antimicrobianas para el tratamiento de enfermedades infecciosas no ha cesado. Asimismo, se ha generado un nuevo problema de salud asociado a este acontecimiento, el surgimiento de bacterias resistentes a múltiples antibióticos.

Este fenómeno se ha convertido en un problema de salud no solo a nivel nacional sino también mundial, el cual se ha asociado principalmente a ambientes intrahospitalarios pero actualmente, se han reportado otros nichos tales como la ganadería y la avicultura. Algunos de los factores principales que han promovido la multirresistencia han sido el uso desmesurado de los antibióticos en ambientes clínicos, así como su utilización para promover el crecimiento en animales.

En el 2009 se reportó que el 80% de los antibióticos vendidos se destinaron a la industria agropecuaria. En su mayoría, no fueron utilizados para combatir infecciones bacterianas si no que fueron administrados continuamente a bajas dosis en los alimentos de los animales para incrementar rápidamente su crecimiento. Al estar la microbiota de los animales expuesta a una constante presión selectiva, se puede promover la aparición del fenotipo de multirresistencia.

A raíz de esta problemática, sería de gran interés investigar alternativas naturales para el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas. Se ha observado que ciertos aceites esenciales de especias tales como la canela (*Cinnamomum zeylanicum*), son capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias. Este conocimiento ha sido ampliamente utilizado durante muchos años para preparar bebidas y/o infusiones que por su gran contenido de ácidos orgánicos tienen propiedades antimicrobianas. Por esta razón, este estudio pretende observar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela sobre bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de alimentos para consumo humano.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. Antibióticos

1.1.1 Historia de los Antibióticos

Un antibiótico es una sustancia química producida por el metabolismo microbiano de bacterias y hongos que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Waksman, 1947). La mayor variedad en estructura y número de antibióticos se encuentra en los actinomicetos, especialmente en el género *Streptomyces*. En este contexto utilizaremos el término antibiótico para referirnos a cualquier clase de molécula orgánica que inhiba o mate microbios por medio de interacciones específicas con perfiles bacterianos, sin tener en cuenta la fuente del compuesto o clase en particular (Davies y Davies, 2010).

En 1910 Paul Erlich descubrió el primer agente antimicrobiano, llamado Salvarsán. Aunque era efectivo para el tratamiento de la sífilis, también causaba efectos secundarios en la salud (Yamaguchi y Saga, 2009).

Posteriormente, en el año de 1928 Alexander Fleming encontró una sustancia producida por un hongo (del género *Penicillium*) que inhibía el crecimiento de *S. aureus*, conocida actualmente como penicilina. Mientras tanto Domagk y colaboradores en 1935 descubrieron las sulfonamidas las cuales eran agentes capaces de matar a microorganismos localizados en el torrente sanguíneo (Yamaguchi et al., 2009).

En las siguientes dos décadas, el descubrimiento acelerado de nuevas moléculas de antibióticos dio origen a la llamada edad de oro de la quimioterapia antimicrobiana (Fig. 1). Esto comenzó con la obtención de la estreptomicina en 1944 y que fue utilizada para el tratamiento de la gran plaga blanca, es decir, la tuberculosis (Davies et al., 2010). En 1950 se descubrieron otros antibióticos como las tetraciclinas, los macrólidos, el cloranfenicol y los glicopéptidos (Walsh y Fischbach, 2009).

En los años de 1960 y 1962 se sintetizaron las moléculas de meticilina y ácido nalidíxico, respectivamente. Mientras que en 1968 y hasta 1980 surgió la primera,

segunda y tercera generación de carbapenems. Seis años después aparece otro antibiótico clasificado dentro de los betalactámicos como el monobactam. En la década de los noventa aparecieron las primeras fluoroquinolonas y desde el año 2000 y hasta la fecha ha existido un decremento en el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas (Yamaguchi et al., 2009).

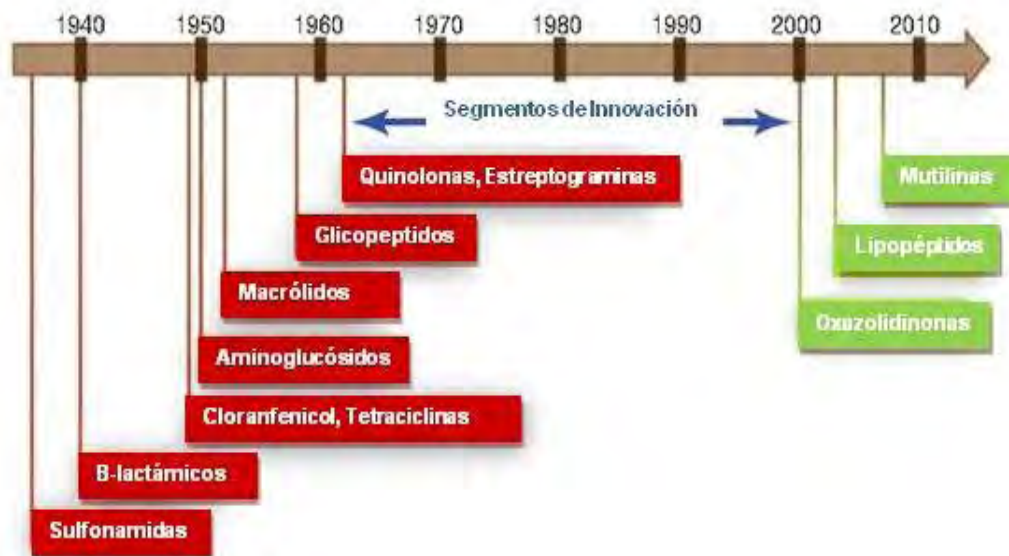


Figura 1. La mayoría de los andamios químicos de los que derivan los antibióticos actuales fueron introducidos a mediados de la década de 1930 y principios de 1960 (Walsh et al., 2009).

1.1.2. Mecanismo de acción de los antibióticos

Todos los antibióticos se caracterizan por tener un espectro antimicrobiano específico que se refiere al número de especies de microorganismos sobre los que puede actuar. Mientras que los antimicrobianos de amplio espectro actúan sobre diferentes especies. Los de espectro intermedio actúan sobre un número limitado de especies y los de bajo espectro actúan solo sobre una sola especie.

Los antibióticos pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción frente a un blanco como aquellos que (Tabla 1):

1. Inhiben la síntesis de la pared celular
2. Inhiben la membrana citoplasmática
3. Inhiben la síntesis de proteínas
4. Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular

Durante el crecimiento y la división de la célula bacteriana, la pared original también debe crecer y formar un nuevo tabique (pared transversa) entre las dos células hijas de modo que cuando estas se separen, cada célula hija posea una membrana completa e íntegra. Los inhibidores de la síntesis de la pared celular actúan en diferentes puntos de la secuencia y no permiten la biosíntesis de la pared, por lo que al alargarse la célula se hará una ruptura por la presión osmótica interna. Algunos antibióticos que actúan a nivel de la pared celular son las penicilinas, las cefalosporinas, la bacitracina y la vancomicina (Utrecht, 2002).

2. Inhibición de la membrana citoplasmática

Las membranas citoplasmáticas sirven como medio de difusión pasiva y llevan a cabo el transporte activo. Las membranas microbianas están compuestas principalmente de fosfolípidos y son afectadas por varios compuestos como la polimixina (antibiótico conformado de grandes polipéptidos cíclicos con grupos amino y carboxilo que conforman una faceta polar y cadenas de hidrocarburos que confieren la parte no polar) que reacciona con los grupos fosfatos de la cubierta de fosfolípidos de la célula haciendo una desorganización de la membrana con escape del contenido intracelular ocasionando lisis (Utrecht, 2002).

3. Inhibición de la síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas se lleva a cabo mediante la traducción de información genética codificada en los ARNm. Este proceso se desarrolla en tres etapas (inicio, alargamiento y terminación). Varios antibióticos inhiben la síntesis de proteínas porque interfieren uniéndose a los ribosomas y evitan la formación normal del péptido en uno o varios puntos. Los aminoglucósidos, las tetraciclinas, el cloranfenicol y los macrólidos son ejemplos clásicos de antibióticos que inhiben esta síntesis. En particular están los aminoglucósidos que se unen a la subunidad 30s, bloqueando la primera etapa de la traducción y la unión del ARNt, por lo que se origina un error en la lectura del código genético (Utrecht, 2002).

4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

La reproducción de las bacterias al igual que la de toda célula viva, requiere la replicación del ADN que contiene y la transferencia de los códigos genéticos para la síntesis de todos los componentes de la célula. La inhibición de la replicación del ADN puede darse de manera directa o indirecta. Como ejemplo de la primera está la rifampicina que inhibe directamente la replicación de los ácidos nucleicos, mientras que las sulfonamidas inhiben la replicación de los ácidos nucleicos de una manera más indirecta porque interfieren con la síntesis de ácido fólico en las células microbianas. Las bacterias deben sintetizar su propio ácido fólico ya que lo utilizan como un acarreador de moléculas de carbono para la síntesis de timidina y de otros nucleósidos puesto que no pueden utilizarlo de una manera preformada ya que no entraría en la célula bacteriana (Utrecht, 2002).

Tabla 1. Mecanismo de acción de agentes antibacterianos (Chopra, 2010).

Sitio	Agente	Objetivo Principal
Pared celular	Penicilinas Cefalosporinas Bacitracina, ramoplanina Vancomicina, teicoplanina Telavancina Cicloserina Fosfomicina Isoniacida Ethambutol	Transpeptidasa Transpeptidasa Isoprenilfosfato Acil-D-alanil-D-alanina Acil-D-alanil-D-alanina y la membrana celular Alanin raemasa/ligasa Piruvil tranferasa Síntesis de Acidos micólicos Arabinosil transferasa
Ribosomas	Cloranfenicol Tetraciclinas Aminoglucósidos Macrólidos Lincosamidas Ácido fusídico Linezolid Pleuromutilins	Peptidil transferasa Sitio A ribosomal Iniciación complejo/translación Subunidad ribosomal 50S Ribosomal A y sitios P Factor de elongación G Sitio A ribosomal Sitio A ribosomal
RNA^t	Mupirocin	Isoleucil-tRNA-sintetasa
Ácidos nucleicos	Quinolonas Novobiocina Rifampicinas 5-Nitroimidazoles Nitrofuranos	ADN girasa (subunidad α / topoisomerasa IV) DNA girasa (subunidad β) ARN polimerasa Cadenas de ADN Cadenas de ADN
Membrana celular	Polimixinas Daptomicinas	Fosfolípidos Fosfolípidos
Síntesis de folato	Sulfonamidas Diaminopirimidinas	Pteroato sintetasa Dihidrofolato reductasa

1.1.3. Uso de los antibióticos en animales

Los antibióticos varían mucho en sus propiedades físicas, químicas y en su toxicidad. Debido a estas características, algunos antibióticos tienen potencialmente un efecto quimioterapéutico notable y son utilizados para el control de diversas infecciones microbianas en el hombre y en los animales.

Una alta porción de los antimicrobianos es usada en las prácticas de la industria en animales para consumo humano. Los antibióticos se incluyen dentro del amplio grupo de compuestos que forman parte de la composición del pienso animal y se administran con fines curativos y/o preventivos. Los piensos contienen en general concentraciones relativamente elevadas del fármaco (en el orden de 100 a 1000 mg/L) y se administran durante períodos bastante cortos (Cancho y García, 2000).

En teoría, el uso terapéutico de los antibióticos en animales tiene como objetivo controlar o eliminar las enfermedades infecciosas previamente documentadas causadas por bacterias, hongos o protozoarios. Se les puede administrar por medio de inyecciones o por vía oral, aunque cabe destacar que la alimentación por piensos es una de las más usadas a la hora de medicar en los sectores zootécnicos. Los antibióticos también son utilizados para la prevención de brotes de cualquier enfermedad por ejemplo, en los ciclos iniciales de crecimiento de animales en donde son especialmente susceptibles a agentes infecciosos muy particulares (Cancho et al., 2000).

Sin embargo, desafortunadamente se ha visto que no solo se utilizan para estos fines. Muchas veces los animales a los que se les prescribieron estos agentes no requerían del antimicrobiano porque no presentaban evidencia de infección.

Por otro lado, se ha observado que los animales incrementaban su peso rápidamente al ingerir dosis subterapéuticas de los antibióticos (promotores del crecimiento). Desde hace ya varias décadas se han venido suministrando diferentes antibióticos durante semanas o meses a dosis subterapéuticas causando la inactivación de algunas bacterias dentro del tracto intestinal y, de esta

forma, dejando disponibles mayor número de nutrientes para el animal (Watson, 2001).

