

Cuernavaca, Mor., 08/09/2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: ALEXIS TÉLLEZ GALVÁN, con el título del trabajo: **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS EXTRACTOS COMERCIALES DE PLANTAS (CÍTRICOS Y CANELA) CONTRA CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* Y *Salmonella Typhimurium*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (X) NO()

A T E N T A M E N T E

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2020-09-08 11:31:31 | Firmante

Zs+5lsUCYEAqUA1X/KJsDjAx4AUH/VDMfexg09UjJTxm6MoWwsMSuH1h8CnxE+uY7OWi64AvAA4Vv/2sKHSEOUb6OsVoSeBS50UVFM+ZC+0nhA6UGUKwyCpdPNEv7vAAV
CMbe5IXsQEla/32k3ig9gOB/k7ps5d8wjcXWESP0DA45/4jwAdMZOHgCQxbu8wxUHnoAVhbYpjksT5OLx+RvOk0S9IB2yX9xmYQhVu1OMi9pCAKUMdMmT040bs5M/I2tc6WiO3
e7I7szUpULC8Cjcg8ab1xiCQ2v0F9RDccJEQ0elxHy6DofnYnfrjTqB9oPjxrJ71w1h3Sne+v/rfCA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



xfyA65

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/jJSHpzO8x1z0rTvDkSrZkJhgOeZKgiZz>



Cuernavaca, Mor., 9 de agosto de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: ALEXIS TÉLLEZ GALVÁN, con el título del trabajo: **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS EXTRACTOS COMERCIALES DE PLANTAS (CÍTRICOS Y CANELA) CONTRA CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* Y *Salmonella Typhimurium*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (X) NO ()

A T E N T A M E N T E

DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DEYANIRA PÉREZ MORALES | Fecha:2020-08-09 14:00:19 | Firmante

ppqj85NRKGC9IX6CPedBFPA4zQr9/DfajMNUXRVT9dxHVz8kuFClotxz1Yd9PDnxfePcCMQV2JjzRqaemr7i5gl87V4Xx0HhXh8XLwNdCwdc75hx4wNa9s8i3VhpjneoOMDkivGXjMx9Dz0I6AOMH3B41Z72nyW/p1mtNsHEq/6r6/b7i/Sy4tg/U7rnP2/PMIbjV0rzMhqlmRbD26dPJNHadX1OXhThFQV6QQP7/5KWEga0cgHT8pumcp8vq5DHNSGYk4R9lecXukKaUlgBFpWagjocSnnel/u17zCQtKlqTPAHvnDw0Zqk1FBVTj/Ya9c4xVv/DB7Ne33Cw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0ur91F

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/58jdpXW1ZgBxzn7VjllKw7QRTcYZuEjqc>



Cuernavaca, Mor., 8 de septiembre 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: ALEXIS TÉLLEZ GALVÁN, con el título del trabajo: **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS EXTRACTOS COMERCIALES DE PLANTAS (CÍTRICOS Y CANELA) CONTRA CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* Y *Salmonella Typhimurium*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (X) NO(____)

A T E N T A M E N T E

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2020-09-08 11:20:43 | Firmante

kC+TF3fg2WceB62IFzIFUI9eJ3t/9+SkOR+fyX4KX7x4AW54GWZTk3je8jo5F2OP4PpBxgqXHeTmRj+Pex4RsBX4zARS7yC57vemAOhYISdNaxZ/z877DcLJj1eN/7teg0Px1IZZo
suPbLnps40KyXMipbVQUAZHO5aQLq1r/eZM/IziUeS5wVb83IB9QiRVsnvAfCzhK1zsnMu1ARX4N7hilUKXDeEhDGRZomrrHtohQ0/S3hJS3BcS/6qGUbZVDqLE30+k2rcBxsost
3zsmZfhpwt24G2ht9Ox5GWxJbR5yReBwaczf6Kc5AqMO8DppOVCI5vxgQ+OruVUK3DQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[gpRHrC](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HBr8rvD4bg3LOP0RsGMagfeAIUSRTluV>



Cuernavaca, Mor., a 9 de agosto de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: ALEXIS TÉLLEZ GALVÁN, con el título del trabajo: **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS EXTRACTOS COMERCIALES DE PLANTAS (CÍTRICOS Y CANELA) CONTRA CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* Y *Salmonella Typhimurium*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

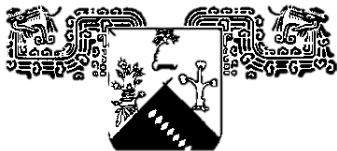
En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI () NO ()

A T E N T A M E N T E



DR. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS EXTRACTOS COMERCIALES DE PLANTAS
(CÍTRICOS Y CANELA) CONTRA CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* Y *Salmonella*
Typhimurium”

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ALEXIS TÉLLEZ GALVÁN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el laboratorio dirigido por el Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, bajo la tutoría de la Dra. Deyanira Pérez Morales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo estuvo financiado por el donativo CONACYT-Problemas Nacionales, número 2017-01-5182, del cual se obtuvieron los recursos para el desarrollo del proyecto de investigación, así como una beca de 7 meses para mí.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer toda una vida de lucha, sacrificios y esfuerzos constantes, solo quiero que sepan que el objetivo logrado también es suyo, y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo, fue su incondicional apoyo. Con admiración y respeto agradezco a mis padres Alejandra Galván Gutiérrez y Sergio Téllez Carpio, así como a mi hermano Ulises Téllez Galván, por ser los principales motores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí.

Agradezco de igual forma a mi directora de tesis la Dra. Deyanira Pérez Morales y al Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, por ser unos excelentes tutores, por siempre estar al pendiente de mis avances experimentales y siempre tomarse el tiempo para atender a mis dudas. Agradezco que me brindaron un lugar en el laboratorio y la confianza de desarrollar un proyecto. Sin duda son excelentes investigadores y sobre todo excelentes personas, un ejemplo a seguir, Me llevo lo mejor de ustedes.

Por último, agradezco a nuestro grupo de trabajo "VB", Marcos, Jessica, Magdalena, Claudia, Daniel, Raul, Fernanda, Emily, Luis, Monica, por ser grandes compañeros, y apoyarme cuando lo necesitaba, y de manera general a todos los integrantes del departamento de Biología Molecular del laboratorio 2 del instituto de biotecnología, UNAM. Donde tuve excelentes compañeros de trabajo y formé grandes amigos.

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
RESUMEN	5
1.INTRODUCCIÓN	6
1.1 GENERALIDADES DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	6
1.2 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	7
1.2.1 Resistencia intrínseca.....	7
1.2.2 Resistencia adquirida	8
1.2.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	8
1.3. EMERGENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.....	9
1.4 FACTORES DETERMINANTES PARA EL SURGIMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	11
1.5 DISEMINACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS Y DE GENES QUE CONFIEREN RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	13
1.6 PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN EL AMBIENTE	15
1.7 CRISIS ACTUAL POR LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	17
1.8 ACINETOBACTER BAUMANNII Y SALMONELLA SPP., PATÓGENOS PRIORITARIOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS	20
1.9 LAS PLANTAS COMO FUENTE BIOLÓGICA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS	22
2. ANTECEDENTES.....	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6. METODOLOGÍA	29
6.1 CEPAS BACTERIANAS	29
6.2 PRODUCTOS COMERCIALES DE EXTRACTOS DE PLANTAS	30
6.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL CINNACAR® Y CITROBIO® POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	30
6.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DEL CINNACAR® Y CITROBIO® POR MACRO DILUCIÓN EN CULTIVO LÍQUIDO	31
6.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE GENTAMICINA Y CIPROFLOXACINA POR MICRO DILUCIÓN EN CULTIVO LÍQUIDO	32
6.6 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO EN EL CUAL EL CINNACAR® Y CITROBIO® TIENEN EFECTO BACTERICIDA SOBRE LAS BACTERIAS.....	33
6.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	33
6.8 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	34
6.9 SELECCIÓN DE BACTERIAS DE A. BAUMANNII RESISTENTES A CINNACAR® Y CITROBIO® A TRAVÉS DE MÚLTIPLES PASES.....	34
7. RESULTADOS.....	36
7.1 LOS PRODUCTOS CINNACAR® Y CITROBIO® PRESENTAN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA DIFERENTES CEPAS DE A. BAUMANNII Y S. TYPHIMURIUM, INCLUYENDO CEPAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	36

7.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE LOS PRODUCTOS CINNACAR® Y CITROBIO® SOBRE LAS DIFERENTES CEPAS DE <i>A. BAUMANNII</i> Y <i>S. TYPHIMURIUM</i>	37
7.3 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ACCIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS PRODUCTOS CINNACAR® Y CITROBIO® FRENTE A <i>A. BAUMANNII</i> Y <i>S. TYPHIMURIUM</i>	41
7.4 LA EXPOSICIÓN AL PRODUCTO CITROBIO® PROVOCA LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DE <i>A. BAUMANNII</i> Y <i>S. TYPHIMURIUM</i>	44
7.5 LA EXPOSICIÓN DE <i>A. BAUMANNII</i> A LOS PRODUCTOS CINNACAR® Y CITROBIO® NO GENERÓ LA SELECCIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A ÉSTOS	46
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS.....	54
11. REFERENCIAS	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Acinetobacter baumannii</i> utilizadas en el presente trabajo.....	29
Tabla 2.- Tiempos de acción en los que diferentes concentraciones del CitroBio® presentan actividad antibacteriana contra <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	42
Tabla 3.- Tiempos de acción en los que diferentes concentraciones del CinnAcar® presentan actividad antibacteriana contra <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Uso estimado de antibióticos en Estados Unidos de América (EUA).....	12
Figura 2.- Selección y transmisión de bacterias resistentes a antibióticos.....	15
Figura 3.- Muertes atribuibles a las infecciones provocadas por bacterias resistentes a antibióticos.....	19
Figura 4.- Lista de patógenos emitida por la OMS, 2017.....	20
Figura 5.- Familias botánicas a las que pertenecen diversas especies de plantas que son usadas en la medicina tradicional mexicana y presentan actividad antibacteriana.....	24
Figura 6.- Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de los productos CinnAcar® y CitroBio® contra cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	36
Figura 7.- Actividad antibacteriana de los productos CinnAcar® y CitroBio® contra cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	37
Figura 8.- Efecto del CinnAcar® y CitroBio® sobre la viabilidad celular de <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	38
Figura 9.- Efecto del CitroBio® sobre la viabilidad celular de <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	39
Figura 10.- Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por efecto del CinnAcar® sobre distintas cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	40
Figura 11.- Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por efecto del CitroBio® sobre distintas cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	41
Figura 12.- Tiempos cortos de acción bactericida del CitroBio® sobre cepas de referencia de <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	43
Figura 13.- Liberación de proteínas intracelulares por efecto de la exposición a CitroBio® en <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	45
Figura 14.- Detección de proteínas intracelulares liberadas por efecto de la exposición a CitroBio® en <i>A. baumannii</i> y <i>S. Typhimurium</i>	45
Figura 15.- La exposición continua de <i>A. baumannii</i> a los componentes del CinnAcar® o CitroBio® no seleccionó bacterias resistentes a éstos.	46

RESUMEN

La acrecentada emergencia y dispersión de bacterias mutirresistentes a antibióticos junto con la búsqueda de nuevas sustancias antibacterianas naturales ha incrementado el interés científico por retomar la búsqueda de compuestos antimicrobianos en extractos derivados de plantas, ya que han demostrado que poseen efectivas propiedades antimicrobianas. El presente estudio demuestra que dos productos comerciales elaborados a partir de un extracto de canela (CinnAcar®) o de frutos cítricos (CitroBio®) tienen actividad bactericida contra cepas de referencia y aislados clínicos mutirresistentes a antibióticos de bacterias patógenas consideradas por la Organización Mundial de la Salud como prioritarias para la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos, *Acinetobacter baumannii* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Nuestros resultados sugieren que para ejercer esta actividad bactericida, los componentes que constituyen a los extractos de canela o cítricos lo hacen a través de un mecanismo distinto por el que actúan los antibióticos a los cuales presentan resistencia las cepas, por lo que dichos componentes podrían representar una alternativa para contrarrestar infecciones causadas por bacterias patógenas como *A. baumannii* y *S. enterica* serovar Typhimurium. Además, los resultados de este trabajo indican que el CitroBio® es un eficiente agente antibacteriano a muy bajas concentraciones y que a concentraciones altas ejerce un efecto bactericida desde tiempos de exposición muy cortos contra cepas que poseen distintos perfiles de resistencia a antibióticos. De manera relevante, después de 35 pases continuos en concentraciones subinhibitorias de los productos CinnAcar® y CitroBio®, no se presentó una selección de bacterias resistentes de *A. baumannii*, en contraste con la generación de resistencia observada tras la exposición gradual a dos antibióticos de uso actual. Los resultados obtenidos indican que estos productos comerciales que ya son usados en cultivos agrícolas u otros extractos de canela o cítricos tienen el potencial de ser buenos candidatos para su aplicación alternativa como desinfectantes en campo o para el desarrollo de agentes bioactivos, respectivamente, contra diversas bacterias patógenas resistentes a antibióticos como *A. baumannii* y *S. enterica* serovar Typhimurium.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los antibióticos

Los antibióticos son compuestos que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de bacterias susceptibles a través de su interacción con blancos moleculares específicos presentes en la célula bacteriana (Andersson & Hughes, 2017). Los antibióticos pueden ser de origen natural (producidos por organismos como bacterias, hongos o plantas), semisintético (derivados de antibióticos naturales que son modificados químicamente) o sintético (sintetizados químicamente).

El descubrimiento de los antibióticos es considerado uno de los avances más importantes en la historia de la medicina. Tras su administración extensiva, fue posible curar una gran variedad de infecciones bacterianas y con ello, salvar millones de vidas (Belloso, 2009, Ventola, 2015).

