

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de bellotas de ciprés
(*Cupressus sempervirens* var *horizontalis*) y semilla de brócoli
(*Brassica oleracea* var *italica*) sobre *Staphylococcus aureus* y
*Pseudomonas aeruginosa***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Biól. Carlos Ramón Vázquez Quiñones

Director: Dra. Elsa Bosquez Molina

Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dr. Oscar Rodolfo Rodas Suárez

México D.F., marzo 2010

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

México D.F. a 15 de Marzo del 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de bellotas de ciprés
(*Cupressus sempervirens* var *horizontalis*) y semilla de brócoli
(*Brassica oleracea* var *italica*) sobre *Staphylococcus aureus* y
*Pseudomonas aeruginosa***

que presentó

Biól. Carlos Ramón Vázquez Quiñones

Comité Tutorial:

Director: Dra. Elsa Bosquez Molina
Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa
Asesor: Dr. Oscar Rodolfo Rodas Suárez

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa

Secretario: Dra. Clara Pelayo Saldivar

Vocal: Dr. José Ramón Verde Calvo

Vocal: Dr. Oscar R. Rodas Suárez

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada deseo agradecer a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, por todo lo brindado, a sus autoridades y personal que sin miramientos apoyaron el progreso y la conclusión de este trabajo, a su personal académico, mis maestros, que sin ellos no hubiera podido comprender lo hermoso de la vida, a mis compañeros de posgrado, pues ellos son al final, los colegas que tendré a mi lado para apoyarme y trabajar por el resto de mi carrera científica.

Gracias a mis asesores que con mucha comprensión y con mucha determinación hicieron que este trabajo saliera a la luz. A la Dra. Elsa Bosquez Molina que bajo su dirección se terminó esta tesis. Al Dr. Francisco Cruz Sosa, quien fue un apoyo constante e incondicional a lo largo de este camino y de quien me precio llamar amigo, gracias Doc. Gracias al Dr. Oscar Rodas Suárez, mentor, amigo y hermano, docto en la ciencia de la microbiología y sabio en el arte de la comprensión, todas esas tardes en el laboratorio surtieron efecto, más allá de lo estimable, gracias por lo enseñado y sabes que no te defraudaré, Gracias Herr Oscar. Un especial reconocimiento al Dr. José Ramón Verde Calvo, por su infinita paciencia y conocimiento en el arte de la cromatografía. Gracias al M. en B. Javier Morales, por sus conocimientos en destilación que dieron inicio al desarrollo de este trabajo.

Deseo agradecer con todo mi corazón el apoyo brindado para la realización de este escrito, sobre todo a mi familia que siempre estuvo ahí en las buenas y en las malas para apoyarme. Al Dr. Carlos Vázquez Salinas, a quien tengo el orgullo de llamar padre. Gracias por tus sabios consejos y tus días a mi lado, siempre fuiste y serás un enorme apoyo y ejemplo a seguir. Gracias a mi madre, La Dra. Elsa Irma Quiñones Ramírez, pues sin ella no hubiera podido comprender todos los detalles de la microbiología, y tal vez ni siquiera hubiera podido escribir algo como esto, me llenas de sabiduría todos los días, además de amor, comprensión y cariño. A la tía Inés, de quien me precio de llamar segunda madre, gracias tía por tus innumerables

desvelos y consejos, gracias por todos esos días que me levantaste para ir a la escuela y me enseñaste el camino de los justos. A mis abuelos que con ternura y amor me enseñaron el hermoso arte de caminar en la vida siempre con una sonrisa, pues al final la vida es solo un gran juego que hay que jugar.

Gracias a mi esposa e hijos, gracias Coco por nuestras innumerables coincidencias y nuestras complacientes divergencias, gracias por ser mi mujer, mi pareja pero sobre todo gracias por ser mi amiga. A mi hijo Raúl, Gracias enano, sin ti no existiría el corazón que me impulsara hacia delante, ni tampoco la fuerza que me hace levantarme cada mañana para lograr mis metas, eres mi fuente de la eterna juventud y al mismo tiempo lo que hace que yo logre todo para darte el mejor ejemplo. Gracias a mi hijo Carlitos, por llegar a nuestras vidas y demostrarnos que los ángeles nunca acabarán de llegar a esta familia, nos diste un impulso mayor y llenaste aún más de amor y ternura nuestra casa. Gracias a todos los que la memoria hace que los traicione pero que en mi corazón llevan un espacio enorme, igual al de su apoyo en mi vida.

Un especial y caluroso agradecimiento para todas las personas que de alguno u otro modo me llevaron a la conclusión de este trabajo. Un científico no nace, se hace, pero no se hace a base de aciertos sino de errores y fracasos, de constancia y determinación hacia lo adverso. Gracias.

Carlos V

A mis Soles

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 USO DE ANTIBIÓTICOS	1
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.4 MEDIDAS DE CONTROL Y PRUEBAS ANTIMICROBIANAS	9
1.4.1 ALTERNATIVAS A LOS ANTIBIÓTICOS	10
1.4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIMICROBIANOS	12
1.4.3 VALIDACIÓN POR ORGANISMOS INTERNACIONALES (NCCLS)	14
1.5 <i>Brassica oleracea</i> var <i>italica</i> (Brócoli)	15
1.6 <i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>horizontalis</i> (Ciprés).....	16
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVO GENERAL.....	19
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO	21

5.1.1 CEPAS BACTERIANAS	21
5.1.2 MATERIAL VEGETAL.....	21
5.2 PROCEDIMIENTO GENERAL	22
5.3 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	23
5.3.1 EXTRACCIÓN DE LA SEMILLA DE <i>Brassica oleracea</i> var <i>italica</i>	24
5.3.2 EXTRACCIÓN DE LA BELLOTA DE <i>Cupressus sempervirens</i> var horizontalis	24
5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	25
5.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).....	26
5.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	28
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 HIDRODESTILACIÓN EN CONDICIONES DE VACÍO ESTÁNDAR.....	30
6.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	31
6.3 RESULTADOS DE LA MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).	33
6.4 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE MUERTE Y VALOR D POR MICRODILUCIONES	40
6.5 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LA BELLOTA DE <i>C. sempervirens</i> VAR HORIZONTALIS Y DE LA	

SEMILLA DE <i>B. oleracea</i> VAR ITALICA POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).....	44
7. CONCLUSIONES	54
8. RECOMENDACIONES	56
9. BIBLIOGRAFÍA CITADA	57
ANEXO 1.....	70
ANEXO 2.....	73
ANEXO 3.....	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Halos de inhibición (mm) causados por el aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis* y los extractos vegetales de *B. oleracea* var *italica*. AEBC.- aceite esencial de bellota de ciprés; EHSB.- extracto hexánico de semilla de brócoli; EETOHSB.- extracto etanólico de semilla de brócoli; EOHSB.- extracto acuoso de semilla de brócoli.....33

Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa*.....34

Cuadro 3. Valor D (pérdida de la viabilidad) para *S. aureus* y *P. aeruginosa* en presencia del aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis* y el extracto etanólico de *B. oleracea* var *italica*41

Cuadro 4. Caracterización de los componentes del aceite esencial de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* por tiempo de retención, nombre del componente y porcentaje.....47

Cuadro 5. Caracterización de los componentes del aceite esencial de *Brassica oleracea* var *italica* por tiempo de retención, nombre del componente y porcentaje.50

Cuadro 6. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis* y los extractos vegetales de *B. oleracea* var *italica* sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa* por diferentes métodos microbiológicos.53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modos de acción de diferentes antibióticos en contra de las bacterias (tomado de Madigan *et al.*, 2004).....2

Figura 2. Estructura de las envolturas de bacterias Gram + y Gram- (tomado de Sánchez de Rivas, 2006).....3

Figura 3. Microfotografía de contraste de *Staphylococcus aureus* (Ohio State University, 2008)..... 6

Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de *Pseudomonas aeruginosa* (Carr, 2008).....7

Figura 5. Esquema de una microplaca utilizada para la determinación de la CMI.27

Figura 6. Perfil de temperatura comparativo entre *C. sempervirens* y *B. oleracea* durante el proceso de extracción.31

Figura 7. Acción antimicrobiana del aceite esencial de bellota de ciprés y de los extractos de semilla de brócoli sobre *Pseudomonas aeruginosa*.32

Figura 8. Acción antimicrobiana del aceite esencial de bellota de ciprés y los extractos de semilla de brócoli sobre *Staphylococcus aureus*.....33

Figura 9. Determinación de la CMI por el método de microdilución.....37

Figura 10. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* var *horizontalis* sobre *S. aureus*.38

Figura 11. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* var *italica* sobre *S. aureus*.38

Figura 12. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de bellota de <i>C. sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> sobre <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 13. Determinación de la actividad antimicrobiana de extracto etanólico de semilla de <i>B. oleracea</i> var <i>italica</i> sobre <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 14. Determinación de la pérdida de la viabilidad (valor D) de <i>P. aeruginosa</i> en presencia del aceite esencial de bellota de <i>C. sempervirens</i> var <i>horizontalis</i>	42
Figura 15. Determinación de la pérdida de la viabilidad de <i>P. aeruginosa</i> en presencia del extracto etanólico de semilla de <i>B. oleracea</i> var <i>italica</i>	43
Figura 16. Determinación de la pérdida de la viabilidad (valor D) de <i>S. aureus</i> en presencia del aceite esencial de bellota de <i>C. sempervirens</i> var <i>horizontalis</i>	43
Figura 17. Determinación de la pérdida de la viabilidad de <i>S. aureus</i> en presencia del extracto etanólico de semilla de <i>B. oleracea</i> var <i>italica</i>	44
Figura 18. Cromatograma del aceite esencial de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i>	48
Fig. 19. Cromatograma del aceite esencial de <i>Brassica oleracea</i> var <i>italica</i>	51

RESUMEN

La seguridad de los alimentos ha sido siempre, un tema de salud pública importante. Se ha estimado que al menos el 30% de la población en países industrializados, padecen de algún trastorno gastro intestinal debido a alimentos manejados inadecuadamente (URL 1). El servicio de salud pública de los Estados Unidos ha identificado a los siguientes microorganismos como los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, ya sea por la gravedad o por el número de casos que producen: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Toxoplasma gondii*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa* (URL 1). El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de las bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y semillas de *Brassica oleracea* var *italica* sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Hasta el momento, no existen datos publicados acerca de la hidrodestilación con vacío estándar del aceite esencial de la semilla de *Brassica oleracea* var *italica* a nivel mundial y de la bellota de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* a nivel nacional ni de sus perfiles de destilación referidos en esta investigación, la mayor extracción de aceite esencial se obtuvo entre los 88 °C y los 76 °C en un intervalo de tiempo de 90 min, en donde se recuperó 0.2mL de aceite esencial de brócoli por 5 lb de semilla (0.003%), y cerca de 5 mL por 530 g de bellota de ciprés (1%), ambos aceites menos densos que el agua. Debido a la mínima recuperación del aceite de semilla de brócoli, se sugirió el hecho de extraer compuestos de la semilla de esta especie con la ayuda de solventes orgánicos como el etanol y el hexano. Además se uso el extracto acuoso recuperado a través de la hidrodestilación acoplada al vacío estándar, esto con base al aroma que despedía y la inferencia de tener ciertos volátiles dentro de él. La obtención de los extractos se hizo por medio de un rotavapor. El estudio antimicrobiano de los aceites se realizó por medio del método de Kirby-Bauer, la dilución en microplaca para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la determinación del valor D. Con respecto a la actividad antimicrobiana en placa, los resultados para *Pseudomonas aeruginosa*, revelan una actividad nula del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* y mínima para los

extractos hexánico y acuoso (5 mm) de semilla de *B. oleracea*. La mayor inhibición obtenida con el método de Kirby-Bauer se demostró con el extracto etanólico de la semilla de *B. oleracea* var *italica* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* con un halo de inhibición de 7 mm y un inóculo de 15 μ L por disco de papel filtro por extracto o aceite esencial. Los resultados obtenidos para la concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos sobre *P. aeruginosa* fueron 50 μ L para el aceite esencial de bellota de *C. sempervirens*; 25 μ L para el extracto hexánico de semilla de *B. oleracea*; 12.5 μ L para el extracto alcohólico de semilla de *B. oleracea* y; 6.5 μ L con el extracto acuoso de semilla de *B. oleracea*, mientras que para *S. aureus* se demostró la efectividad del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* var. *horizontalis* como antimicrobiano en el crecimiento de este microorganismo con un halo de inhibición de 10 mm y un inóculo de 15 μ L por disco de papel filtro por extracto o aceite esencial. En cuanto a la CMI, se determinó una concentración de 12.5 μ L para el aceite esencial de bellota de *C. sempervirens*; <3.125 μ L para el extracto hexánico de semilla de *B. oleracea*; 25 μ L para el extracto alcohólico de semilla de *B. oleracea* y; >100 μ L con el extracto acuoso de semilla de *B. oleracea*. La determinación de la reducción decimal (D) estableció una reducción del 99.9% de las UFC a los 3 minutos para el extracto etanólico de *B. oleracea* sobre *P. aeruginosa*, 5 minutos para el aceite esencial de *C. sempervirens* sobre *P. aeruginosa*; 3 minutos para el extracto etanólico de *B. oleracea* sobre *S. aureus* y 1 minuto para el aceite esencial de *C. sempervirens* sobre *S. aureus*. Al ser analizados los datos con un ANOVA, el caso del extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* sobre *P. aeruginosa*, no fue significativo aún y cuando la efectividad del extracto es evidente en el laboratorio. En lo que se refiere a la caracterización y determinación de la composición de los aceites utilizados en este trabajo, los aceites esenciales de la bellota de ciprés y de la semilla de brócoli muestran una totalidad de 20 componentes para la bellota de ciprés con un componente mayoritario (α -pineno) con hasta un 49.81% de presencia en la mezcla, y para la semilla de brócoli se obtuvo una caracterización de hasta 22 componentes, dentro de los cuales dos, el butano-1-isotiocianato (37%) y el 4-formil-1,3-(2H) dihidroimidazol-2-tiona (19.03%), son los mayoritarios.

**Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la
electricidad y la energía atómica: la voluntad
Albert Einstein**

1. INTRODUCCIÓN

Una de las preocupaciones principales para cualquier agencia de salud en cualquier parte del mundo, es la seguridad y la inocuidad de los alimentos y los sistemas nosocomiales, pues se ha estimado que al menos el 30% de la población en países industrializados, padecen de algún trastorno gastro intestinal debido a alimentos manejados inadecuadamente (URL 1). A pesar de los mejoramientos en la higiene de las técnicas de producción alimentaria, la seguridad de los alimentos se ha convertido en un tema de salud pública importante. Muchos productos alimenticios son perecederos por naturaleza y requieren de protección contra la contaminación durante su preparación, almacenamiento y distribución para conservar su calidad con una mayor vida de anaquel (Rasooli, 2007).

Muchos microorganismos pueden contaminar el alimento durante las diferentes etapas de su manejo entre la producción y el consumo. La ingestión de algunos microorganismos no es peligrosa para la salud; el sistema digestivo los elimina antes de que puedan causar el menor trastorno. Sin embargo, la multiplicación de otro tipo de microorganismos en los alimentos y/o su capacidad para la generación de sustancias tóxicas es la causa del problema cuando son ingeridos. Se requiere un proceso adecuado y una higiene rigurosa desde el inicio hasta el consumidor como medida de control para evitar la proliferación y como consecuencia la generación de toxinas (URL 1).

El servicio de salud pública de los Estados Unidos ha identificado a los siguientes microorganismos como los mayores causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, ya sea por la gravedad o por el número de casos que ella produce: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *E. coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Toxoplasma gondii*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* (URL 1).

1.1 USO DE ANTIBIÓTICOS

El primer paso en contra de las intoxicaciones y septicemias e infecciones por microorganismos es el uso de antibióticos de 1ª 2ª y 3ª generación. La clasificación de los

antibióticos depende entre otros del sitio blanco de acción aún cuando no compartan una estructura química similar. Algunos actúan sobre la síntesis de la pared celular (betalactámicos, glicopéptidos, polimixinas); otros sobre el proceso de replicación del DNA (quinolonas), de transcripción (rifampicina), de la biosíntesis de proteínas (tetraciclinas, eritromicina, lincomicina, estreptomycin, cloranfenicol) o sobre el metabolismo (sulfamidas). A su vez, para su actividad requieren que las bacterias se encuentren en división activa y que el antibiótico encuentre su sitio blanco (Fig. 1) (Sánchez de Rivas, 2006).

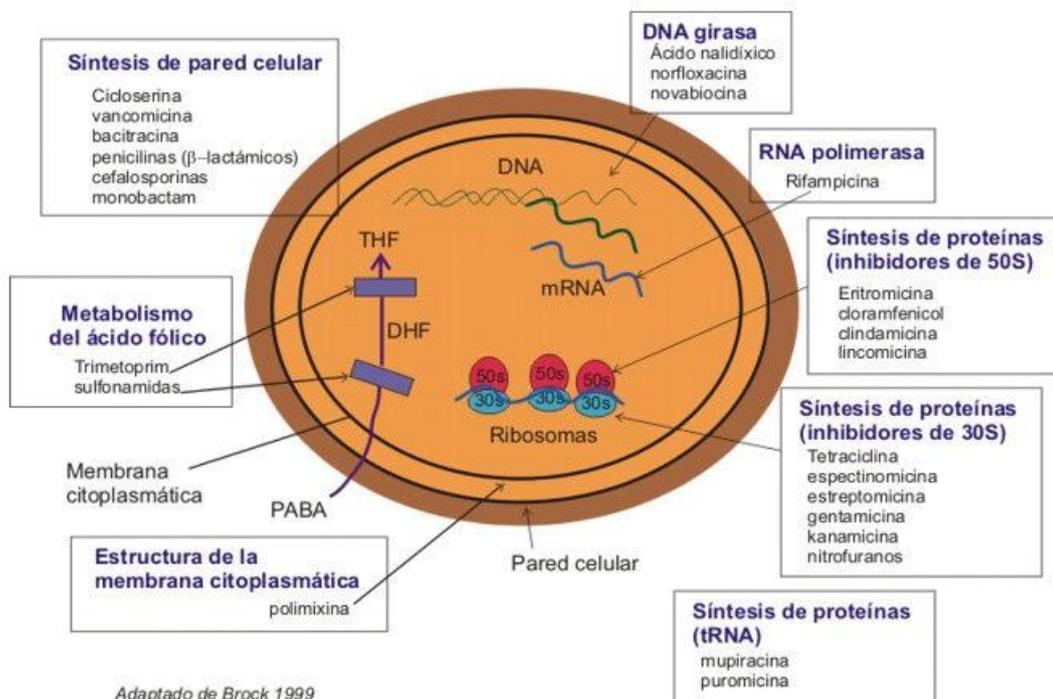


Figura 1. Modos de acción de diferentes antibióticos en contra de las bacterias (tomado de Madigan *et al.*, 2004)

Por otro lado, los microorganismos Gram- y Gram + se han vuelto resistentes a una serie de antibióticos que hasta la década pasada, funcionaban bien en hospitales y comunidades humanas (Carton *et al.*, 1993; Eickhoff, 1992). En bacterias Gram positivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *etc.*) la pared se encuentra inmediatamente accesible y constituye un blanco ideal, de ahí la eficacia de los antibióticos contra este tipo de bacterias. Esto no ocurre en bacterias Gram negativas

(*Enterobacterias, Pseudomonas, Shigella, Serratia* etc.) en donde la pared es mucho menor y se encuentra inmersa entre 2 membranas, las cuales impiden el paso del antibiótico al interior de la bacteria.

El consumo de antibióticos tiene un gran impacto en la ecología bacteriana de la biota hospitalaria, al favorecer la selección de cepas altamente resistentes a los mismos (Fig. 2) (McGowan, 1983).