1.2. Orígenes de la resistencia a antibióticos

El uso inadecuado de los antibióticos que se administran en los piensos de los animales puede originar la presencia de residuos de dichos fármacos ya sea en el tejido muscular y en otros tipos de tejidos tales como el caso del hígado y el riñón. A raíz de esto se ha propiciado una presión selectiva en las bacterias que ha originado el escenario adecuado para la transferencia de material genético entre microorganismos patógenos y microorganismos comensales (no patógenos) determinando la aparición y diseminación del fenotipo de resistencia a los antibióticos. De la misma manera, estos animales pueden contener trazas de antibióticos que se incorporen al organismo humano a través de la cadena alimenticia, fomentando igualmente la aparición de microorganismos resistentes (Cancho et al., 2000).

Varios estudios han demostrado la presencia de microorganismos resistentes a antibióticos en productos de animales para consumo humano. Un estudio en Europa en el año de 1970 demostró que se utilizó la avoparcina, una droga similar a la vancomicina, como promotor de crecimiento. Al ejercer una constante presión selectiva sobre las bacterias, se propició que la flora natural microbiana de los animales se convirtiera en resistente a diversos antibióticos (Marshall y Levy, 2011).

En 1975 se realizó un estudio que consistió en la administración de tetraciclina en la comida a pollos de una granja. Subsecuentemente, se realizaron los análisis de las bacterias que se encontraban en los intestinos de los pollos, hallando organismos con el fenotipo de resistencia a las tetraciclinas. Además, las personas que convivían con estos animales también desarrollaron flora intestinal resistente a tetraciclina (Levy y FitzGerald., 1976).

En Dinamarca en los años de 1995 y 1996 hubo un aumento de la resistencia en cepas de *Enterococcus faecium* que se encontraban en los pollos para consumo humano debido al abuso de la avilamicina (Marshall et al., 2011).

Adicionalmente, se realizaron otros estudios que mostraron la presencia de microorganismos resistentes a antibióticos en diferentes tipos de carne para consumo humano. En el año de 2001 se realizó un estudio en el cual se muestrearon 200 tipos de carnes, entre ellas la de pollo, la de res, la de pavo y la de puerco de diferentes supermercados de la ciudad de Washington D. C. Se encontró que el 20% de las muestras contenían diferentes tipos de *Salmonella* resistentes a antibióticos (White y Zhao, 2001).

1.2.1 Transferencia de material genético en bacterias

La resistencia que han generado las bacterias a múltiples antibióticos se puede explicar mediante el intercambio de material genético de forma horizontal (transferencia horizontal de genes) ya sea por transformación, transducción o conjugación.

Transformación

Ocurre cuando el ADN se encuentra desnudo a causa de la lisis de algunas bacterias; este ADN es adoptado por otras bacterias mediante una recombinación genética (Fig. 2). El gen de resistencia al antibiótico puede ser integrado dentro del cromosoma o en el plásmido de la célula receptora.

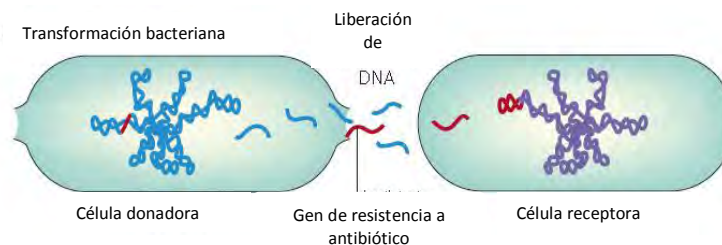


Figura 2. Transferencia de material genético mediante la Transformación (Lowy y Furaya, 2006).

Transducción

En la transducción, los genes de resistencia al antibiótico son transferidos de una bacteria a otra por medio de bacteriófagos y pueden ser integrados dentro del cromosoma de la célula receptora (Fig. 3). La transducción puede ser generalizada o especializada. En la primera, un ADN bacteriano tanto cromosómico como plasmídico pasa a formar parte del ADN de un hospedero en lugar del genoma del virus. En la segunda, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente en el genoma del hospedero.

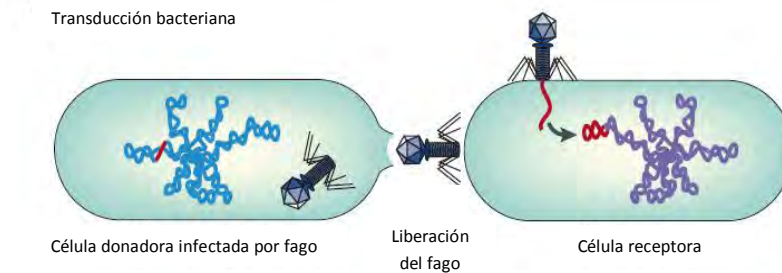


Figura 3. Transferencia de material genético mediante la transducción (Lowy et al., 2006)

Conjugación

La conjugación ocurre mediante el contacto directo entre dos bacterias y se requiere de una bacteria que contenga un plásmido conjugativo y una bacteria receptora que carezca de él (Fig. 4) Los genes que regulan la transferencia están situados en una región del plásmido llamada *tra*. Algunos genes de la región *tra* están relacionados con la síntesis de los pili. Los pili permiten el apareamiento específico entre ambas bacterias, dando lugar a la formación de un puente de conjugación por el cual pasa el ADN de una bacteria a otra. El ADN a transferir es el plásmido conjugativo.

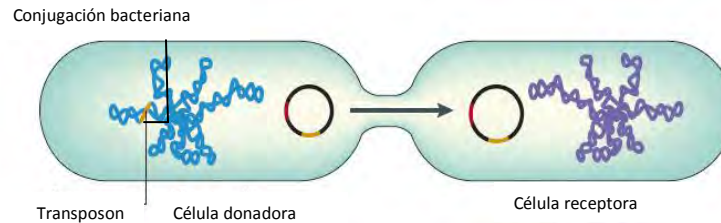


Figura 4. Transferencia de material genético mediante la conjugación (Lowy et al., 2006).

1.2.2. Elementos genéticos móviles

1. Plásmidos

Watanabe describió plásmidos de resistencia en el año de 1963 a los que llamó plásmidos R. Al paso del tiempo dicho nombre ha sido modificado.

Los plásmidos son definidos como moléculas de ADN que se replican de manera autónoma del cromosoma bacteriano; múltiples plásmidos pueden existir dentro de una sola bacteria (Fig. 5).

La función principal del plásmido es permitir la evolución de las bacterias en condiciones ambientales sumamente variables y pueden codificar resistencia para uno o dos antibióticos. Se cree que los plásmidos de resistencia se originan por la acumulación de diferentes genes que en condiciones normales no son parte de los cromosomas bacterianos, los plásmidos se reconocen como la mayor amenaza a la eficacia de los antibióticos.

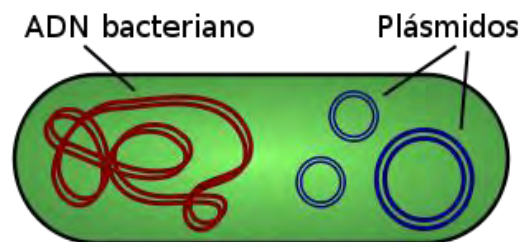


Figura 5. Plásmido dentro de una célula bacteriana.

2. Transposones

Son secuencias discretas de ADN capaces de translocarse de un replicon a otro, por lo que se dice que saltan de un gen a otro (Denis, 2010).

Los transposones fueron identificados por primera vez como inserciones espontáneas en los operones bacterianos. Anulaban la transcripción o la traducción de los genes en los cuales se insertaban. A partir de entonces, se caracterizaron diversos transposones. Las “secuencias de inserción” (IS) son unidades autónomas que codifican para una proteína indispensable llamada transposasa. Todas las IS comparten una organización similar. En sus extremos hay secuencias cortas repetidas e invertidas llamadas “inverted repeats” (IR). Las IS contienen una única región codificante que codifica para la transposasa y se encuentra entre los dos IR (Fig. 6). Cuando un elemento IS transpone, se duplica una secuencia del huésped en el sitio de inserción y se identifican porque son pequeñas secuencias directas que flanquean a las IR (Orman, 2006).

Los transposones replicativos (el elemento es duplicado durante la reacción, así la unidad que se transpone es una copia del elemento original), y los transposones no replicativos son aquellos que se mueven como una entidad física directamente de un sitio a otro, en forma conservada (Orman, 2006).

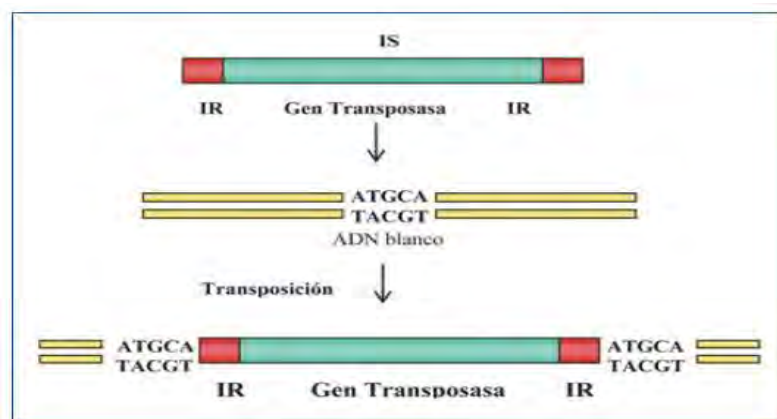


Figura 6. Secuencias de inserción y su transposición. En la transposición de una IS se duplica una secuencia del huésped en el sitio de inserción que se identifican como secuencias directas que flanquean las IR (Orman, 2006).

También existen los transposones compuestos (Fig. 7) conformados por una región central que porta el gen marcador, flanqueada a ambos lados por elementos de secuencias de inserción, pudiendo encontrarse en la misma orientación o invertida.

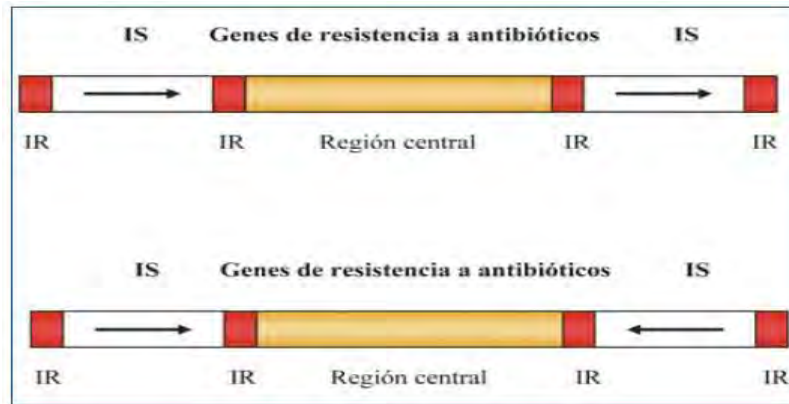


Figura 7. Transposones compuestos. Arriba: transposon compuesto por secuencias de inserción con la misma orientación.

Abajo: Transposon compuesto por secuencias de inserción invertidas (Orman, 2006).

3. Integrones

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico en el que mediante un mecanismo de recombinación sitio-específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Se dice que es dinámico ya que los integrones tienen la capacidad para escindir ADN en forma de círculos autónomos y la capacidad de estos “círculos” autónomos para integrarse en otro integrón diferente (García, 1999).

Los integrones contienen colecciones de genes llamados “cassettes” que están generalmente organizados en torno al gen de una proteína llamada integrasa que realiza la función de recombinación y que a su vez da las diferencias para los cuatro tipos de integrones que existen (I, II, III y IV).

Estructuralmente se suele hablar de tres regiones en un integrón (Fig. 8): 1) Una región constante 5' que contiene básicamente el gen de la integrasa que se

transcribe de derecha a izquierda; 2) en el extremo 5' del gen una región con dos promotores divergentes que controlan respectivamente la transcripción del gen de la integrasa y 3) una región de los genes estructurales situados a la derecha. En la región central variable se localizan los genes estructurales del integrón (casi siempre genes de resistencia a antibióticos).

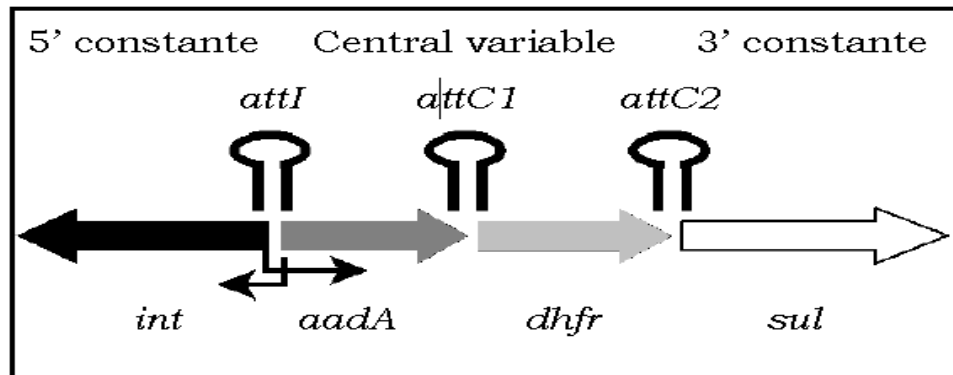


Figura 8. Esquema de la estructura del integrón (García, 1999).