La era de los antibióticos inició formalmente con el hallazgo de la penicilina por el bacteriólogo británico Alexander Fleming. En septiembre de 1928, durante su trabajo en el Hospital St. Mary de Londres, y gracias a un evento fortuito, Fleming encontró que en una de las cajas Petri donde había cultivado a la bacteria *Staphylococcus aureus*, la espora de un hongo del género *Penicillium*, también había crecido de manera espontánea como una contaminación (Fleming, 1945). Al observar detenidamente la caja Petri, Fleming encontró una zona de inhibición del crecimiento bacteriano (lisis celular) justo alrededor del hongo, intuyendo que éste había secretado una sustancia que inhibía el crecimiento de la bacteria; tiempo después a dicha sustancia le denominó penicilina (Fleming, 1945). Posteriormente, Charles Thom identificó que dicho hongo pertenecía a una cepa de la especie *Penicillium notatum* (Fleming, 1945, Acuña, 2002). Años más tarde, el médico australiano Howard Walter Florey y el bioquímico alemán Ernst Boris Chain, se enfocaron en investigar de forma más detallada aspectos químicos de la penicilina, logrando purificarla, promoviendo su fabricación y administración médica y extensiva (ACS & RCS, 1999). Así, en la década de 1940 se realizó la primera prescripción de antibióticos para tratar infecciones (Ventola, 2015). A partir de ese momento y durante la segunda mitad del siglo XX, se siguieron descubriendo y administrando muchas clases de antibióticos que ayudaron a contrarrestar bacterias

patógenas causantes de diferentes tipos de enfermedades potencialmente mortales, disminuyendo de manera significativa la morbilidad y mortalidad de diversas infecciones bacterianas en humanos (Powers, 2004, Beloso, 2009). La capacidad para curar enfermedades de origen bacteriano también fue posible gracias al conocimiento de los agentes causales de las infecciones (Beloso, 2009). Poco tiempo después de que los antibióticos fueron introducidos en la quimioterapia humana, estos empezaron a ser utilizados también en la veterinaria (Witte, 2000).

Adicionalmente, la administración de los antibióticos también ha incidido de manera positiva en otras áreas de la medicina humana, por ejemplo, su uso terapéutico ha permitido la prevención de infecciones en pacientes inmunocomprometidos a consecuencia de haber experimentado alguna cirugía, trasplantes de órganos o que reciben tratamientos de quimioterapia, entre otros (Ventola, 2015).

1.2 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos se define como la capacidad que tienen las bacterias para multiplicarse en dosis letales de antibióticos, lo que ocasiona que dichos compuestos se vuelvan ineficaces contra las bacterias (Spengler *et al.*, 2017). La resistencia a antibióticos puede ser intrínseca o adquirida.

1.2.1 Resistencia intrínseca

De manera natural, las bacterias pueden ser resistentes a ciertos antibióticos, a esta resistencia se le denomina intrínseca. Este tipo de resistencia se presenta cuando las células bacterianas poseen ciertas características funcionales o estructurales (inherentes a su biología), que las hacen refractarias a la acción de algunos antibióticos; por ejemplo, la ausencia del blanco de acción del antibiótico o la composición de su membrana citoplasmática, la cual proporciona poca permeabilidad a la entrada del antibiótico (Blair *et al.*, 2015). Estas propiedades innatas se presentan permanentemente y están determinadas en el genoma de todas las cepas de una misma especie de bacteria o grupos de ellas (bacterias Gram negativas), además, son independientes de la presión

de selección que ejercen los antibióticos y no se atribuyen a eventos de transferencia horizontal de genes (Cox & Wright, 2013).

1.2.2 Resistencia adquirida

Por otro lado, la resistencia adquirida no es constante, se presenta como una propiedad específica de ciertas cepas de una especie de bacteria determinada que de manera natural es susceptible al efecto de un antibiótico, pero que tras ser modificada genéticamente, ya sea por mutaciones en genes cromosomales o mediante la adquisición de nuevos elementos genéticos asociados con la resistencia a antibióticos, se vuelve refractaria a la acción del antibiótico (Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013). La resistencia adquirida está correlacionada con la presión de selección que ejercen los antibióticos en las bacterias, ya que por procesos de selección natural, las bacterias se adaptan para sobrevivir en las condiciones del medio ambiente, sean éstas favorables o no.

En bacterias, la información genética que se requiere para conferir resistencia adquirida a antibióticos puede estar presente tanto en genes localizados en el cromosoma, como en elementos extra-cromosomales como los plásmidos (Partridge *et al.*, 2018). Además de los plásmidos, otros elementos genéticos móviles, incluyendo transposones, integrones o islas genómicas, pueden actuar como vectores para la transmisión de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias por eventos de transferencia horizontal de genes (conjugación, transducción o transformación) (Partridge *et al.*, 2018). Así, una vez que surgen cepas de bacterias resistentes, este nuevo fenotipo puede diseminarse entre la comunidad bacteriana.

En la clínica, los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles son los más importantes, ya que la resistencia adquirida puede llevar a un fracaso terapéutico por la constante variabilidad genética de las bacterias (Fernández-Riverón *et al.*, 2003).

1.2.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Existen diversos mecanismos moleculares por los que las bacterias pueden desarrollar resistencia a antibióticos, ya sea de manera intrínseca o adquirida; una misma

bacteria puede presentar más de un mecanismo de forma simultánea (Cabrera *et al.*, 2007, Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013, Blair *et al.*, 2015, Wright, 2016, Balaban *et al.*, 2019):

- Disminución de la permeabilidad de la envoltura celular de la bacteria, lo que limita la entrada del antibiótico, ya sea por modificaciones estructurales en los componentes de la envoltura de la célula o por la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas), alterando el sistema de transporte.
- Expresión de proteínas trans-membranales (bombas de eflujo) que expulsan activamente al antibiótico una vez que ha ingresado a la bacteria, lo cual resulta en una baja concentración del antibiótico dentro de la célula.
- Alteración del sitio blanco del antibiótico (sitio que reconoce y donde actúa) por la generación de mutaciones genéticas o modificaciones post-traduccionales; algunas bacterias (micobacterias) aumentan el número de sitios blanco, para que la cantidad de moléculas del antibiótico sean sobrepasadas.
- Expresión de proteínas o enzimas que inactivan al antibiótico, ya sea modificando su estructura química o degradándolo.
- Expresión de estados fisiológicos específicos que son menos susceptibles a la actividad de los antibióticos, como la formación de biopelícula o la generación de células persistentes o tolerantes.

1.3. Emergencia de bacterias resistentes a antibióticos

Se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre el surgimiento de cepas resistentes a antibióticos y el consumo de antibióticos en humanos (Goossens *et al.*, 2005) y animales (Witte, 2000, McEwen & Fedorka-Cray, 2002, Mathew *et al.*, 2007). Al poco tiempo de que el uso de la penicilina (el primer antibiótico en ser prescrito en la clínica en la década de 1940) se haya generalizado, se advirtió la emergencia de cepas patógenas resistentes a este antibiótico en hospitales (Barber & Rozwadowska.Dowzenko, 1948). Invariablemente, la introducción al mercado de

cualquier nuevo antibiótico ha derivado en la posterior emergencia de cepas resistentes en entornos clínicos, incluso en tiempos tan cortos como un año o menos (Marston *et al.*, 2016). Asimismo, a principios de la década de 1950 empezaron a surgir los primeros reportes donde se identificaron bacterias coliformes resistentes a estreptomicina en animales, dicho antibiótico había sido administrado a los pavos de donde se aislaron dichas bacterias (Starr & Reynolds, 1951).

Las bacterias resistentes a antibióticos se pueden clasificar en multidrogo-resistente (MDR), extensivamente drogo-resistente (XDR) o pandrogo-resistente (PDR) (Magiorakos *et al.*, 2012). MDR se refiere a una cepa no susceptible a al menos un antibiótico que pertenezca a tres o más categorías distintas de antibióticos. XDR es una cepa no susceptible a al menos un antibiótico que pertenezca a todas excepto dos o menos categorías de antibióticos, es decir, que son susceptibles a sólo una o dos categorías diferentes de antibióticos. PDR es una cepa no susceptible a todos los antibióticos de todas las categorías. A las bacterias resistentes a múltiples antibióticos se les ha llamado de manera genérica súper-bacterias (*superbugs* en inglés). Además de la resistencia a múltiples antibióticos, en algunos casos estas bacterias también han desarrollado un incremento en su capacidad virulenta, así como una mayor eficiencia en su transmisión (Aslam *et al.*, 2018).

De manera relevante, durante las últimas tres décadas se ha reportado un aumento dramático en la emergencia de cepas de diversas especies de bacterias (Gram negativas y Gram positivas) aisladas de hospitales o de la comunidad, que son MDR, XDR o PDR. Por ejemplo, entre 1989 y 1999, el porcentaje de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina aisladas de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos incrementó de 0.4% a 25.9% en EUA (Cohen, 2000). La resistencia a antibióticos ha sido detectada en numerosos patógenos, sin embargo, los más frecuentes a nivel mundial son bacterias de la familia Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*), así como especies del denominado grupo ESKAPE, que reciben este nombre por el acrónimo que forma la primera letra del género de las especies de bacterias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Rice, 2008).

1.4 Factores determinantes para el surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos

A pesar de que la resistencia a antibióticos es un proceso natural en la evolución de las bacterias, que está regida por la presión de selección que ejercen los antibióticos, así como por características biológicas propias de las bacterias (plasticidad genética, alta tasa de replicación), existen factores antropogénicos sin precedente que han contribuido significativamente a la acelerada selección de bacterias resistentes; uno de los principales es el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en la medicina humana y veterinaria (Holmes *et al.*, 2016).

A nivel mundial, los antibióticos están entre los fármacos que más frecuentemente se prescriben en medicina humana (CDC, 2013). Del año 2000 a 2010, el consumo de antibióticos incrementó 36% a escala global, principalmente en países desarrollados (Van Boeckel *et al.*, 2014). Del total de los antibióticos vendidos, una gran cantidad de antibióticos son recetados en pacientes hospitalizados, pero una cantidad mucho mayor son consumidos en la comunidad, es decir, en pacientes ambulatorios que acuden a unidades de atención primaria de salud (Goossens *et al.*, 2005, ECDC, 2012, Suda *et al.*, 2013). De manera notable, diversos estudios han revelado que hasta en un 60% de los casos, los antibióticos se recetan de forma innecesaria (Hecker *et al.*, 2003, Luyt *et al.*, 2014, O'Neill, 2015b, Fleming-Dutra *et al.*, 2016). Asimismo, se ha evidenciado que la elección del antibiótico que se prescribe, las indicaciones para el tratamiento o la duración de la terapia son inapropiadas en un 30-50% de los casos, lo que lleva a una falta de efectividad de los antibióticos (Ohl & Luther, 2011, Fridkin *et al.*, 2014).

Si bien en los últimos años en algunos países se ha buscado controlar el consumo de antibióticos en humanos, a través de su venta únicamente con receta médica, en la veterinaria se siguen suministrando bajo un esquema poco regulado y vigilado. De manera relevante, a diferencia de lo que ocurre en humanos, donde los antibióticos sólo se administran con fines terapéuticos, en animales del sector pecuario (aves, bovinos, cerdos, ovinos, etc.) no sólo se utilizan para curar enfermedades, también se usan como profilácticos y como promotores de crecimiento (Mathew *et al.*, 2007). Lo anterior ha contribuido en gran medida a que en algunos países, las cantidades de antibióticos

administradas en animales criados para consumo, superen por mucho las que se utilizan en humanos (Hollis & Ahmed, 2013, Van Boeckel *et al.*, 2014, O'Neill, 2015a) (Figura 1).

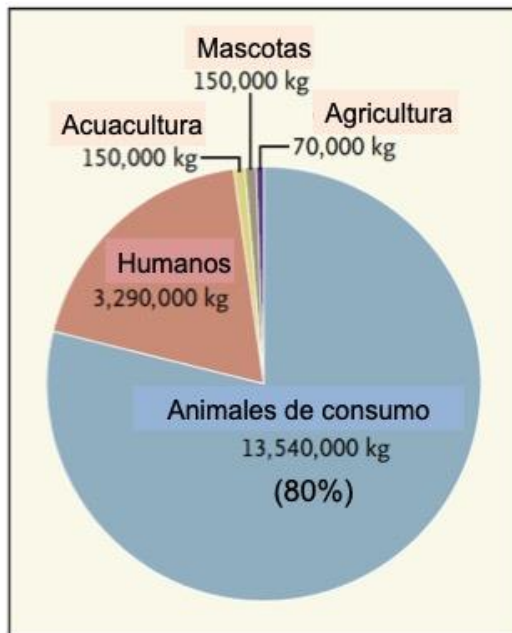


Figura 1.- Uso estimado de antibióticos en Estados Unidos de América (EUA). Los datos se muestran como la cantidad aproximada de antibióticos en kilogramos (kg) usados en EUA en un año, donde del total, el suministro en animales de consumo es mucho mayor ($\approx 80\%$) en comparación a la utilización de antibióticos en humanos ($< 20\%$). Modificado de Hollis and Ahmed, 2013.

En animales, cuando los antibióticos se usan como promotores de crecimiento o como profilácticos, frecuentemente se administran en dosis sub-terapéuticas (no letales) y durante periodos prolongados (Hollis & Ahmed, 2014). Además, tanto en el medio ambiente como en los hospederos, existe un gradiente de concentraciones de antibióticos a las que las bacterias están expuestas. Se ha demostrado que las concentraciones sub-terapéuticas de antibióticos también promueven la selección de bacterias resistentes, ya que favorecen la generación de alteraciones genéticas como cambios en la expresión de genes, transferencia horizontal de genes o mutagénesis (Andersson & Hughes, 2014). Adicionalmente, ciertos antibióticos que se prescriben en medicina humana también son administrados en animales, debido a que algunos de estos antibióticos son de último recurso en la terapia humana, la selección de bacterias resistentes a este tipo de antibióticos en ambientes no clínicos constituye un grave problema (Mathew *et al.*, 2007).