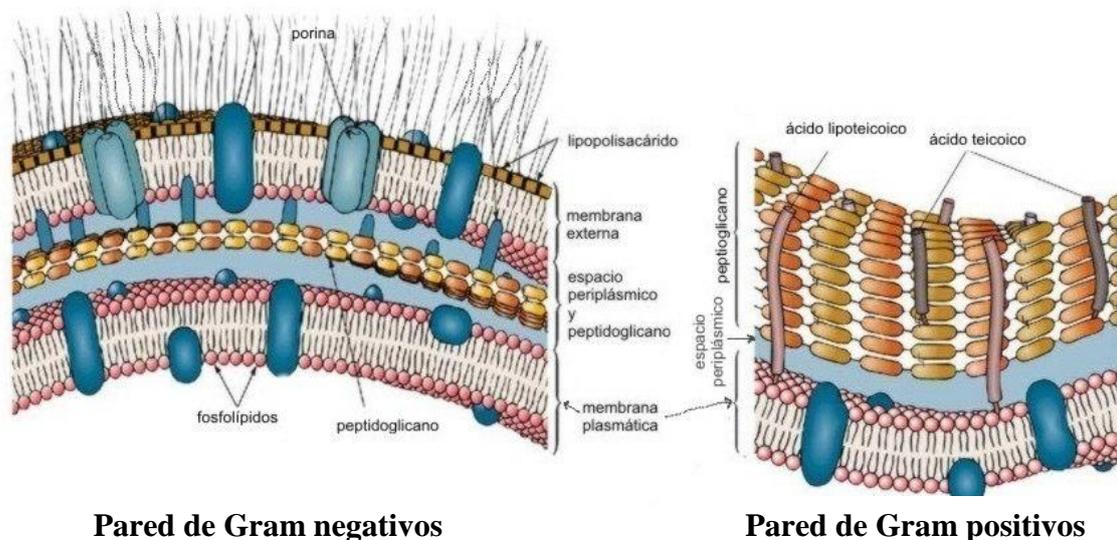


Figura 2. Estructura de las envolturas de bacterias Gram + y Gram- (tomado de Sánchez de Rivas, 2006)

Existe una clara relación causa-efecto entre el uso de antibióticos y la emergencia de gérmenes resistentes, responsables de graves infecciones nosocomiales. El fenómeno de la resistencia se puede entender en base a dos factores: los antibióticos que actúan como un agente selectivo, que favorece la sobrevivencia y propagación de los microorganismos, y por otro lado los genes de resistencia. Un aspecto importante que contribuye a la diseminación de la resistencia es la capacidad de éstos genes para moverse hacia otras bacterias por varios mecanismos de intercambio genético (Levy, 2002). Es evidente, por lo tanto, que la presión selectiva de los antibióticos (se denomina presión selectiva al factor que ejerce el medio sobre un microorganismo específico y que le afecta en mayor o menor medida según sus condiciones genéticas, y solo aquellos que tengan alguna característica distinta para afrontar los efectos del antibiótico podrán

sobrevivir) no sólo es un problema epidemiológico, sino también clínico (McGowan, 1983).

Este impedimento se contrarrestó produciendo por síntesis química un derivado de la penicilina capaz de atravesar la bicapa lipídica y ser eficiente en las infecciones producidas tanto por bacterias Gram+ como Gram- (cefalosporinas). Pero el uso indiscriminado de éstas ha provocado el desarrollo de resistencias por parte de muchos microorganismos (Sanders, 1991). La emergencia de bacilos Gram- productores de β lactamasas de amplio espectro se ha relacionado con su uso frecuente, especialmente en aquellas áreas en donde su uso es más generalizado como en las áreas de cuidados intensivos en hospitales (Tenover, 1991).

Las β lactamasas son proteínas fijadoras de penicilina que catalizan la hidrólisis del anillo β lactámico, separando el enlace amida, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular. Las β lactamasas en las bacterias Gram negativas se encuentran en el espacio periplásmico entre la pared celular y la membrana externa. En las bacterias Gram positivas que carecen de pared, las β lactamasas son excretadas (Weber *et al.*, 1999; Keith *et al.*, 2000).

Los organismos productores de β lactamasas de amplio espectro (BLEA) han aparecido en los últimos años constituyendo un problema de salud pública grave. La frecuencia de BLEA difiere según el área geográfica e institución de salud. El programa de vigilancia mundial (SENTRY por sus siglas en inglés) las reporta con un 45% de frecuencia en Latinoamérica y solo 7% en los EE.UU (Forero, 2002). El programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY se inició en enero de 1997. Fue diseñado para vigilar las infecciones nosocomiales y adquiridas entre la comunidad, mediante una red mundial de hospitales centinela distribuidos por localización geográfica con el objetivo de seguir la trayectoria de los patógenos que se presentan comúnmente y sus tendencias de resistencia antimicrobiana.

Es importante resaltar, por otro lado, que estas β lactamasas de amplio espectro se hallan codificadas en genes plasmídicos fácilmente transferibles de unos microorganismos a otros (Neu *et al.*, 1992).

Otro ejemplo de esto son el grupo de antimicrobianos conocido como quinolonas, diferentes estudios reportan una marcada resistencia bacteriana debido a la práctica clínica, casi tan rápidamente como su implantación generalizada en los hospitales y en la comunidad (Chin *et al.*, 1989). Estas resistencias están claramente identificadas, especialmente frente a bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en situaciones favorecedoras, bien por tratarse de infecciones con un inóculo importante de gérmenes o bien por localizarse en órganos con concentraciones tisulares de antibióticos inadecuadas (bajas o irregulares) (Vasil, 1986; Ball, 1990; Lowy, 2003).

1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (Fig. 3) es una bacteria Gram positiva esférica que se agrupa en pares, cadenas cortas o agrupado en racimos. Algunas cepas son capaces de producir toxinas termostables capaces de causar enfermedades en humanos como la estafiloenterotoxigenosis. La estafiloenterotoxigenosis, estafiloenterotoxemia o intoxicación estafilocócica es una intoxicación alimentaria asociada a *Staphylococcus aureus*. La gravedad de los síntomas depende de la susceptibilidad del individuo hacia la toxina, la cantidad ingerida de alimento contaminado, la cantidad ingerida de toxina y la salud general en general del hospedero. Los síntomas más comunes son náusea, vómito, dolor y calambres abdominales y postración. Algunos individuos podrían no siempre mostrar todos los síntomas asociados con la enfermedad. En los casos más graves podrían presentarse dolores de cabeza, calambres musculares y cambios temporales en la presión arterial y en la frecuencia del pulso. La recuperación generalmente lleva dos días. Sin embargo, no es inusual que la recuperación completa lleve tres días y algunas veces más en los casos más graves (URL 1).

Esta intoxicación está asociada a alimentos que se han sometido a un proceso de cocción inadecuado o bien a un almacenamiento a bajas temperaturas (7.2 °C o menos) (URL 1).

Los alimentos involucrados en esta intoxicación son carne y sus productos, aves y sus productos como huevos; ensaladas que contengan huevo, atún, pollo, papa y macarrones, productos de panadería como pasteles rellenos, pays, y derivados de chocolate, rellenos para sándwich, lácteos y leche; comidas que necesitan un manejo

para su envasado y aquellas que no son conservadas bajo condiciones adecuadas de temperatura después de la preparación (URL 1).

S. aureus es el agente más identificado como causante de enfermedades nosocomiales (Mendoza *et al.*, 2000) y es causante de la muerte de ancianos, infantes y personas inmunocomprometidas o muy débiles en casos de enterotoxiosis (URL 1).

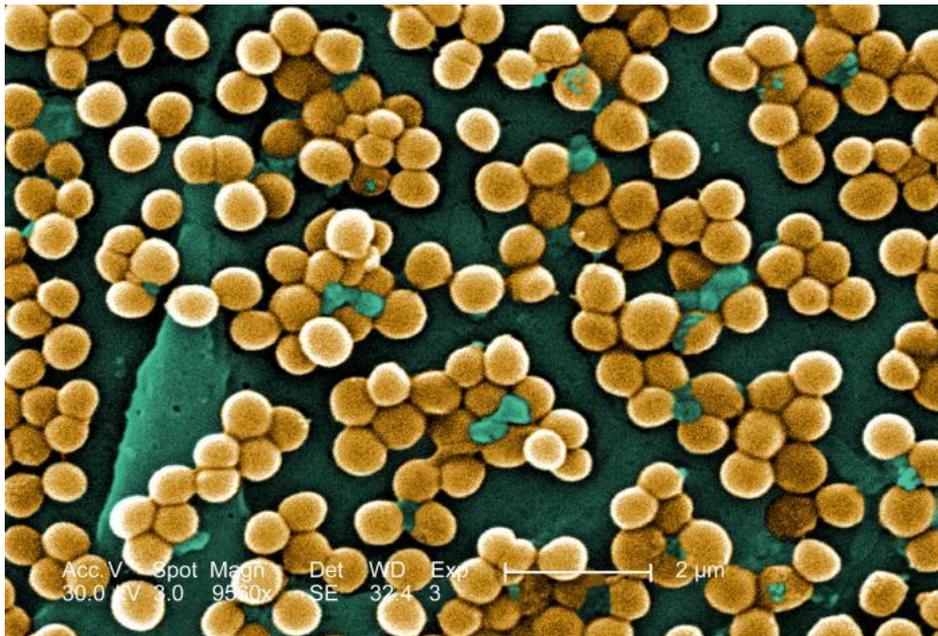


Figura 3. Microfotografía de contraste de *Staphylococcus aureus* (Ohio State University, 2008)

S. aureus se encuentra en el aire, el suelo, el sistema de drenaje, agua, leche y comida o maquinas preparadoras de productos alimenticios, mascotas y humanos. Estos dos últimos son los reservorios principales pues el microorganismo se encuentra en pasajes nasales y garganta, el pelo y la piel de casi el 50% de los individuos aparentemente sanos. La incidencia se incrementa ante los individuos que se encuentren en contacto con personas propensas a la adquisición del microorganismo (URL 1).

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo ambiental común resistente a algunos desinfectantes químicos, y que además puede crecer en algunos de ellos. *P. aeruginosa* es el principal agente biológico de la mayoría de las intoxicaciones,

septicemias y enfermedades gastrointestinales intrahospitalarias (Nester *et al.*, 2007). Asimismo, los miembros de la familia *Pseudomoniaceae* son relevantes en los procesos de conservación de alimentos y constituyen puntos de riesgo en programas de calidad de acuerdo con HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points) (Ray, 1996).

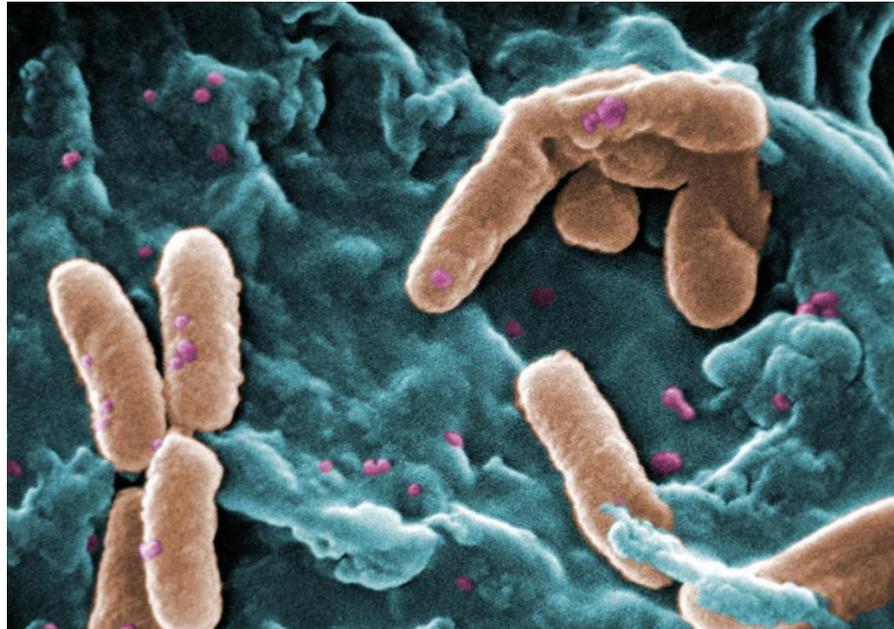


Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de *Pseudomonas aeruginosa* (Carr, 2008)

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena Gram negativa de 2-5 μm de largo por 1 μm de ancho (fig. 4), móvil por un flagelo polar. Versátil y oportunista en términos de su genética, potencial metabólico y mecanismos de virulencia (Vasil, 1986), ubicuo en la naturaleza e inocuo en casi todos los ambientes, sin embargo, *P. aeruginosa* puede causar infecciones graves o hasta mortales en pacientes inmunodeprimidos (Govan and Harris, 1986). Esta versatilidad le da oportunidad de responder a condiciones ambientales variables y frecuentemente adversas. Considerado por muchos como un organismo aeróbico, es capaz de crecer anaeróbicamente en presencia de ciertos sustratos como los nitratos o la arginina (Vasil, 1986). Es capaz de crecer en fuentes nutritivas muy simples e inclusive utilizar lentamente compuestos empleados en la formulación de desinfectantes y antisépticos. Se considera mesófila, aunque puede

crecer a 42 °C. *P. aeruginosa* se considera de fácil crecimiento, por lo que puede ser recuperada en medios simples, ricos y selectivos.

Asimismo, la patogenicidad del microorganismo se asocia a algunos factores de virulencia que lo hace particularmente hábil para infectar tejidos de hospederos específicos. Entre los principales están: toxinas extracelulares, proteasas, hemolisinas y exopolisacáridos por mencionar algunos (Liu, 1974; Liu, 1979; Morihara and Homma, 1985; Govan and Harris, 1986; Vasil, 1986; Govan, 1988, Iglewski *et al.*, 1990).

La diversidad de mecanismos de intercambio genético, incluidos la transformación, transducción y la conjugación, favorecen a *P. aeruginosa* a adaptarse a condiciones adversas por medio de la adquisición de nueva información genética, pues aún cuando este patógeno oportunista contiene un genoma central sustancial y altamente conservado del 90% solo el 10% restante, muestra una variabilidad significativa (Wiehlmann *et al.*, 2007).

Las manipulaciones genéticas han revelado recientemente el papel de diversos factores de virulencia de este microorganismo. La técnica de mutagénesis de transposones y los métodos de DNA recombinante (clonación) se han utilizado para el estudio de algunos factores asociados a la virulencia de *P. aeruginosa*. Esta bacteria es invasiva y toxigénica y las infecciones ocurren al parecer en diferentes etapas: adherencia bacteriana, colonización, invasión y diseminación, enfermedad sistémica o toxémica. Los factores de virulencia pueden contribuir a una o varias etapas de la patogénesis. Los factores superficiales, incluyendo pili, los lipopolisacáridos y los alginatos secretados probablemente contribuyen a otros procesos ulteriores en el curso de la infección. Las toxinas, incluyendo a la exotoxina A, la fosfolipasa C (hemolisina), y las proteasas (SEA-SEJ) puede contribuir al daño tisular y su diseminación (Vasil, 1986). En cuanto a la resistencia a antibióticos y antimicrobianos, esta debe a ciertos sistemas de eflujo de amplio espectro (BSME), dentro de los cuales figuran el MexAB-OprM y el MexXY-OprM. Aunado a estos sistemas, dos sistemas de eflujo tripartitas, el MexCD-OprJ y el MexEF-OprN, que promueven la adquisición de resistencia de amplio espectro hacia los antimicrobianos como resultado de una hiperexpresión mutacional de genes de eflujo.

Más aún, estas bombas promueven la salida de numerosas colorantes, detergentes, inhibidores, desinfectantes y solventes orgánicos (Poole, 2001).

Por todo lo anterior, *P. aeruginosa* se asocia más con infecciones intrahospitalarias que comunitarias.

1.4 MEDIDAS DE CONTROL Y PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

Los mecanismos de transmisión más comunes de enfermedades son a través del tracto gastrointestinal, las vías respiratorias, por contacto directo, y por vectores (Lugo de la Fuente, 2005).

Las enfermedades transmitidas por alimentos deben ser de consideración. Los alimentos deben estar adecuadamente preparados y controlados para evitar la transmisión de enfermedades, ya que el alimento apto para el consumo humano puede servir también para sustentar el crecimiento de los microorganismos (Madigan *et al.*, 2004). Si se tienen en cuenta la diversidad de microorganismos que acompañan a los alimentos de origen vegetal y animal en su estado natural, se pueden predecir los tipos generales de microorganismos que es de esperar se encuentren en un determinado producto alimenticio en una etapa posterior de su existencia (Jay, 1994).

Existen dos grandes grupos de medidas de control de las enfermedades, las preventivas que involucran las buenas prácticas de producción, manejo y consumo de los alimentos, y las correctivas dentro de las cuales se encuentran los tratamientos con antibióticos y antimicrobianos.

Las medidas más eficaces para el control de las infecciones por microorganismos en general, son las barreras que limitan su proliferación. Entre las precauciones habituales figuran el lavado de las manos antes y después de cualquier contacto con alimentos o personas infectadas (Camarena y Sánchez, 2009). A nivel industrial se recomienda las buenas prácticas en el manejo de los alimentos así como la vigilancia por parte de personal adecuado instruido en las técnicas referidas por la HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points). El sistema HACCP enfatiza el control del proceso, concentra el control en los puntos críticos para la inocuidad del producto, valoriza la comunicación entre la industria y la inspección. Se trata de un sistema preventivo y no

correctivo. Una herramienta utilizada para proteger los alimentos de peligros biológicos, químicos y físicos.

1.4.1 ALTERNATIVAS A LOS ANTIBIÓTICOS

La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos tiende a enfocarse hacia agentes con nuevos mecanismos de acción que sean capaces de evadir los mecanismos de resistencia bacteriana actuales (Critchley, 2003; Dartois, *et al.*, 2005; Dryla, *et al.*, 2005). De la misma forma, el surgimiento y transmisión de cepas con resistencia a los glucopéptidos, hace urgente la prioridad en el desarrollo de estrategias de tratamiento y la creación de nuevos fármacos para el control en la diseminación de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA por sus siglas en inglés) (Jacqueline *et al.*, 2003; Cooper, *et al.*, 2004; Jacqueline *et al.*, 2005). En un esfuerzo por detener esta diseminación y el incremento en la incidencia de la resistencia a los antibióticos, la industria farmacéutica y de los alimentos han invertido importantes recursos en la búsqueda de nuevos compuestos inhibitorios de origen microbiano vegetal y animal (Brehm-stecher y Johnson, 2003; Wyllie, 2003; Gurib-Fakim, 2006).

Entre las alternativas de grandes alcances para controlar o inhibir la actividad de microorganismos en general y patógenos en particular, se encuentran los extractos y aceites esenciales provenientes de diferentes plantas u órganos de éstas.

Los aceites esenciales son compuestos complejos volátiles, naturales, caracterizados por un olor penetrante y que son formados por las plantas como metabolitos secundarios. Los aceites esenciales son líquidos, lípidos y raramente pigmentados, liposolubles o solubles a compuestos orgánicos, con densidad generalmente más baja que el agua. Pueden ser sintetizados en muchos órganos vegetales, tales como brotes, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutas, raíces, madera o corteza, y son almacenadas en células excretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que contienen alrededor de 20-60 componentes a muy diferentes concentraciones (20-70%). Generalmente, estos componentes determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales. (Croteau *et al.*, 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Hüshnu *et al.*, 2007).