En conjunto estos tres elementos genéticos móviles mencionados (plásmidos, transposones e integrones) forman parte de los mecanismos de resistencia adquirida de las bacterias.

Por otro lado, se ha asociado la resistencia a mutaciones, lo cual es un evento relativamente poco común, normal y espontáneo que no es inducido. Las células que son alteradas por una mutación tienden a ser inferiores en su metabolismo cuando son comparadas con otras células que no han mutado, ya que se requiere de una cantidad de energía mayor para mantener estas mutaciones y tienden a ser suprimidas por una población bacteriana competitiva. Aunque estos microorganismos pueden tener una baja virulencia, la multiresistencia les permite persistir en ambientes hospitalarios y causar infecciones nosocomiales.

1.2.2 Resistencia Intrínseca

Como ya se sabe, la adquisición de elementos genéticos móviles puede conferir a las bacterias resistencia. Sin embargo existen otros mecanismos de resistencia intrínseca que están implicados en el fenotipo de multirresistencia y pueden impedir la acción de los antibióticos. Estos incluyen la prevención al acceso del antibiótico al interior de la célula por barreras de baja permeabilidad o la expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana exportándolo activamente fuera de la misma (es decir, expulsando el antibiótico).

Estos mecanismos de exportación son atribuidos a genes y proteínas que se encuentran en todos los organismos y que son llamadas bombas de expulsión, las cuales parecen cumplir un papel fisiológico, ya que en las bacterias pueden conferir resistencia a sustancias naturales producidas por el hospedero incluyendo bilis, hormonas y moléculas de autodefensa. Posiblemente, estos sistemas estén mediando la resistencia a los antibióticos usados en los humanos y la medicina veterinaria como un subproducto del papel fisiológico al que están sometidas (Piddock, 2006).

Por lo tanto, las bombas de expulsión en las bacterias tienen un papel importante ya que les podría permitir sobrevivir en su nicho ecológico. Los genes y las proteínas de las bombas de expulsión en las bacterias se encuentran en el cromosoma o en elementos genéticos transmisibles (Piddock, 2006).

Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar una amplia gama de estructuras y compuestos diferentes (incluidos antibióticos de diferentes clases) y están encargadas de evitar que el antibiótico se incorpore a la célula bacteriana al expulsarlo activamente al medio extracelular sin permitir su interacción con la molécula diana (Becerra y Plascencia, 2009). Como ejemplo particular de un patógeno con alto grado de resistencia intrínseca se puede mencionar a *Pseudomonas aeruginosa*.

Existen 5 súper familias de bombas de expulsión (Fig. 9) que están asociadas a multirresistencia de antibióticos y que son:

1. Familia (ABC)

Esta súperfamilia denominada así por sus siglas en inglés (ATP-binding cassette) juega un rol mayor en la multirresistencia de células humanas cancerígenas. Tiene un sistema acoplado a la hidrólisis de ATP. Su papel en la resistencia a los medicamentos, sin embargo, parece ser más limitado en las bacterias aunque se han encontrado homólogos bacterianos como el transportador multifármacos (LMRA) de *Lactococcus lactis* (homólogo a la proteína de mamífero (MDR1) (Nikaido, 2009).

En *Escherichia coli* esta familia le confiere resistencia a los tintes catiónicos, daunomicina, y trifenilfosfonio. En cambio en *L. lactis* no parece jugar un papel importante en la resistencia a los medicamentos. Sin embargo, los estudios bioquímicos de esta bomba condujeron a un mecanismo propuesto para el acoplamiento de extrusión de drogas y la hidrólisis de ATP y el descubrimiento de que los dominios transmembranales de esta bomba por sí sola pueden producir un flujo de protones dependiente de gradientes de drogas. Otro transportador ABC en *E. coli* (MacB) trabaja junto con el gen estructural para un adaptador periplásmico de la proteína (MacA) confiriendo resistencia a macrólidos cuando existe una sobreexpresión de esta bomba. Se realizaron otros estudios en los demás exportadores de fármacos ABC de bacterias Gram-positivas, tales como (BMRA) de *Bacillus subtilis* y (Sav 1866) de *S. aureus*, cuya estructura cristalográfica de rayos X tuvo un impacto importante en los estudios de los transportadores ABC (Nikaido, 2009).

2. Familia (MFS)

Esta familia de bombas (por sus siglas en inglés Major facilitator superfamily) la forman varias subfamilias en las cuales los transportadores de azúcar y fármacos

son los más numerosos. Trabaja con un sistema antiporte impulsado por protones y los transportadores están compuestos de 400 residuos de aminoácidos (Borges-Walmsley, 2003). QacA y QacB están compuestos por 14 segmentos transmembranales y fueron los primeros ejemplos de esta clase. Estas bombas expulsan activamente biocidas y tintes monocatiónicos tales como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio y bromuro de etidio. Otro transportador de múltiples fármacos que pertenecen a esta rama es EmrB de *E. coli*, que confiere resistencia a desacoplantes tales como el carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona y a los antibióticos tales como el ácido nalidíxico y la tiolactomicina. En *S. aureus* está presente (NorA) que es un transportador compuesto por 12 segmentos transmembranales que produce resistencia a las fluoroquinolonas así como también a tintes catiónicos e inhibidores catiónicos incluyendo la puromicina y el tetrafenilfosfonio (Nikaido, 2009).

3. Familia (MATE)

(Multidrug and toxic-compound extrusion). Estos transportadores son similares a los MFS, ya que están compuestos por 450 residuos de amoniácidos; utilizan un sistema antiporte impulsado por Na^+ (Borges-Wamsley, 2003). En *Vibrio parahaemolyticus* se encontró un sistema antiporte de multifármacos impulsado por iones de Na^+ que le confiere resistencia a las fluoroquinolonas, los colorantes y los aminoglucósidos. Otro trasportador de esta familia fue encontrado en *E. coli* llamado YdhE el cual le confiere resistencia a la bacteria contra antimicrobianos catiónicos.

4. Familia (SMR)

(Small multidrug resistance) fueron originalmente descubiertos y codificados en plásmidos de *S.aureus* y subsecuentemente fueron encontrados en cromosomas de bacterias Gram negativas. Estas proteínas trabajan con un sistema antiporte impulsado por protones y expulsan compuestos como biocidas cuaternarios de amonio o etidio. Representan a las proteínas conocidas más pequeñas ya que contienen sólo cuatro sitios transmembranales en una secuencia de 110 residuos de aminoácidos. En *E. coli* se conoce el transportador ErmE el cual ha sido extensamente estudiado. Este tiene sólo un residuo cargado en los segmentos transmembranales de glucosa (Glut14). Cuando el transportador se encuentra con el sustrato, este residuo se desprotona y en su lugar se une el sustrato (Nikaido, 2009).

5. Familia (RND)

La familia (Resistance nodulation división) trabaja con un sistema antiporte impulsado por protones y tiene transportadores que juegan un papel muy importante en la multirresistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas ya que estas bombas están asociadas con otras dos clases de proteínas. Esto puede ilustrarse con el canal de la membrana externa en *E.coli* ejemplificado por TolC. La familia de las proteínas OMF (factor de membrana externa, por sus siglas en inglés) y la proteína adaptadora periplásmica como AcrA de *E. coli* y MexA de *P. aeruginosa*, están clasificados en la familia MFP (proteína de fusión de la membrana, por sus siglas en ingles). La asociación de estas proteínas fue confirmada por estudios de entrecruzamiento químico y por el aislamiento del complejo que contiene a las tres proteínas. Esta construcción permite la exportación directa de fármacos al medio externo, en lugar del espacio periplásmico. Esto es una gran ventaja porque una vez que sean exportados al espacio externo las moléculas antimicrobianas deben atravesar la barrera de la membrana externa para volver a entrar en las células bacterianas. Algunas

bombas RND muestran una amplia especificidad de sustrato. En *E.coli* con el transportador AcrB puede bombear hacia afuera no sólo a la mayoría de los antibióticos comunes como (la acriflavina, el cloranfenicol, las cefalosporinas, las fluoroquinolonas, los macrólidos, la novobiocina, las penicilinas, las tetraciclinas y el trimetoprim) sino también colorantes como el cristal violeta, los detergentes como el dodecil sulfato de sodio, e incluso el bromuro de etidio (Nikaido, 2009).

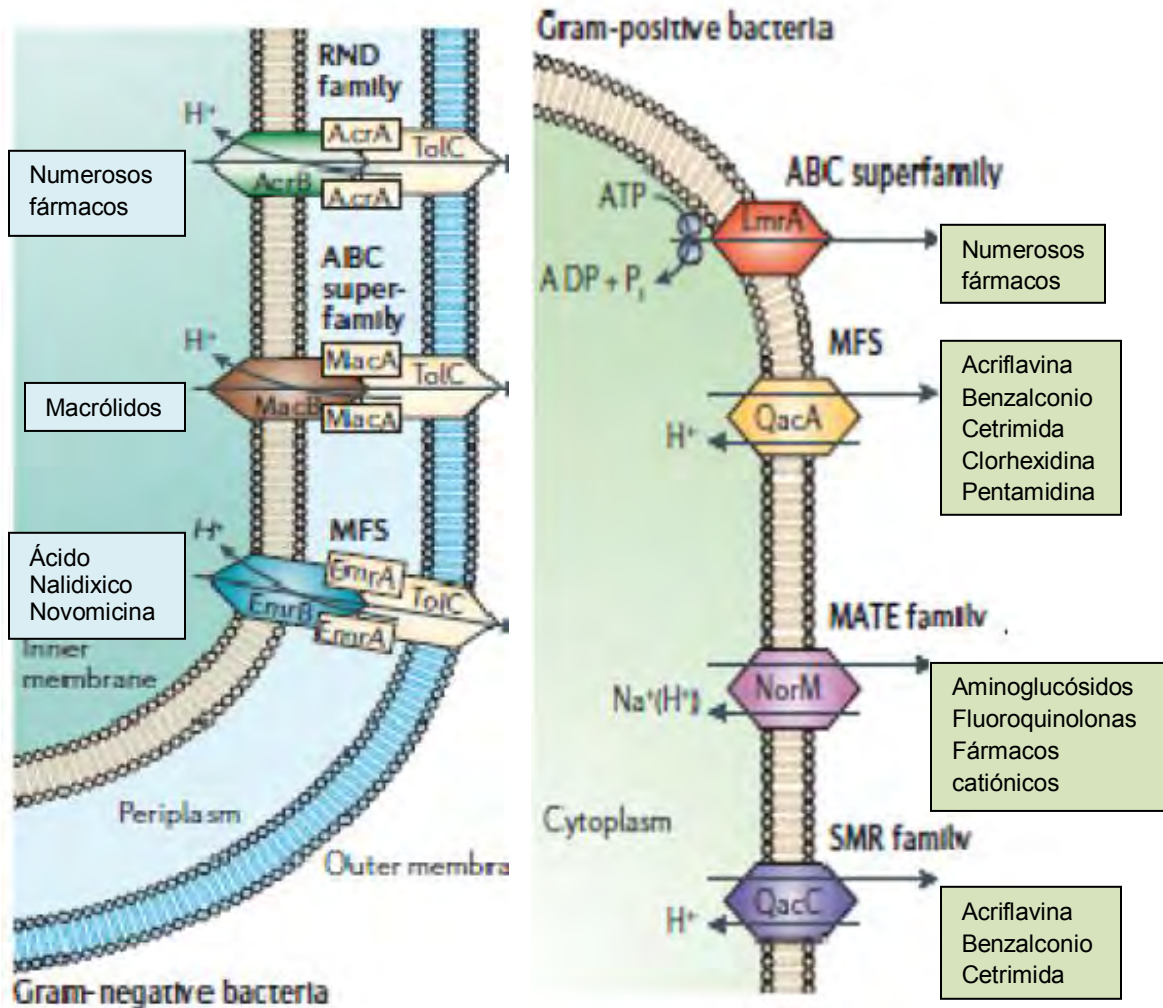


Figura 9. Representación esquemática de la estructura de la membrana y la ubicación de las 5 diferentes familias de bombas de expulsión (Pidcock, 2006).

Debido a todos los mecanismos moleculares de resistencia adquirida que poseen las bacterias y sumados los recientes mecanismos intrínsecos que son muy complejos, se ha sugerido que la síntesis de nuevas moléculas de antibióticos no parecería ser la mejor opción para tratar a la multirresistencia.