Otros escenarios donde los antibióticos se utilizan de forma inadecuada y/o en exceso son la acuicultura (Cabello, 2006, Heuer *et al.*, 2009), la agricultura (McManus *et al.*, 2002, Stockwell & Duffy, 2012) y la medicina veterinaria para mascotas (Rantala *et al.*, 2004, Guardabassi & Prescott, 2015) (Figura 1).

Aunado al uso indiscriminado de antibióticos, otro gran problema es que el descubrimiento de familias de antibióticos con un mecanismo de acción completamente nuevo se ha reducido drásticamente en los últimos años. Entre 1980-1989, la FDA, que es la Agencia Federal de Medicamentos y Alimentación de EUA (*Food and Drug Administration*), aprobó 30 fármacos antibacterianos, mientras que de 1990-1999 fueron 22; en contraste, de 2000-2009 aprobó sólo 7 nuevos antibacterianos y del 2010-2016, solamente 6 (Powers, 2004, Ventola, 2015, Marston *et al.*, 2016). Así, de manera paradójica, el incremento en la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos coincide con una dramática disminución en el número de compañías farmacéuticas que están desarrollando nuevos antibióticos. La falta de interés en invertir por parte de las farmacéuticas se debe principalmente a la poca rentabilidad que representa el desarrollo de antibióticos. Para que se pueda obtener la aprobación de un nuevo antibiótico por la FDA, se requiere de la realización de numerosos ensayos clínicos, lo que genera grandes costos; a diferencia de los fármacos prescritos para tratar enfermedades crónicas, los cuales necesitan ser consumidos de forma prolongada (generalmente años), los antibióticos se toman sólo durante periodos cortos de tiempo (usualmente días y para algunos pocos, meses); actualmente, para la mayoría de los antibióticos, las patentes para su fabricación se han liberado, por lo que pueden ser suministrados por compañías de medicamentos genéricos, lo que resulta en el acceso a fármacos baratos, además, los consumidores esperan que todos los antibióticos tengan un precio similar (Wright, 2014).

1.5 Diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y de genes que confieren resistencia a antibióticos

Como ya se mencionó anteriormente, tras el consumo excesivo de antibióticos, ocurre la selección de bacterias resistentes a estos fármacos en los seres humanos, animales o plantas (Figura 2). Aunado a esto, otro de los graves problemas es que a

través de múltiples vías, las bacterias resistentes a antibióticos pueden diseminarse entre los organismos y el medio ambiente (Figura 2).

En los seres humanos, una de las principales rutas de exposición y contagio de bacterias resistentes a antibióticos es a través del contacto con personas que las porten, ya sea en centros de salud (clínicas, hospitales) o en entornos comunitarios; los animales de consumo también pueden contagiarse por la cercanía que llega a existir entre ellos en los lugares donde son criados (Woolhouse & Ward, 2013, Bengtsson-Palme *et al.*, 2018) (Figura 2). La transmisión de bacterias resistentes a antibióticos también puede ocurrir de animales (de granja o domésticos) a humanos o viceversa, esta transmisión puede ser directa, mediante el contacto entre ellos, o indirecta, por el consumo por parte de los humanos, de alimentos derivados de animales que portan bacterias resistentes a antibióticos (Woolhouse & Ward, 2013, Weiman, 2016) (Figura 2). Por otro lado, uno de los principales ambientes que es reservorio de bacterias resistentes a antibióticos en animales es el tracto gastrointestinal, de donde pasan al excremento y luego al suelo, en el caso de los humanos, pasan principalmente a las aguas residuales; a partir de estas vías, dichas bacterias pueden diseminarse a los suelos, aguas (ríos, lagos, mares), plantas, etc. (Woolhouse & Ward, 2013, Xiong *et al.*, 2018, Nnadozie & Odume, 2019) (Figura 2). Dentro de este ciclo de diseminación, los cultivos agrícolas que son regados con aguas tratadas o abonados con estiércol contaminados con bacterias resistentes a antibióticos, y que posteriormente sirven de alimento para los seres humanos o los animales, son otra fuente de adquisición de bacterias resistentes a antibióticos (Figura 2). Además, algunas plantas comestibles son portadoras de bacterias resistentes a antibióticos porque reciben aspersión con antibióticos para tratar o prevenir el desarrollo de infecciones, lo cual permite la selección de bacterias resistentes (Woolhouse & Ward, 2013, Stockwell & Duffy, 2012) (Figura 2).

Es preciso resaltar que una vez que las bacterias resistentes a antibióticos alcanzan un nuevo hospedero o nicho ecológico, éstas pueden actuar como donadoras de material genético, y por eventos de transferencia horizontal de genes, transferir a otras bacterias con las que comparten nicho, genes cuyos productos confieren resistencia a los fármacos, promoviendo la diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos en la naturaleza (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Por ejemplo, se han encontrado los

mismos genes asociados con resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de animales y de humanos (Wang *et al.*, 2018a). Las bacterias receptoras de genes asociados con la resistencia a antibióticos pueden ser patógenas o comensales, e incluso pueden tener poca relación filogenética con las bacterias donadoras, aunque es más probable que la transferencia genética ocurra entre bacterias que son filogenéticamente cercanas (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha reportado la presencia de genes de resistencia a antibióticos incluso en el aire de grandes ciudades alrededor del mundo (Li *et al.*, 2018).

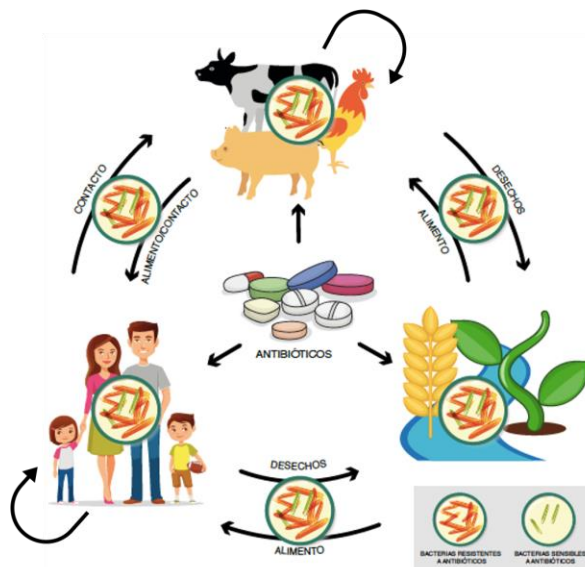


Figura 2.- Selección y transmisión de bacterias resistentes a antibióticos. La administración excesiva de antimicrobianos ha provocado la selección de bacterias resistentes a antibióticos y su transmisión entre humanos, animales y medio ambiente (agua, suelo, aire), a través de múltiples vías. Tomado de Pérez Morales and Bustamante Santillán (2018).

1.6 Presencia de residuos de antibióticos en el ambiente

Se sabe que los antibióticos representan un elemento natural en la composición del suelo, ya que varios de los que actualmente se usan en la medicina fueron aislados a partir de microorganismos que habitan dicho ecosistema y que los producen como metabolitos secundarios. Sin embargo, las principales excepciones a esto son los antibióticos totalmente sintéticos, como las sulfonamidas y quinolonas. Algunos otros, como la mayoría de los beta-lactámicos y algunos macrólidos, son derivados semisintéticos de compuestos naturales. Los antibióticos sintéticos o semi-sintéticos son

menos propensos a la degradación biológica, favoreciendo su acumulación. Aunque la presencia de residuos de antibióticos en el suelo podría considerarse un fenómeno natural, se ha demostrado que las concentraciones de antibióticos actuales son inusuales, debido principalmente a su aplicación en la producción pecuaria (Pikkemaat *et al.*, 2016).

Adicionalmente, muchos antibióticos son pobremente absorbidos por los animales, incluido el hombre y una gran cantidad de ellos son eliminados del cuerpo sin metabolizar y esparcidos en la naturaleza; se ha reportado que hasta un 90 y 75% de los antibióticos administrados en animales pueden ser excretados en la orina y heces, respectivamente (Sarmah *et al.*, 2006). Una vez que los antibióticos ingresan al medio ambiente, es posible que algunos de ellos puedan persistir en la naturaleza, dependiendo de su sorción a partículas orgánicas en el suelo, su transformación o degradación por procesos bióticos o abióticos, lo cual está influenciado por las propiedades fisicoquímicas del mismo, factores climáticos o características del suelo (Pikkemaat *et al.*, 2016, Cycon *et al.*, 2019). Consistente con lo anterior, se han detectado concentraciones de diferentes antibióticos en agua, suelo, estiércol, biosólidos (materia orgánica reciclada a partir del tratamiento de aguas residuales procesadas) y cultivos de plantas, siendo los más abundantes las tetraciclinas (2.68 $\mu\text{g/g}$ en suelo y 184 $\mu\text{g/g}$ en estiércol) y la ciprofloxacina (3.26 $\mu\text{g/g}$ en biosólidos) (Pan & Chu, 2017).

Las altas concentraciones de antibióticos están perturbando los ecosistemas naturales del suelo, al cambiar la estructura y la abundancia de la comunidad microbiana que ahí habita y afectando la capacidad de estos microorganismos para degradar contaminantes y cumplir su papel en ciclos biogeoquímicos (Pikkemaat *et al.*, 2016, Cycon *et al.*, 2019). Por lo tanto, en suelos y aguas impregnados con residuos de antibióticos, las bacterias encuentran otra fuente de exposición constante a antibióticos, por lo que en estos ambientes también se favorece la selección de bacterias resistentes a antibióticos. Por todo esto, además de desarrollar nuevos antibióticos, también es importante buscar métodos de desinfección para estos ambientes.

1.7 Crisis actual por la resistencia a antibióticos

Ya que en la actualidad prácticamente todos los antibióticos que son aplicados en la clínica han perdido su eficacia contra un número cada vez mayor de cepas bacterianas, la resistencia a antibióticos limita las opciones terapéuticas para erradicar bacterias patógenas. Por lo tanto, amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de numerosas infecciones bacterianas, por lo que enfermedades otrora curables, vuelven a ser incurables, dirigiéndonos peligrosamente a una era post-antibiótica, donde algunas enfermedades anteriormente consideradas comunes y poco peligrosas se pueden convertir en mortales (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>).

En pacientes contagiados con bacterias patógenas resistentes a antibióticos, ante la ausencia de una erradicación exitosa, las bacterias pueden permanecer infectando durante periodos más largos de tiempo, en comparación con las bacterias patógenas susceptibles a antibióticos, con lo que aumenta el riesgo de su transmisión; produciendo también tasas de morbilidad y mortalidad más altas (Aslam *et al.*, 2018). Asimismo, estos pacientes requieren tiempos de hospitalización más extensos y como consecuencia, los gastos médicos generados son mayores, tanto para el enfermo como para los sistemas de salud gubernamentales (Aslam *et al.*, 2018).

De manera relevante, los antibióticos también ejercen una presión de selección sobre bacterias que constituyen la microbiota normal (bacterias comensales) de los animales, incluido el hombre, provocando la selección de microorganismos comensales resistentes a antibióticos (Berendonk *et al.*, 2015). En estudios realizados en individuos sanos, se ha determinado que bacterias de la familia Enterobacteriaceae resistentes a beta-lactamasas de espectro extendido, forman parte de su microbiota intestinal, llegando a encontrarse en una proporción mayor al 50% (Woerther *et al.*, 2013). El gran problema es que las bacterias comensales resistentes a antibióticos pueden transferir genes que confieren resistencia a antibióticos a otras bacterias, incluyendo cepas patógenas.

Diversas organizaciones de salud como los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EUA (CDC, *Centers for Disease Control and*

Prevention), la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, *Infectious Diseases Society of America*), el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*) y la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO, por sus siglas en inglés, *World Health Organization*), consideran a la resistencia a antibióticos como un problema mundial que amenaza la salud pública. También se ha proyectado que podría generar consecuencias catastróficas equiparables a las provocadas por el cambio climático (Roope *et al.*, 2019). Además, fue declarada un riesgo global por el Foro Económico Mundial en 2013 (WEF, 2013) y en 2019, la OMS la enumeró dentro de los 10 desafíos prioritarios que tiene que enfrentar en materia de salud (<https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/ten-threats-to-global-health-in-2019>).

Los efectos adversos de la resistencia a antibióticos ya se están manifestando en todo el mundo. Actualmente, las infecciones provocadas por microorganismos resistentes a antibióticos provocan la muerte de al menos 700,000 personas al año a nivel mundial (Figura 3) (O'Neill, 2014). Asimismo, en EUA y Europa, las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos representaron en 2015, una incidencia promedio de 170 años de vida ajustados por discapacidad (AVAD o DALY, por sus siglas en inglés, *Disability-Adjusted Life Years*) por cada 100,000 habitantes (Cassini *et al.*, 2019). Este dato es similar al obtenido de la combinación de los AVAD de tres de las principales enfermedades infecciosas: influenza, tuberculosis y SIDA (183 AVAD/100,000 habitantes) (Cassini *et al.*, 2019). Los AVAD son una medida que representa la carga de una enfermedad, expresada como el número de años perdidos debido a la falta de salud, una discapacidad o una muerte prematura.

Para cerrar la brecha entre las percepciones globales de cuán grave es el problema hoy y lo que podría ocurrir si la tendencia actual continúa, se estimó el posible impacto mundial de la resistencia a antibióticos para el año 2050. Los resultados muestran un costo humano y económico anual considerable: 10 millones de muertes (Figura 3) y un monto de hasta 100 trillones de dólares (O'Neill, 2014).