Químicamente, los volátiles presentes en aceites esenciales son mezclas de lípidos de bajo peso molecular y se agrupan en:

- Terpenos o hidrocarburos de fórmula general $(C_5H_8)_n$ como el limoneno;
- Derivados oxigenados de estos hidrocarburos como el citral;
- Compuestos aromáticos que tienen una estructura benzoica tal como el eugenol y;
- Compuestos que contienen nitrógeno y/o azufre como la tiazolidina (Reineccius, 1994)

Los terpenos forman clases diferentes en cuanto a su estructura y funcionalidad. Están conformados por combinaciones de varias cadenas de cinco carbonos llamadas isoprenos. La biosíntesis de los terpenos consiste en la síntesis del precursor isopentenil difosfato (IPP). Los principales terpenos son los monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (15), pero los hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) también existen. Un terpeno que contenga oxígeno es llamado terpenoide (Bakkali *et al.*, 2008).

Los monoterpenos están formados de un par de unidades de isopropeno (C10). Estas son las moléculas más representativas, pues constituyen casi el 90% de los aceites esenciales y permiten una gran variedad de estructuras. Los sesquiterpenos están formados por un ensamble de tres unidades de isoterpenos (C15). La extensión de las cadenas permite por tanto una gran cantidad de combinaciones y por lo mismo de estructuras (Bakkali *et al.*, 2008).

Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano y ocurren en menor frecuencia que los terpenos. Las rutas biosintéticas concernientes a los terpenos y a los derivados fenilpropano, generalmente se separan en plantas, pero pudieran coexistir en algunas especies con una ruta biosintética dominando (Bakkali *et al.*, 2008).

Los componentes nitrogenados y azufrados como los glucosinolatos o los derivados del isotiocianato también son metabolitos secundarios característicos de

diversas plantas pero también se pueden generar por calentamiento de algunos alimentos (rostizados, parrilla entre otros) (Bakkali *et al.*, 2008).

1.4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIMICROBIANOS

El modo de acción antimicrobiano de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales no se debe a uno solo, sino a un gran número de grupos químicos diferentes presentes en éstos. Por lo tanto, su actividad antimicrobiana no es atribuida a un mecanismo específico sino a varios sitios blanco dentro y fuera de la célula (Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002). Además no todos los sitios blanco se afectan de forma separada, sino que algunos son consecuencia de la alteración previa de un mecanismo metabólico. Una característica importante de los aceites esenciales es que sus componentes tienen hidrofobicidad, lo que permite su reparto entre los lípidos de las membranas celulares, incluyendo las mitocondriales en el caso de eucariotes (Knobloch *et al.*, 1986; Sikkema *et al.*, 1994).

Debido entonces a su lipofilia, su paso a través de la membrana y pared celular es libre, causando alteraciones en las diferentes capas de lipopolisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos permeabilizándolos. En las bacterias, la permeabilización de la membrana está asociada con la pérdida de iones, la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y la fuga del "pool" de ATP (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 2000, 2002; Di Pasqua *et al.*, 2006; Turina *et al.*, 2006). Algunas enzimas como las ATPasas se encuentran embebidas en la membrana celular y componentes como los grupos hidrocarburos cíclicos actúan sobre ellas, distorsionando la relación proteolipídica debido a la acumulación de éstos en la bicapa. Alternativamente se puede presentar, una interacción directa entre los componentes lipofílicos de los aceites esenciales con los componentes hidrofóbicos de las proteínas de las membranas (Juven *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1995).

Se ha encontrado que los componentes de los aceites esenciales también coagulan proteínas del citoplasma y producen daño en la pared celular conduciendo a una pérdida de macromoléculas y posteriormente la lisis y la muerte (Juven *et al.*, 1994; Gustafson *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Oussalah *et al.*, 2006).

Con base en investigaciones con levaduras, se ha reportado que la mitocondria es un sitio blanco importante para los componentes de los aceites esenciales (Schmolz *et al.*, 1999). La permeabilización de la membrana interna y externa de la mitocondria, lleva a la muerte celular por apoptosis y necrosis; el análisis de los perfiles lipídicos por cromatografía de gases muestra una gran disminución en ácidos grasos insaturados al mismo tiempo que un incremento por igual de grasas saturadas (Di Pasqua *et al.*, 2007). Así mismo, los aceites esenciales dañan al DNA mitocondrial causando deficiencias en el mecanismo respiratorio (Bakkali *et al.*, 2008).

En general, la actividad citotóxica de los aceites esenciales se debe mayormente a la presencia de fenoles tales como el carvacrol, eugenol (2metoxi-4-(2-propenilfenol) y timol (Farag *et al.*, 1989; Thoroski *et al.*, 1989; Cosentino *et al.*, 1999; Dorman and Deans, 2000; Juliano *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001) así como aldehídos y alcoholes (Bruni *et al.*, 2003; Sacchetti *et al.*, 2005). Con respecto al efecto fenólico sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa*, se reporta que tanto el carvacrol como el timol tienen efectos parecidos, esto debido a la posición idéntica de su grupo hidroxilo en el anillo fenólico.

Las propiedades funcionales de los diferentes terpenos se deben a la adición repetitiva del isopentil pirofosfato para formar el prenildifosfato, precursor de varias clases de terpenos; modificación del prenildifosfato alílico por medio de sintetasas específicas para formar el esqueleto terpénico y la modificación enzimática secundaria del esqueleto.

El fenol tiene actividad germicida siendo ingrediente activo del producto comercial Lysol. Los fenoles destruyen las membranas citoplasmáticas de los microorganismos y desnaturalizan sus proteínas. Las amplias ventajas de los componentes fenólicos incluyen su amplio intervalo de actividad y su capacidad de retener su actividad aún bajo la presencia de contaminantes orgánicos y detergentes. El hexaclorofeno tiene actividad importante contra *Staphylococcus aureus*, pero a altas concentraciones se observa un efecto neurotóxico (Nester *et al.*, 2007).

Las soluciones acuosas del 60 al 80% de alcohol etílico o isopropílico destruyen células vegetativas y hongos con rapidez, pero no bacterias en fase logarítmica. El alcohol quizás actúa coagulando enzimas y otras proteínas esenciales y dañando las membranas

lipídicas. Las proteínas son más solubles y se desnaturalizan con más facilidad en alcoholes mezclados con agua, lo que explica el porqué las soluciones acuosas son más efectivas que el alcohol puro. Los aldehídos como el glutaraldehído, el formaldehído y el ortoftalaldehído (OPA), destruyen los microorganismos al alterar las funciones de sus proteínas y ácidos nucleicos (Nester *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias, pero como el uso de extractos vegetales implica el uso de múltiples compuestos a la vez, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Haddadin, *et al.*, 2002; Lowy, 2003; Begun, 2005; Sifri *et al.*, 2005), por lo que entonces es posible que los extractos vegetales y aceites esenciales puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes y multirresistentes a agentes antimicrobianos de uso común.

Los reportes sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no se pueden comparar directamente debido a diferencias metodológicas tales como la planta elegida, organismo a probar y método para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana (Hammer, 1999; Faleiro *et al.*, 2003), esto evidentemente produce una variabilidad en los datos reportados sobre la actividad antimicrobiana, limitando la comparación entre estudios y pudiendo devenir en la duplicación de trabajos.

Aunque los aceites esenciales tienen un amplio espectro de actividad, no todos son capaces de inhibir a la mayoría de las bacterias (Bergonzelli, *et al.*, 2003) algunos estudios se han concentrado exclusivamente en un aceite o en un microorganismo.

1.4.3 VALIDACIÓN POR ORGANISMOS INTERNACIONALES (NCCLS)

Se han desarrollado muchos métodos específicamente para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (Remmal *et al.* 1993a; Carson *et al.*, 1995; Smith and Navilliat 1997; Mann and Markham 1998). El beneficio de basar los nuevos métodos en los ya existentes como los ensayos convencionales del “National Committe for Clinical and Laboratory Standards” (NCCLS), es que los nuevos ensayos tenderán a ser más fácilmente aceptados por cuerpos regulatorios (Carson *et al.* 1995; Smith and Navilliat 1997). El NCCLS es un subcomité desarrollado por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), un centro de colaboración de la Organización

Mundial de la Salud (OMS ó WHO por sus siglas en inglés) cuya función es estandarizar y acreditar las pruebas clínicas y que fue creado en 1967 (URL 3).

El NCCLS se encarga de determinar y en su caso mejorar, la calidad de los resultados de laboratorio identificando la necesidad, prioridad y manejo del desarrollo de los protocolos y guías en los laboratorios clínicos y manufactureros para que estos puedan caracterizar y mejorar los sistemas analíticos. Así mismo, cubre otras funciones: mejorar y estandarizar los procedimientos de control de calidad y la interpretación de los resultados de prueba en los laboratorios clínicos microbiológicos; establecer un criterio de proceso para los medios de cultivo, procedimientos automatizados o métodos de prueba en la microbiología clínica; y mejorar el manejo de los servicios clínicos y de laboratorio en bien del paciente.

Además, los métodos del NCCLS se han diseñado específicamente para asegurar la actividad de los componentes antimicrobianos, y los factores que afecten la reproducibilidad se han investigado exhaustivamente (Hammer *et al.*, 1999). Aún cuando los métodos del NCCLS se han desarrollado para agentes antimicrobianos convencionales, se pueden hacer modificaciones menores para que estos métodos puedan ser usados para probar la efectividad de aceites esenciales y extractos vegetales (Carson *et al.* 1995).

1.5 *Brassica oleracea* var *italica* (Brócoli)

Brassica oleracea var *italica* (brócoli) es una hortaliza de la familia de las crucíferas con un alto contenido en glucosinolatos. La composición química del aceite esencial reportada de este vegetal es muy limitada en artículos científicos por lo que se puede referir como relativamente nuevo. El aceite esencial de la semilla de brócoli, por otro lado, no se ha destilado y al momento no se tienen reportes de este procedimiento de extracción ni de la composición del extracto, pero según Morales (2007, comunicación personal) la composición de los floretes de brócoli tiene un alto contenido en componentes azufrados. Los glucosinolatos son precursores de importantes moléculas llamadas isotiocianatos en vegetales intactos. Estos son convertidos en isotiocianatos por medio de la acción de una enzima llamada mirosinasa (E.C. 3.2.3.1), enzima que coexiste con los glucosinolatos en las crucíferas (Shapiro *et al.*, 2001). Se ha encontrado que la composición de glucosinolatos en floretes jóvenes es de 20 a 50 veces mayor que en los

exhibidos en los anaqueles para su venta (Fahey *et al.*, 1997). Los floretes de brócoli y sus componentes isotiocianatos inducen a las enzimas de fase 2 y proveen protección en contra de los tumores químicamente inducidos (Shapiro *et al.*, 2001).

Por otro lado, diversos experimentos han indicado que los isotiocianatos tienen potencial para el control del crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos. Los niveles de isotiocianatos en brócoli dependen del genotipo (Farnham *et al.*, 2005), mientras que la actividad enzimática de la mirosinasa depende de las variaciones del clima y la genética (Charron *et al.*, 2005). Charron y colaboradores (2002), encontraron que el contenido de glucosinolato explicaba el 48% de la variación de la susceptibilidad causada por *Pseudomonas marginalis* exhibida entre los diferentes cultivares de brócoli.

Las evidencias experimentales soportan el hecho de que el mecanismo de acción de los isotiocianatos está asociado a reacciones inespecíficas con cualquier proteína. Se piensa que estas reacciones ocurren entre el grupo isotiociano (R-N=C=S) y el grupo amino de la lisina, el grupo sulfhidrilo de la cisteína y/o las uniones disulfuro. Después de la reacción, el isotiocianato permanece unido covalentemente a la proteína, ocasionando cambios en su estructura terciaria y la pérdida parcial o total de la actividad enzimática (Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas, 2006).

1.6 *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* (Ciprés)

El ciprés es un árbol o arbusto de la clase de las coníferas nativo de México, Honduras y El Salvador. Tiene una vasta presencia en el valle de México y es frecuente encontrarlo en las laderas húmedas de los bosques de coníferas (Martínez, 2008). En México existen seis especies silvestres (*C. arizonica*, *C. forbesii*, *C. guadalupensis*, *C. lindleyi*, *C. montana* y *C. benthami*) y otras cultivadas (*C. sempervirnes*, *C. macrocarpa*, *C. goveniana*). La especie de más amplia distribución en el país es *C. lindleyi*, que se encuentra en latitudes de 2000 a 3000 msnm. (Martínez, 1953). Es un árbol perennifolio, corpulento y de troncos rectos; mide de 10 a 30 m de altura, su copa es cónica y con ramas extendidas algo ascendentes. Es de rápido crecimiento, aproximadamente de 0.70 a 1.40 m por año y ofrece sombra densa, requiere de climas templados, húmedos y subhúmedos (Martínez, 2008).

Tolera el frío pero no las heladas intensas. Vive alrededor de 60 años. Sus hojas tienen forma de escamas, son imbricadas, con ápice agudo y base redondeadas son de color verde oscuro y miden cerca de 2 mm de largo por 1 mm de ancho. Su corteza es resinosa de color gris o pardo rojizo, desprendible en bandas largas y estrechas. Se utiliza en la alineación de calles para crear barreras rompevientos o dar sombra y como ornato en parques y jardines. Sirve de refugio para la fauna silvestre (Martínez, 2008). Su madera tiene cualidades técnicas deseables, incluyendo grano fino, textura uniforme, fragancia agradable y alta durabilidad (Alatorre, 1976), se emplea en la construcción rural para hacer horcones y techos de casas y la corteza se usa como tejas. Se usa para hacer pulpa de papel o para ebanistería. Se atribuyen propiedades medicinales para todas sus partes, por ejemplo, la resina se usa para el control de las infecciones de las uñas y es buen coadyuvante en heridas de lenta cicatrización, una cocción de la madera se usa para baños de pies como antitranspirante, por su cantidad de taninos, los extractos de las piñas se han usado en ungüentos para diversas afecciones y las vaporizaciones con esencia de ciprés son útiles para el tratamiento de la tós. (URL 2).

En el presente estudio se utilizaron las semillas de *Brassica oleracea* var *italica*, así como, bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*. Actualmente, no se tiene reportes algunos de los aceites esenciales de ninguna de estas dos especies de las partes vegetales mencionadas, y por lo mismo, ningún reporte de su actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

2. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y semillas de *Brassica oleracea* var *italica* tienen actividad antimicrobiana, entonces inhibirán el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de las bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y semillas de *Brassica oleracea* var *italica* sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los aceites esenciales de las bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y las semillas de *Brassica oleracea* var *italica* por el método de hidrodestilación en condiciones de vacío estándar.
- Evaluar la actividad antimicrobiana cualitativa *in vitro* de los aceites esenciales de las bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y las semillas de *Brassica oleracea* var *italica*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales de las bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y las semillas de *Brassica oleracea* var *italica*.
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales de las bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y las semillas de *Brassica oleracea* var *italica*.
- Caracterizar los principales componentes de los aceites esenciales de las bellotas de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y las semillas de *Brassica oleracea* var *italica*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1 CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron las cepas de colección del Laboratorio de Microbiología General de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Son cepas de referencia de la “American Type Culture Collection” (ATCC) que se utilizan en las pruebas de cualquier nuevo antimicrobiano o antibiótico para evaluar su efectividad.

Gram negativa.- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Gram positiva.- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

5.1.2 MATERIAL VEGETAL

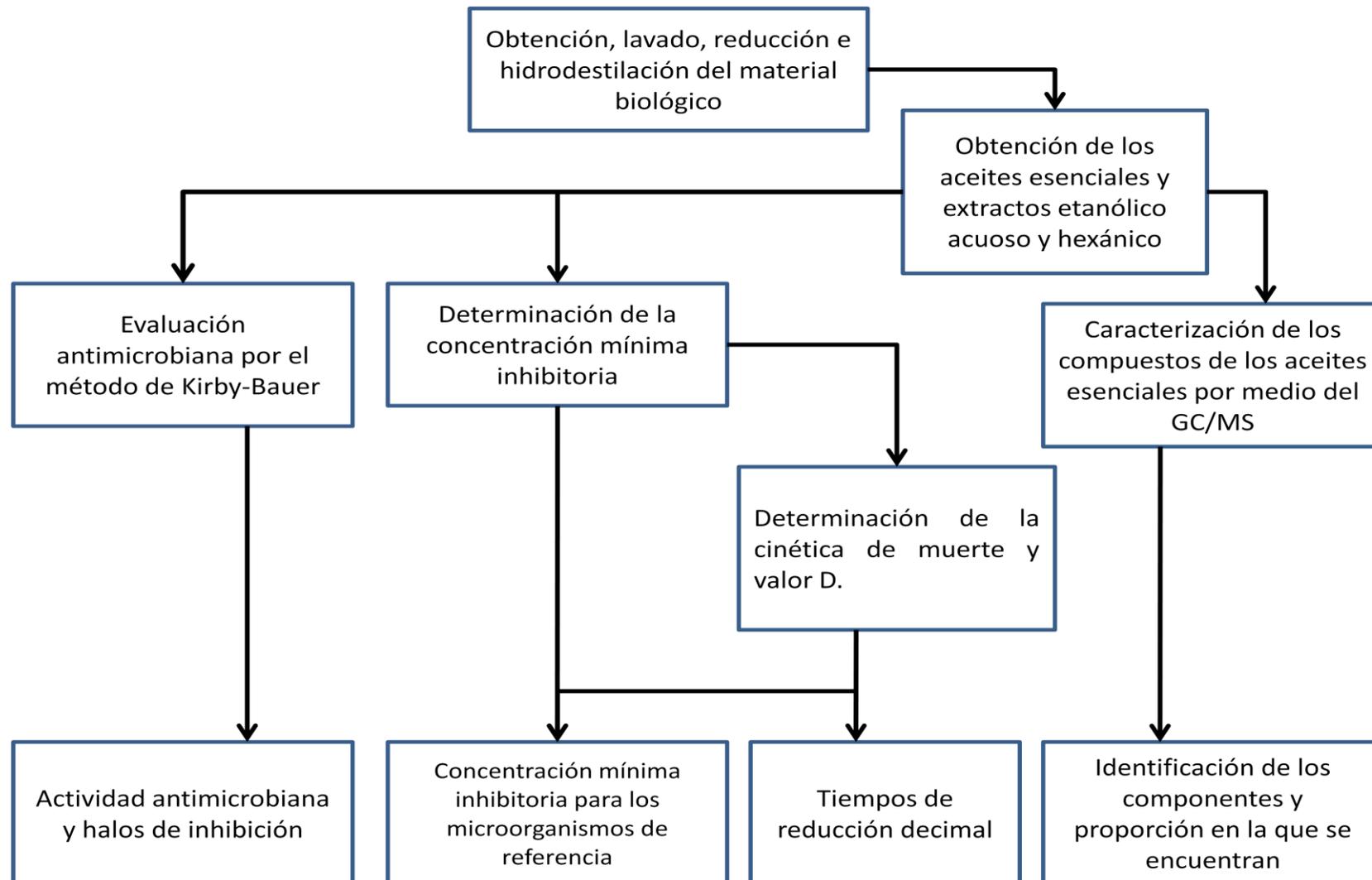
- Semillas de *Brassica oleracea* var italiana. La semilla de brócoli fue comprada en “El Semillero”, con el número de lote 3034, exportado por Service Plus, Le Houga, Francia, la importación fue hecha por Distribuidora Rancho Los molinos, S.A. de C.V.

Se emplearon 2.265 kg de esta semilla, colocándose en matraces Erlenmeyer de 5 L para su remojo con agua una noche anterior a su utilización.

-Bellotas de *Cupressus sempervivens* var horizontalis, las bellotas fueron recolectada de árboles aledaños a la UAM-I, colectándose 530 g de bellotas maduras y semimaduras.



5.2 PROCEDIMIENTO GENERAL



Para la extracción de los aceites esenciales de *B. oleracea* var *italica* y *C. sempervirens* var *horizontalis* se empleó el método de hidrodestilación con vacío estándar descrito en AOAC (1990) y modificado por Morales (1999). Para medir la actividad antimicrobiana (prueba cualitativa), la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida (pruebas cuantitativas) se utilizaron tres pruebas analíticas del NCCLS; para la caracterización de los aceites esenciales se usara la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS).