La búsqueda de nuevas alternativas para aminorar este problema se ha convertido en una necesidad, por lo cual este estudio presenta el uso de una de las tantas especias naturales como la canela, que con sus diferentes propiedades podría ser utilizada como una nueva opción para el tratamiento contra bacterias multirresistentes a antibióticos.

1.3 *Cinnamomum zeylanicum*

Cinnamomum zeylanicum conocida tradicionalmente como canela es una especia; a las especias se les puede definir como "cualquier sustancia seca, fragante, aromática o un vegetal pungente" o en general a la sustancia de una planta, ya sea en la forma en que se encuentre, cuya función principal es como condimento ya que contribuye al sabor ya sea picante o no de los alimentos y/o bebidas en la nutrición humana. (Sherman y Billing, 1998).

De acuerdo a su descripción botánica proviene del género *Cinnamomum* y de la familia de las *Lauraceae* o familia del Laurel. Su nombre científico es *Cinnamomum verum* ó *Cinnamomum zeylanicum blume*.

El género *Cinnamomum* comprende aproximadamente 250 especies que se distribuyen ampliamente en China, India y Australia. *Cinnamomum cassia*, otra especie de canela, también se le llama canela china que ha sido encontrada tanto en estado silvestre como en forma de cultivo en el sudeste asiático desde la edad antigua y luego fue introducida en Indonesia, América del Sur y Hawai. *Cinnamomum zeylanicum* se originó en la isla de Sri Lanka y la India. Entre las principales especies de valor económico alto están *C. cassia* y *C. burmannii* (Yang, Wang y Wang , 2009).

Sus árboles y arbustos están formados de hojas perennes aromáticas (Fig. 10). Los arboles crecen hasta 20 m de altura con ramas jóvenes que son lisas de color marrón. Sus hojas son opuestas, coriáceas, ovadas con tres (rara vez con cinco) venas prominentes. Las hojas jóvenes son de color rojizo y más tarde se vuelven de color verde oscuro. Sus flores son pequeñas, de color amarillo pálido y nacen en panículas axilares o terminales. El fruto es carnoso, drupa ovoide, que contiene una semilla y se vuelve de color púrpura oscuro o negro cuando está maduro (Barceloux, 2008). Su corteza es más suave cuando el arbusto aun no es tan maduro, mientras que se va endureciendo conforme va su madurando.



Figura 10. Planta de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

1.3.1 Historia

La canela ha sido utilizada como una especia desde hace miles de años, ya que se han encontrado diferentes referencias antiguas como por ejemplo la Biblia (Barceloux, 2008).

En Egipto la canela era una especia utilizada como un fluido para embalsamar a sus muertos y también se utilizaba en la medicina ayurvédica. La corteza de canela era usada como un estimulante antiemético, antidiarréico, y en general para las flatulencias. También fue uno de los primeros tratamientos para la bronquitis. Otros usos tradicionales crónicos incluían el tratamiento de la impotencia, la frigidez, la disnea, la inflamación del ojo, la leucorrea, la vaginitis, el reumatismo y la neuralgia, así como para las heridas y los dolores de muelas (Barceloux, 2008).

1.3.2. Usos y Propiedades

Algunas plantas y especias se han caracterizado por ser ricas en aceites esenciales los cuales a su vez tienen otros usos como aromatizantes, perfumes, fragancias y productos farmacéuticos (por sus propiedades funcionales).

Desde la antigüedad se cree que ya existía la destilación para la obtención de estos aceites esenciales como la trementina ya que fue mencionada por los historiadores griegos y romanos. La destilación fue utilizada por primera vez como método de producción de aceites esenciales en el medio Oriente (Egipto, India y Persia) hace más de 2000 años y fue mejorada en el siglo IX por los árabes. El primer relato escrito que existió de la destilación del aceite esencial se atribuye a Villanova (Burt, 2004).

En la actualidad existen diferentes métodos para destilar aceites esenciales como el arrastre por vapor y la hidrodestilación. El primero, es uno de los métodos más conocidos desde hace ya varias décadas ya que así se obtenían los primeros aceites esenciales para la realización de los perfumes. En cuanto a la hidrodestilación, es un método ampliamente utilizado actualmente para la extracción de compuestos volátiles de diferentes tipos de plantas y especias. Aunque tiene algunas desventajas tales como la pérdida de algunos compuestos volátiles, bajo nivel de la eficiencia de extracción y la posible degradación de los compuestos químicos insaturados mediante efectos térmicos o hidrolíticos. Sin embargo, se utiliza ya que da mejores resultados de extracción así como por su

conveniencia costo-efectividad en comparación con el método de la destilación de arrastre por vapor (Yang et al., 2009).

La destilación se puede definir como la separación de los componentes de una mezcla de dos o más líquidos en virtud de la diferencia en su presión de vapor (Guenther, 1948).

Los aceites esenciales varían ampliamente en cuanto a su composición y puntos de ebullición. Cada sustancia con un punto de ebullición determina la volatilidad y posee una presión de vapor definida que depende de la temperatura predominante y que es muy baja en el caso de sustancias con un muy alto punto de ebullición. Por lo tanto, se puede considerar la intensidad de un olor, en cierta medida y con muchas excepciones, como una manifestación de la volatilidad (punto de ebullición y presión de vapor) de la sustancia que emite el olor (Guenther, 1948).

Los componentes individuales o en conjunto de los aceites esenciales se utilizan como saborizantes y conservadores de alimentos aunque su uso como conservadores se ve limitado debido a los sabores asociados que pueden alterar el sabor de la comida o las bebidas. Sin embargo, la utilización de estos como conservadores naturales funciona y afectan el crecimiento de los microorganismos y puede dar lugar a nuevas tecnologías para su uso en el mantenimiento de la calidad de los alimentos y en general como agente antimicrobiano (Mau y Chen, 2001).

1.3.3. Química del aceite esencial de canela

Se han explorado compuestos de origen natural y otros productos naturales con propiedades antimicrobianas como las de algunas especias que contienen aceites esenciales como es el caso del clavo que en su aceite esencial contiene una sustancia llamada eugenol, en el ajo la alicina, y en el caso de la canela el aldehído cinámico y el eugenol (Figs. 11 y 12). Un estudio demostró que estos dos compuestos tuvieron propiedades inhibitorias contra *Aspergillus flavus* (Chang y Cheng, 2001).

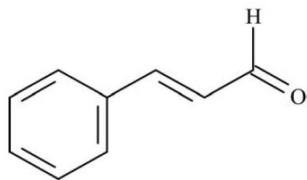


Figura 11.

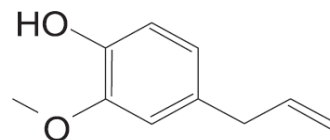


Figura 12.

Estructura química del cinamaldehído

Estructura química del eugenol

La corteza de las plantas *Cinnamomum* también contienen taninos condensados, es decir, dímeros, trímeros y un alto contenido de las proantocianidinas oligoméricas (poliméricos flavan-3-oles) (Shan, Corke y Brooks, 2007).

Las propiedades antibacterianas de la canela en rama no solo están dadas por la contribución de los aceites esenciales (cinamaldehído), sino también por la contribución de los componentes no volátiles (proantocianidinas).

Los compuestos fenólicos contenidos en los aceites esenciales parecen ser los principales responsables de las propiedades antibacterianas (Burt, 2004). Numerosas publicaciones que se han realizado con estudios más sofisticados como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas han presentado datos sobre la composición del aceite esencial de canela (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes del aceite esencial de canela *C. zeylanicum* (Yang et al., 2009).

	Compuesto	Porcentaje (%)
Alcoholes	Bencenometanol	0.16
	Linalool	0.14
	Benzenoetanol	0.10
	Borneol	0.92
	α – Terpineol	0.15
	Benzenopropanol	0.07
	4-(2-Propenilfenol)	0.28
	Cinamyl alcohol	0.07
	Eugenol	79.75
	Cis-isoeugenol	0.05
Aldehídos	Hidrocinnamaldehído	0.04
	Benzaldehído	0.05
	Trans-cinamaldehído	16.25
	Vainillina	0.10
Alcano	Neohexano	0.01
Alquenos	5-(2-Propenil)-1,3-benzodioxol	0.47
	3-Metilbenzotiofeno	0.01
Éter	(3-Etoxi-hexa-1,5-dienil)-benzeno	1.14
Cetonas	Cumarina	0.05
	p-Vinilbenzohidrazida	0.12
Sulfuros	Dipropilsulfona	0.01

Por otro lado se han realizado más de 500 reportes, los cuales han arrojado resultados acerca del efecto antimicrobiano que causa el aceite esencial de canela en diferentes tipos de bacterias (Kalemba y Kunicka, 2003).

Un estudio demostró que la rama de canela y sus principales componentes ((E)-cinamaldehído y proantocianidinas) poseían significativamente propiedades antibacterianas *in vitro* contra bacterias transmitidas por los alimentos (Shan, et al., 2007).

Otro estudio reportó que varios aceites esenciales provenientes de las cortezas de *Corydothymus capitatus*, *C. cassia*, *C. verum*, *Satureja montana* y *Origanum heracleoticum* fueron los más activos contra 4 bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Lacroix y Ouussalah 2007).

Bacillus cereus, una bacteria Gram positiva, también fue inhibida por 11 aceites esenciales, entre ellos el aceite esencial de canela el cual fue el que mostró el mejor efecto de inhibición de las esporas de este microorganismo (Valero y Salmerón, 2003).

En el 2010 un estudio probó aceite esencial de canela (*C. zeylanicum* Blume) frente a 21 bacterias y 4 especies de *Candida* mostrando una fuerte actividad antimicrobiana contra estos (Unlu Zeytinoglu y Ergene, 2010). Mientras que en el 2011 se reportó que el aceite esencial de canela dio resultados prometedores en cuanto a la inhibición de bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *S. aureus* y en Gram negativas como *E. coli* y *S. typhimurium* (Lu y Ding, 2011).

1.3.4 Mecanismos de acción

Al tener en cuenta que el aceite esencial de canela está compuesto por diferentes clases de compuestos químicos lo más probable es que su actividad antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico (Fig. 13).

Una característica importante de los aceites esenciales y sus componentes es su hidrofobicidad, ya que les permite un desacomodo en los lípidos de la membrana

de la célula bacteriana haciendo una perturbación de la estructura y la permeabilidad (Burt, 2004).

Otros efectos pueden incluir la inhibición de la fuerza protón motriz, la inhibición de la cadena respiratoria y la transferencia de electrones, así como la inhibición de la oxidación de sustratos. También puede causar desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, la inhibición del transporte activo, la pérdida de los metabolitos de la célula y la interrupción de la síntesis de ADN, ARN, proteínas, lípidos y polisacáridos. También puede provocar daños en las células causando poros o deformidades (Shan et al., 2007).

Otros autores han observado una distorsión de la estructura física de las células bacterianas pudiendo causar una expansión y una desestabilización de la membrana y como consecuencia la fluidez de la membrana incrementando la permeabilidad causando una fuga de diversos constituyentes intracelulares vitales tales como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos ocasionando la muerte celular o la iniciación de los procesos autolíticos (Shan et al., 2007). Se cree que no todos estos mecanismos son independientes, ya que algunos se ven afectados como consecuencia de otro mecanismo.

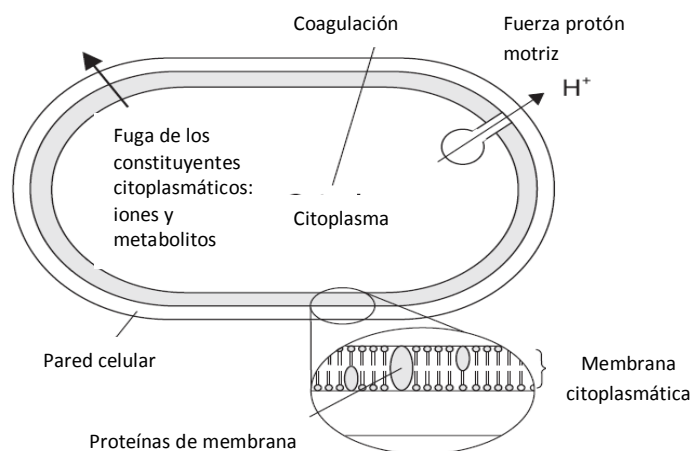


Figura 13. Sitios y mecanismos en la célula bacteriana donde el aceite esencial de canela podría actuar (Burt, 2004).

Los mecanismos de acción de los agentes antibacterianos dependen del tipo de microorganismos y están relacionadas principalmente con la estructura de la pared celular y la disposición de la membrana externa.