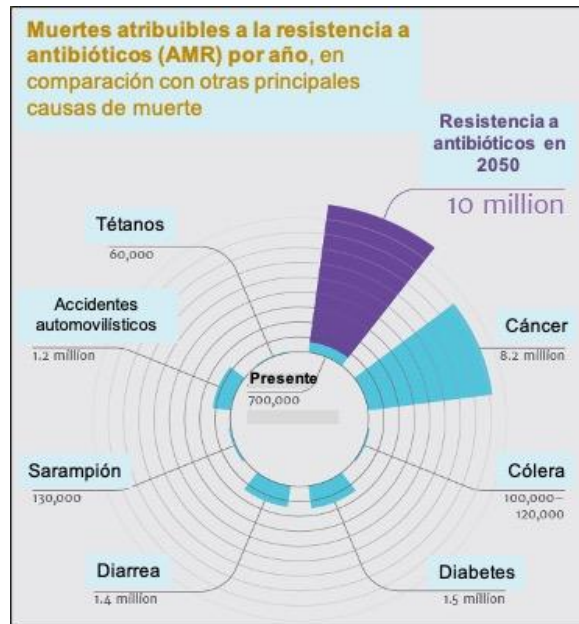


Figura 3.- Muertes atribuibles a las infecciones provocadas por bacterias resistentes a antibióticos. Si la tendencia actual de enfermedades provocadas por bacterias patógenas resistentes a antibióticos continúa, se estima que para el año 2050, la tasa de mortalidad sea de 10 millones de personas anualmente, 14 veces más que hoy en día y que la principal causa de muerte, que es el cáncer. Modificado de O'Neill, 2014.

Ante toda esta problemática, miembros de la OMS emitieron una lista de especies de bacterias patógenas resistentes a antibióticos para las cuales se requiere priorizar la investigación y el desarrollo de antibióticos nuevos y efectivos (WHO, 2017). La categorización de estas bacterias patógenas en tres niveles (Figura 4), estuvo basada en los siguientes criterios: mortalidad que provocan; la carga económica a los sistemas de salud y la comunidad que producen; la prevalencia de la resistencia a antibióticos que presentan; la tendencia a 10 años de su resistencia a antibióticos; su capacidad de transmisión; su propensión para poder prevenirse en los sistemas de salud y la comunidad; si hay versatilidad en los tratamientos efectivos disponibles; y la probabilidad de desarrollar nuevos antibióticos para erradicarlas en el futuro (Tacconelli *et al.*, 2018). Así, se han identificado a las bacterias resistentes a antibióticos más importantes a nivel mundial para las que existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos tratamientos, ya que, entre otras cosas, presentan altas tasas de incidencia en hospitales (Figura 4).



Figura 4.- Lista de patógenos emitida por la OMS, 2017. Se enumeran las especies de bacterias para las cuales se necesita urgentemente de investigación, descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos. De acuerdo con diversos parámetros (ver texto), se categorizaron en tres niveles: crítico, alto y medio. Modificado de <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.

En México, también existe una incidencia creciente de aislamientos de bacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos en diversos hospitales, entre ellas *E. coli*, *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. y *Enterobacter cloacae* (PUCRA, 2018a, PUCRA, 2018b).

1.8 *Acinetobacter baumannii* y *Salmonella* spp., patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos

Dentro de los patógenos prioritarios para realizar investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos se encuentra encabezando la lista, en el nivel crítico (el más urgente), *A. baumannii*. Por otro lado, en el nivel de prioridad alto se encuentran especies del género *Salmonella*, siendo *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium* de aquí en adelante), uno de las serovares más importantes por la patogenia que causa en humanos y animales.

A. baumannii es un cocobacilo Gram negativo, aerobio estricto e inmóvil, ubicuo en suelo y agua, que pertenece a la familia Moraxellaceae y clasificado dentro del grupo de bacterias ESKAPE (Rice, 2008, Howard *et al.*, 2012). De manera relevante, en las

últimas tres décadas ha emergido como un patógeno oportunista que es una causa primordial de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud o IAAS (anteriormente denominadas infecciones nosocomiales), principalmente en pacientes críticos que se encuentran hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), asociado con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Da Silva & Domingues, 2016). No obstante, cada vez son más frecuentes los contagios de *A. baumannii* en pacientes internados fuera de UCI y en la comunidad (Lin & Lan, 2014). Entre los factores de riesgo para la adquisición de *A. baumannii* se encuentran el uso previo de antibióticos; procedimientos médicos invasivos como cirugías mayores, aplicación de catéteres, intubaciones endo-traqueales para ventilación mecánica; quemaduras graves; inmunosupresión; transfusiones de sangre o componentes sanguíneos; entre otros (Fournier & Richet, 2006, Martin-Aspas *et al.*, 2018). Produce un amplio rango de infecciones en muchas partes del cuerpo, las cuales son variables en severidad (Howard *et al.*, 2012). Algunas manifestaciones clínicas que están relacionadas con la infección de *A. baumannii* incluyen choque séptico; neumonía asociada a ventilación mecánica; traqueobronquitis; bacteriemia; infección asociada a cirugía, de tejidos blandos y de la piel o del tracto urinario; meningitis; entre otras (Lin & Lan, 2014, Martin-Aspas *et al.*, 2018). Dos características biológicas se han asociado con la importancia de *A. baumannii* como importante patógeno humano: su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales inhóspitas por periodos largos de tiempo y su resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo los carbapenémicos (Harding *et al.*, 2018) y la colistina, que es un antibiótico de último recurso (Qureshi *et al.*, 2015); se han reportado cepas de *A. baumannii* MDR y PDR (Magiorakos *et al.*, 2012). En nuestro país, se han aislado cepas clínicas de *A. baumannii* de distintos hospitales que presentan un alto porcentaje de resistencia a diversos antibióticos, entre ellos los carbapenémicos (Colín-Castro *et al.*, 2017, PUCRA, 2018a)

S. Typhimurium es un bacilo flagelado, Gram negativo, aerobio, que puede causar salmonelosis, una enfermedad adquirida principalmente a través del consumo de agua o alimentos contaminados, y que se manifiesta como gastroenteritis (amplio espectro de gravedad) y en menor frecuencia como infección sistémica en humanos; también puede infectar un amplio rango de otros hospederos animales (Ilyas *et al.*, 2017). De acuerdo con datos de la OMS, los serovares que se aíslan con más frecuencia en la clínica son

S. Typhimurium y *S. Enteritidis*, mientras que *S. Typhimurium* es más prevalente en aislados no humanos (Galanis *et al.*, 2006). A pesar del mejoramiento en las medidas de saneamiento e higiene, la enfermedad aún representa una significativa carga económica para los sistemas de salud gubernamentales por la morbilidad y mortalidad que causa, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Sanchez-Vargas *et al.*, 2011). Como se ha reportado para muchas otras bacterias que causan infecciones en humanos, el número de cepas de *Salmonella* MDR ha incrementado en muchos países en las últimas tres décadas (Sanchez-Vargas *et al.*, 2011). De manera importante, en México se ha reportado la presencia de cepas de *S. Typhimurium* MDR aisladas de fuentes humanas y animales (Zaidi *et al.*, 2007, Wiesner *et al.*, 2009, Wiesner *et al.*, 2011).

1.9 Las plantas como fuente biológica para el descubrimiento de nuevos antibióticos

Desde hace miles de años y de forma empírica, los seres humanos han utilizado una extensa variedad de especies de plantas como tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, incorporándolas en la práctica de la medicina tradicional (Sharma *et al.*, 2017). Actualmente, casi todos los países del mundo practican la medicina tradicional y la demanda va en aumento, dependiendo del país, la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población se basa en la medicina tradicional (OMS, 2013). Entre las diversas enfermedades infecciosas para las que se utilizan a las plantas como tratamiento se encuentran infecciones respiratorias, gastrointestinales, urinarias, entre otras.

Es de resaltar que muchos de los conocimientos tradicionales han constituido la base para el desarrollo de investigaciones científicas que han comprobado la eficacia terapéutica de numerosas plantas (Sharma *et al.*, 2017).

Las plantas son organismos sésiles que constantemente se encuentran expuestas a la invasión por microorganismos patógenos y/o a la depredación por insectos y otros animales herbívoros, por lo que a través de su evolución adquirieron la capacidad de producir una notable diversidad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales les confieren una ventaja selectiva como mecanismo de defensa (Vivanco *et al.*, 2005). Los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos químicos naturales o fitoquímicos de bajo peso molecular cuya síntesis deriva del metabolismo secundario,

generalmente cumplen funciones no esenciales en los procesos metabólicos básicos, a diferencia de los componentes procedentes del metabolismo primario (Dixon, 2001). Se ha estimado que en conjunto, las plantas sintetizan más de 100,000 metabolitos secundarios, los cuales poseen una extensa diversidad química, de estos, se calcula que se han aislado menos del 10% (Cowan, 1999, Dixon, 2001). Asimismo, se ha estimado que del total de especies de plantas superiores reconocidas (se calcula que hay entre 250,000-500,000 especies de plantas en la tierra), únicamente se ha estudiado a nivel farmacológico entre el 5-10% (Cowan, 1999, Abreu *et al.*, 2012, Borges *et al.*, 2016). Por todo esto, los fitoquímicos producidos por la gran diversidad de especies vegetales constituyen una fuente de recursos naturales sub-explorados con potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad terapéutica, entre ellas la actividad antimicrobiana.

A nivel mundial, se han identificado más de 1,340 plantas que poseen compuestos antimicrobianos definidos (Tajkarimi *et al.*, 2010). Las propiedades antimicrobianas de las plantas se han atribuido a fitoquímicos específicos dentro de los cuales destacan los fenoles (quinonas, flavonoides, taninos, cumarinas, entre otros), terpenos (saponinas), terpenoides, alcaloides, lectinas, polipéptidos, glicolípidos, entre otros (Cowan, 1999, Sharma *et al.*, 2017).

En México, de acuerdo con Sharma *et al.*, 2017, 343 especies de plantas, pertenecientes a 92 familias botánicas, presentan evidencia experimental de tener propiedades antibacterianas. El número de especies bioactivas para cada familia botánica se muestra en la Figura 5, donde se observa que las familias con el mayor número de especies que exhiben propiedades antibacterianas son: *Asteraceae* con 57 especies (16.61%), *Fabaceae* con 28 especies (8.16%), *Lamiaceae* con 21 especies (6.12%) y *Euphorbiaceae* con 14 especies (4.08%); además, estas familias son de las más diversas en México y presentan un alto porcentaje de endemismo (Sharma *et al.*, 2017). También es de destacar que los géneros con mayor número de especies con actividad antibacteriana *in vitro* son: *Bursera* (6 especies); *Lippia* (5 especies); y *Citrus*, *Cordia*, *Lantana*, *Lysoloma*, *Quercus*, *Senna*, *Tagetes* (4 especies cada género). Los últimos géneros agrupan especies de plantas que tienen gran importancia económica,

ya que son utilizados como alimentos básicos, además de tener usos ornamentales y medicinales (Sharma *et al.*, 2017).

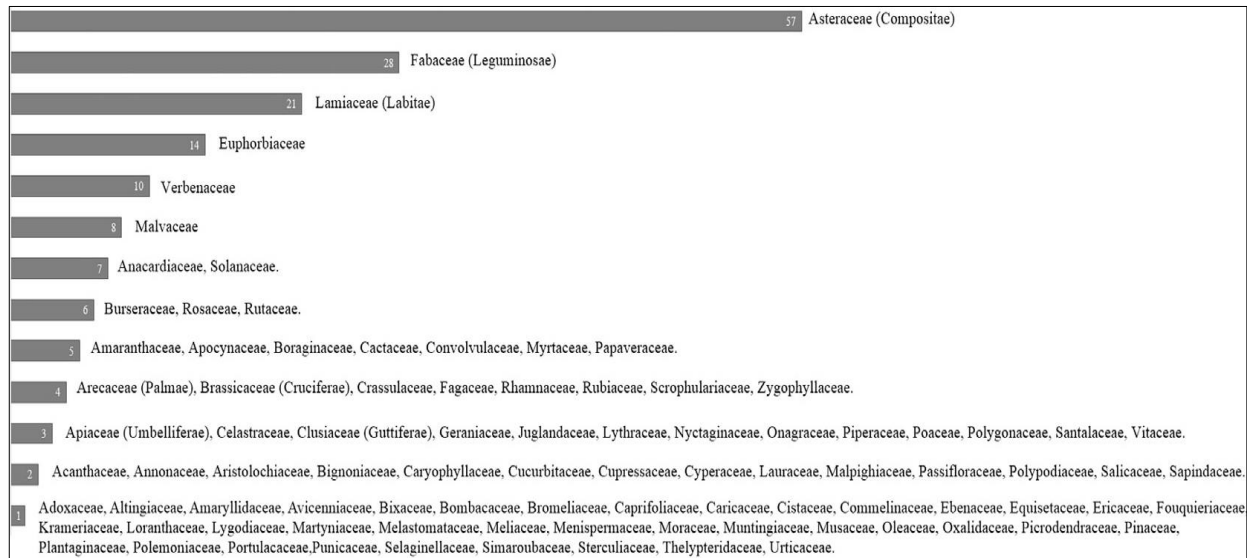


Figura 5.- Familias botánicas a las que pertenecen diversas especies de plantas que son usadas en la medicina tradicional mexicana y presentan actividad antibacteriana. Para cada familia se especifica el número de especies vegetales con actividad antibacteriana. Tomado de Sharma *et al.*, 2017.

2. ANTECEDENTES

Actualmente existe una gama de productos comerciales elaborados a base de extractos de plantas destinados a diversas aplicaciones, una de estas es su utilización como agroquímicos. Nuestro grupo de trabajo ha establecido una colaboración con el Dr. Odón Vite Vallejo, que trabaja en la empresa Grupo Ultraquimia, donde se elaboran productos derivados de extractos de plantas que poseen actividad insecticida y son comercializados para la eliminación de plagas que afectan a las plantas. Debido a que los ingredientes activos de estos productos son componentes derivados de plantas, es decir, moléculas orgánicas, dichos productos son biodegradables, lo que evita su acumulación en el ambiente. Estos productos poseen un registro sanitario ante la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios).