5.3 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

La destilación termodinámicamente involucra cambios de estado en la muestra (de líquido a vapor y de vapor a líquido) de sustancias no miscibles con diferentes puntos de ebullición (agua y aceite) así como un cambio de la presión al generarse vacío en condiciones de presión atmosférica (de la Cd. de México, 585 mm de Hg). Una vez iniciado el ascenso de la temperatura de la muestra, se eleva la presión en el interior del sistema, generando salida de gases (principalmente aire) que no son condensados por el refrigerante. Cuando inicia la ebullición, los vapores que se condensan caen por el tubo comunicante del cuerpo del destilador mismo que se llena de aceite y agua, se inicia así el reflujo. Se recomienda dejar de 60 a 90 minutos antes de apagar el control de temperatura cuando no hay condensación aceitosa evidente.

El perfil químico de los compuestos en los aceites esenciales difiere no solo en el número de moléculas sino también en los tipos estereoquímicos de las moléculas extraídas, de acuerdo con el tipo de extracción (Masotti *et al.*, 2003; Angioni *et al.*, 2006). La recuperación del aceite esencial de semilla de *B. oleracea* no fue significativa, por lo que se hicieron también extracciones con un rotavapor, siguiendo los primeros pasos de homogeneización de la semilla pero en lugar de agua destilada se utilizó etanol puro y hexano como solventes orgánicos, con el fin de recuperar una mayor cantidad de extracto y de compuestos. Estos extractos fueron, al final, tratados y envasados del mismo modo y cuidado que los aceites esenciales de los dos vegetales.

5.3.1 EXTRACCIÓN DE LA SEMILLA DE *Brassica oleracea* var *italica*

La muestra se redujo de tamaño y homogeneizó con una licuadora de marca Oster de uso doméstico utilizando el agua con la que la semilla había sido remojada en proporción 1:2 (semilla:agua) ocupando el 50-65% de la capacidad del matraz Erlenmeyer. Una vez reducido el tamaño se destiló de acuerdo con la técnica 19.128 del AOAC (1990) de hidrodestilación modificado con vacío estándar como lo reporta Morales (1999). Todo el equipo está construido en vidrio y consta de tres partes: un matraz de bola de fondo plano de 2-5 lt, el destilador o trampa (parte central) y el refrigerante (parte superior).

Se destilaron semillas de brócoli homogeneizadas usándose un matraz de bola de 5 L Schott Duran West Germany, con un peso por carga máximo de 800 g, una parrilla eléctrica agitadora *cimarec* con temperatura controlada para calentar la muestra a una velocidad de ascenso constante hasta llegar a la temperatura de ebullición de 92 °C y con agitación constante. Los vapores de agua y aceite esencial se condensaron al recircular agua a 0 °C con una bomba de inmersión a través del intercambiador de calor o refrigerante. La recolección y almacenamiento de los aceites se hizo en matraces aforados de 1-10 mL de capacidad.

5.3.2 EXTRACCIÓN DE LA BELLOTA DE *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*

En el caso de *C. sempervirens* var *horizontalis*, las bellotas fueron reducidas con un molino de mano, y posteriormente con la licuadora utilizada para la semilla de brócoli, se siguió el mismo procedimiento referido anteriormente para su destilación.

Para la lectura de resultados se usó la nomenclatura: EETOH (extracto etanólico de semilla de *Brassica oleracea* var *italica*); AEBC (aceite esencial de bellota de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*); EHSB (extracto hexánico de semilla de *B. oleracea* var *italica*) y; EOHSB (extracto acuoso de semilla de *B. oleracea* var *italica*).

5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para determinar la posible actividad sobre el crecimiento microbiano de los aceites esenciales de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* y *Brassica oleraceae* var *italica*, se aplicó la técnica microbiológica de difusión disco-placa, en condiciones de esterilidad trabajando bajo campana de flujo laminar y con todo el material esterilizado en autoclave a una temperatura de 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos (Anexo 1). La prueba de difusión en disco se basa en la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando un gradiente continuo de concentración. Si el disco que contiene el antimicrobiano se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco de inhibición del crecimiento. Esta área, al ser proporcional a la concentración mínima inhibitoria (CMI) permitirá la distinción de cepas sensibles, resistentes o intermedias (NCCLS, 2005).

La sensibilidad-resistencia a antimicrobianos se determinó utilizando discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro, impregnados con los aceites esenciales, sobre agar Müeller-Hinton (MH), siguiendo las recomendaciones del NCCLS (NCCLS, 2005). Las cepas se incubaron en agar Müeller-Hinton (MH) a 37 °C ± 2 °C, durante toda la noche para la obtención de cultivos jóvenes (18-24 h) y se procedió a realizar la dilución del cultivo en solución salina al 0.85% estéril, mostrando una densidad igual al 0.5 de la escala de MacFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Las placas con agar MH se inocularon con la suspensión microbiana, para ello se utilizó un hisopo de algodón estéril y se eliminó el exceso haciéndolo rotar contra la pared del tubo. Posteriormente se extendió por la superficie del agar MH en varias direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo, el cual se dejó secar por espacio de diez minutos. A continuación se colocaron los discos impregnados con 15 µL de los aceites esenciales a valorar, con la ayuda de pinzas flameadas y asegurándose de que se mantuviera un perfecto contacto con la superficie del agar.

La separación entre los discos fue como mínimo de 1 cm, para evitar interferencias entre los agentes antimicrobianos. Antes de incubar las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante otros diez minutos, para que los discos hicieran una

predifusión y posteriormente se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h. En los casos en que hubo sensibilidad, se observó un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco. El tamaño del halo depende de la sensibilidad del microorganismo y de la concentración del antimicrobiano en el disco (NCCLS, 2000).

5.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

La concentración mínima inhibitoria de un agente antimicrobiano es aquella que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible en una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Se determina incubando una cantidad conocida de bacterias en presencia de diluciones definidas del agente antimicrobiano, posteriormente se hacen los conteos correspondientes para determinarla. Ésta es probablemente la prueba de determinación de CMI más popular. Utilizando los criterios del NCCLS, los resultados son interpretados como microorganismo sensible (tratable), intermedio o resistente (intratable) (NCCLS, 2000).

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se usó el método de microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones de la NCCLS (Anexo 2).

Esta prueba se hizo en una campana de flujo laminar bajo condiciones estrictas de esterilidad. El medio que se utiliza es el caldo MH o el Isosensitest, en el caso de este estudio se usó el caldo MH. Este se adicionó en todos los pozos de la microplaca, en un volumen de 100 μL a cada uno. Posteriormente se adicionaron 100 μL del extracto o aceite esencial en cada uno de los primeros pozos (A1, B1, C1, etc.) mezclando bien los dos líquidos para una dilución final de 1:2, se tomaron entonces 100 μL de esta mezcla y adicionaron al siguiente pocillo (A2, B2, C2, etc.) repitiendo la mezcla de los dos líquidos para obtener una dilución final 1:4. Este procedimiento se repitió hasta llegar a una dilución final de 1:64 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64). El inóculo (cepa bacteriana) se distribuyó en cada uno de los pocillos de la microplaca conteniendo las diluciones de antimicrobiano a razón de 10 μL para tener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL en un volumen de 100 μL (Fig. 5). Después de una incubación de 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ se determinó la

capacidad de crecimiento de la bacteria en presencia del antimicrobiano por valoración de la turbidez del medio y la densidad del citoplasma del microorganismo con un lector de ELISA a una absorbancia de 620 nm (NCCLS, 2005).



Figura 5. Esquema de una microplaca utilizada para la determinación de la CMI. Las diferentes concentraciones del agente antimicrobiano se incorporan a los pozos de la microplaca de izquierda a derecha a razón de 1:2, por lo que A1 tendrá una dilución de 1:2 (si el inóculo es de 50 μ L, el total de volumen en el pozo será de 100 μ L), así, B1 tendrá una dilución de 1:4, o sea, 25 μ L, y así sucesivamente. Posterior a la incorporación del agente y su dilución se inocula uniformemente el microorganismo en todas las placas.

Por otro lado, la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se define como la menor concentración del antimicrobiano que destruye el 99.9% del inóculo original, lo que equivale a una disminución de 3 logaritmos decimales con relación al recuento de colonias (UFC) del inóculo inicial. El cálculo se efectuó por el recuento de células viables antes y después de exponerlos al antimicrobiano. Uno de estos cálculos es la cinética de

muerte, si el proceso resulta irreversible el agente tiene actividad bactericida ó si el microorganismo pudiera recuperar su viabilidad el efecto sería bacteriostático. Se puede obtener empleando el procedimiento de microdilución en placa o dilución en tubo (NCCLS, 2005). Los resultados de la CMB pueden ser reportados como valor D (Tiempo de reducción decimal, esto es el tiempo requerido para reducir la población microbiana un 99% o un orden de magnitud).

Para cada cepa bacteriana se determinó el valor D, preparándose una solución acorde a la concentración obtenida de UFC suspendidas en la prueba anterior (0.5 del Nefelómetro de MacFarland), a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en caldo Todd-Hewitt para obtener concentraciones desde 32 hasta 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las cepas a probar se inocularon en tubo de ensaye con rosca y solución salina al 0.85% a razón de 1:10 (0.5 mL por 5 mL de solución salina). De las cepas ajustadas se inocularon 100 μL en los caldos Todd-Hewitt conteniendo las diluciones de los aceites esenciales con 500 μL de extracto o aceite esencial y 500 μL de solución salina (50% v/v).

Posteriormente se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en tubos con 5 mL de solución salina al 0.85%. Al final se incubaron placas con agar MH que fueron inoculadas con 0.1 mL de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} para los tiempos 30 s y 60 s, así como las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} para los tiempos 180 s y 300 s.

Estas placas se incubaron a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h, al término de la incubación se leyeron con cuenta colonias para calcular la CMB, con base a la ecuación descrita por la Norma Oficial Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{100 - S \times 100}{C.V.}$$

Donde S son las colonias sobrevivientes al tiempo marcado y CV es la cuenta viable inicial.

5.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

La cromatografía de gases es una técnica instrumental con alto poder para resolver la separación de mezclas complejas de compuestos que pueden ser volatilizados. Los compuestos se separan según la afinidad que tengan por una fase estacionaria cuando son transportados por un gas conocido como fase móvil (Anexo 3). Al acoplar un

espectrómetro de masas al cromatógrafo, se genera una huella digital conocida como espectro de masas de cada una de las sustancias separadas en el cromatógrafo (Esteban, 1993).

La preparación de las muestras se llevó a cabo por la técnica de SPME (Solid Phase MicroExtraction) de la siguiente manera: se vertieron 2 μL en un vial de 1 mL el cual fue calentado a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min acoplado a una jeringa SPME que contenía una fibra SPME de 75 micras carboxen/PDMS para la captura de los compuestos volátiles, esta jeringa, pasado el tiempo correspondiente, se insertó en el cromatógrafo, exponiendo la fibra al inyector el tiempo requerido para su desorción (30 min). El cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas utilizado fue un Agilent T de la serie 6890 con una columna capilar HP5 de 30.0 m x 250mm x 0.25 μm . Las condiciones de operación fueron una temperatura inicial del horno de 60 $^{\circ}\text{C}/3$ min, posteriormente se utilizaron dos gradientes ascendentes de temperatura, el primero de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a los 90 $^{\circ}\text{C}$ y el segundo de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a los 220 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del inyector fue de 200 $^{\circ}\text{C}$ y del detector de 250 $^{\circ}\text{C}$, el gas acarreador fue el N_2 con un flujo de 2 mL/min y un split de 1:2 con flujo constante a una presión de 16.9 psi. Cada corrida tuvo una duración de 60 min. Estas determinaciones se hicieron por triplicado para los dos aceites. La identificación de los compuestos leídos por el GC/MS se llevo a cabo con el software-librería Nist05 a.L.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó aplicando a los datos generados un análisis de varianza (ANOVA) a través de un diseño completamente al azar para corroborar si existía una actividad antimicrobiana significativa de los aceites esenciales.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 HIDRODESTILACIÓN EN CONDICIONES DE VACÍO ESTÁNDAR

En la Fig. 6 se presentan los perfiles de temperatura durante la extracción de la semilla de *Brassica oleracea* var *italica* y de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*. Como puede apreciarse, durante los 70 minutos de la destilación los perfiles son muy similares, del mismo modo, el tiempo y la temperatura a la que se obtiene la recuperación óptima de los aceites es muy similar.

Hasta el momento, no existen datos publicados acerca de la hidrodestilación con vacío estándar del aceite esencial de la semilla de *Brassica oleracea* var *italica* a nivel mundial y de la bellota de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* a nivel nacional ni de sus perfiles de temperatura referidos en esta investigación. Cabe señalar que la obtención de un perfil de temperatura tiene como propósito optimizar el proceso de destilación al menor costo posible, estandarizando el proceso de extracción, de tal manera que la composición química del aceite tenga la menor variación en su composición. De este modo se puede decir que la mayor extracción de aceite esencial se obtiene de los 76 °C a los 88 °C.

Se recuperó 0.2 mL de aceite esencial de brócoli por 2.265 Kg semilla (0.009%), y cerca de 5 mL por 530 g de bellota de ciprés (1%), ambos aceites son menos densos que el agua.

Debido al rendimiento tan bajo del aceite de semilla de brócoli, se realizó una extracción adicional de las semillas con la ayuda de solventes orgánicos como el etanol y el hexano; también se usó el extracto acuoso recuperado de la hidrodestilación ya que debido al aroma que despedía se asumió que podía contener ciertos volátiles. La obtención de los extractos se hizo por medio de un rotavapor. Asimismo, es de comentarse que aún y cuando no se utilizó el aceite esencial de semilla de brócoli para las pruebas antimicrobianas, si se caracterizó por GC-MS en cuanto a su composición.

Estos 2 extractos se obtuvieron licuando las semillas con el etanol y el hexano por separado utilizando el mismo homogeneizador que para el aceite esencial, posteriormente se les dejó reposar de 12 a 18 h y al siguiente día se vaciaron al matraz de

bola del rotavapor. Este matraz fue calentado a baño maría con un cristizador de 5 litros y una parrilla eléctrica agitadora *cimarec* con temperatura controlada para calentar la muestra a una velocidad de ascenso constante hasta llegar a la temperatura de ebullición y con agitación constante.

La condensación de los vapores de agua y aceite esencial se logró al recircular agua a 0 °C con una bomba de inmersión a través de un equipo refrigerante conectado al rotavapor. Se recuperaron los extractos en un matraz de 10 mL, los cuales fueron mantenidos en congelación hasta su uso en la determinación de la actividad antimicrobiana.

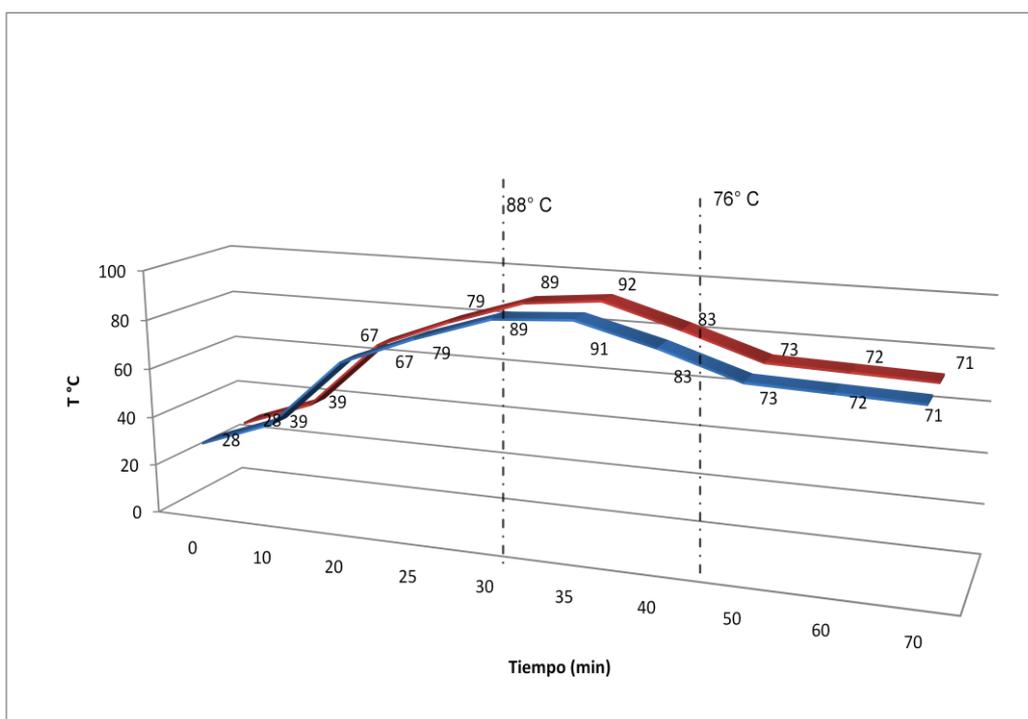


Figura 6. Perfil de temperatura comparativo entre *C. sempervirens* y *B. oleracea* durante el proceso de extracción.

6.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Con respecto a la prueba cualitativa de la actividad antimicrobiana, los resultados revelaron una actividad nula del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* y mínima para los extractos hexánico y acuoso (5 mm) de semilla de *B. oleracea* para *P. aeruginosa*

(Fig. 7). La mayor inhibición obtenida con el método de Kirby-Bauer se obtuvo con el extracto etanólico de la semilla de *B. oleracea* var *italica* con un halo de inhibición de 7 mm a una concentración de 15 μ L por disco de papel filtro del extracto del aceite esencial. Los resultados obtenidos con el método de Kirby-Bauer demostraron la efectividad del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* var *horizontalis* como antimicrobiano en el crecimiento de *S. aureus* con un halo de inhibición de 10 mm y 15 μ L por disco de papel filtro del aceite esencial (Fig. 8). Los datos al momento de compararse, indican una clara actividad del aceite esencial de *C. sempervirens* y del extracto etanólico de *B. oleracea* para los microorganismos *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente (Cuadro 1).

En este sentido, los resultados son 30 veces más sensibles a lo reportado por Alzamora y col. (2001) que refieren halos de inhibición de entre 6 y 20 mm con concentraciones de aceites esenciales de *Tagetes pusilla*, *Senecio tephrosiodes*, *Lepechinia meyenii*, *Eucalyptus globulus* y *Cymbopogon citratus* de 5 mililitros (mL) en comparación con los resultados mostrados en este estudio (5mL<15 μ L).

Asimismo, estos datos son una contribución importante ya que no se han encontrado en la bibliografía reportes sobre la cuantificación de la actividad antimicrobiana de los aceites ensayados en el presente estudio.

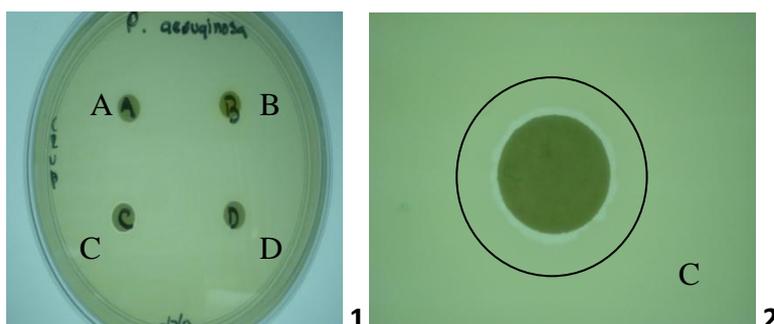


Figura 7. Acción antimicrobiana del aceite esencial de bellota de ciprés y de los extractos de semilla de brócoli sobre *Pseudomonas aeruginosa*. **1.**- A es el aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis*; B es el extracto hexánico de semilla de *B. oleracea* var *italica*; C es el extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* var *italica* y; D es el extracto acuoso de semilla de *B. oleracea* var *italica*. **2.**- halo de inhibición del extracto etanólico de *B. oleracea* var *italica* sobre *P. aeruginosa* (C).