Muchos estudios previos indicaron que la mayoría de los extractos de especias fueron más activos frente a bacterias Gram positivas que en bacterias Gram negativas como en el caso de *P. aeruginosa* que muestra una resistencia intrínseca a una amplia variedad de aceites esenciales debido a las diferencias de la pared celular y su membrana externa rica en moléculas de lipopolisacárido (Shan et al., 2007). En bacterias Gram negativas la acción de los aceites esenciales afecta a la pared celular bacteriana y la membrana citoplásmica, lo que resulta en una fuga del citoplasma (Kalemba et al., 2003).

De acuerdo a los diferentes mecanismos y propiedades antibacterianas que tiene el aceite esencial de canela se podría optar para diferentes usos, uno de ellos como conservador de alimentos y así prevenir las enfermedades transmitidas por bacterias multirresistentes a antibióticos y quizá como agente terapéutico contra enfermedades causadas por bacterias multirresistentes a diferentes antibióticos.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de diferentes alimentos para consumo humano.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinación del método de destilación más favorable para la obtención de aceite esencial de canela ya sea hidrodestilación o por arrastre de vapor.
2. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela sobre diferentes cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos.
3. Determinación de la cantidad mínima requerida del aceite esencial de canela para causar inhibición en cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos.
4. Búsqueda de algunos de los compuestos del aceite esencial de canela, responsables de la inhibición de las bacterias multirresistentes.

2.3. HIPÓTESIS

Debido a que el aceite esencial de canela (*C. zeylanicum*) ha mostrado efecto antibacteriano sobre algunas cepas de bacterias tipo es posible que también tenga efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de alimentos para consumo humano.

2.4. JUSTIFICACIÓN

El fenotipo de multirresistencia por parte de las bacterias se ha presentado desde hace ya algunas décadas, más comúnmente en los ambientes intrahospitalarios, probablemente debido al mal uso de los agentes antimicrobianos. Este problema no solo se hizo presente en este ámbito sino que traspasó fronteras, llegando a los animales destinados para consumo humano, los cuales son muy buenos reservorios de genes de resistencia. Varios estudios han demostrado que carne de pollo y carne de res se encuentren contaminadas por estos microorganismos (White y Zhao, 2001).

En el 2009 en Estados Unidos la FDA y el presidente de ese país se comprometieron a ponerle fin al uso de antibióticos que son directamente suministrados a estos animales y así generar un decremento sobre la utilización de éstos y reducir el problema de la multirresistencia a los antibióticos en alimentos para consumo humano (Loglisci, 2010).

Por otro lado, en México se han hecho ya varios estudios del comportamiento de bacterias y otros organismos como los hongos frente al efecto de diferentes aceites esenciales pero no su efecto en cepas silvestres multirresistentes a antibióticos aisladas de alimentos para consumo humano. Por lo tanto este estudio pretende presentar una alternativa natural para la prevención o el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos, en donde el uso de éstos ya no es suficiente y también como una medida para preservar la inocuidad de los alimentos.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Selección de cepas multirresistentes

Se trabajó con 9 cepas multirresistentes a antibióticos congeladas y previamente aisladas y caracterizadas. Estas cepas provenían de carne de pollo para consumo humano y se encontraban etiquetadas como: R4, R5, R25, R34, PG6¹, PC2, PC4, PG4², PG10¹. Para su descongelación se dejaron en un refrigerador a 7°C (aproximadamente) durante 24 h. La reactivación de las cepas se hizo tomando 150 µL de inóculo de cada cepa y se resembraron en caldo Luria (3 mL en cada tubo) incubándolas 24 h a 37°C. Este procedimiento se realizó durante 6 días consecutivos.

3.2. Purificación de las cepas

Cada cepa inoculada se resembró en medios de cultivo selectivos y diferenciales como agar Mc McConkey y Manitol Sal Agar para descartar cualquier cepa contaminante y así poder observar su morfología.

3.3. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Una vez reactivadas las cepas puras se inocularon 150 µL en un medio enriquecido para tener cultivos jóvenes de 24 h y así poder realizar las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Esto se realizó en agar Müller-Hinton por la metodología de Bauer-Kirby. Las cepas fueron ajustadas a una densidad de 0.5 unidades Mc Farland (1×10^8 cel/mL). Tras 24 h de incubación a 37°C se midieron los halos de inhibición de los diversos antibióticos colocados (12 antibióticos, kit comercial de Investigación Diagnóstica®). Se determinó que 5 cepas (PG4², PC2, PC4, R4, R5) presentaron resistencia a al menos 5 antibióticos.

3.4. Pruebas Bioquímicas

Una vez purificadas las 5 cepas, se realizaron pruebas bioquímicas convencionales para bacilos Gram negativos.

3.5. Obtención del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

El aceite esencial de canela se obtuvo mediante dos métodos de destilación: arrastre por vapor e hidrodestilación.

3.5.1 Arrastre por vapor

En el primer caso se utilizaron 30.0 g de canela (adquirida de venta al menudeo en el mercado (Merced) al centro de la ciudad), estos se molieron y se colocaron en un matraz de 250 mL y en otro matraz de 250 mL se colocaron 170 mL de agua. Después se montó el equipo Quickfit® poniendo un mechero debajo del matraz que contenía el agua y conectando este con el segundo matraz que contenía la canela molida por medio de un puente de manguera; se colocó el colector en el segundo matraz para obtener el destilado. El tercer matraz que recibió el destilado fue tapado con papel aluminio (Fig. 14).

La muestra se comenzó a calentar y pasados 40 min cayó la primera gota. Al pasar otros 40 min se colectó aproximadamente 120 mL de destilado y se suspendió el calentamiento. Del destilado se extrajo totalmente el aceite esencial con 10 mL de acetato de etilo. Esta mezcla se agitó 10 seg y se dejó reposar por 30 min. Al tener las fases separadas, la fase orgánica se colectó en un vial y la fase acuosa se desechó.

A la fase orgánica se le agregó sulfato de sodio anhidro suficiente para remover el agua remanente. La muestra se decantó y el aceite esencial se recolectó en otro vial color ámbar ya que la luz podía oxidar dicho aceite. Se dejó reposar a 25°C durante 3 días para eliminar el acetato de etilo; si el aceite se deja reposar a una temperatura más alta el aceite puede comenzar a oxidarse.

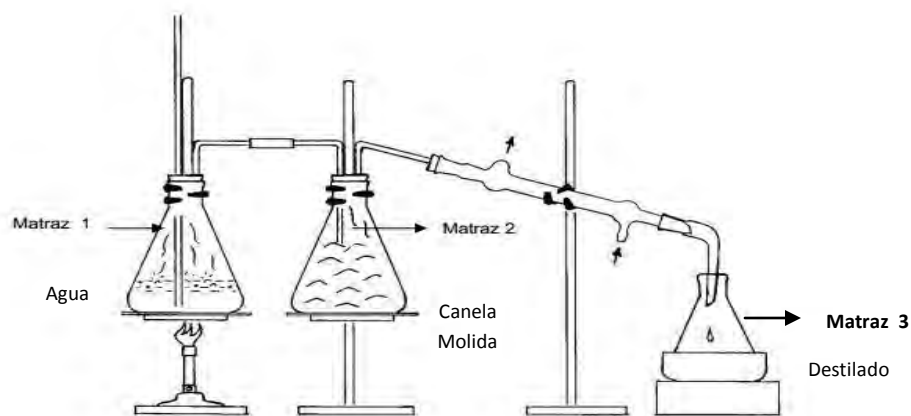


Figura 14. Equipo para destilación por arrastre de vapor.

3.5.2 Hidrodestilación

Para el caso de la hidrodestilación, se colocaron 60.0 g de canela en un matraz de bola con fondo plano de 500 mL. Se añadieron 320 mL de agua y se montó el equipo colocando el matraz en la parrilla de calentamiento sosteniéndolo con unas pinzas. Se colocó una trampa tipo Cleverger y el refrigerante (Fig. 15). Se calentó hasta ebullición por aproximadamente 2 h 30 min a 3 h (la muestra debe estar en agitación constante, de no ser así ésta comenzaba a quemarse). El aceite emulsificado comenzó a caer en la bureta recolectando aproximadamente 1mL. Se extrajo totalmente el aceite esencial con 3mL de acetato de etilo. Esta mezcla se agitó 10 seg y se dejó reposar por 10 min. Al tener las fases separadas, la fase orgánica se colectó en un vial y la fase acuosa se desechó.

A la fase orgánica se le agregó sulfato de sodio anhidro suficiente para remover el agua remanente. La muestra se decantó y el aceite esencial se recolectó en otro vial color ámbar ya que la luz podía oxidar el aceite; se dejó a 25°C durante 3 días para eliminar el acetato de etilo. Si el aceite se dejaba reposar a una temperatura más alta, el aceite podía comenzar a oxidarse. Al aceite obtenido por este método se le realizó cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas el cual fue realizado por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química (USAI).

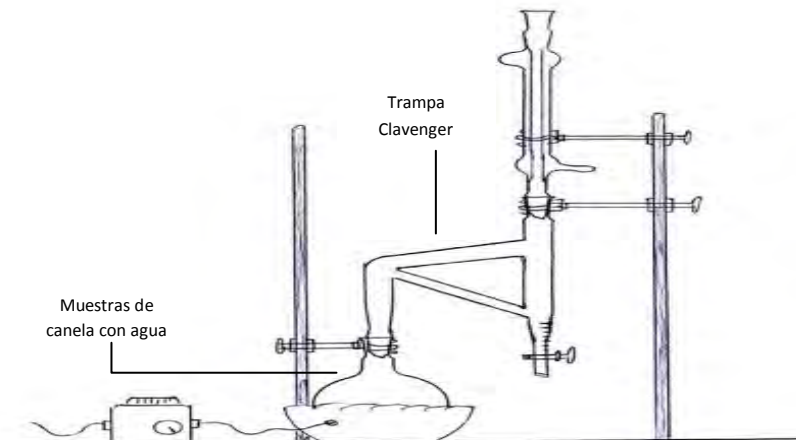


Figura 15. Equipo para hidroddestilación con trampa de Clavenger.

3.6. Pruebas de susceptibilidad con aceite esencial de canela (*C. zeylanicum*)

1. Prueba de difusión en agar

Se resembró cada cepa con 150 μL de inóculo en medios de cultivo enriquecidos como caldo nutritivo para obtener cultivos jóvenes de 24 h. Siguiendo la metodología de Bauer-Kirby ya antes descrita, las cepas fueron ajustadas a una densidad de 0.5 Unidades Mc Farland ($1 \times 10^8 \text{ cel/mL}$). Se inóculó la cantidad necesaria de células en cajas de petri con 20 mL de agar nutritivo. Una vez inculadas las cinco cepas, en cada caja se colocaron 4 discos de papel filtro impregnados con 20 μL del aceite esencial de canela y un disco con 20 μL de aceite mineral en el centro de la caja como control negativo (Fig. 16). Las cajas fueron incubadas durante 24 h a 37°C y finalmente se observaron y midieron los halos de inhibición producidos por el aceite.

2. Determinación de la cantidad mínima requerida de aceite esencial

Para este método una vez inoculadas las cajas de Petri se colocaron 4 discos de papel filtro impregnados con diferentes cantidades de aceite esencial de canela (5, 10, 15 y 20 μL) mientras que en otras cajas se colocaron 4 discos de papel filtro con cantidades menores (1, 2, 3, 4 μL) del mismo aceite esencial y 1 disco con aceite mineral como control negativo en cada cepa para determinar la cantidad mínima capaz de producir halos de tamaño significativos (Fig. 17).

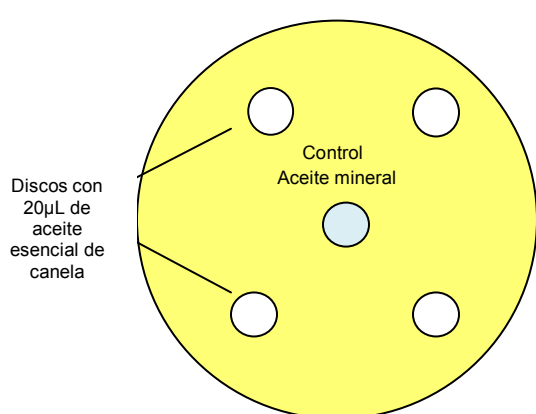


Figura 16. Cajas Petri con discos de 20 μL de aceite esencial.

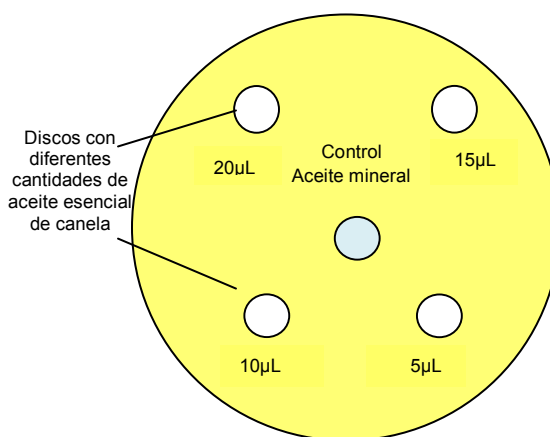


Figura 17. Cajas Petri con discos impregnados con 5, 10, 15 y 20 μL de aceite esencial.