En experimentos previos al presente trabajo, se estudió la capacidad bactericida de varios de los productos elaborados por Grupo Ultraquimia, encontrándose que los productos CinnAcar® y CitroBio®, presentaron actividad antibacteriana contra diversas especies de bacterias, incluidas *A. baumannii* y *S. Typhimurium* (Pérez-Morales, D. y Bustamante, V., datos no publicados). El ingrediente activo del producto CinnAcar® es un extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), mientras que el CitroBio® es un concentrado de extracto de cítricos no especificados.

La canela es una especia muy común que ha sido utilizada por muchísimas culturas alrededor del mundo desde hace varios siglos. Se obtiene a partir de la corteza interior de árboles tropicales perenes del género *Cinnamomum* (familia Lauraceae), principalmente de la especie *C. zeylanicum* (Ranasinghe *et al.*, 2013). Además de su uso culinario, la canela también es utilizada como remedio para tratar padecimientos respiratorios, digestivos, ginecológicos o infecciones urinarias (Ranasinghe *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2017). Asimismo, se ha demostrado que tiene muchos otros efectos biológicos como antiinflamatorio, antidiabético, antioxidante, anticáncer, antiséptico, analgésico, antiespasmódico, astringente, hemostático, insecticida, nematocida, antifúngico y antibacteriano (García, 2016, Vasconcelos *et al.*, 2018). Algunos de los compuestos químicos que constituyen a la canela son el cinamaldehído, eugenol, cinamil acetato, cinamil alcohol, cinamato, ácido cinámico, entre varios otros (Liu *et al.*, 2017,

Vasconcelos *et al.*, 2018). Dependiendo de la parte del árbol utilizada y del método de extracción, la presencia y cantidad de cada uno de los diferentes componentes variará. Por ejemplo, se ha reportado que en el aceite esencial procedente de la corteza, el cinamaldehído es el compuesto más abundante, constituyendo un 56-76% de la composición total, mientras que en el aceite volátil derivado de hojas, el cinamaldehído representa únicamente el 2-3% de los componentes (Ross, 1976). Por otro lado, el eugenol constituye el 81-87% de los compuestos presentes en el aceite esencial obtenido de hojas y sólo el 2-6% en el aceite procedente de la corteza (Ross, 1976). Diversas investigaciones realizadas con extractos de canela han demostrado su efecto antimicrobiano contra hongos y diferentes bacterias como *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y especies de los géneros *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, entre otros (Gupta *et al.*, 2008, Ranasinghe *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2017).

Por otro lado, el género *Citrus* agrupa a diversas especies de arbustos o árboles perenes de la familia Rutaceae, cuyos frutos son comúnmente llamados cítricos y poseen un alto contenido de vitamina C y ácido cítrico. Debido a su facilidad de entrecruzamientos, existen numerosos híbridos o variedades cultivadas. Estudios realizados con diferentes cítricos de gran consumo como son naranja dulce (*Citrus x sinensis*), limón (*Citrus x limon*), toronja (*Citrus x paradisi*), bergamota (*Citrus x bergamia*), entre otros, han demostrado que poseen propiedades antimicrobianas efectivas frente a distintas especies de bacterias como *E. coli*, *S. aureus*, así como especies de los géneros *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Listeria*, entre otros (Juárez *et al.*, 2010, Torres-Alvarez *et al.*, 2016, Baba *et al.*, 2018, Ramadan *et al.*, 2015, Mandalari *et al.*, 2007, Negi & Jayaprakasha, 2001).

A pesar de que la actividad antimicrobiana de extractos de canela y de diferentes cítricos contra varias especies de bacterias ha sido previamente estudiada, su actividad frente a aislados de bacterias resistentes a antibióticos, así como sobre la especie *A. baumannii*, ha sido escasamente evaluada. Así, dado que los productos comerciales CinnAcar® y CitroBio® son biodegradables y no son tóxicos para las plantas y animales, incluido el humano, en el presente trabajo se determinó si estos productos también poseían una actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas *A. baumannii* y *S. Typhimurium*, incluyendo cepas multirresistentes a antibióticos.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana es hoy en día una de las mayores amenazas para la salud, debido a que muchos de los antibióticos que se utilizan en la actualidad han perdido su acción frente a bacterias resistentes. Es por eso que hay una urgencia en desarrollar alternativas a los antibióticos actuales que puedan contender contra este tipo de microorganismos, no sólo a nivel clínico, sino con otras posibles aplicaciones para eliminar bacterias resistentes a antibióticos en el medio ambiente.

4. HIPÓTESIS

Los productos comerciales de extractos de plantas CinnAcar[®] (extracto de canela) y CitroBio[®] (extracto de cítricos), presentarán actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si los productos CinnAcar[®] y CitroBio[®] presentan actividad antibacteriana contra cepas multirresistentes a antibióticos de las bacterias patógenas *Acinetobacter baumannii* y *Salmonella Typhimurium*.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antibacteriana de los productos (CinnAcar[®] y CitroBio[®]) contra aislados clínicos multirresistentes a antibióticos de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*.
- Determinar la concentración mínima bactericida de los productos (CinnAcar[®] y CitroBio[®]) en *A. baumannii* y *S. Typhimurium*.
- Determinar el tiempo en el cual los productos (CinnAcar[®] y CitroBio[®]) presentan actividad antibacteriana contra *A. baumannii* y *S. Typhimurium*.
- Examinar si la exposición a los productos CinnAcar[®] y CitroBio[®] selecciona bacterias resistentes de *A. baumannii*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas bacterianas

Las cepas de *S. Typhimurium* utilizadas en este proyecto forman parte del cepario de laboratorio del Dr. Víctor H. Bustamante Santillán del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 y A773 fueron proporcionadas por el Dr. Rafael Franco Cendejas, del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ), Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”. El aislado *A. baumannii* 5038 fue donado por el Dr. Miguel Ángel Cevallos del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. En la Tabla 1 se muestran algunas características de las cepas utilizadas en este estudio.

Tabla 1.- Cepas de *Salmonella* Typhimurium y *Acinetobacter baumannii* utilizadas en el presente trabajo.

Cepa bacteriana	Perfil de resistencia a antibióticos	Fuente de Aislamiento
<i>S. Typhimurium</i> SL1344 (cepa de referencia)	Estreptomicina	Bovino
<i>S. Typhimurium</i> 33676	Ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, amikacina, gentamicina, ceftazidima, trimetoprima, ciprofloxacino	Aislada de un hemocultivo de una paciente de 15 años con infección febril y pancolitis severa
<i>S. Typhimurium</i> YU39	Ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina, ceftriaxona, ácido nalidíxico, trimetoprima	Aislada en Yucatán de un paciente con infección sistémica en sangre
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978 (cepa de referencia)	Ampicilina	Aislada de un niño de 4 meses con meningitis fatal
<i>A. baumannii</i> 5038	Multirresistente a antibióticos	Sin información
<i>A. baumannii</i> A773	Gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina, tigeciclina, minociclina, cefepima, kanamicina	Aislada de una biopsia a partir de una granulación facial en humanos

6.2 Productos comerciales de extractos de plantas

A continuación, se mencionan algunas características de los productos comerciales evaluados en este proyecto:

CinnAcar®

Nombre: PROGRANIC CinnAcar

Ingrediente activo: Extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Concentración: 15.0% en peso, equivalente a 151.8 g de i.a./L

Formulación: Emulsión aceite en agua

Uso: Agrícola

Clasificación: Insecticida y/o acaricida (botánico)

Mecanismo de acción: Contiene sustancias naturales (cinamaldehído) que causan mortalidad, repelencia y disuasión de la alimentación de los insectos, también causan excitación del sistema nervioso que provoca un enmascaramiento de las feromonas involucradas en el apareamiento. Crea una barrera mecánica contra los insectos plaga.

CitroBio®

Concentrado de extracto de cítricos utilizado para desinfectar alimentos y que sirve de materia prima para la elaboración de productos de uso agrícola por Grupo Ultraquimia.

6.3 Determinación de la actividad antibacteriana del CinnAcar® y CitroBio® por el método de difusión en disco

En este trabajo, los protocolos que se siguieron para determinar la actividad antibacteriana de los productos comerciales CinnAcar® y CitroBio®, fueron los avalados para evaluar la susceptibilidad a antibióticos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* o CLSI (CLSI, 2017) y lo especificado por Uddhav and Sivagurunathan (2016).

De acuerdo con el CLSI, se recomienda el uso del medio de cultivo Mueller-Hinton (MH) como el más adecuado para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos porque muestra buena reproducibilidad de lote a lote; es adecuado para el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas; y existen datos recopilados suficientes que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio. Considerando lo

anterior, en el presente proyecto se decidió utilizar el medio MH para evaluar la actividad antibacteriana de los productos CinnAcar® y CitroBio®.

Para el método en difusión en disco, el mismo día del experimento se prepararon cajas Petri que tuvieran una capa de agar MH (BIOXON) de 4 mm de grosor. Para esto, se agregaron 20 ml de agar MH fundido a placas Petri de poliestireno de 90 x 15 mm (Klinicus). A partir de pre-inóculos de las cepas a evaluar, los cuales habían sido incubados en 5 ml de LB (10 g de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona en 1 litro de agua destilada, pH 7.2) a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche, una dilución 1/50 se inoculó en un nuevo cultivo de 5 ml de LB y se incubó a 37°C en agitación, hasta alcanzar una Densidad Óptica a 600 nm de 0.6 ($DO_{600nm}=0.6$), cuya densidad bacteriana es de $\sim 1 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml. Una vez que se alcanzó la DO de 0.6, se hicieron diluciones 1/10 de cada cultivo, para tener una densidad de $\sim 1 \times 10^7$ UFC/ml. Cinco ml de los cultivos diluidos se colocaron en las cajas Petri con agar MH, permitiendo que el cultivo se absorbiera durante 1 min. Transcurrido el tiempo, el exceso de cultivo se retiró con una pipeta estéril y se dejó secar durante 20 min adicionales. Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron impregnados con 15 μ l de CinnAcar®, CitroBio®, agua estéril, emulsificante o kanamicina (Sigma-Aldrich) (30 μ g) y se dejaron secar durante 5 min. Posteriormente, con la ayuda de pinzas estériles, los discos fueron colocados sobre las cajas Petri y éstas se incubaron a 37°C durante 18 h para determinar la presencia o no de un halo de inhibición alrededor del disco. Si se detectó un halo de inhibición, su diámetro se midió con una regla.

6.4 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del CinnAcar® y CitroBio® por macro dilución en cultivo líquido

La CMB se define como la concentración más baja en la cual no se detecta ningún crecimiento después de subcultivar el cultivo expuesto al compuesto a evaluar en medio fresco (Burt, 2004).

Se siguieron protocolos descritos por Uddhav and Sivagurunathan (2016) y Chimnoi *et al.* (2018). A partir de pre-inóculos de las cepas a evaluar, los cuales habían

sido incubados en 5 ml de LB a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche, una dilución 1/50 se inoculó en un nuevo cultivo de 5 ml de LB y se incubó a 37°C en agitación, hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0.6$, el cual contiene $\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml. Este cultivo se diluyó 1/20 para contener $\sim 5 \times 10^6$ UFC/ml, finalmente se tomaron 10 μ l de este cultivo para tener 5×10^4 UFC por tubo. Estas bacterias fueron inoculadas en tubos de ensayo (13 x 100 mm) estériles con distintas diluciones (V/V) del producto comercial a evaluar (CinnAcar® o CitroBio®) en medio MH líquido (DIFCO DB), en un volumen final de 1 ml. Para cada microorganismo ensayado se colocó como control de crecimiento un tubo que no tuviera el compuesto a evaluar. Los tubos se incubaron a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante 16 h. Transcurridas las 16 h, los cultivos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min para retirar los productos (CinnAcar® o CitroBio®) de los cultivos, resuspendiendo la pastilla de bacterias en 1 ml de amortiguador de fosfato (PBS) 1X estéril. Diluciones seriadas en PBS 1X estéril de estos cultivos fueron plaqueadas en placas de agar LB e incubadas a 37°C durante 18 h para obtener el número de UFC.

6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de gentamicina y ciprofloxacina por micro dilución en cultivo líquido

La CMI se define como la concentración más baja que provoca la inhibición visible del crecimiento del organismo evaluado (Burt, 2004).

Se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior, excepto que el crecimiento de las bacterias en las distintas concentraciones de los antibióticos gentamicina (Sigma-Aldrich) y ciprofloxacina (Sigma-Aldrich) se evaluó en placas de cultivo celular de 96 pozos estériles (Corning) en volúmenes finales de 100 μ l y no se obtuvieron los números de las UFC, únicamente se determinó en un espectrofotómetro (DO_{600nm}), si las bacterias crecieron o no en presencia de las diferentes concentraciones de los antibióticos.

6.6 Determinación del tiempo en el cual el CinnAcar[®] y CitroBio[®] tienen efecto bactericida sobre las bacterias

A partir de pre-inóculos de las cepas a evaluar, los cuales habían sido incubados en 5 ml de LB a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche, una dilución 1/50 se inoculó en un nuevo cultivo de 5 ml de LB y se incubó a 37°C en agitación, hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0.6$. Un ml de estos cultivos se expuso a la CMB, así como a 2X y 4X la CMB de cada producto (CinnAcar[®] o CitroBio[®]) durante 10, 30, 60, 120 y 180 min o durante 15 s, 5 y 10 min a 4X la CMB del CitroBio[®]. A continuación, los cultivos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min para retirar los productos de los cultivos, resuspendiendo las pastillas de bacterias en 1 ml de PBS 1X estéril. Posteriormente, diluciones seriales de los cultivos fueron plaqueadas en placas de agar LB e incubadas a 37°C durante 18 h para determinar el número de UFC en cada uno de los tiempos evaluados.