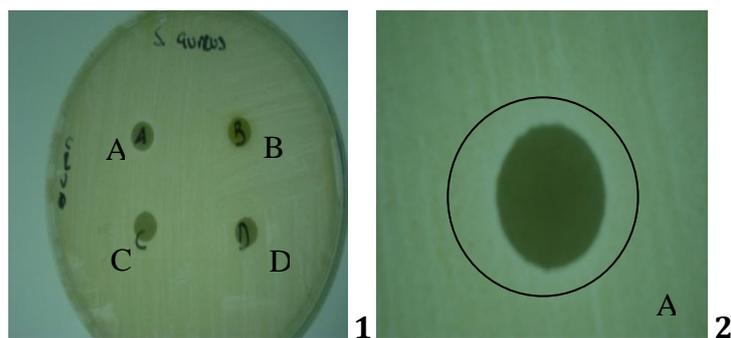


Figura 8. Acción antimicrobiana del aceite esencial de bellota de ciprés y los extractos de semilla de brócoli sobre *Staphylococcus aureus*. **1.**- A es el aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis*; B es el extracto hexánico de semilla de *B. oleracea* var *italica*; C es el extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* var *italica* y; D es el extracto acuoso de semilla de *B. oleracea* var *italica*. **2.**- halo de inhibición del aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis* sobre *S. aureus* (A).

Cuadro 1. Halos de inhibición (mm) causados por el aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis* y los extractos vegetales de *B. oleracea* var *italica*. AEBC.- aceite esencial de bellota de ciprés; EHSB.- extracto hexánico de semilla de brócoli; EETOHSB.- extracto etanólico de semilla de brócoli; EOHSB.- extracto acuoso de semilla de brócoli.

MICROORGANISMO	AEBC	EHSB	EETOHSB	EOHSB
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 mm	Neg	Neg	Neg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neg	5 mm	7 mm	5 mm

6.3 RESULTADOS DE LA MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).

En la Fig. 9 se presenta la imagen de la placa empleada para determinar la actividad inhibitoria del aceite esencial de *C. sempervirens* y los diferentes extractos de *B.*

oleracea evaluados; observando de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo, se muestra claramente la disminución del crecimiento bacteriano, esto se puede notar por el aclaramiento de los pozos, más turbio en la extrema derecha y conforme se mira hacia la izquierda, la turbiedad disminuye. Esta primera prueba visual nos permite inferir que sí existe una sensibilidad hacia los extractos y que esta sensibilidad se encuentra dentro de las diluciones propuestas. La sensibilidad observada de las bacterias a los extractos de los aceites esenciales corrobora la hipótesis planteada.

Cuando se efectuaron los análisis con el lector de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), los resultados obtenidos para la concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos sobre *P. aeruginosa* fueron 50 μL para el aceite esencial de bellota de *C. sempervirens*; 25 μL para el extracto hexánico de semilla de *B. oleracea*; 12.5 μL para el extracto alcohólico de semilla de *B. oleracea*; y 25 μL para el extracto acuoso de semilla de *B. oleracea*. Los resultados obtenidos para la concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos sobre *S. aureus* fueron 12.5 μL para el aceite esencial de bellota de *C. sempervirens*; <3.125 μL para el extracto hexánico de semilla de *B. oleracea*; 25 μL para el extracto alcohólico de semilla de *B. oleracea* y; >100 μL con el extracto acuoso de semilla de *B. oleracea* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Método de microdilución en caldo (CMI)				
	Aceite esencial de <i>C. sempervirens</i>	Extracto hexánico de semilla de <i>Brassica oleracea</i>	Extracto etanólico de semilla de <i>Brassica oleracea</i>	Extracto acuoso de semilla de <i>Brassica oleracea</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5 μL	<3.125 μL	25 μL	>100 μL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 μL	25 μL	12.5 μL	25 μL

Estas concentraciones muestran que los extractos probados en el presente estudio poseen una actividad antimicrobiana ya que existen reportes (Emami *et al.*, 2006) que muestran valores mayores a los obtenidos en esta investigación: 6.25 mg/mL para la CMI sobre *S. aureus* con aceite esencial de los frutos (bellotas), mientras que para el aceite esencial de las hojas, la CMI sobre este microorganismo fue de 25 mg/mL. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, el aceite esencial de frutos tuvo una CMI de 50 mg/mL, mientras que para las hojas, la CMI fue de 75 mg/mL. Estos resultados indican una mayor capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales destilados en este estudio, tanto para las bacterias Gram positivas como para las Gram negativas.

Asimismo, no existen datos previos sobre las CMI reportadas en este estudio, aúñado a que no existe consistencia en cuanto a las unidades en las que se reporta ($\mu\text{L/mL}$, mL, mg/mL $\mu\text{g/mL}$, etc.), el tipo de ensayo utilizado o las condiciones en las cuales la muestra fue recogida y/o almacenada. Esto es de suma importancia pues si no se logra estandarizar la metodología para la destilación, extracción y comprobación de la capacidad antimicrobiana de los diferentes aceites esenciales, los datos no podrán ser tomados en cuenta para futuros usos en el campo de la higiene e industria alimentaria, así como en la prevención y control de los microorganismos por la inconsistencia de la información generada.

Debido al limitado número de reportes ya que no existe la posibilidad de comparación fidedigna y veraz con respecto a otros trabajos relacionados al tema, en la mayoría de los casos, la valoración de los resultados solo es equiparable a los resultados obtenidos con antibióticos, lo cual una vez más, no refleja claramente un resultado veraz debido a la diferente metodología y mecanismos de acción de estos últimos con respecto a los mecanismos antimicrobianos de los aceite esenciales.

Cabe mencionar que se efectuaron ensayos utilizando únicamente los solventes de los extractos vegetales (etanol, hexano y agua), para descartar que los solventes por si mismos tuvieran alguna actividad inhibitoria contra los microorganismos de prueba. Este ensayo determinó que si existía una inhibición sobre los microorganismos a utilizar el hexano y esto fue considerado para el análisis estadístico y solo ver la actividad que tenían los otros dos extractos.

A los resultados obtenidos con el lector de ELISA, se les aplicó un análisis estadístico para determinar la correlación de la acción antimicrobiana de los extractos sobre los microorganismos referidos con la concentración. En la Fig. 10 se muestra el resultado de la correlación del antimicrobiano (aceite esencial de *C. sempervirens*) sobre *S. aureus*, en donde se observa la relación de incremento en cuanto a la concentración del antimicrobiano (eje X) y el incremento en absorbancia (eje Y), esto es, el incremento del antimicrobiano influyó directamente en la población de la bacteria, a menor concentración bacteriana, menor turbiedad se tuvo en los micropozos, lo que derivó en una mayor absorbancia para el equipo de ELISA, así, la correlación absorbancia-concentración fue del 99% ($p < 0.0001$).

En el caso del extracto etanólico, los resultados de correlación, corroboraron los resultados vistos en la microplaca, pues no existió una relación significativa ($R^2 = 0.002$; $p = 0.931$) entre la absorbancia y la reducción de la cepa microbiana con la concentración del agente antimicrobiano, en este caso el EETOHSB (Fig. 11).

Para el caso del aceite esencial de *C. sempervirens* sobre *Pseudomonas aeruginosa* (fig. 12), los resultados de correlación corroboraron los visto en la microplaca pues la relación de la actividad antimicrobiano sobre el crecimiento del microorganismo en el micropozo no fue significativa ($R^2 = 0.404$; $p = 0.175$) esto podría deberse a que las bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* poseen un espacio intermembranal, así como una membrana externa que la protege contra los agentes nocivos externos aúñado a la resistencia intrínseca a un gran número de antimicrobianos y agentes químicos (Longbottom *et al.*, 2004).

Al ser analizados estadísticamente, los resultados de la relación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la semilla de *B. oleracea* sobre *Pseudomonas aeruginosa* no fueron significativos, pese a que la efectividad del extracto fue evidente en el laboratorio. Esto podría deberse a una resistencia intrínseca del microorganismo dentro del procedimiento del ensayo, aún y cuando los resultados concordaron en todas la repeticiones hechas para este experimento (Fig. 13)

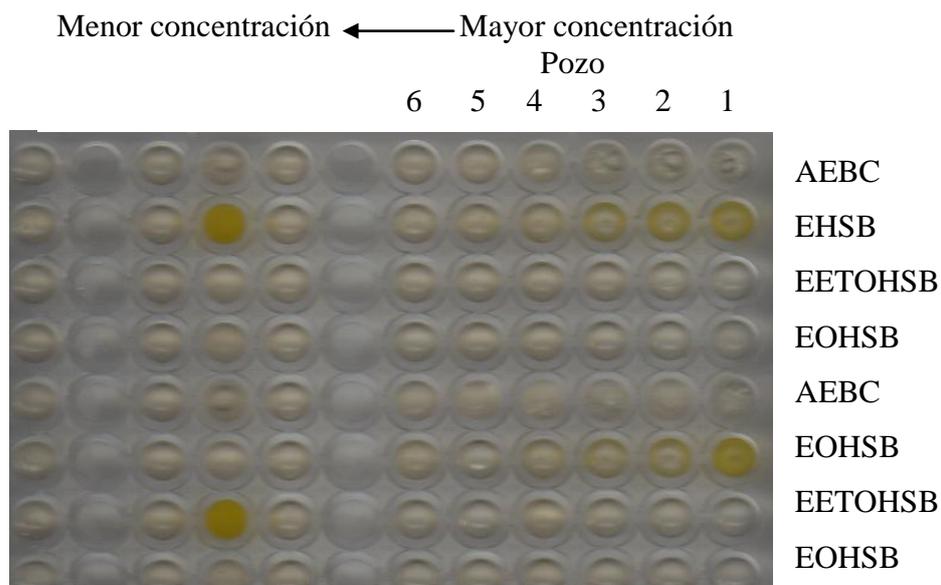


Figura 9. Determinación de la CMI por el método de microdilución. De derecha a izquierda, en los primeros seis pozos, se observa claramente las diferentes concentraciones y la clara inhibición de los extractos sobre los microorganismos.

(AEBC.- aceite esencial de bellota de ciprés; EHSB.- extracto hexánico de semilla de brócoli; EETOHSB.- extracto etanólico de semilla de brócoli; EOHSB.- extracto acuoso de semilla de brócoli). Pozo 1.- concentración 1:2; pozo 2.- concentración 1:4; pozo 3.- concentración 1:8; pozo 4.- concentración 1:16; pozo 5.- concentración 1:32; pozo 6.- concentración 1:64

Estos resultados fueron esencialmente importantes para el segundo ensayo o screening, pues en éste se corroboraría la actividad antimicrobiana del extracto, o en su defecto se corroboraría el error que pudiese haber estado implicado en la determinación de la CMI para este extracto.

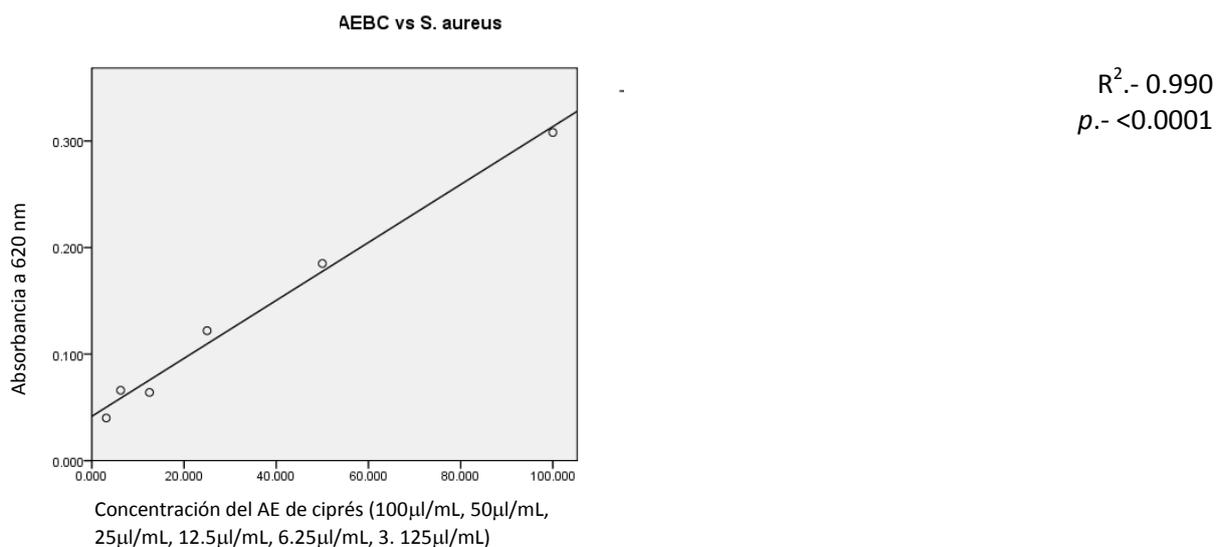


Figura 10. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* var *horizontalis* sobre *S. aureus*.

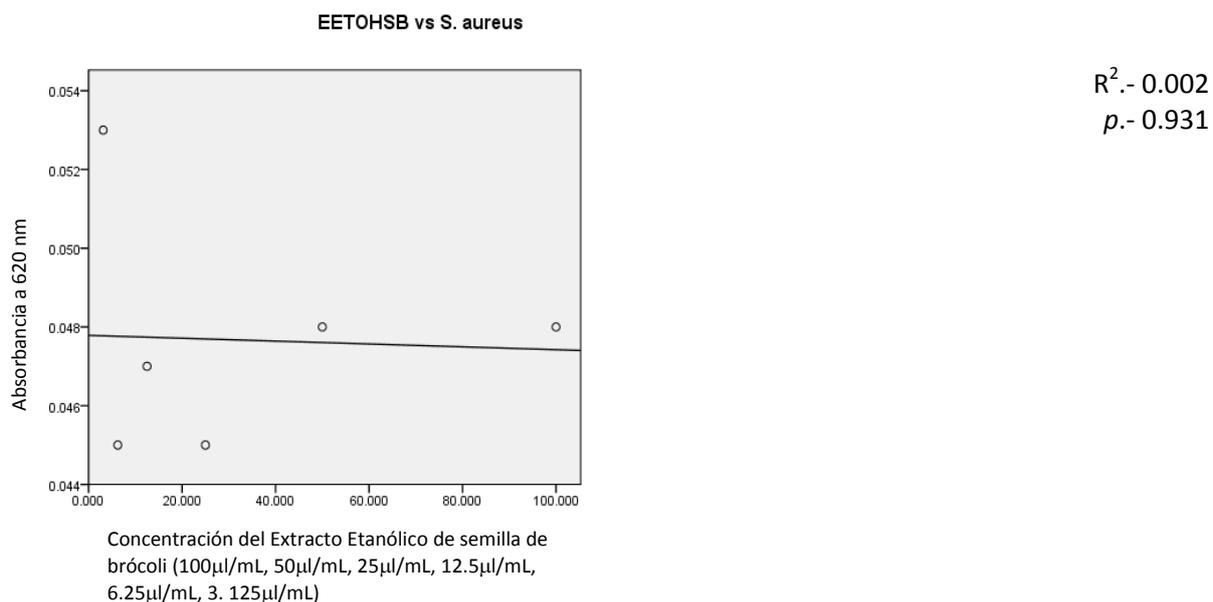


Figura 11. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* var *italica* sobre *S. aureus*.

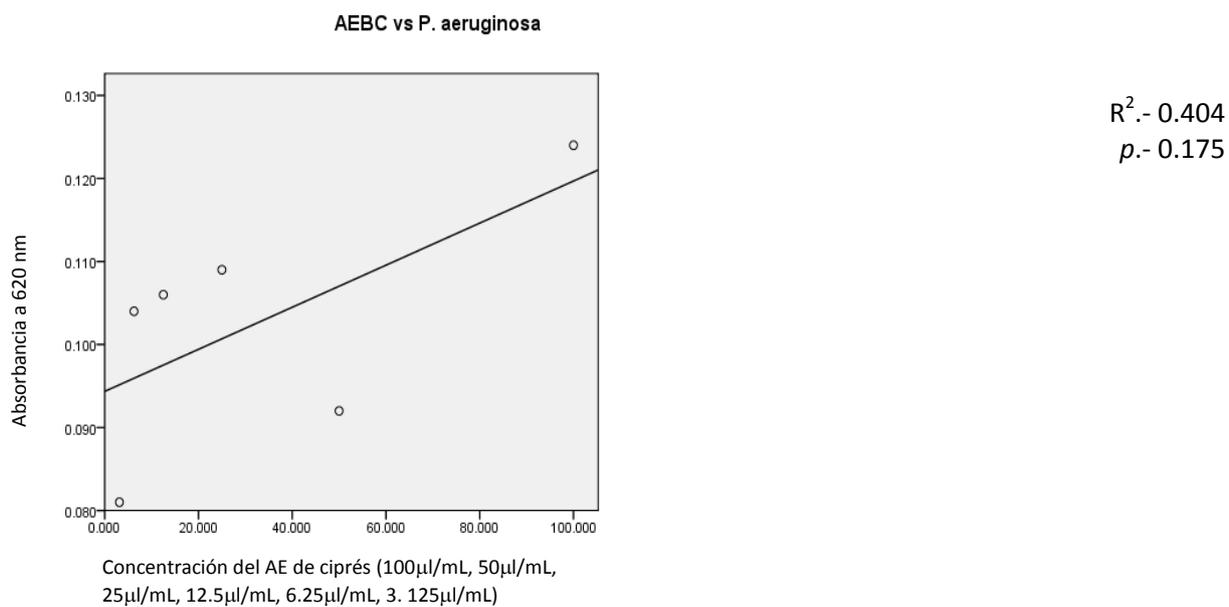


Figura 12. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* var *horizontalis* sobre *P. aeruginosa*.

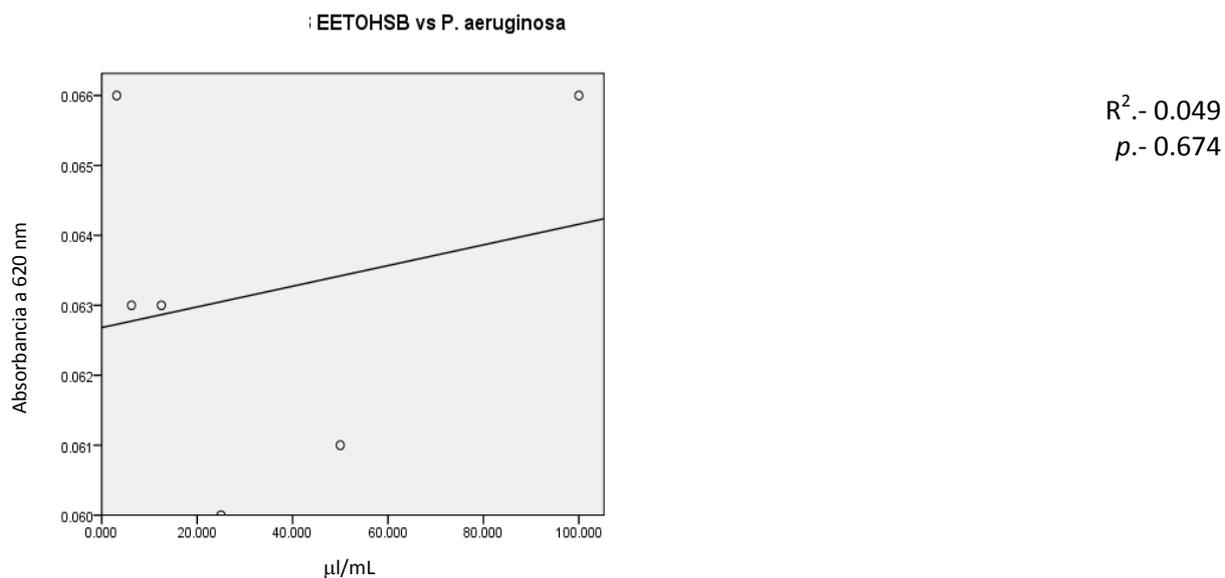


Figura 13. Determinación de la actividad antimicrobiana de extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* var *italica* sobre *P. aeruginosa*.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE MUERTE Y VALOR D POR MICRODILUCIONES

Este tipo de estudios no se han referido hasta ahora en ningún reporte de investigación relacionado a los aceites esenciales, por lo que los resultados son también una contribución importante. Asimismo, debe aclararse que es necesario el uso de la cinética de pérdida de la viabilidad como una prueba de screening para los aceites esenciales, evaluando así su capacidad bactericida o bacteriostática, pues la determinación de la CMI por sí sola no es prueba suficiente para afirmar que el antimicrobiano es efectivo para el control de la bacteria en el medio o el alimento. La determinación de la pérdida de la viabilidad, cinética de muerte o valor D se calcula con ayuda de la ecuación citada en la metodología donde, por ejemplo, el número de sobrevivientes a los 180 s de *P. aeruginosa* con el extracto etanólico de semilla de brócoli fue de 2.0×10^4 UFC con un inóculo inicial de 5.4×10^8 UFC; el porcentaje de reducción en este caso fue de 99.9%, y el valor D o tiempo en el cual se alcanza la reducción decimal fue de 180 s.