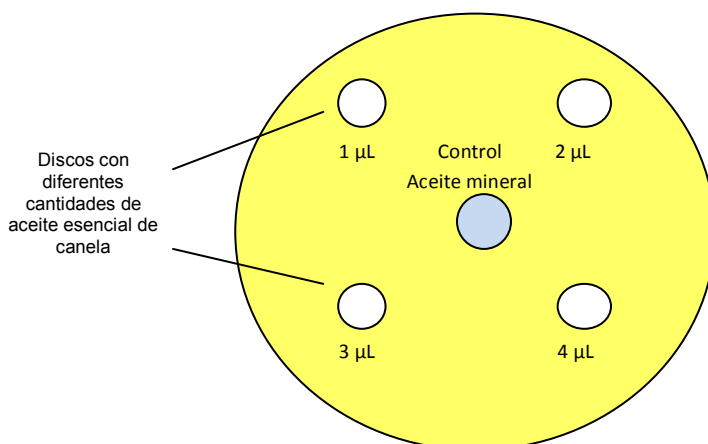


Figura 18. Cajas Petri con discos impregnados con 1, 2, 3, y 4 μL de aceite esencial.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Purificación de cepas

Resembradas las 9 cepas se observó crecimiento únicamente en agar McConkey en donde se encontraron bacilos Gram negativos. Con el crecimiento de éstas cepas se pudo observar la morfología macroscópica de cada una, resultando muy similares entre sí (Ver anexo 1), solo se notaban dos tipos de colonias: unas de color blancas, redondas, con elevación convexa, cremosas, uniformes e iguales, con textura butirosa, mientras las otras colonias eran de bordes irregulares y textura seca. Cada una de las cepas fue examinada detalladamente al microscopio.

4.2. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Se determinó la resistencia a antibióticos de cada cepa mediante el método de Bauer-Kirby colocando en cajas Petri con agar Muller-Hinton ya inoculadas, multidiscos con 12 diferentes antibióticos (Tabla. 3).

Tabla 3. Antibióticos utilizados en los antibiogramas.

Amikacina (AK)	Cloranfenicol (CL)
Ampicilina (AM)	Gentamicina (GE)
Carbenicilina (CB)	Netilmicina (NET)
Cefalotina (CF)	Nitrofurantoína (NF)
Cefotaxima (CFX)	Norfloxacina (NOF)
Ciprofloxacina (CPF)	Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT)

Dichas cajas Petri se incubaron durante 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición producidos por los antibióticos (Fig.19). Los criterios utilizados para determinar la susceptibilidad o resistencia de las cepas fueron los siguientes: Halo < 1.5cm = resistente y halo > 1.5cm = sensible. Límites establecidos indicados en el kit comercial de Investigación Diagnóstica®

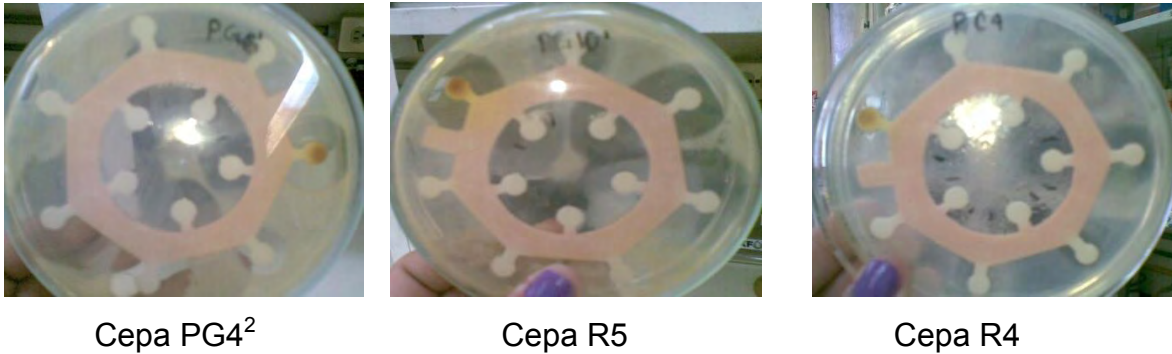


Figura 19. Antibiogramas

Una vez medidos los halos a las 9 cepas, se seleccionaron 5 cepas (PG4², PC2, PC4 especies *A. salmonicida* R4 especie *A. rmedia*, R5 de la familia *Enterobacteriaceae*) que tuvieran un mayor grado de multirresistencia (Fig. 20).

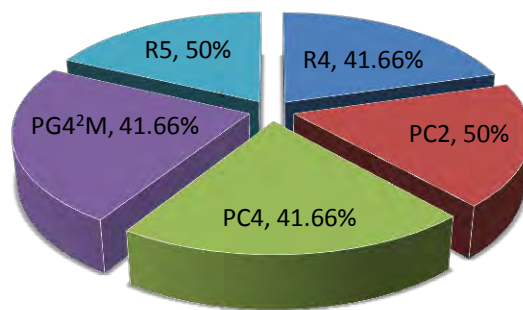


Figura 20. Porcentajes de resistencia de las 5 cepas seleccionadas. El 100% de resistencia se refiere a los 12 antibióticos probados, el 50% a un total de 6 antibióticos y el 41.66% representa el porcentaje de resistencia a 5 antibióticos.

Se obtuvo una relación entre el porcentaje de cepas que fueron resistentes a cada uno de los doce antibióticos (Fig.21).

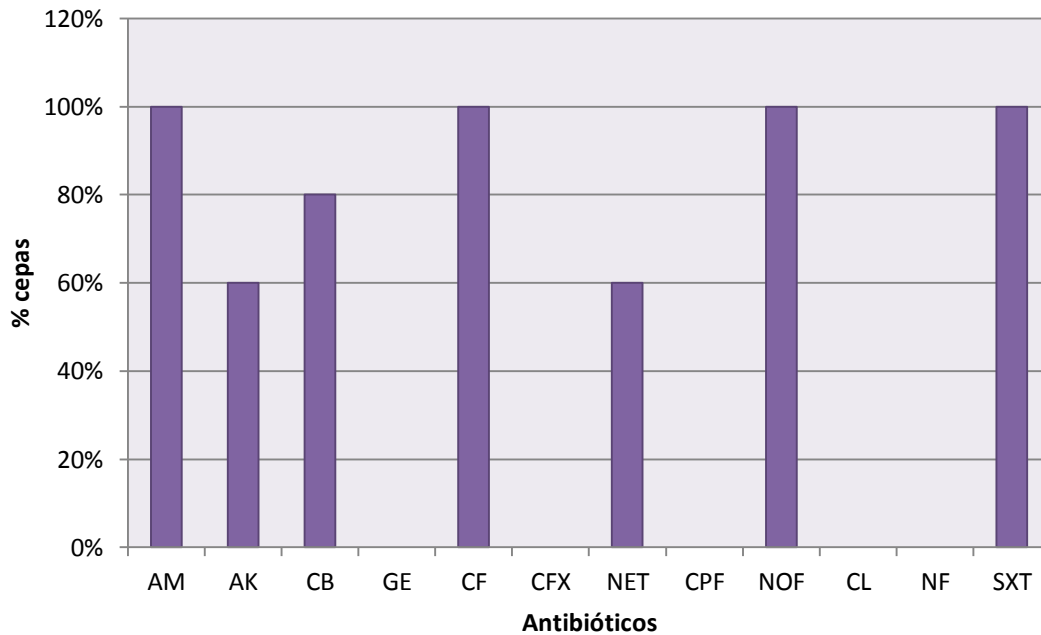


Figura 21. Porcentaje de resistencia a cada uno de los antibióticos.

4.3. Caracterización e identificación bioquímica

De acuerdo a los resultados que arrojaron las pruebas bioquímicas convencionales para cada una de las 5 cepas multirresistentes, (Ver anexo 2) se determinó que la cepa R4 pertenece al género *Aeromonas rmedia*, PC2, PC4, PG4² son del mismo género y pertenecen a *Aeromonas salmonicida* subesp *achromogenes*, y R5 a un organismo de la familia *Enterobacteriaceae sp.*

4.4. Obtención de destilados

1. Arrastre de vapor

Con el método de arrastre de vapor, se obtuvo una cantidad de menos de 2 μ L de aceite esencial, insuficiente para realizar las pruebas de susceptibilidad a éste.

2. Hidrodestilación

Siguiendo esta metodología se obtuvieron 400 μ L de aceite esencial de canela por cada 60 g de la misma. Esto se hizo de manera regular para la obtención de más aceite y sus usos posteriores.

4.5. Compuestos del aceite esencial de canela (*C. zeylanicum*) que se obtuvieron de la cromatografía de gases acoplado a masas

La cromatografía de gases se realizó a dos muestras de aceite esencial de canela, destilados en diferente día obtenido por hidrodestilación. Los resultados obtenidos corresponden a los compuestos volátiles contenidos en dicho aceite esencial (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Muestra 1. Componentes del aceite esencial de canela (USAI).

Nombre	Área %	Peso	Fórmula
2-Propenal, 3-phenyl-	16.36	132	C9H8O
2-Propenal, 3-phenyl-	15.222	132	C9H8O
2-Propenal, 3-phenyl-	15.222	132	C9H8O
2-Propenal, 3-phenyl-	15.217	132	C9H8O
2-Propenal, 3-phenyl-	15.217	132	C9H8O
Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-	4.1258	164	C10H12O2
Cyclobutanone, 3-phenylmethyl-	4.1258	160	C11H12O
2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate	2.8085	176	C11H12O2
à-Caryophyllene	2.8075	204	C15H24
Benzyl Benzoate	1.6117	212	C14H12O2
Benzylidenemalonaldehide	1.3478	160	C10H8O2
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1.0212	154	C10H18O
Caryophyllenyl alcohol	0.83368	222	C15H26O
n-Hexadecanoic acid	0.79183	256	C16H32O2
p-menth-1-en-8-ol	0.74765	154	C10H18O
Benzenepropanal	0.64879	134	C9H10O
Caryophyllene	0.57114	204	C15H24
1,4-Naphthoquinone, 2-acetyl-3,5,8-trihydroxy-6-methoxy-	0.54783	278	C13H10O7
Hydroxylamine, O-(phenylmethyl)-	0.35046	123	C7H9NO
Benzene, 1,1'-(1,3-propanediyl)bis-	0.16434	196	C15H16
Boroxin, tripropyl-	0.1241	210	C9H21B3O3
Benzoic acid, 2-phenylethyl ester	0.095419	226	C15H14O2
1,4-Pentadiene, 2,3,3-trimethyl-	0.037505	110	C8H14

Tabla 5. Muestra 2. Componentes del aceite esencial de canela (USAI).

Nombre	Area %	Peso	Fórmula
2-Propenal, 3-phenyl-	32.183	132	C ₉ H ₈ O
2,2'-Biphenylene dicinnamate	31.418	446	C ₃₀ H ₂₂ O ₄
2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate	6.3488	176	C ₁₁ H ₁₂ O ₂
1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-	6.2905	136	C ₁₀ H ₁₆
Eugenol	3.6659	164	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)	3.6659	204	C ₁₅ H ₂₄
Benzenepropanamine	3.6659	135	C ₉ H ₁₃ N
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1.8909	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Caryophyllene	1.5885	204	C ₁₅ H ₂₄
Benzyl Benzoate	1.5513	212	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
Benzylidenemalonaldehide	1.2291	160	C ₁₀ H ₈ O ₂
p-menth-1-en-8-ol	1.0458	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Benzenemethanol, à,à,4-trimethyl-	1.0451	150	C ₁₀ H ₁₄ O
Caryophyllenyl alcohol	0.94473	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Caryophyllene oxide	0.94473	220	C ₁₅ H ₂₄ O
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	0.78264	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Benzenepropanal	0.77104	134	C ₉ H ₁₀ O
n-Hexadecanoic acid	0.20328	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
à-Phellandrene	0.20328	136	C ₁₀ H ₁₆
Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	0.14326	136	C ₁₀ H ₁₆
2-Cyclohexen-1-ol, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-, trans-	0.13306	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Benzene, (5-iodopentyl)-	0.099402	274	C ₁₁ H ₁₅ I
à-Phellandrene	0.093592	136	C ₁₀ H ₁₆
Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	0.053757	204	C ₁₅ H ₂₄
1,4-Pentadiene, 2,3,3-trimethyl-	0.03879	110	C ₈ H ₁₄

4.6. Pruebas de sensibilidad con aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Como se mencionó antes, estas pruebas se realizaron por el método de Bauer-Kirby en cajas con agar nutritivo, utilizando discos de papel filtro impregnados con 20 µL del aceite esencial de canela (Fig. 22).