6.7 Cuantificación de proteínas

A partir de pre-inóculos de las cepas a evaluar, los cuales habían sido incubados en 5 ml de LB a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche, una dilución 1/50 se inoculó en un nuevo cultivo de 5 ml de LB y se incubó a 37°C en agitación, hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0.6$. Un ml de estos cultivos se expuso a una dilución 1/100 de cada producto (CinnAcar[®] o CitroBio[®]) durante 10 min. A continuación, cada cultivo fue centrifugado a 13,000 rpm durante 1 min para retirar los productos de los cultivos y las pastillas de bacterias se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X estéril. Paralelamente, 1 ml de cada cultivo fue sonicado en un sonicador (Soniprep 150) durante 3 minutos. Asimismo, 1 ml de cada cultivo sin tratar fue usado como control negativo del experimento. A continuación, los cultivos tratados con el CinnAcar[®] y CitroBio[®], los sonicados y los no tratados fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 5 min para obtener los sobrenadantes libres de células. Cada sobrenadante fue cuidadosamente trasladado a un tubo eppendorff limpio. Estos sobrenadantes obtenidos también se usaron en la electroforesis de proteínas.

Para la cuantificación de las proteínas totales presentes en los sobrenadantes obtenidos, se utilizaron placas de 96 pozos (Corning) donde se agregaron por duplicado 10 μ l de cada sobrenadante por pozo, utilizando como blanco PBS 1X. Posteriormente se añadió a cada pozo 200 μ l de una mezcla (50:1) de los reactivos del kit BCA “Protein Assay Reagent” (Pierce) y se incubó la placa a 37°C durante 30 min. La concentración de proteínas totales se calculó mediante la lectura de las absorbancias a 562 nm en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (BioTek), utilizando el software KC3. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de concentraciones de la proteína BSA (albúmina de suero de bovino).

6.8 Electroforesis de proteínas

La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis desnaturalizante o SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) en geles de poliacrilamida (acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%) al 12%, corridos en buffer Tris-Glicina 1X/SDS 0.1% a 40 mA durante 3 h. Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R250 (BioRad).

6.9 Selección de bacterias de *A. baumannii* resistentes a CinnAcar® y CitroBio® a través de múltiples pases

Se siguió el protocolo descrito por Zipperer *et al.* (2016). Al día 1 del experimento, un pre-inóculo de la cepa a evaluar incubado en 5 ml de LB a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche fue diluido 1/50 en 5 ml de LB e incubado a 37°C en agitación hasta alcanzar una $OD_{600nm}=0.6$. En tubos de ensayo estériles (13 x 100 mm), se prepararon concentraciones (V/V) mayores a la CMB (4X y 2X), concentraciones menores (0.5X) o la CMB (1X) del producto comercial a evaluar (CinnAcar® o CitroBio®) en un volumen final de 1 ml de medio MH líquido. Concentraciones 4X, 2X, 1X y 0.5X de la CMI también se prepararon para los antibióticos gentamicina y ciprofloxacina, los cuales fueron utilizados como control positivo del experimento. De cada concentración de los productos comerciales y de los antibióticos, 100 μ l fueron colocados por duplicado en placas de cultivo estériles de 96 pozos (Corning), a los cuales posteriormente se les

inoculó 10 µl de los respectivos cultivos de bacterias crecidos a una $OD_{600nm}=0.6$, para tener una densidad de $\sim 1 \times 10^6$ UFC. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 h y a continuación se determinó el crecimiento de los cultivos midiendo la DO_{600nm} en un espectrofotómetro para microplacas Epoch 2 (BioTek). Este procedimiento se repitió cada 24 h durante 35 días, tomando como inóculo para cada nuevo día, las bacterias crecidas en la concentración subinhibitoria (no inhibidora del crecimiento) de los productos comerciales o de los antibióticos. Inicialmente, la concentración subinhibitoria correspondía a 0.5X de la CMI (gentamicina o ciprofloxacina) o la CMB (CinnAcar® o CitroBio®). Sin embargo, el día en el que las bacterias crecían en concentraciones igual o mayores a las de la CMI o la CMB, es decir, 1X, 2X o 4X, se tomaba esta nueva concentración como la subinhibitoria y se exponía a las bacterias a dos concentraciones dos veces mayores que la última concentración inhibitoria. Por ejemplo, si las bacterias crecían a una concentración 2X de la CMI o la CMB, esta concentración era la nueva concentración subinhibitoria y se les exponía al día siguiente a 4X y 8X y así sucesivamente.

7. RESULTADOS

7.1 Los productos CinnAcar® y CitroBio® presentan actividad antibacteriana contra diferentes cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*, incluyendo cepas multirresistentes a antibióticos

Como primer acercamiento, la actividad antimicrobiana de los productos CinnAcar® y CitroBio® fue evaluada cualitativamente, mediante el método de difusión en disco (Figura 6). Ya que el CitroBio® es un producto cuyo diluyente es el agua y el CinnAcar® está mezclado con un emulsificante, el agua y el emulsificante fueron usados como controles negativos. Como control positivo se utilizó al antibiótico kanamicina (Figura 6). Para el caso de la cepa *A. baumannii* A773, en el momento en que se realizó la prueba no se sabía que era resistente a kanamicina. Considerando como actividad antibacteriana positiva la presencia de un halo de inhibición del crecimiento, en la Figura 7 se muestran los diámetros de los halos de inhibición formados por efecto del CinnAcar® y el CitroBio®, en las diferentes cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Como puede observarse, ambos productos presentaron actividad contra todas las cepas evaluadas, incluyendo las cepas MDR (*A. baumannii* A773, *A. baumannii* 5038, *S. Typhimurium* 33676 y *S. Typhimurium* YU39). Resaltando que el CinnAcar® exhibió una actividad mayor que el CitroBio®, e incluso mayor que el control positivo.

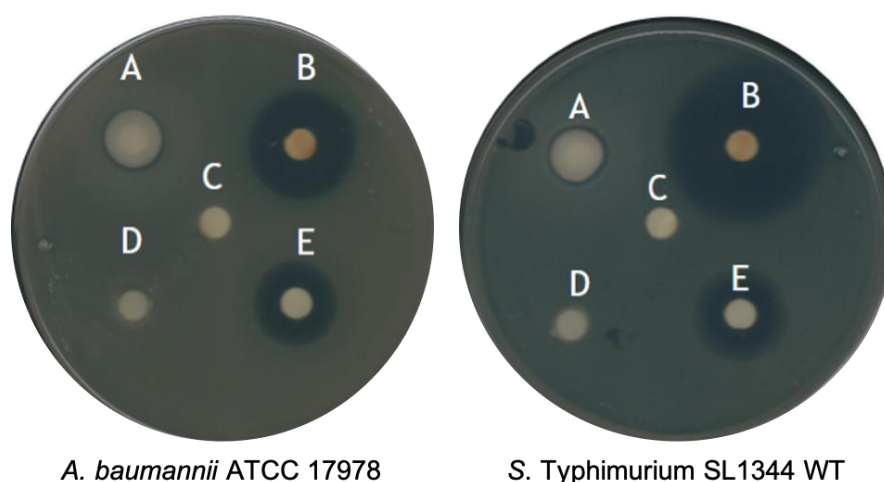


Figura 6.- Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de los productos CinnAcar® y CitroBio® contra cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en disco en todas las cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*, aquí sólo se muestra el efecto en las cepas de referencia. A) CitroBio®, B) CinnAcar®, C) Agua, D) Emulsificante y E) Kanamicina. Figura representativa de al menos tres repeticiones con resultados similares.

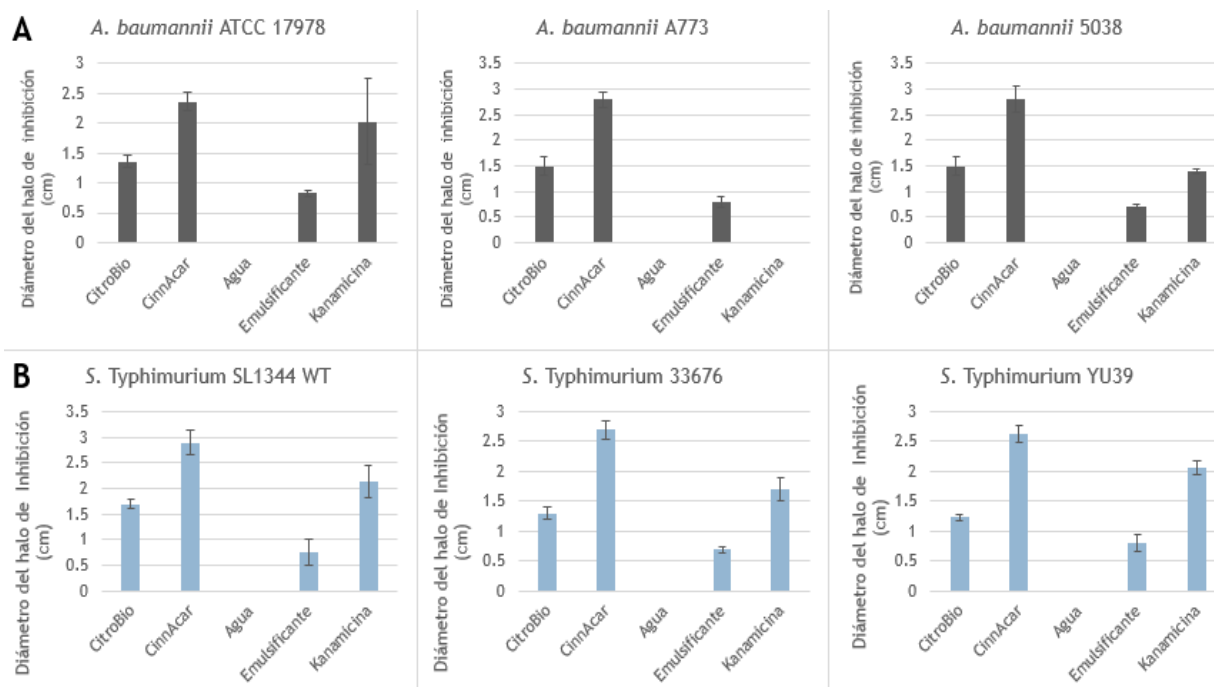


Figura 7.- Actividad antibacteriana de los productos CinnAcar® y CitroBio® contra cepas de *A. baumannii* (A) y *S. Typhimurium* (B). La actividad de los compuestos evaluados fue determinada como positiva por la presencia de un halo de inhibición. De cada halo de inhibición se midió el diámetro en centímetros (cm). Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

7.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los productos CinnAcar® y CitroBio® sobre las diferentes cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*

Una vez que se determinó que los productos CinnAcar® y CitroBio® presentaron actividad antibacteriana contra las distintas cepas evaluadas, el siguiente paso fue determinar la concentración a la cual presentaban dicho efecto inhibitorio. Para esto se realizó la determinación de la CMB por la técnica de macrodilución. Cultivos de las distintas cepas fueron expuestos con distintas concentraciones (diluciones V/V) de CinnAcar® (151.80 g/L) y CitroBio® (concentración desconocida), durante 16 horas a 37°C. Debido a que no existían estudios previos acerca del uso de estos productos comerciales como antimicrobianos, que sugirieran la concentración a la cual se pudiera observar un efecto sobre las bacterias, como primera exploración se decidió probar un rango de distintas diluciones con diferencia de un factor de 10 (diluciones 1/10 hasta 1/10,000). Como se puede observar en la Figura 8, al usar las cepas de referencia de *A.*

baumannii y *S. Typhimurium*, la dilución mínima de CinnAcar® a partir de la cual ya no se observó crecimiento bacteriano fue 1/100 (1.518 g/L). A las diluciones 1/1000 (0.1518 g/L) y 1/10,000 (0.01518 g/L), el número de bacterias viables fue muy similar al encontrado en la condición control (no expuesta al CinnAcar®). Sorprendentemente, para el CitroBio®, incluso en la dilución 1/10,000 no se recuperaron bacterias viables de ninguna de las dos cepas de referencia usadas, *A. baumannii* y *S. Typhimurium* (Figura 8), mostrando un efecto inhibitorio más potente en comparación con el CinnAcar®.

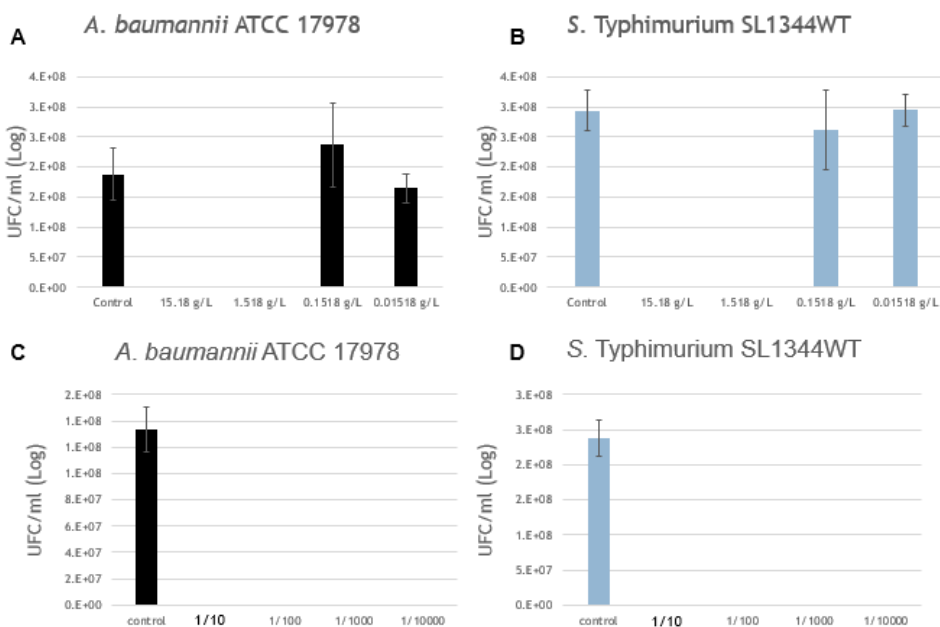


Figura 8.- Efecto del CinnAcar® (A, B) y del CitroBio® (C, D) sobre la viabilidad celular de *A. baumannii* (A, C) y *S. Typhimurium* (B, D). Cultivos de *A. baumannii* ATCC 17978 o *S. Typhimurium* SL1344 WT con un número aproximado de 50,000 bacterias totales fueron expuestas a distintas diluciones (V/V) de CitroBio®. La condición control representa las bacterias no expuestas a CitroBio®. Los cultivos fueron incubados en medio Mueller-Hinton líquido a 37°C durante 16 horas en agitación. Posteriormente, el número de bacterias viables expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinado por conteo en placas de LB. Los datos son expresados como el promedio ± desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Con el fin de determinar la CMB para el CitroBio®, los cultivos de las bacterias de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* se expusieron a diluciones mayores de 1/10,000, encontrándose que la dilución en la cual se recuperaron bacterias viables fue 1/100,000 (Figura 9).