De acuerdo con el valor D, Los tiempos en los que se obtuvo la reducción del 99.9% de las UFC fueron: 3 minutos para el extracto etanólico de *B. oleracea* sobre *P. aeruginosa*, 5 minutos para el aceite esencial de *C. sempervirens* sobre *P. aeruginosa*; 3 minutos para el extracto etanólico de *B. oleracea* sobre *S. aureus* y 1 minuto para el aceite esencial de *C. sempervirens* sobre *S. aureus* (Cuadro 3).

Una vez realizados los cálculos matemáticos con la ecuación proporcionada por la Norma Oficial Mexicana, se determinó gráficamente el valor D. En la Fig. 14 podemos ver la tendencia de la pérdida de viabilidad de *P. aeruginosa* en presencia del aceite esencial de *C. sempervirens*. El tiempo determinado para este microorganismo fue de 300 s. En la prueba "pre-screening" (difusión disco-placa) el medio utilizado fue el óptimo para el crecimiento de la bacteria y la concentración del extracto era el suficiente (15µL) mientras que en este ensayo el medio fue simple (caldo Todd-Hewitt y solución salina al 0.85%), y para la determinación de la CMB en caldo se partió de una concentración del extracto de 500 µL.

Estos valores siguen estando muy por debajo de las concentraciones reportadas en trabajos anteriores (Chanegriha *et al.*, 1997; Emami *et al.*, 2004; Emami *et al.*, 2006), y constituyen una aportación importante para comprender el mecanismo de acción antimicrobiano de los componentes del aceite esencial utilizado, pues aún cuando utilizó una concentración mayor, los niveles usados son aceptables en relación al costo que podría tener en caso de ser aplicado.

Cuadro 3. Valor D (pérdida de la viabilidad) para *S. aureus* y *P. aeruginosa* en presencia del aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis* y el extracto etanólico de *B. oleracea* var *itálica*

<i>t</i> (s)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>			
	EETOH		AEBC		EETOH		AEBC	
	UFC/mL	(valor D)	UFC/mL	(valor D)	UFC/mL	(valor D)	UFC/mL	(valor D)
0	5.4 x 10 ⁸	-----	5.4 x 10 ⁸	-----	8.8 x 10 ⁸	-----	8.8 x 10 ⁸	-----
30	1.2 x 10 ⁷	97.7777	2.0 x 10 ⁷	96.2962	1.0 x 10 ⁸	88.6363	2.0 x 10 ⁷	97.7272
60	2.0 x 10 ⁶	99.6296	1.1 x 10 ⁷	97.9629	8.0 x 10 ⁶	99.0909	1.0 x 10 ⁶	99.8863
180	2.0 x 10 ⁴	99.9962	8.4 x 10 ⁶	98.4444	2.0 x 10 ⁴	99.9977	3.0 x 10 ⁴	99.9965
300	1.0 x 10 ⁴	99.9981	1.0 x 10 ³	99.9998	2.0 x 10 ⁴	99.9977	1.0 x 10 ⁴	99.9988

Dilución del antimicrobiano: 50 µL, dilución del inoculo inicial 10 µL, con diluciones consecutivas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ para 30 y 60 segundos y 10⁻¹ a 10⁻⁴ para 180 y 300 s.

En la Fig. 15 se muestra la determinación del valor D para el extracto etanólico de la semilla de *B. oleracea* sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Al contrario de la determinación de la CMI, el incremento en la concentración del antimicrobiano nos da un efecto más claro sobre este microorganismo, pues si no se podía concluir que el microorganismo era sensible al extracto alcohólico por medio de la CMI, al momento de medir la pérdida de la viabilidad de este microorganismo, obtenemos claramente un tiempo de 3 minutos para su reducción decimal, lo que hace concluir que el extracto posee actividad antimicrobiana.

En la Fig. 16 se muestra la determinación de la pérdida de la viabilidad (valor D) del *Staphylococcus aureus* en presencia del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens*,

como se observa se tuvo un menor tiempo para la reducción decimal en este ensayo (60 s). Este dato indica que el extracto tiene actividad antimicrobiana y sugiere que los compuestos mayoritarios del aceite esencial (α -pineno y/o terpenos) son responsables de la actividad antimicrobiana observada.

En la Fig. 17 se muestra el valor D obtenido para *Staphylococcus aureus* en presencia del extracto etanólico de la semilla de *B. oleracea*, como se puede ver, el tiempo (180 s.) fue mayor al del aceite esencial de ciprés. Este resultado permite suponer que el mecanismo de acción de los isotiocianatos, componentes importantes del extracto etanólico de *Brassica oleracea* (inactivación enzimática) no es tan eficiente para *S. aureus* en comparación al mecanismo de acción de los terpenos (ruptura de la membrana citoplásmica y fuga de componentes del citosol) presentes en el ciprés.

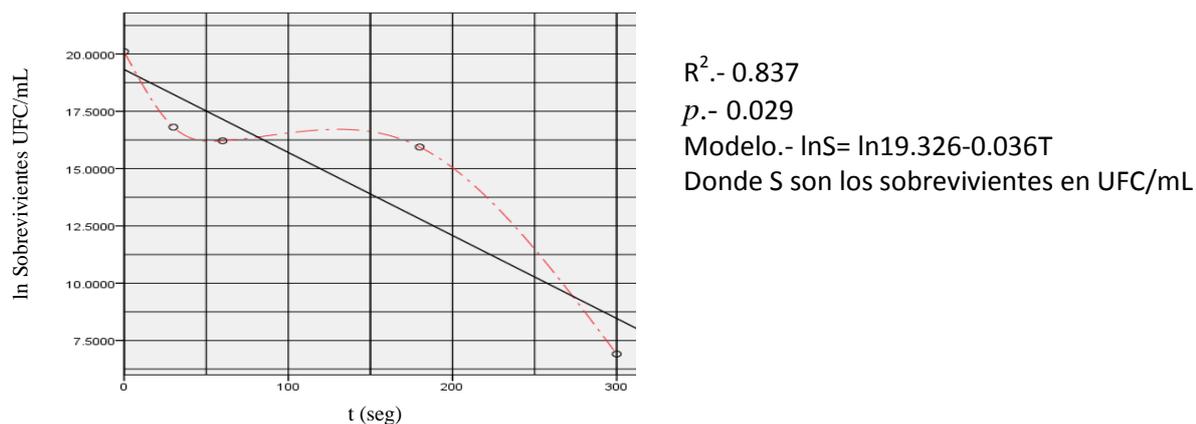


Figura 14. Determinación de la pérdida de la viabilidad (valor D) de *P. aeruginosa* en presencia del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* var *horizontalis*

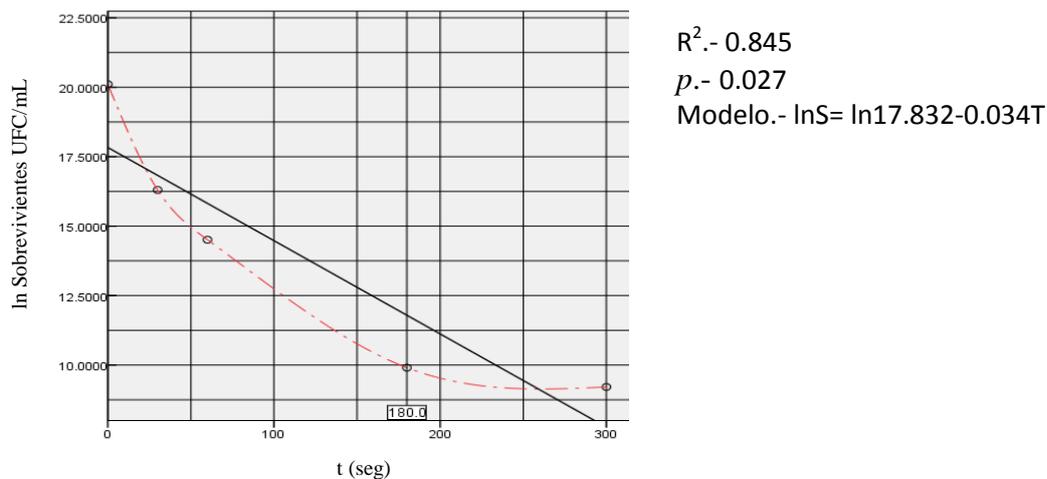


Figura 15. Determinación de la pérdida de la viabilidad de *P. aeruginosa* en presencia del extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* var italica

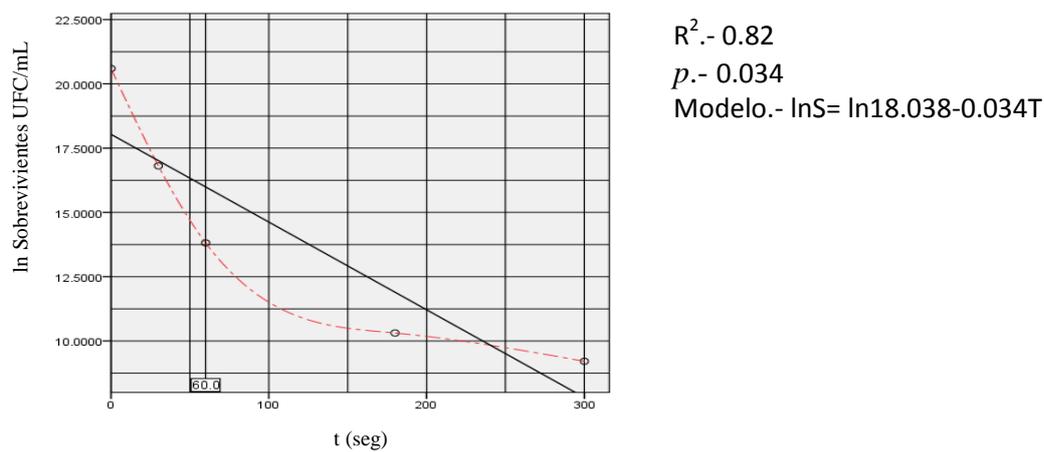


Figura 16. Determinación de la pérdida de la viabilidad (valor D) de *S. aureus* en presencia del aceite esencial de bellota de *C. sempervirens* var horizontalis

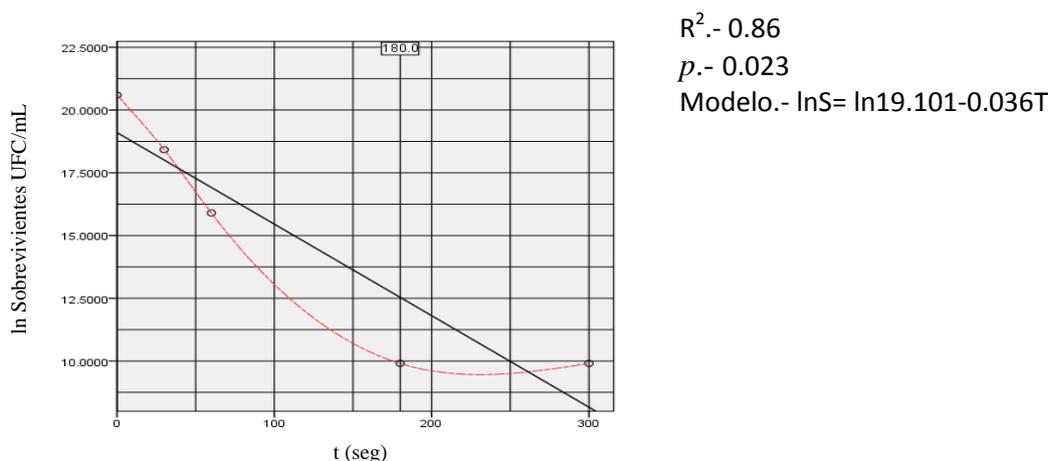


Figura 17. Determinación de la pérdida de la viabilidad de *S. aureus* en presencia del extracto etanólico de semilla de *B. oleracea* var *italica*

Se debe mencionar que al parecer la actividad del aceite esencial de *C. sempervirens* no es afectada por los mecanismos de defensa intrínsecos de *S. aureus*, dentro de los cuales se puede enumerar una hidrólisis enzimática para los compuestos β -lactámicos, reducción de afinidades para receptores como el de la penicilina o la vancomicina, la síntesis de dipéptidos para reducir la afinidad de antimicrobianos o la producción de acetiltransferasas o fosfotransferasas que modifican los aminoglicósidos de la membrana citoplásmica, esto debido a su condición hidrofóbica (Lowy, 2003).

6.5 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LA BELLOTA DE *C. sempervirens* VAR HORIZONTALIS Y DE LA SEMILLA DE *B. oleracea* VAR ITALICA POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).

En el Cuadro 4 se presenta los componentes detectados en el aceite esencial de la bellota de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*, determinándose un total de 20

componentes de los cuales 8 son mayoritarios (94.48%) con un componente principal (α -pineno) ocupando hasta un 49.81% en la mezcla, 3-careno (17.94%), β -felandreno (6.21%), β -mirceno (6.185%), limoneno (5.55%), β -pineno (4.13%), terpinoleno (3.44%) y α -ocimeno (1.22%).

Aún cuando se tienen estudios fitoquímicos y biológicos de *Cupressus sempervirens* L., no se tienen reportes previos de estudios fitoquímicos y biológicos de la bellota de esta especie para la República Mexicana. Tapondjou y col. (2005) reportan un aceite esencial de las hojas de *C. sempervirens* con una composición del 14.8% de sabinona, 11.4% de terpinen-4-ol y 9.9% de α -pineno, también se encuentran en porcentajes menores (6%) compuestos como el mirceno, limoneno, β -felandreno, ρ -cimeno, terpineoleno, eucumeno, carvacrol y cedrol, entre otros.

Por otro lado, Emami y col. (2004) reportan aceites esenciales de frutos y ramas con hojas adyacentes de *C. sempervirens*, en donde el porcentaje de los componentes principales en las hojas alcanza hasta un 30 % de α -pineno, 24 % de Δ -3-careno y menos del 7 % en terpinoleno, α terpenil acetato, germacreno D, limoneno, y mirceno. Para el aceite esencial de los frutos el porcentaje de α -pineno alcanza el 39 %, el Δ -3-careno el 24 %, y los mismos compuestos anteriormente mencionados en porcentajes menores al 5.6 %.

Los mismos investigadores realizaron el mismo estudio dos años después (Emami *et al.*, 2006) encontrando ciertas diferencias en los porcentajes de los componentes: 21.4 % de α -pineno, 16 % de Δ -3-careno, 13 % de germacreno D y menos del 6 % en terpinoleno, α terpenil acetato, limoneno, y mirceno. Dos años antes habían encontrado trazas de bronil acetato, ausente en este estudio, mientras que en el trabajo anterior no se había encontrado Δ -cadineno y para el 2006 éste tenía un 1.6 del porcentaje total de los compuestos encontrados en las hojas del ciprés. Para el aceite esencial de los frutos el porcentaje de α -pineno alcanzaba el 46 %, el 27 % de Δ -3-careno, 6.4 % de terpinoleno, 5.4 % de mirceno, así como menos del 2.8 % de sabineno, β -pineno, limoneno y germacreno-D. Así mismo se encontraron trazas de β -cariofileno, α -humuleno, Δ -cadineno y cedrol.

La importancia del presente estudio radica también en la caracterización de este aceite esencial, pues reafirma el hecho de que las condiciones climáticas, el manejo de la muestra así como su recolección, la metodología empleada para su destilación y su envasado, son factores determinantes para la composición de éste. La composición del aceite esencial de *C. sempervirens* destilado en este estudio contiene una variedad y porcentaje mayor de compuestos a lo reportado anteriormente. Se debe puntualizar además que el compuesto α -pineno está presente en la mezcla en un 49.81% y que su presencia no se había reportado en trabajos anteriores (Chanegriha, 1997.- 44.9% y Emami *et al.*, 2006.- 46 %, Ibrahim *et al.*, 21.15%); adicionalmente la recuperación del aceite esencial fue significativamente mayor a lo reportado (1%).

Cuadro 4. Caracterización de los componentes del aceite esencial de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* por tiempo de retención, nombre del componente y porcentaje.