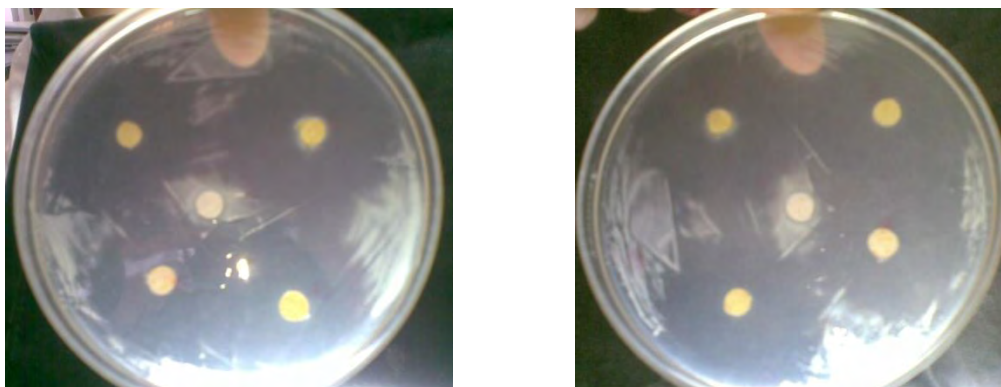


Figura 22. Halos de inhibición originados por el aceite esencial de canela en dos de las cepas probadas *A. salmonicida* (PC4) y una cepa de la familia *Enterobacteriaceae* (R5).

En la tabla 6 se muestra el tamaño de los halos medidos en centímetros producidos con 20 µL de aceite esencial de canela en cada una de las 5 cepas que fueron resistentes a antibióticos.

Tabla 6. Tamaño de los halos ocasionados por el aceite esencial de canela en cada cepa.

Cepas	R4	PC2	PC4	PG4 ²	R5
Tamaño de los halos	3.4 cm	2.9 cm	3.0 cm	2.6 cm	3.0 cm

Una vez que se comprobó que hubo inhibición del crecimiento bacteriano con 20µL del aceite esencial de canela se prosiguió a probar diferentes cantidades del mismo.

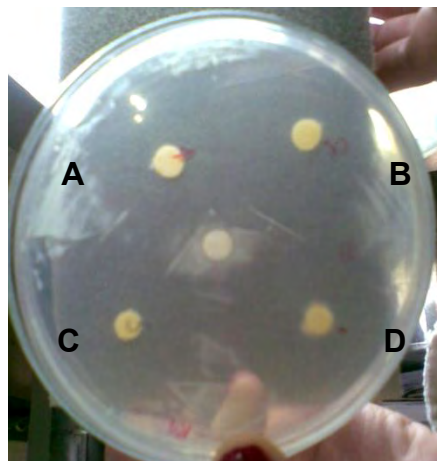


Figura 23. Halos de inhibición originados en la cepa R4 con diferentes cantidades de aceite esencial de canela: A) 5µL, B) 10µL, C) 15µL y D) 20µL

En la tabla 7 se observa el tamaño de los halos producidos en cada cepa con diferentes cantidades del aceite esencial de canela.

Tabla 7. Tamaño de los halos ocasionados en cada cepa por las diferentes cantidades del aceite esencial de canela.

Cantidad de aceite esencial de canela	Cepas				
	R4	PC2	PC4	PG4 ²	R5
5µl	2.6 cm	1.9 cm	2.0 cm	1.9 cm	2.3 cm
10µl	3.0 cm	2.3 cm	2.2 cm	1.9 cm	2.5 cm
15µl	2.9 cm	2.5 cm	2.7 cm	2.2 cm	2.9 cm
20µl	3.3 cm	3.1 cm	3.0 cm	2.8 cm	3.1 cm

Una vez que se comprobó que 5 μL del aceite esencial de canela originaba halos de tamaño significativo en las cinco cepas, se prosiguió a probar cantidades menores a esta. En las siguientes figuras se observan los halos producidos por 1, 2, 3 y 4 μL .

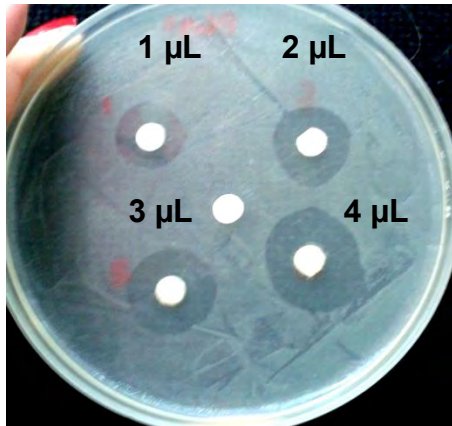


Figura 24. Ceba PG4²

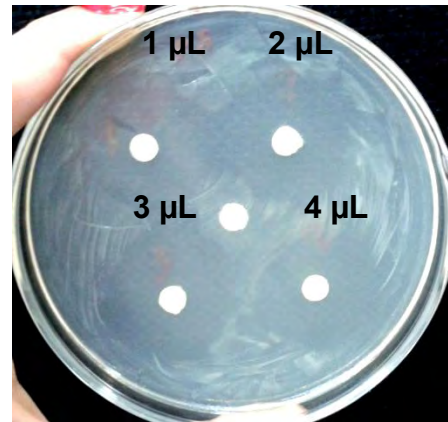


Figura 25. Ceba R4

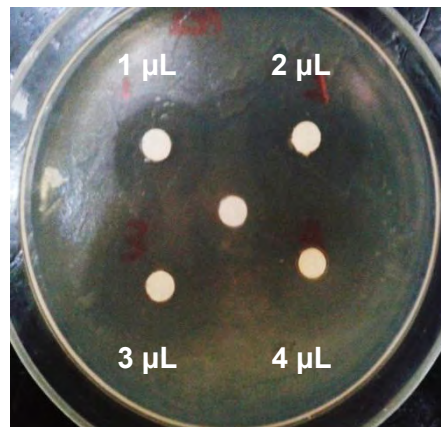


Figura 26. Ceba PC2

En la tabla 8 se muestra el tamaño de los halos originados en cada cepa con cantidades menores a 5 μL de aceite esencial de canela.

Tabla 8. Tamaño de los halos originados en cada cepa por las diferentes cantidades del aceite esencial de canela.

Cantidad de aceite esencial de canela	Cepas				
	R4	PC2	PC4	PG4 ²	R5
1 μL	2.2	2.4	1.9	1.4	-
2 μL	2.5	2.5	2.1	1.7	-
3 μL	2.5	2.7	2.4	1.9	-
4 μL	2.7	2.9	2.5	2.0	-

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Una vez purificadas las cepas de especie *A. salmonicida*, *A. rmedia* y una de la familia *Enterobacteriaceae* en medios de cultivos selectivos como agar McConkey, se identificaron bacilos Gram negativos que previamente se habían aislado de carne de pollo y carne de res para consumo humano. Estos microorganismos encontrados, de acuerdo a la literatura, son congruentes ya que los bacilos Gram negativos son propios de la flora intestinal de los animales y del humano que a su vez, a través de la manipulación de dichos alimentos, pueden originar una contaminación cruzada.

A las cepas puras se les realizaron las pruebas de susceptibilidad a diferentes antibióticos. En la figura 19 se observan los antibiogramas realizados mientras que en la figura 20 se puede observar que las cepas PC2 y R5 fueron resistentes al 66% de los antibióticos. Estos fueron: ampicilina, amikacina, cefalotina, netilmicina, trimetoprim/sulfametoxazol mientras que no fueron resistentes a carbenicilina. En el caso de las cepas PG4², PC4 y R4, éstas fueron resistentes al 50% de los antibióticos probados como la ampicilina, amikacina, carbenicilina, cefalotina, netilmicina, norfloxacin y trimetoprim/sulfametoxazol. Cabe destacar que las cinco cepas fueron resistentes a la ampicilina, antibiótico perteneciente a la familia de los β -lactámicos. Probablemente la resistencia a este antibiótico pudo aparecer debido a su uso desde hace ya varios años ya que fue el primer antibiótico utilizado desde la década de los sesentas de manera continua para el tratamiento de infecciones bacterianas. De igual modo se podría suponer en los casos de la amikacina y la netilmicina, aminoglucósidos que fueron de los pilares básicos de la quimioterapia antimicrobiana.

En la figura 21 se observa que las 5 cepas fueron resistentes a ampicilina, cefalotina, norfloxacin y a sulfametoxazol/trimetoprim. Cuatro de las cepas que representaron el 80% fueron resistentes a carbenicilina, mientras que el 60% de las cepas presentaron resistencia a amikacina y netilmicina y ninguna presentó resistencia a gentamicina, cefotaxima, ciprofloxacina, cloranfenicol ni a

nitrofurantoína. Las bacterias en estudio mostraron resistencia a una amplia gama de diferentes familias de antibióticos como son las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y las sulfonamidas. Encontrar este fenómeno de multirresistencia nos indica que el uso de los antibióticos en animales de criadero ya sea como promotores de crecimiento o la administración de dosis equivocadas crea un ambiente favorable para la aparición de estos microorganismos que aunque no son patógenos, pueden ser diseminados a través de la cadena alimenticia a los seres humanos y otros sectores como el agropecuario actuando como reservorio de genes de resistencia.

Algunos de los elementos genéticos móviles pueden ser los responsables de la multirresistencia a los antibióticos. Además, si se suman los mecanismos intrínsecos de las bacterias, como la sobreexpresión de las bombas de expulsión, ello podría generar la multirresistencia simultánea a diferentes familias de antibióticos. Debido a los múltiples mecanismos de resistencia, este estudio propuso una alternativa natural para combatir el fenotipo de resistencia a múltiples antibióticos.

En este último rubro, se escogió una especie como la canela (*C. zeylanicum*) que, como algunas especias, pueden contener cierta cantidad de aceite esencial y que a su vez tiene diversas propiedades antimicrobianas. Por el contrario, no hay estudios que revelen la inhibición de bacterias multirresistentes a diferentes antibióticos simultáneamente utilizando esta alternativa natural.

De esta manera, se decidió realizar experimentos utilizando los extractos de aceite esencial de canela obtenidos por destilaciones (arrastre de vapor e hidrodestilación). Se probó una cantidad de 20 μ L del aceite esencial de canela en cada cepa para experimentar su capacidad de inhibición. En la tabla 6 se puede observar el tamaño de los halos de inhibición ocasionados con dicha cantidad del aceite esencial de canela teniendo efectos de inhibición muy satisfactorios y destacando el hecho de que todas las cepas multirresistentes a antibióticos estudiadas fueron sensibles a dicho aceite.

Se observaron halos de inhibición de alrededor de 2.6 y 3.4 cm. Las cepas R4, PC4 y R5 fueron las más sensibles frente al aceite esencial de canela ya que sus halos midieron alrededor de 3.0 y 3.4 cm. En cuanto a la cepa PC2 su halo generado por el aceite fue de 2.9 cm mientras que en la cepa PG4² el halo causado por el aceite midió 2.6 cm pudiendo decir, que éstas cepas fueron menos sensibles frente al aceite esencial de canela. En la figura 22 se pudo observar el efecto inhibitorio del aceite esencial sobre dos de las cepas multirresistentes a antibióticos.

Una vez que se observó que con 20 μ L del aceite esencial se originaban halos de un tamaño satisfactorio, se procedió a probar diferentes cantidades del aceite esencial (5, 10 y 15 μ L). En la tabla 7 se presentan los tamaños de los diferentes halos generados en cada cepa y se observa que conforme la cantidad del aceite disminuye se generan halos de tamaño un poco menor, aunque es claro que eso no implicó que las cantidades de 5 y 10 μ L perdieran efecto inhibitorio ya que el halo inhibitorio más pequeño midió 1.9 cm con 5 μ L del aceite esencial de canela. De igual manera, se volvió a observar que las cepas PC2 y PG4² probadas con 5, 10, 15 y 20 μ L del aceite tuvieron halos de menor tamaño comportándose como un poco más resistentes a su efecto inhibitorio ya que presentaron halos de 1.9 cm el más pequeño. Las cepas que presentaron mayor sensibilidad fueron R4, PC4 y R5 ya que 5 μ L del aceite esencial fueron suficientes para ocasionar halos oscilando entre 2.6, 2.0 y 2.3 cm respectivamente. En la figura 23 se pueden observar los halos producidos en una de las cepas con las diferentes cantidades del aceite esencial de canela.