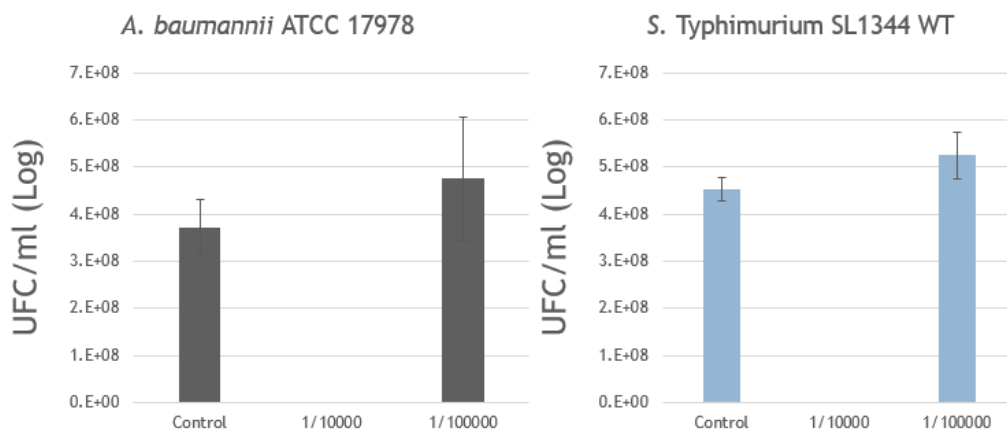


Figura 9.- Efecto del CitroBio® sobre la viabilidad celular de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Cultivos de *A. baumannii* ATCC 17978 o *S. Typhimurium* SL1344 WT con un número aproximado de 50,000 bacterias totales fueron expuestas a distintas diluciones (V/V) de CitroBio®. La condición control representa las bacterias no expuestas a CitroBio®. Los cultivos fueron incubados en medio Mueller-Hinton líquido a 37°C durante 16 horas en agitación. Posteriormente, el número de bacterias viables expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinado por conteo en placas de LB. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Para determinar la CMB específica, se redujo el rango de diluciones a probar, a partir de la dilución en la que no se recuperaron colonias viables y la primera dilución donde se observó crecimiento de *A. baumannii* o *S. Typhimurium* (Figuras 8 y 9), con incrementos en un orden de 2. Esto último, siguiendo el orden de incremento de las concentraciones que se establecen en el CLSI para determinar la CMI de antibióticos. Además, se incluyó a las cepas MDR para determinar la CMB. En la Figura 10 panel A, se muestra el efecto del CinnAcar® sobre el crecimiento de las tres cepas de *A. baumannii*, encontrándose que la CMB para la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 fue de 0.759 g/L y para las cepas MDR, *A. baumannii* A773 y *A. baumannii* 5038, fue de 0.379 g/L.

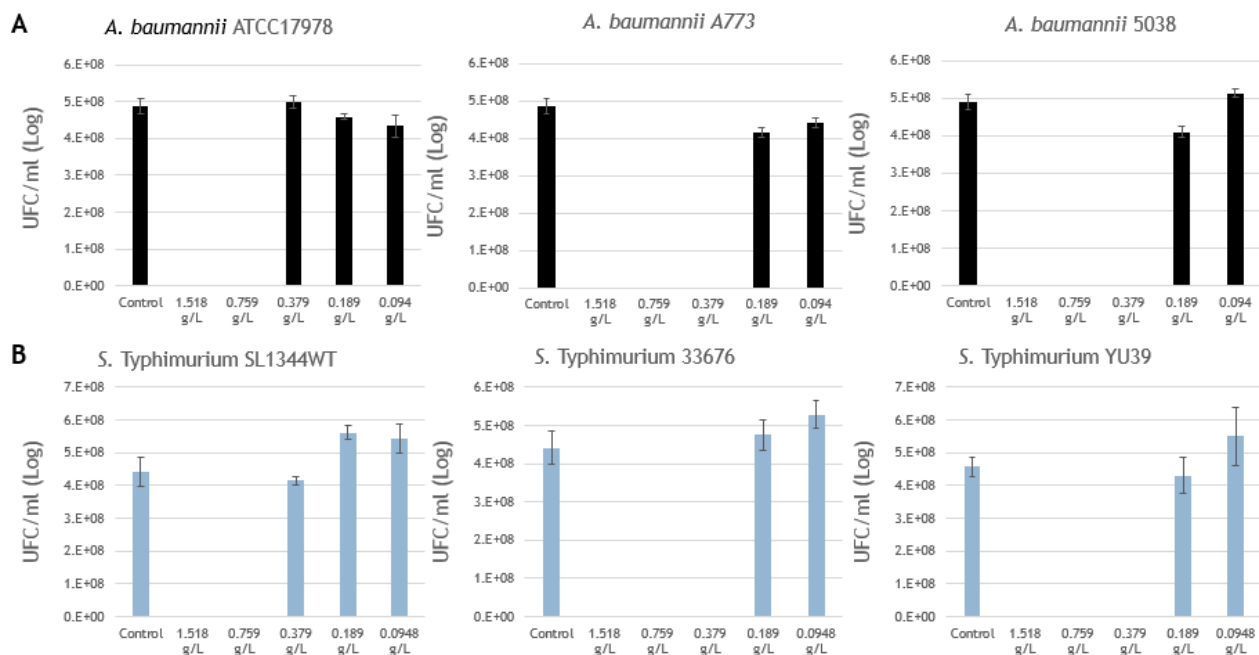


Figura 10.- Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por efecto del CinnAcar[®] sobre distintas cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Cultivos de las diferentes cepas con un número aproximado de 50,000 bacterias totales fueron expuestas a distintas diluciones (V/V) de CinnAcar[®]. La condición control representa las bacterias no expuestas a CinnAcar[®]. Los cultivos fueron incubados en medio Mueller-Hinton líquido a 37°C durante 16 horas en agitación. Posteriormente, el número de bacterias viables expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinado por conteo en placas de LB. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Cuando las distintas cepas de *S. Typhimurium* fueron evaluadas, la CMB para la cepa SL1344 WT correspondió a una dilución de 0.759 g/L, mientras que para las cepas MDR *S. Typhimurium* 33676 y *S. Typhimurium* YU39 fue de 0.379 g/L (Figura 10 panel B).

En el caso del CitroBio[®], la CMB para la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* fue de 1/40,000, mientras que para las dos cepas MDR (*A. baumannii* A773 y *A. baumannii* 5038) fue de 1/20,000 (Figura 11 panel A). Para *S. Typhimurium*, la CMB de la cepa de referencia SL1344 WT y de las cepas MDR (*S. Typhimurium* 33676 y *S. Typhimurium* YU39) fue de 1/10,000 (Figura 11 panel B).

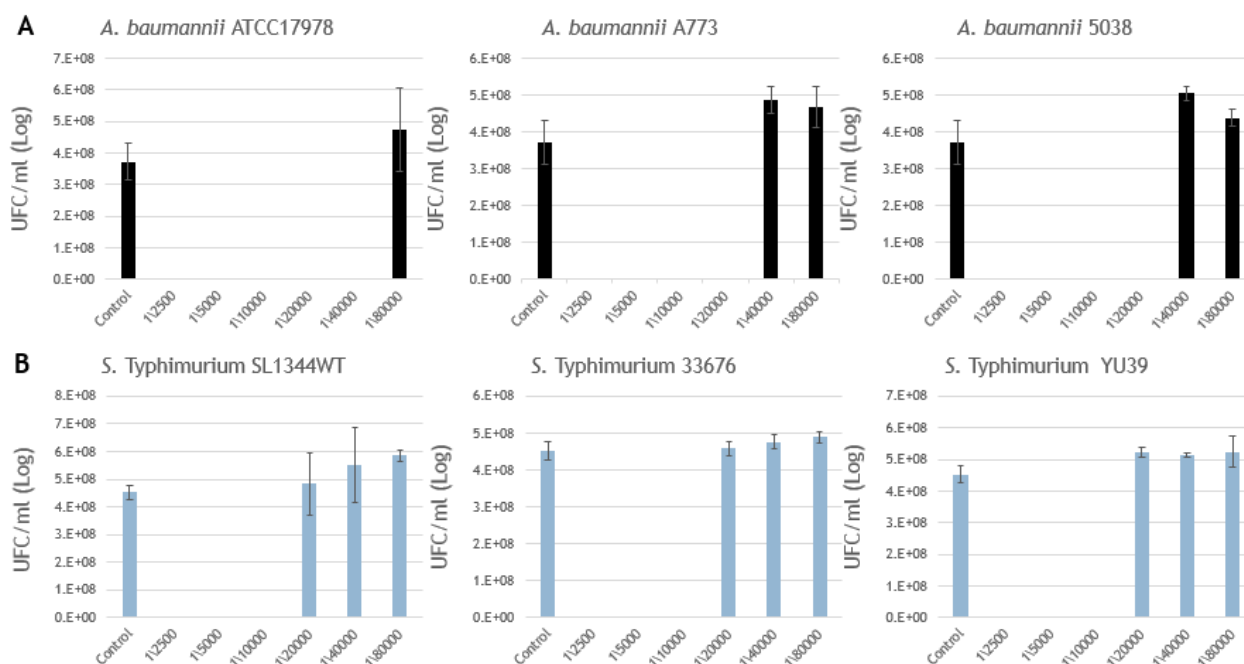


Figura 11.- Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por efecto del CitBio® sobre distintas cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Cultivos de las diferentes cepas con un número aproximado de 50,000 bacterias totales fueron expuestos a distintas diluciones (V/V) de CitBio®. La condición control representa las bacterias no expuestas a CitBio®. Los cultivos fueron incubados en medio Mueller-Hinton líquido a 37°C durante 16 horas en agitación. Posteriormente, el número de bacterias viables expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinado por conteo en placas de LB. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

7.3 Determinación del tiempo de acción antibacteriana de los productos CinnAcar® y CitBio® frente a *A. baumannii* y *S. Typhimurium*

Una vez que se determinó el valor de la CMB, el siguiente paso fue determinar el tiempo mínimo en el que los productos podían afectar a *A. baumannii* y *S. Typhimurium*, esto considerando los posibles usos de estos productos. Por ejemplo, al ser usados como desinfectantes, se requeriría que el tiempo donde se observe un efecto sobre las bacterias sea relativamente corto. Por tal motivo, se evaluó la acción antibacteriana del CinnAcar® y CitBio® a tiempos de 10 min, 30 min, 1, 2, y 3 h. La primera concentración por probar fue la CMB (1X), sin embargo, ninguno de los dos productos (CinnAcar® y CitBio®) tuvieron un efecto sobre las bacterias en ninguno de los tiempos establecidos, pues las bacterias que fueron expuestas a los productos crecieron en números similares

a las bacterias no expuestas (Tablas 2 y 3). Por lo tanto, la siguiente concentración a evaluar fue 2 veces la CMB (2X) de cada producto, donde tampoco se observó un efecto en contra de las bacterias en estos tiempos (Tablas 2 y 3). En contraste, cuando se aumentó la concentración del CitroBio® a 4 veces la CMB (4X), no hubo crecimiento de las bacterias en ninguno de los tiempos evaluados (Tabla 2). En el caso del CinnAcar®, la concentración de 4X la CMB tuvo un efecto bactericida a las 2 h de exposición para *A. baumannii* y a partir de la hora 1 para *S. Typhimurium* (Tabla 3).

Tabla 2.- Tiempos de acción en los que diferentes concentraciones del CitroBio® presentan actividad antibacteriana contra *A. baumannii* y *S. Typhimurium*.

1x CMI Citrobio						
cepas	control	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	364666666.7± 41968242	337666666.7± 11590226	307666666.7 ±34990475	320000000± 29308702	326000000± 51264022	413333333.3 ±17616280
<i>S. Typhimurium</i> SL1344WT	335000000± 30315013	316000000± 29461840	348000000±2 4331050	392000000± 15874508	380000000± 8000000	412000000±27 874720
2x CMI Citrobio						
Cepas	control	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	329333333±1 9008770	311333333.3± 23544285	301666666.7 ±7637626	375666666.7 ±42003968	398333333.3± 31342197	375666666.7 ±59810813
<i>S. Typhimurium</i> SL1344WT	282333333±1 0785793	274000000±1 0379384	298000000±1 9287301.5	3480000001 9672316	444666667±42 782395	439000000±2 1000000
4x CMI Citrobio						
Cepas	control	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	340333333± 27061658	0	0	0	0	0
<i>S. Typhimurium</i> SL1344WT	296333333± 32393415	0	0	0	0	0

Debido a que a una concentración de 4 veces la CMB, el CitroBio® presentó un tiempo de acción desde los 10 min de exposición, el siguiente paso fue evaluar si aún a tiempos menores a 10 min, podría tener un efecto bactericida. Como se puede observar en la Figura 12, de manera sorprendente, desde los 15 s de exposición al CitroBio®, el producto tuvo un efecto bactericida sobre las bacterias. Este mismo resultado también se observó al exponer a las cepas MDR de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* al CitroBio® 4X en los tiempos establecidos (datos no mostrados).