Tiempo de retención	Nombre del componente	presencia en porcentaje
6.48	α -pineno	49.81
10.02	3-careno	17.94
8.22	β -felandreno	6.21
9.05	β -mirceno	6.185
11.50	Limoneno	5.55
7.81	β -pineno	4.13
15.58	Terpinoleno	3.44
12.73	α -ocimeno	1.22
12.14	cis-ocimeno	0.56
24.61	Terpineol	0.49
23.15	α -terpinen-4-ol	0.32
20.12	α -pironeno	0.28
41.57	Cariofileno	0.25
13.29	γ -terpineno	0.15
34.54	L- α -bornil acetato	0.14
13.14	4-careno	0.11
38.73	terpinil butirato	0.06
39.96	bornil acetato	0.06
42.86	α -cariofileno	0.06
38.62	α -cubebeno	0.04

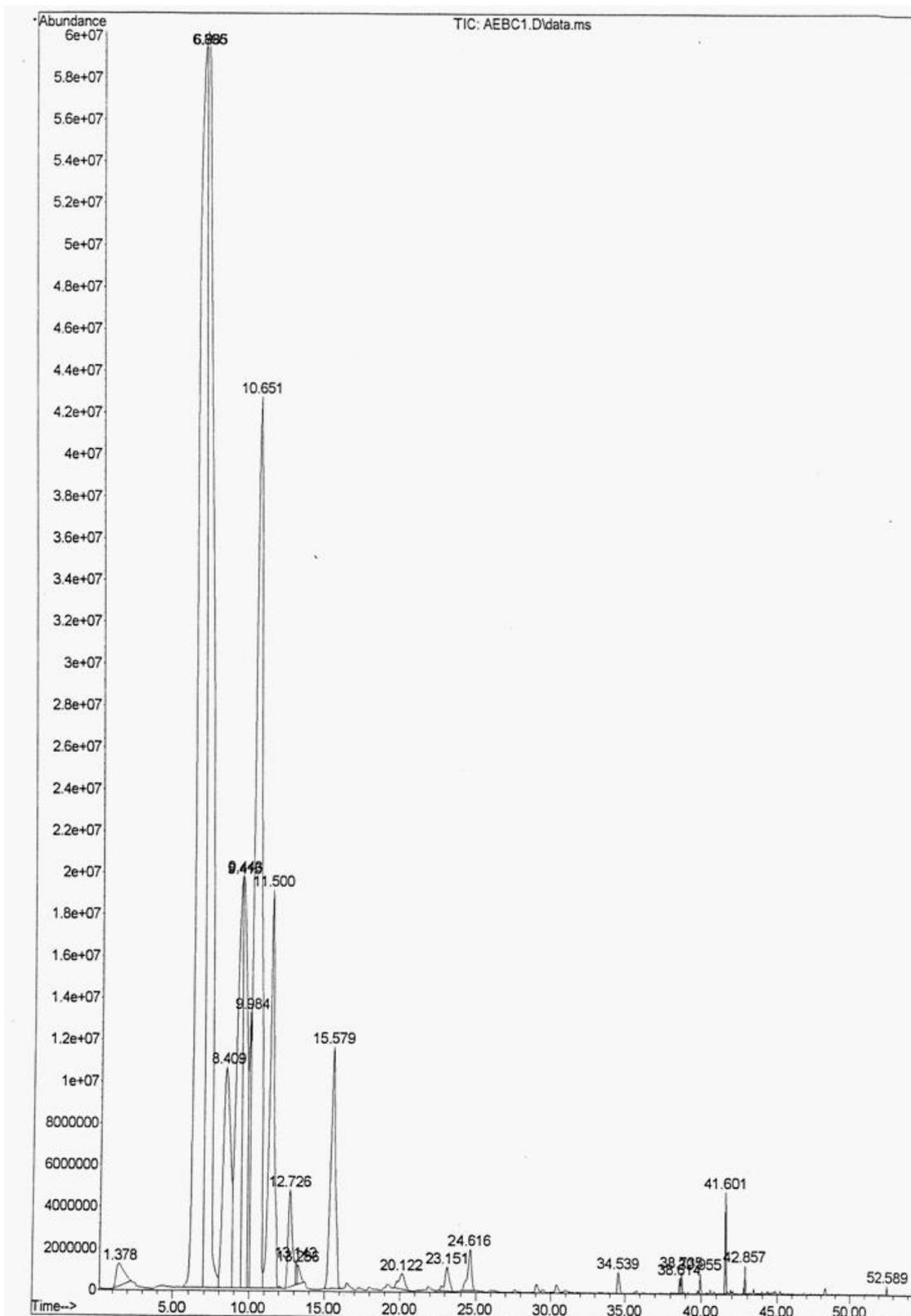


Figura 18. Cromatograma del aceite esencial de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*. Los tiempos de retención de cada compuesto están definidos por un número específico para cada pico, la abundancia del compuesto está dada por la altura del pico para cada compuesto específico.

En el Cuadro 5 se presentan los componentes detectados del aceite esencial de *Brassica oleracea* var *italica*, determinándose un total de 22 componentes, con 14 compuestos mayoritarios (98.35%) de los cuales dos, el butano-1-isotiocianato (37%) y el 4-formil-1,3-(2H) dihidroimidazol-2-tiona (19.03%), son los principales, además del 5-metiltiopentanitrilo (7.95%), 2-nitrotiofeno (7.52%), 1-buteno-4-isotiocianato (7.16%), 5 metilhexanonitrilo (6.22%), 4-metil-2-tiozolamina (2.48%), 3 metitiopropil isotiocianato (2.48%), orcinol (1.8%), 1, 4 ciclo hex-2-enedion (1.7%), 2-feniletil isotiocianato (1.41%), hexano-1-isotiocianato (1.32%), 2 pentil furano (1.14%) y dehidro-*p*-cimeno (1.14%).

La determinación de los componentes de este aceite esencial es de suma importancia pues hasta ahora no se había logrado caracterizar debido a los bajos rendimientos obtenidos (0.009%). Los compuestos identificados coinciden con lo encontrado por Morales (2002, comunicación personal) en cuanto a la composición del aceite esencial de florete de brócoli, pero al mismo tiempo revelan la presencia de nuevos componentes que abren nuevas líneas de investigación pues se trata de metabolitos secundarios de esta especie.

Cuadro 5. Caracterización de los componentes del aceite esencial de *Brassica oleracea* var *italica* por tiempo de retención, nombre del componente y porcentaje.

Tiempo de retención	Nombre del componente	Porcentaje
40.338	butano, 1-isotiocianato	37
18.21	4-formil-1,3 (2H)-dihidroimidazol-2-tiol	19.03
21.796	5-metiltiopentanitrilo	7.95
21.906	2-nitrotiofeno	7.52
6.489	1-buteno, 4-isotiocianato	7.16
5.227	5 metilhexanonitrilo	6.22
10.139	4-metil-2-tiazolamina	2.48
32.056	3-metiltiopropil isotiocianato	2.48
27.261	Orcinol	1.8
9.389	1,4 ciclohex-2-enedion	1.7
41.194	2-feniletil isotiocianato	1.41
21.045	hexano, 1 isotiocianato	1.32
6.713	2-pentil furano	1.14
11.892	dehidro <i>p</i> -cimeno	1.14
5.293	1-piperideina	0.8
3.466	alil isotiocianato	0.72
2.717	4-metilpentanonitrilo	0.57
15.86	Z-neo-alo-cimeno	0.51
24.76	Hidrocina monitrilo	0.4
12.606	<i>n</i> -pentyl isotiocianato	0.35
40.724	2,6-dimetil-2,6-octadieno	0.3
41.961	Curcumeno	0.12

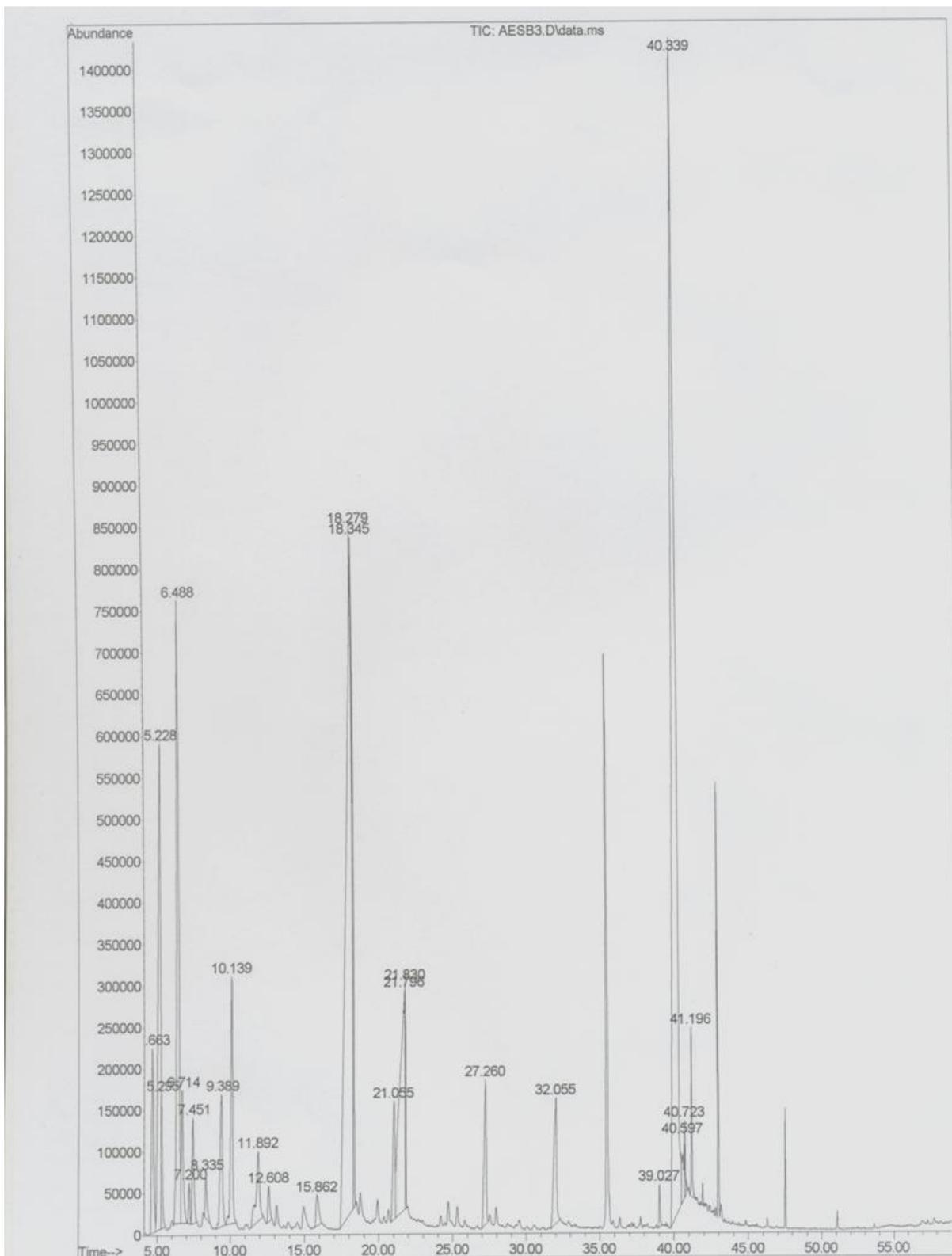


Fig. 19. Cromatograma del aceite esencial de *Brassica oleracea* var *italica*. Los tiempos de retención de cada compuesto están definidos por un número específico para cada pico, la abundancia del compuesto está dada por la altura del pico para cada compuesto específico

Los compuestos mayoritarios identificados permiten suponer la actividad que estos componentes pudieran tener, es decir los mecanismos de acción antimicrobianos. El α -pineno es un terpeno cíclico el cual se piensa que actúa a nivel membranal, alterando la unión de los fosfolípidos presentes en la bicapa lipídica de las bacterias Gram positivas (Burt, 2004). Esto concuerda con los resultados obtenidos de este trabajo experimental, pues el que el terpeno mencionado sea el compuesto mayoritario y su forma de acción sea como la referida, demuestra la actividad obtenida sobre la bacteria Gram positiva *S. aureus*.

En el caso de los compuestos azufrados obtenidos en el aceite esencial de semilla de brócoli, la información publicada al respecto permite suponer que la actividad observada sobre el microorganismo *P. aeruginosa* pertenece al mecanismo adjudicado a los isotiocianatos. Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas (2006), concluyen que una de las partes principales de comunicación de la bacteria Gram negativa con el exterior citoplásmico son las porinas, estructuras celulares que contienen subunidades proteicas que posibilitan o inhabilitan la entrada de sustancias al espacio periplásmico, si estas proteínas son inhabilitadas como lo menciona Tiznado-Hernández, entonces la formación de poros en la membrana externa es posible, lo cual conllevaría a la pérdida de iones y al final del espacio periplásmico y por último del citoplasma, esto debido a la acción de otros componentes del mismo aceite esencial.

El otro compuesto mayoritario (4-formil-1,3 (2H)-dihidroimidazol-2-tiol), pudiera tener el mismo mecanismo adjudicado a los azoles, que inhiben la biosíntesis del ergosterol, provocando la lisis a nivel de la membrana citoplásmica (Jabra-Rizk *et al.*, 2004).

Por último, en el cuadro 6 se resumen todos los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana de los extractos de *B. oleracea* var *italica* y el aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis*.

Cuadro 6. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. sempervirens* var *horizontalis* y los extractos vegetales de *B. oleracea* var *italica* sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa* por diferentes métodos microbiológicos.

	Método de Kirby-Bauer		Método de Microdilución en caldo (CMI)		Cinética de la pérdida de la viabilidad (50 µL de extracto)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 8.8 x 10 ⁸	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5.4 x 10 ⁸
AE <i>C. sempervirens</i>	+++ (10mm)	neg	12.5 µL	50 µL	60 s [final S].- 1.0 x 10 ⁶	300 s [final S].- 1.0 x 10 ³
Extracto hexánico de semilla de <i>Brassica oleracea</i>	neg	++ (5mm)	<3.125 µL	25 µL	-----	-----
Extracto etanólico de semilla de <i>Brassica oleracea</i>	++ (5mm)	+++ (7mm)	25 µL	12.5 µL	180 s [final S].- 2.0 x 10 ⁴	180 s [final S].- 2.0 x 10 ⁴
Extracto acuoso de semilla de <i>Brassica oleracea</i>	neg	++ (5mm)	>100 µL	25 µL	-----	-----

7. CONCLUSIONES

Con base en el método de hidrodestilación acoplado a vacío estándar, se obtuvo un aceite esencial de la bellota de *C. sempervirens* var *horizontalis* con un rendimiento del 1% (5mL/500g); y del 0.009% para el aceite esencial de semilla de *B. oleracea* var *italica* (0.2mL/2.265 Kg).

Se demostró el efecto inhibitorio de los diferentes extractos en contra de los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. La sensibilidad de los organismos Gram positivo, en general, es mayor que la de los organismos Gram negativos. Los extractos alcohólicos de la semilla de *Brassica oleracea* var *italica*, presentaron la mayor actividad antimicrobiana para *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad del aceite esencial de bellota de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* es significativa en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos para la concentración mínima bactericida por medio de una cinética de muerte mostraron que a una concentración fija de 50 μ L, con el aceite esencial el 99.9% de reducción en UFC/mL se da a los 60 s, mientras que para el extracto etanólico se da a los 180 s.

La concentración final que se obtuvo en la determinación de la concentración mínima inhibitoria es menor a la referida en las investigaciones científicas de antibióticos como la penicilina, la meticilina, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, dicloxacilina, etc. (Alós, 1999; Camarena y Sanchez, 1999; Gérvas, 2000; Paniagua *et al.*, 2003).

Se determinó que la concentración de los diferentes extractos para las pruebas cualitativa y cuantitativa, es menor a la referida en la bibliografía (Hammer *et al.*, 1999; Alzamora, 2001; Emami *et al.*, 2004; Emami *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2009), 15 μ L para la primera y 50 μ L v/v para CMI en este estudio mientras que la bibliografía refiere una concentración de 700 μ L v/v para CMI y hasta 1 mL en disco de papel filtro, todos los estudios *in vitro*.

Asimismo, se probaron estos aceites con otras cepas (*Listeria monocytogenes* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 19114, *Salmonella typhi* ATCC 6539) comprobándose su efectividad no solo para los microorganismos de referencia de la CLSI, sino también para otros microorganismos de de capital importancia para el ser humano.

Se obtuvo la caracterización del aceite esencial de la bellota de ciprés, identificándose 20 compuestos con un componente mayoritario (α -pineno 49.81%). Para el aceite esencial de brócoli se obtuvieron 22 compuestos con 2 compuestos mayoritarios (butano 1-isotiocianato (37%) y 4-formil 1,3 (2H) dihidroimidazol 2-tiona (19.03%))

8. RECOMENDACIONES

La imperiosa necesidad de alternativas para el control de microorganismos como los descritos y utilizados en esta investigación, urgen hacia una investigación más a fondo y definida en cuanto a los aceites esenciales se refiere. Asimismo, es necesario la descripción en cuanto al modo de acción de los componentes principales de estos aceites a nivel celular, bioquímico y/o molecular, pues esto permitirá un mejor entendimiento y desarrollo de tecnologías futuras.

Se sugiere que este ensayo sea dirigido al posterior estudio de los mecanismos de acción de los componentes mayoritarios y a su actividad sinérgica, esto es, la combinación de los diferentes aceites y la combinación de diferentes componentes de un aceite y otro, del mismo modo se debe determinar en un futuro cercano los mecanismos de acción de lo mencionado anteriormente, pues esto permitirá comprender más claramente la función desarrollada por los compuestos presentes en estos aceites.

Asimismo, es necesario más trabajo experimental, pues el enfoque a solo dos microorganismos nos deja sin la visión global o en conjunto del potencial de estos dos aceites, por lo que se recomienda la experimentación de estos aceites con más cepas, tanto Gram positivas como Gram negativas, con producción de mucosas o partículas como sideróforos o plásmidos, pili o "swarming", etc.

Por otro lado, se debe comprender que el uso de antibióticos y/o aceites esenciales no es solución última, pues el desarrollo de defensas y resistencias por parte de los microorganismos es bien sabido y su uso indiscriminado podría llevar como lo hizo con los antibióticos al desarrollo de resistencia. El que sepamos y obtengamos nuevas tecnologías para el control y la erradicación de enfermedades no da cabida a su uso sin control, por el contrario, con un uso controlado y racional, los aceites esenciales y sus componentes podrían ser claves en el control de microorganismos patógenos y brotes a futuro y propiciarían el uso racional de la fitoterapia, que indicará en qué casos se requiere la opción más adecuada en función de su efectividad, minimización de los problemas derivados del uso de otros tratamientos y del cociente costo/beneficio.

9. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alatorre, R. 1976. Causas del debilitamiento y muerte del Ciprés. México, D. F. Presentado en la Escuela Nacional de Agricultura del Colegio de Postgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo para obtención del grado de Maestro en Ciencias.
- Alós, J. I. 1999. Resistencia bacteriana a los antibióticos: The never ending story. *Med. Clin.*103: 94-96.
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., y Fernández, G. 2001. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 62:156-161
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., y Cabras, P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54:4364–4370.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Decimoquinta ed. pp 344. Association of Official Analytical Chemists. Washington D. C. E. U.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., é Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446–475.
- Ball P. Emergent resistance to ciprofloxacin amongst *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: clinical significance and therapeutic approaches. *J Antimicrob Chemoter* 1990; 26 Supl F: 165-179.
- Begun, J. 2005. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infect Immun.* 73:872-877.
- Bergonzelli, G.E., Donnicola, D., Porta, N., y Corthésy-Theulaz, I.E. 2003. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3240-3246.

- Betts, T. J. 2001. Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A* 936:33–46.
- Bowles, E. J. 2003. *Chemistry of Aromatherapeutic Oils*. Allen & Unwin, ISBN 174114051X.
- Brehm-stecher, B. F. y E. A. Johnson. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol and apritone. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3357-3360.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., y Dehesa, M. 2003. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85:415–421.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223–253.
- Camarena J. J., y Sánchez R. 2009. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC.
- Carson, C.F., Hammer, K.A. y Riley, T.V. 1995. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 82, 181–185.
- Carton J. A., Maradona J. A., Pérez del Molino G., y Asensi V. 1993. Tendencias registradas en el empleo de antimicrobianos en un hospital español entre los años 1986 a 1991. *Med Clin (Barc)* 100: 761- 765.
- Chanegriha, N., Baaliouamer, A., Meklati, B. Y. 1997. GC and GC/MS Leaf Oil Analysis of Four Algerian Cypress Species. *J. Essent. Oil Res.* 9:555-559.

- Charron, C. S., Sams, C. E., y Canaday C. H. 2002. Impact of glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* (Italica group)) on growth of *Pseudomonas marginalis*, a causal agent of bacterial soft rot. *Plant disease*. 86 (6): 629-632.
- Charron, C. S., Saxton A. M., y Sams, C. E. 2005. Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucocinolate-myrosine system. II. Myrosine activity in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *Journal of the science of Food and Agriculture*. 85 (4); 682-690
- Chin N. X., Clynes N., y Neu H. 1989. Resistance to ciprofloxacin appearing during therapy. *Am J Med*. 87 (5A): 28-31.
- Cooper, B.S., Medley, G. F., Stone, S. P., Kibbler, C. C., Cookson, B. D., Roberts, J. A., Duckworth, G., Lai, R., y Ebrahim, S. 2004. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:10223-10228.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., y Palmas, F. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29:130– 135.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., y Wyllie, S. G. 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol*. 88:170–175.
- Critchley, I. A., Blosser-Middleton R. S., Jones, M. E., Thornsberry, C., Sahm, D. F., y Karlowsky, J. A. 2003. Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. *Antimicrob Agents chemother*. 47:1689-1693.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., y Lewis, N. G. 2000. Natural products secondary metabolites. In: Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.