Puede verse que con 5 μ L del aceite esencial se originaban claros halos de inhibición por lo que se decidió probar si cantidades menores como 1, 2, 3 y 4 μ L tendrían un efecto de inhibición similar. En la tabla 8 se muestran los tamaños de los halos ocasionados con las diferentes cantidades del aceite. Se observa que con 1 μ L del aceite esencial de canela hubo halos mayores a 1.5 cm en tres de las cepas probadas las cuales fueron R4, PC4, y PC2 mientras que la cepa PG4² tuvo un halo de 1.4 cm considerándola no sensible ya que se necesitaron 2 μ L para

causar su inhibición; en el caso de la cepa R5 se observó que con cantidades menores a 5 μL como 1, 2, 3, y 4 μL no hubo presencia de halos de inhibición. En la figura 24 se observan los halos producidos en la cepa PG4², mientras que en las figuras 25 y 26 se observan dos de las cepas (R4 y PC2) con sus respectivos halos de inhibición.

Los resultados anteriores indican que los halos producidos en 3 de las cepas muestran una relación directamente proporcional, ya que al aumentar la cantidad de aceite esencial de canela el tamaño de los halos también se ve aumentado. Se observa que el tamaño de los halos generados por el aceite esencial de canela dependerá del tipo de cepa contra la que se esté probando

Los aceites esenciales obtenidos se estudiaron en la USAI mediante cromatografía de gases. Este estudio mostró a los diferentes compuestos presentes en la muestra que pudieron actuar como agentes inhibidores sobre bacterias multirresistentes a antibióticos. De acuerdo a la tabla 4, se pudo observar que los compuestos que estuvieron en mayor proporción fueron el 2-Propenal 3-fenil- también conocido como cinamaldehído, el fenol 2-metoxi-3-(2-propenil)- ó guaiacol, la ciclobutanona 3-fenilmethyl-, el 2-propen-1-ol 3-fenil-acetato conocido como acetato cinámico o cinamal acetato y el α -cariofileno que es también conocido como α -humuleno. De igual manera, en la tabla 5 se muestra que los compuestos que estuvieron en mayor proporción fueron el cinamaldehído, el 2,2'-bifenileno dicinamato, el 2-propeno-1-ol 3-fenil-acetato conocido como acetato cinámico o cinamal acetato, el 1,3,7-octatrieno 3,7-dimetil, el eugenol, el 1,6-cyclodecadieno1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-, la bencenopropanamina, el linalool y el cariofileno. El cinamaldehído fue el componente que estuvo presente en ambas muestras y el de mayor proporción mientras que en la muestra dos estuvo presente el eugenol. De acuerdo a la literatura el cinamaldehído es uno de los componentes de *C. zeylanicum* que se encuentran en una mayor proporción, alrededor del 60 al 80%, mientras que el eugenol en este tipo de especie de canela se encuentra alrededor del 2%. (Shan et al., 2007). La literatura también sugiere que los componentes de canela

obtenidos de cortezas y raíces de plantas *Cinnamomum* de la misma especie varían considerablemente en su composición química; esto podría explicar las variaciones entre las cantidades de algunos compuestos químicos como el eugenol que fue encontrado en una de las dos muestras del aceite esencial de canela.

Relacionando los resultados de la inhibición de estas bacterias con los compuestos encontrados en el aceite esencial de canela podemos sugerir que el cinamaldehído, principal componente del aceite, podría ser el responsable de la inhibición de este tipo de bacterias, aunque no se descarta la posibilidad de que los otros compuestos que se encuentran en menor proporción contribuyan en conjunto a la inhibición de las mismas. De acuerdo a la literatura, el cinamaldehído, al tener un grupo carbonilo, podría unirse a las proteínas, impidiendo la acción de descarboxilasas de aminoácidos en *Enterobacter aerogenes* (Wendakoon, 1995).

La literatura sugiere que el eugenol (otro de los compuestos encontrados en una de las muestras de aceite) podría actuar como un agente de inhibición sobre la producción de amilasa y proteasas en *B. cereus*. Se piensa que el grupo hidroxilo del eugenol puede unirse a las proteínas, evitando la acción enzimática en *E. aerogenes*. (Wendakoon, 1995).

Debido a que los aceites esenciales los componen diversas estructuras químicas no se pueden establecer mecanismos específicos, pero en general se pueden considerar daños en la pared celular bacteriana (causando poros) y, principalmente, en la membrana citoplasmática ocasionando una desestabilización de su estructura, haciéndola incapaz de actuar como una barrera impermeable y causando fuga de compuestos intracelulares vitales tales como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos (Shan et al., 2007).

De acuerdo a la literatura, los componentes activos de los extractos podrían unirse a la superficie de la célula y luego penetrar en los sitios diana, posiblemente en la bicapa de fosfolípidos de la membrana citoplasmática y enzimas unidas a la

membrana, ocasionando la inhibición de la fuerza motriz de protones, la inhibición de la cadena respiratoria y la inhibición de la oxidación de sustratos. (Shan et al., 2007).

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

1. Se determinó que el método más favorable para la obtención del aceite esencial de canela fue la hidrodestilación por la cantidad de aceite esencial obtenido.
2. El aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) tuvo un efecto inhibitorio efectivo y satisfactorio sobre las diferentes cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos.
3. El volumen de aceite esencial de canela (*C. zeylanicum*) requerido para causar halos de inhibición significativos en 3 de las cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos fue de 1 μL mientras que en otra de las cepas fue de 2 μL y en una más fue de 5 μL .
4. Los compuestos del aceite esencial de canela que se encontraron en mayor proporción fueron el cinamaldehído, el bencenopropanal, el eugenol y el linalool. Los compuestos antes mencionados podrían ser los principales causantes de la inhibición de las bacterias multirresistentes a antibióticos.
5. No se puede descartar la posibilidad de que los compuestos que se encuentran en menor proporción contribuyan con algunas propiedades antibacterianas.

REFERENCIAS

- Barceloux. «Cinnamomum Species.» Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants and Venomous Animals. (2008): 39-43.
- Becerra, Plascencia. «Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias.» Enfermedades Infecciosas y Microbiología. (2009): 70-76.
- Borges-Wamsley. «Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs.» Biochemichal Journal. (2003): 313-338.
- Burt. «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods.» A review International Journal of Food Microbiology. (2004): 223-253.
- Cancho, García. «El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual.» Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Galicia (ALTAGA). (2000): 39-47.
- Chang, Cheng. «Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from Cinnamomun osmophloeou.» Journal of Ethnopharmacology. (2001): 123-127.
- Chopra. «Modes of action.» Greenwood, Norby, Whitley, Finch. Antibiotic on Chemoterapy. Edinburgh: British ibrary, 2010. 10.
- Davies, Davies. «Origins and evolution of antibiotic resistance.» Mycrobiology and Molecular Biology Reviews. (2010): 417-433.
- Denis. «The problem of resistance.» Greenwood, Norby, Whitley, Finch. Antibiotic on Chemotherapy. Edinburg: British Library, 2010. 28, 34.
- García. «Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos.» Sociedad Española de Microbiología. (1999.): 18-22.
- Guenther. The Essential Oils. New York: D. Van Nostrand, 1948.
- Kalemba, Kunicka. «Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils.» Current Medicinal Chemistry. (2003): 813-829.
- Lacroix, Oussalah. «Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E.coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes.» Food Control. (2007): 414-420.

Levy, FitzGerald. «Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of tetracycline-supplemented feed on a farm.» New England Journal of Medicine. (1976): 583-588.

Loglisci. «New FDA numbers reveal food animal consume Lion's share of antibiotics.» 23 de Diciembre de 2010.

Lowy, Furuya. «Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting.» Nature (2006): 36-45.

Lu, Ding. «Antibacterial Effect of Cinnamon Oil combined with Thyme or Clove Oil.» Agricultural Sciences in China. (2011): 1482-1487.

Marshall, Levy. «Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health.» Clinical Microbiology Reviews (2011): 718-733.

Mau, Chen. «Antimicrobial Effect of Extracts from Chinese Chive, Cinnamon, and Corni Fructus.» Journal Agricultural Food Chemical. (2001): 183-188.

Nikaido. «Multidrug resistance in bacteria.» Annu Rev Biochem. (2009): 119-146.

Orman. «La Resistencia Bacteriana y sus Mecanismos de Dispersión.» Revista de la Facultad de Odontología (UBA) (2006): 13-19.

Piddock. «Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance.» Nature. (2006): 629-636.

Shan, Corke, Brooks, Cai. «Antibacterial Properties and Major Bioactive Components of Cinnamon Stick(Cinnamomum burmannii):Activity against Foodborne Pathogenic Bacteria.» Journal Agricultural Food Chemical (2007): 5484-5490.

Sherman, Billing. «Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot.» The Quarterly Review of Biology. (1998): 3-49.

Utrecht. «Principios de la terapéutica antimicrobiana.» Kalant, Roschlau. Principios de la farmacología médica. Reverte, 2002. 648,649,674,675,682,683,691,692.

Unlu, Zeytinoglu, Ergene. «Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil Cinnamomum seylanicum Blume (Lauraceae).» Food and Chemical Toxicology. (2010): 3274-3280.

Valero, Salmerón. «Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth.» International Journal of Food Microbiology. (2003): 73-81.

Waksman. «What is an antibiotic or an antibiotic substance?» Mycological Society of America. (1947): 565-569.

Walsh, Fischbach. «Antibiotics for Emerging Pathogens.» Science. (2009): 1089-1093.

Watson. «Veterinary drug residues.» Food chemical safety. (2001): 109-120.

Wendakoon. «Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices.» Journal of Food Protection. (1995): 280-283.

White, Zhao, Sudler. «The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats.» The New England Journal of Medicine (2001): 1147-1154.

Yamaguchi, Saga. «History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria.» JMAJ (2001): 103-108.

Yang, Wang, Wang. «Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions.» Innovative Food Science and Emerging Technologies. (2009): 289-292.

ANEXOS

ANEXO 1. Características morfológicas de las cepas

Cepa	Características Macroscópicas en Medio de Cultivo McConkey	Observaciones Microscópicas
PG6¹	Colonias blancas, redondas, cremosas, todas eran uniformes e iguales.	Bacilos cortos gram negativos, con punta un poco ovalada o redondeada, agrupaciones en cadena.
PC2	Colonias incoloras sin forma, unas más grandes y otras más pequeñas, consistencia no cremosa.	Bacilos cortos gram negativos, presentan pleomorfismo, un poco más anchos, agrupaciones en cadena.
PC4	Colonias incoloras, con forma redonda consistencia cremosa.	Bacilos cortos gram negativos, con punta redonda sin agrupación.
PG4²	Colonias blancas, con forma redonda todas del mismo tamaño, consistencia cremosa.	Bacilos gram negativos cortos, agrupados de dos en dos con punta ovalada y un poco más anchos.
PG10¹	Colonias blancas, con forma redonda, todas del mismo tamaño, consistencia cremosa.	Bacilos gram negativos, largos y sin agrupación
R4	Colonias incoloras de forma irregular, unas más grandes y otras más pequeñas, consistencia no cremosa.	Bacilos cortos gram negativos, de punta ovalada, curvos y delgados
R5	Colonias incoloras de forma irregular, unas más grandes y otras más pequeñas, consistencia no cremosa.	Bacilos cortos gram negativos, de punta ovalada, delgados.
R25	Colonias blancas, de forma redonda, consistencia cremosa, borde convexo.	Bacilos cortos gram negativos, con punta ovalada, no tan delgados.
R34	Colonias blancas, de forma redonda, consistencia cremosa, borde convexo.	Bacilos de tamaño mediano gram negativos, con punta ovalada.

Anexo 2. Pruebas Bioquímicas

Prueba Bioquímica	Cepa R4			Cepa PC2			Cepa PC4			Cepa PG4 ²			Cepa R5		
	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Sulfhídrico, Indol, Movilidad (S I M)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Movilidad, Indol, Ornitinina (M I O)	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Rojo de Metilo	+			-			-			+			+		
Voges Proskauer	+			+			+			+			+		
Citrato	+			-			-			+			+		
Urea	-			-			-			-			-		
Oxido/Fermentación	O/F ↑			O/F ↑			O/F ↑			O/F			O/F ↑		
Bilis Escualina	-			-			-			-			-		
Catalasa	+			+			+			+			+		
Oxidasa	+			+			+			+			-		
Fermentación de Carbohidratos															
Cepa	Glucosa	Galactosa	Manitol	Lactosa	Rafinosa	Sorbitol	Maltosa								
R4	+ ↑	+	+ ↑	+ ↑	-	-	+								
PC2R	+	+	-	-	-	-	+								
PC4R	+	+	-	-	-	-	+								
PG4²M	+	+	-	-	-	-	+								
R5	+ ↑	+	+ ↑	+ ↑	-	-	+								

Referencia: Producción de gas ↑