- Dartois, V., Sanchez-Quezada, J., Cabezas, E., Chi, E., Dubbelde, C., Dunn, C., Granja, J., Gritzen, C., Weinberger, D., Reza-Ghadiri, M., y Parr, T. R. Jr. 2005. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3302-3310.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., y Mauriello, G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54:2745–2749.
- Dorman, H. J. D., y Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:08– 316.
- Dryla, A., Prustomersky, S., Gelbmann, D., Hanner, M., Bettinger, E., Kocsis, B., Kustos, T., Henics, T., Meinke, A., y Nagy, E. 2005. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12:387-398.
- Eickhoff T. C. Antibiotics and nosocomial infections. En: Bennett JV, Brachman PS, editores. *Hospital Infections.* (3.ª ed.). Boston, Toronto, Londres: Little, Brown, 1992; 245-264.
- Emami, S. A., Assili, J., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B. S., y Hassanzadeh-Khayyat, M. 2006. Chemical and Antimicrobial Studies of *Cupressus sempervirens* L. and *C. horizontalis* Mill. Essential Oils. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2(2):103-108.
- Emami, S. A., Hassanzadeh-Khayyat, M., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B. S., y Assili, J. 2004. Chemical Constituents of *Cupressus sempervirens* L. cv. *Cereiformis* Rehd Essential Oils. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1:39-42.
- Esteban, L. 1993. La espectrometría de masas en imágenes. ACK editores. Universidad complutense. Madrid, España.

- Fahey, J. W., Zhang, Y., y Talalay, P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10367–10372.
- Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., y Pedro, L. G. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett Appl Microbiol.* 36:35-40.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., y El-Baroty, G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52:665– 667.
- Farnham, M. W., Stephenson, K. K., y Fahey, J. W. 2005. Glucoraphanin level in broccoli seed is largely determine by genotype. *Hortscience.* 40 (1):50-53
- Forero, J. (2002). Betalactamasas de espectro extendido en pediatría. *Pediatría.* 37: 5-7.
- Gérvás, J. 2000. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Aten. Primaria.* 8: 589-596.
- Gould, I. M. 1988. Control of antibiotic use in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 22: 395-397.
- Govan, J. R. W. 1988. Alginate biosynthesis and other unusual characteristics associated with the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, p. 67-96. In E. Griffiths, W. E. Donachie, and J. Stephen (ed.), *Bacterial infections of respiratory and gastrointestinal mucosae*. IRL Press, Oxford.
- Govan, J. R. W., y G. S. Harris. 1986. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol. Sci.* 3:302-308.
- Güenther, E., 1948. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 27:1-93.

- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L., Bell, H. C., y Wyllie, S. G., Warmington, J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 26:194–198.
- Haddadin, A. S. Fappiano, S. A., y Lipsett, P. A. 2002. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. Postgrad Med J. 78:385-392.
- Hammer, K. A., Carson, C.F. y T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils an other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 1999, 86:985–990.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., y Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46:3590–3595.
- Ibrahim, N. A., El-Seedi, H. R., y Mohammed, M. M. D. 2009. Constituents and biological activity of the chloroform extract and essential oil of *Cupressus sempervirens*. Chemistry of Natural Compounds. 45:309-313.
- Iglewski, B. H., L. Rust, y R. A. Beever. 1990. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, p. 36-43. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Jacqueline, C., Caillon, J., Le Malbecque, V., Miègeville, A.-F., Donnio, P.-Y., Bugnon, D., y Potel, G. 2003. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. J. Antimicrob Chemother. 51:857-864.
- Jacqueline, C., Navas, D., Batard, E., Miegerville, A. F., Le Mabecque, V., Kergueris, M. F., Bugnon, D., Potel, G., y Caillon, J. 2005. In vitro and in vivo synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 49:45-51.

- Jay, J., 1994. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia 3ª ed. Zar., España. 804 pp.
- Juliano, C., Mattana, A., y Usai, M. 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12:516–522.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., y Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76:626–631.
- K. Hüsnü Can Başer, K.H.C., y Demirci, F. 2007. Chemistry of essential oils. In *Flavours and fragrances*. Ralf Günter Berger (ed). Springer Berlin Heidelberg. Germany, 43-86 pp.
- Keith S. Kaye, Henry S. Fraimow, y Elias Abrutyn. 2000. Pathogens resistant to antimicrobial agents. *Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Clinical Management. Infectious Disease Clinics of North America.* 14(2):293-319.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., y Weis, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. Oil Res.* 1:119–128.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., y Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453–462.
- Levy, S. 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 49:25-30
- Liu, P. V. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 130(Suppl):S94-S99.
- Liu, P. V. 1979. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. In R. G. Doggett (ed.), *Clinical manifestations of infection and current therapy*. Academic Press, Inc., New York. P. 63-88.

- Longbottom, C.J., Carson, C.F., Hammer, K.A., Mee, B.J., y Riley, T.V., 2004. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energydependent cellular processes. J. Antimicrob. Chemother. 54:386–392.
- Lowy, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 111:1265-1273.
- Lugo de la Fuente, G. 2005. Bacteriología médica. Ediciones Cuellar 3ª ed. México D. F. 778 pp.
- Madigan, M., T., Martinko, J., M., y Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Ed. Pearson Prentice-Hall 10a ed. Madrid, España. 1096 pp.
- Mann, C.M. y Markham, J.L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. J App Microbiol 84:538–544.
- Martinez, L. Arboles y aéreas verdes urbanas de la ciudad de México y su zona metropolitana. (ed.) Fundación Xochitla. (1ª edición). México D. F. CONABIO. 2008. 145-147
- Martinez, M. 1953. Los pinos mexicanos. Edic. Botas. 361 p.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessiere, J. M., y Viano, J. 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. J. Agric. Food Chem. 51:7115–7121.
- McGowan, J. E. Jr. 1983. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. Rev Infect Dis. 5:1033-1048.
- Mendoza, C., Barrientos, C., Panizza, V., Concha, B., Romero, P., y Barahona, C. 2000. Prevención de la infección intrahospitalaria por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante el manejo de portadores. Rev Chil Infect. 17:129-134.
- Morales, J. 1999. Efecto bacteriostático de aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*) sobre dos microorganismos presentes en carnes. México, D.

F. Presentado en la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa para obtención del grado de Maestro en Biotecnología

Moriyama, K., y J. Y. Homma. 1985. Pseudomonas proteases, p. 41-79. In I. A. Holder (ed.), Bacterial enzymes and virulence. CRC Press, Boca Raton, Fla.

NCCLS, 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Fifth edition. NCCLS document M7-A5. [ISBN 1-56238-394-9] NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898. USA.

NCCLS, 2005. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—tenth edition. NCCLS document M7-A10. [ISBN 1-56238-394-9] NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898. USA.

Nester, E. W., Anderson, D. G., Evans-Roberts, C. Jr., y Nester, M. T. 2007. Microbiología humana. El manual moderno. México, D. F. 996 pp.

Neu, H. C., Duma, R. J., Jones, R. N., McGowan, J. E. Jr., O'Brien, T. F., y Sabath, L. D. 1992. Antibiotic resistance. Epidemiology and therapeutics. Diagn Microbiol Infect Dis. 15: 53-60.

Oussalah, M., Caillet, S., y Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 69:1046–1055.

Paniagua, G. L., Monroy, E., Vaca, S., y González, S. E. 2003. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Revista Médica del Hospital General de México. 66: 13-21.

Poole, K. 2001. Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3:255-264.

Rasooli, I. 2007. Food preservation – A Biopreservative Approach. Food. 1:111-136.

- Ray, B. 1996. Fundamental food microbiology. CRC. Press. Boca Ratón. E. U. pp7-15.
- Reineccius, G. 1994. Source book of flavors. Ed. Chapman & Hall (2nd ed). New York. EE.UU. pp 24-106.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M. y Tantaoui- Elaraki, A. 1993a. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in the agar medium. J Ess Oil Res 5:179–184.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., y Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. Food Chem. 91:621–632.
- Sanchez de Rivas, C. 2006. ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?. Química Viva 2: 63-77.
- Sanders, C. C. 1991. New beta-lactams: new problems for the internist. Ann Intern Med. 115:650-651.
- Schmolz, E., Doebner, R., Auste, R., Daum, R., Welge, G., y Lamprecht, I. 1999. Bioenergetic investigations on tea-tree and related essential oils. Thermochim. Acta 337:71–81.
- Shapiro M, Sacks T, Simchen E, Michel J, y Rudensky B. 1981. Antibiotic use on the surgical services of two Jerusalem hospitals, as determined by surveillance and influenced by an intervention program. Rev Infect Dis. 3: 754-759.
- Shapiro, T., Fahey, W., J., Wade, K., Stephenson, K., y Talalay, P. 2001. Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts: Metabolism and Excretion in Humans. Cancer epidemiol biomarkers. 10:501-508.
- Shimizu, I., Isshiki, Y., Nomura, H., Sakuda, K., Sakuma, K. y Kondo, S. 2009. The antibacterial activity of fragrance ingredients against *Legionella pneumophila*. Biol. Pharm. Bull. 32:1114-1117.

- Sifri, C. D., Barech-Bernal, A., Calderwood, S. B., y von Eiff, C. 2006. Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect Immun.* 74: 1091-1096.
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., y Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269:8022– 8028.
- Skandamis, P. N., y Nychas, G. J. E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91:1011 –1022.
- Smith, M. D. y Navilliat, P. L. 1997. A new protocol for antimicrobial testing of oils. *J Microbial Methods.* 28:21–24.
- Tapondjou, A. L., Adler, C., Fontem, D. A., Bouda, H., y Reichmuth, C. 2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research.* 41:91-102.
- Tenover, F. C. 1991. Novel and emerging mechanisms of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. *Am J Med.* 91(3B):76-81.
- Thoroski, J., Blank, G., y Biliaderis, C. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52:399– 403.
- Tiznado-Hernandez, M., y Troncoso-Rojas, R. 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. *Stewart Postharvest Review.* 1(4):1-14.
- Turina, A. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., y Perillo, M. A. 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122:101–113.
- Ultee, A., Bennik, M. H., y Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561–1568.

- Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., y Smid, E. J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch. Microbiol. 174:233–238.
- Vasil, M. L. 1986. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J. Pediatr. Res. 108:800-805.
- Weber, D. J., Raasch, R., y Rutala, W. 1999. Emerging Resistance and Therapeutic Options. Nosocomial Infections in the ICU. The Growing Importance of Antibiotic-Resistant Pathogens. Chest. 115(3):34- 41.
- WHO, 2002. Food safety and foodborne illness. World Health Organization Fact sheet 237, revised January 2002. Geneva.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Kohler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P., y Tummeler, B. 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:8101–8106.
- Wyllie, M. G. 2003. The genesis of a phyto-pharmaceutical industry (Mark II). BJU Int. 91: 721-722.

URL'S (Última fecha de consulta: 1 de marzo del 2010)

- 1.- www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html Center for Food Safety & Applied Nutrition; Food and Drug Administration.
- 2.- www.conabio.gob.mx
- 3.- www.clsi.org
- 4.- www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/

Anexos

ANEXO 1

TÉCNICA DE DIFUSIÓN DEL ANTIBIÓTICO EN PLACA EMPLEANDO MULTIDISCOS (MÉTODO DE KIRBY-BAUER)

Esta técnica consiste en discos de papel filtro impregnados con el antimicrobiano a probar, los cuales se aplican en la superficie de placas de medio de cultivo sólido sembrado masivamente con el microorganismo cuya sensibilidad o resistencia se quiera probar. Esta técnica será modificada para el uso de aceites esenciales. En caso de que haya sensibilidad, se observará un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco (min. <19mm). El tamaño del halo dependerá de la sensibilidad del microorganismo y de la concentración del antimicrobiano en el disco.

- Lavado, envoltura y esterilización de todo el material a utilizar como: microfiltros con membranas, tubos de ensaye, pipetas y puntas para micropipetas.
- Preparación de caldo peptona de caseína – peptona de harina de soya, colocar 10 mL en 35 tubos con tapón de rosca y esterilizarlos.
- Preparación de agar soya tripticaseína, vaciar en 30 cajas de Petri desechables y estériles, dejar solidificar e incubar a 37°C por 24 horas para comprobar que no hubo contaminación (prueba de esterilidad).
- Preparación de solución salina, colocar 10 mL. en 21 tubos de tapón de rosca y esterilizarlos.

Preparación del inóculo

- Siembra de los cultivos de microorganismos de referencia por estría cruzada cada uno de ellos en una placa de agar y se incubará a 37°C durante 24h.

- Toma con asa esteril de 3 a 5 colonias aisladas en las placas de agar soya tripticaseina al día siguiente; siembra en tubo con caldo peptona de caseína – peptona de harina de soya; incubación a 37°C 24h.
- Toma de algunos mililitros de estas cepas para su adición a la solución salina hasta que la turbidez del tubo sea igual por comparación visual a la del tubo N° 0.5 del Nefelómetro de MacFarland, pues este es el tubo de referencia que corresponde a la concentración de 1.5×10^8 bacterias mL⁻¹.
- Uso inmediato una vez ajustado la suspensión celular para sembrar dos placas de agar soya tripticaseina con un hisopo sobre la totalidad de la superficie del agar para la obtención de un inóculo uniforme, se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja y el agar (siembra masiva).
- Dilución en 1 mL de solución salina una cantidad conocida del aceite esencial; esterilizar la solución pasándola por un microfiltro con membrana Millipore con un tamaño de poro de 0.45 micrómetros de diámetro.
- Obtención de discos de papel filtro Whatman 41 y con ayuda de una perforadora, colocarlos en una caja petri para obtener 20 cajas con 10 discos cada una; esterilización.
- Impregnado de diez microlitros a los discos de papel filtro estériles con ayuda de una micropipeta P-100 para cada una de las diluciones realizadas de los aceites esenciales.
- Colocación con pinzas flameadas en sentido de las manecillas del reloj de los discos de papel filtro a cada placa sembrada con los cultivos ajustados de los microorganismos, presionando ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto completo con la superficie.

- Incubación de las placas a 37°C por 24 horas.
- Corroboración del halo de inhibición alrededor del disco, en caso de presentarlo, medir su diámetro.

ANEXO 2

TÉCNICA DE LA DILUCIÓN DEL EXTRACTO EN MICROPLACA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE CEPAS BACTERIANAS.

Esta técnica consiste en depositar en una microplaca, diferentes concentraciones del antimicrobiano en cada uno de los pozos junto con una cantidad conocida de una suspensión ajustada de los microorganismos de prueba. Para saber si hubo inhibición o no, se lee en un Lector de ELISA cada pocillo y se compara con un testigo.

Utilizando parte de lo que se preparó en la técnica anterior se llevará a cabo lo siguiente en condiciones de esterilidad:

Identificar cada uno de los pozos de la microplaca estéril, los números marcados significaran las diluciones y las letras las bacterias de prueba.

Con ayuda de una micropipeta P-100 colocar en cada uno de los pozos del "1" al "6" 100 μL de caldo nutritivo para cada uno de los extractos y microorganismos (6x4x2), el 7º pozo se dejó vacío como barrera física y el 8º fue adicionado con 100 μL de caldo nutritivo solamente.

Colocar las diluciones seriadas del extracto en cada uno de los pozos de cada fila con la ayuda de una micropipeta P-100 agregando 100 μL agitando con la misma punta de la micropipeta para obtener un homogéneo, de este modo en cada fila se obtendrá una serie decreciente de concentraciones del extracto. La primera columna contendrá la concentración más alta (1:2) y la sexta columna la más baja (1:64). Esta distribución del extracto en la microplaca permite las mediciones posteriores en el lector.

Se adicionaron 10 μL de las suspensiones bacterias ajustadas a una concentración de 1.5×10^8 bacterias por mililitro, de modo que cada pozo tuvo la misma concentración de un cultivo bacteriano.

La columna "9" fue utilizada como control positivo, en donde se colocó el microorganismo que corresponde según la fila, más 100 μ L de caldo nutritivo.

La columna "12" se uso como pozo de desechos al momento de adicionar el extracto o aceite esencial.

Incubar las placas a 37°C por 24 horas.

Al término de este periodo de tiempo las placas se leen en un lector de Elisa (Labsystems Multiskan MS) a una longitud de onda de 620 nm, así se obtendrán las absorbancias de cada pozo que se comparan con el testigo para determinar si hubo o no inhibición.

ANEXO 3

Fundamento y determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica instrumental con alto poder para resolver la separación de mezclas complejas de compuestos que pueden ser volatilizadas. Los compuestos se separan según la afinidad que tengan por una fase estacionaria cuando son transportados por un gas conocido como fase móvil. Al acoplar un espectrómetro de masas al cromatógrafo, se genera una huella digital conocida como espectro de masas de cada una de las sustancias separadas en el cromatógrafo. El espectro de masas contiene información sobre los iones generados durante la fragmentación de los compuestos, estos iones permiten caracterizar la molécula de cada uno de los componentes de la muestra. El ion molecular conocido proporciona el peso del componente separado. Es pues, la espectrometría de masas, una técnica analítica versátil que se usa para identificar compuestos desconocidos. Tiene alta especificidad y sensibilidad que ofrece la ventaja de ser rápido y con rango de aplicabilidad alto en otras técnicas analíticas como la cromatografía de HPLC, resonancia magnética nuclear, infrarrojo etc (Esteban, 1993).

Una vez separadas las moléculas en la columna cromatográfica, ingresan a un área de baja presión, normalmente inferior a 10^{-6} mbar, en la que son vaporizadas en caso de que no sean gaseosas. De ahí son bombardeadas por una fuente de electrones conocida como cámara de ionización, el más utilizado es el de impacto electrónico o "EI". Esta corriente de electrones (100.000 veces mayor a la corriente que circula a nivel casero) es generada por una emisión térmica con un filamento de tungsteno o renio (similar a un foco). Un voltaje de 70 eV bombardea las moléculas en estado gaseoso provocando la emisión estimulada de un electrón ionizado de la misma, generando positivamente hasta 0.01 del total de las moléculas que ingresan. No solamente se generan moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+), también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía (Esteban, 1993).

Se debe considerar que el patrón de fragmentación o forma como se rompe la molécula, presentan proporciones relativas a cada uno de estos iones y es característico de la molécula analizada y de las condiciones del proceso de ionización. Después de que se han generado los iones en los espectrómetros de masa magnéticos, estos, son atraídos hasta un campo magnético con el propósito de alinearlos y proporcionar la misma energía cinética y repeler los electrones generados. Posterior a la alineación, los iones son dirigidos a través del campo hasta un filtro en el que las moléculas que no fueron ionizadas se bombean a lo largo del sistema de vacío (Esteban, 1993).

Finalmente, los iones o fragmentos que llegan al analizador o al ordenador generan un espectro de masa/carga (m/z) el cual es proporcional a la cantidad de fragmentos o iones ordenados una vez que pasaron por el filtro. La información generada se recopila en un espectro de masa/carga el cual es característico de cada sustancia analizada. Se representa en el eje X al radio del ion molecular o cociente masa/carga (m/z) contra su abundancia en el eje Y. al analizar los datos obtenidos con las herramientas de la espectrometría se detectan fragmentos con diferentes abundancias a lo largo del eje masa/carga que proporcionan la información suficiente para conocer la fórmula estructural del compuesto detectado.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de bellotas de ciprés
(*Cupressus sempervirens* var *horizontalis*) y semilla de brócoli
(*Brassica oleraceae* var *italica*) sobre *Staphylococcus aureus* y
*Pseudomonas aeruginosa***

que presentó

Biól. Carlos Ramón Vázquez Quiñones

Comité Tutorial:

Director: Dra. Elsa Bosquez Molina
Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa
Asesor: Dr. Oscar Rodolfo Rodas Suárez

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa

Secretario: Dra. Clara Pelayo Saldivar

Vocal: Dr. José Ramón Verde Calvo

Vocal: Dr. Oscar R. Rodas Suárez