Tabla 3.- Tiempos de acción en los que diferentes concentraciones del CinnAcar® presentan actividad antibacteriana contra *A. baumannii* y *S. Typhimurium*.

1x CMI Cinnacar						
cepas	control	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	359000000± 59573484	334000000± 40509258	322000000± 24062419	370000000 ±35510562	399000000 ±21633308	412000000±1 8330303
<i>S.Typhimurium</i> SL1344WT	224000000± 33645208	208000000± 13000000	293000000± 18681542	327000000 ±27000000	300000000 ±26057628	337000000±1 20000
2x CMI Cinnacar						
Cepas	control	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	3310000000 ±35510562	294000000± 16000000	327000000± 25159491	351000000 ±33867388	378000000± 58206520	390000000 ±25000000
<i>S.Typhimurium</i> SL1344WT	273000000± 12124356	253000000± 55641698	231000000± 17691802	300000000 ±45077711	332000000± 30610456	354000000 ±13856406
4x CMI Cinnacar						
Cepas	control	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	334000000 ±15524175	310000000± 43588989	322000000± 17435596	391000000 ±43714986	0	0
<i>S.Typhimurium</i> SL1344WT	287000000 ±42579338	254000000± 13453626	303000000± 28583212	0	0	0

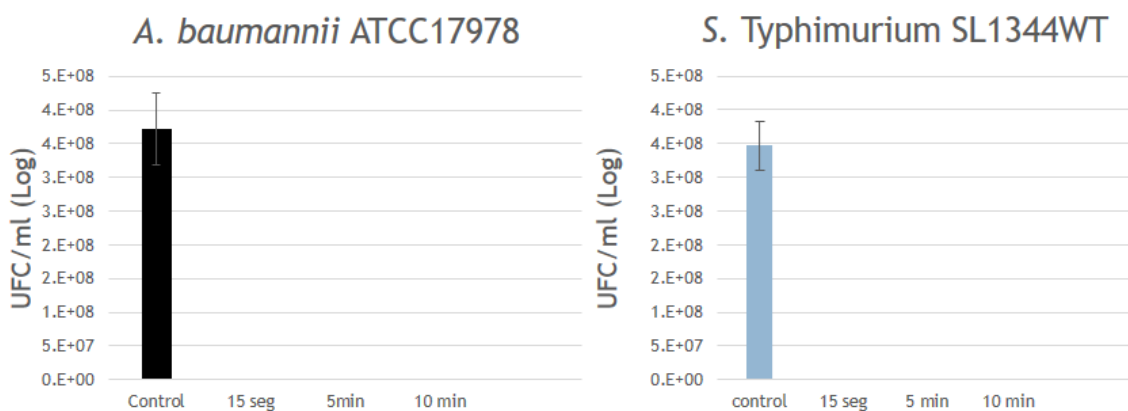


Figura 12.- Tiempos cortos de acción bactericida del CitroBio® sobre cepas de referencia de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Cultivos con un número aproximado de 1×10^8 bacterias fueron expuestos a una concentración de 4 veces la CMB de CitroBio® durante 15 s, 5 ó 10 min. El número de bacterias viables, expresado en unidades formadoras de colonias (UFC), fue determinado por conteo en placas de LB después de retirar el CitroBio®. Los datos son mostrados como el promedio \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

7.4 La exposición al producto CitroBio® provoca la liberación de proteínas intracelulares de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*

Debido a la rapidez del efecto del producto CitroBio® sobre las bacterias, nos preguntamos si el posible mecanismo de acción a través del cual se estaría provocado la muerte de las células sería un proceso de lisis celular. Si el CitroBio® afectaba la integridad de la membrana celular de las bacterias, se provocaría la liberación del contenido celular, incluidas las proteínas. Una vez liberadas, éstas ahora estarían presentes en los sobrenadantes libres de células de los cultivos y no se encontrarían intracelularmente. Para corroborar esta hipótesis, cultivos de bacterias (cepas de referencia) expuestas durante 10 minutos a CinnAcar® y CitroBio®, en una dilución 1/100 (se aumentó a esta concentración debido al efecto tardío del CinnAcar®), fueron centrifugados y la concentración de proteínas de los sobrenadantes libres de células fue cuantificada. La sonicación de las bacterias constituyó el control positivo del experimento, ya que este proceso produce un rompimiento de la membrana y por lo tanto, la liberación del contenido celular. De los sobrenadantes de las bacterias incubadas con CitroBio®, se obtuvo una concentración de proteínas similar a la concentración encontrada en los cultivos sonicados (Figura 13). En contraste, en los cultivos expuestos a CinnAcar® no se detectó la presencia de proteínas, al igual que en los cultivos sin tratar, donde no se esperaba encontrar proteínas, pues las células debían estar íntegras (Figura 13).

Para corroborar los resultados de la cuantificación de proteínas, se procedió a visualizarlas mediante su corrimiento en SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Consistente con los resultados de la cuantificación de proteínas, para ambas cepas de referencia (*A. baumannii* y *S. Typhimurium*), sólo se observaron bandas en los cultivos tratados con CitroBio® (dilución 1/100) y los cultivos sonicados (control positivo), pero no en los cultivos no expuestos a los productos (control negativo), ni en los incubados con CinnAcar® (dilución 1/100) (Figura 14). Cuando se realizaron los mismos tratamientos a las cepas MDR de ambas bacterias, los resultados fueron similares (datos no mostrados).

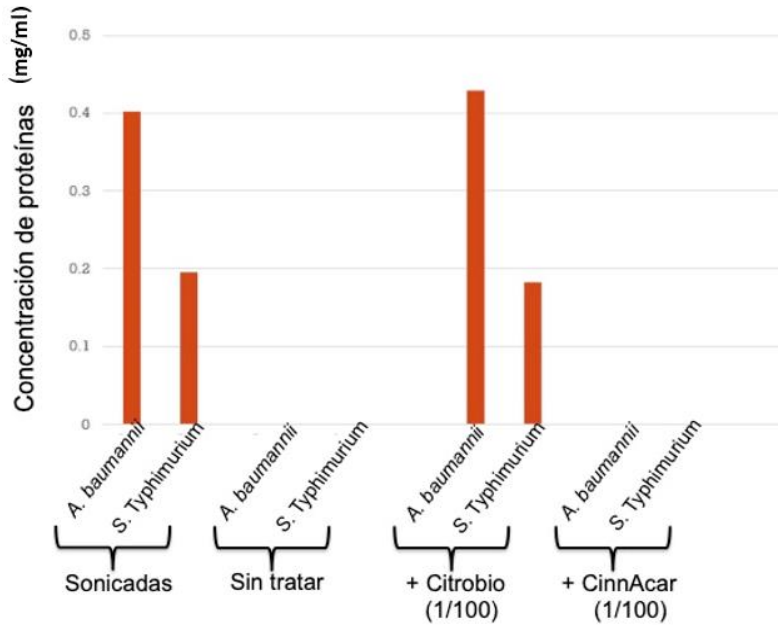


Figura 13.- Liberación de proteínas intracelulares por efecto de la exposición a CitroBio® en *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Las proteínas presentes en los sobrenadantes libres de células de cultivos de las cepas *A. baumannii* ATCC 17978 o *S. Typhimurium* SL1344 WT expuestas a CitroBio® o CinnAcar® (dilución 1/100), de cultivos sonicados o cultivos sin tratar, fueron cuantificadas mediante un *kit* comercial. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes.

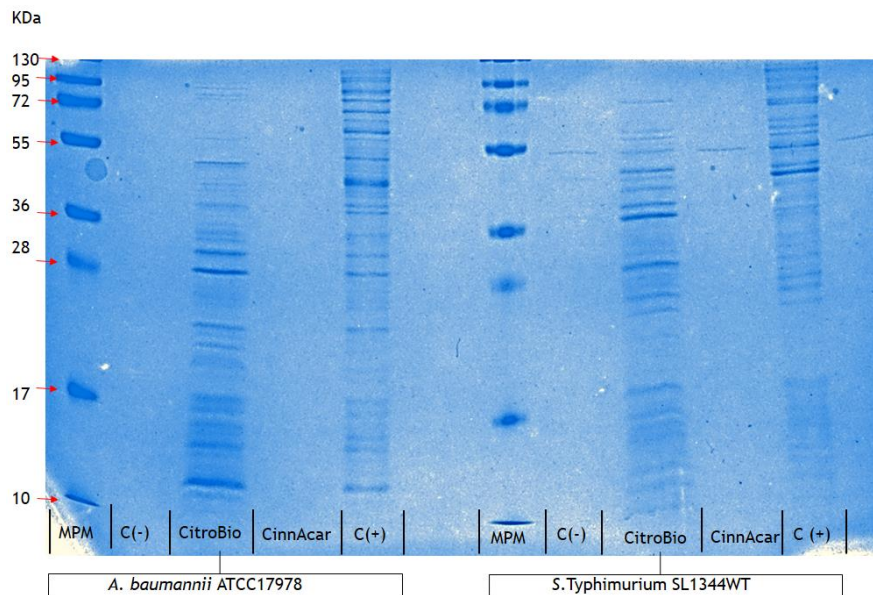


Figura 14.- Detección de proteínas intracelulares liberadas por efecto de la exposición a CitroBio® en *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos de las cepas *A. baumannii* ATCC 17978 o *S. Typhimurium* SL1344 WT expuestas a CitroBio® o CinnAcar® (dilución 1/100), de cultivos sin tratar (C-) o cultivos sonicados (C+), fueron visualizadas en un gel de poliácridamida (SDS-PAGE) al 12% y teñidas con azul de Coomassie. Se muestra un gel representativo de al menos tres experimentos independientes con resultados similares.

7.5 La exposición de *A. baumannii* a los productos CinnAcar® y CitroBio® no generó la selección de bacterias resistentes a éstos

Debido a que el uso constante de antibióticos favorece la selección de bacterias resistentes a su acción, es de vital importancia evaluar la tendencia natural que los nuevos compuestos antibacterianos puedan tener en la selección de bacterias resistentes. Durante 35 días, se evaluó si la exposición a concentraciones subinhibitorias de los productos CinnAcar® y CitroBio® seleccionaban bacterias de *A. baumannii* ATCC 17978 resistentes a éstos. Como se puede observar en la Figura 15, durante los primeros 10 días del experimento, *A. baumannii* generó resistencia a los dos antibióticos usados como control positivo (gentamicina y ciprofloxacina), pues fue capaz de crecer en concentraciones antes inhibitorias. Conforme transcurrió el experimento, la bacteria creció a concentraciones cada vez mayores de los antibióticos, teniendo como resultado que en 35 días, *A. baumannii* fue capaz de crecer a una concentración de 32 veces la CMI de ciprofloxacina y 8 veces la CMI de gentamicina. En contraste y de manera significativa, en el periodo de 35 días de exposición, *A. baumannii* no fue capaz de crecer en concentraciones inhibitorias de los productos CinnAcar® o CitroBio® (Figura 15).

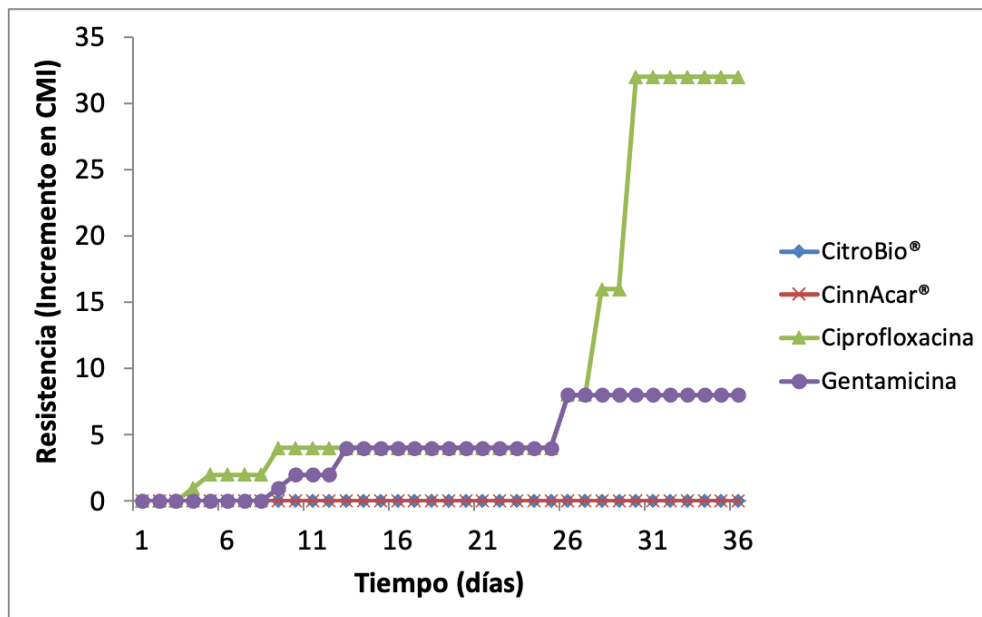


Figura 15.- La exposición continua de *A. baumannii* a los componentes del CinnAcar® o CitroBio® no seleccionó bacterias resistentes a éstos. Durante 35 días, *A. baumannii* ATCC 17978 fue expuesta a concentraciones subinhibitorias de los productos CinnAcar® y CitroBio® y de los antibióticos ciprofloxacina y gentamicina.

8. DISCUSIÓN

Actualmente, la resistencia a antibióticos representa una de las más grandes amenazas para la salud pública a nivel mundial. Una de las diversas acciones propuestas por diferentes Organizaciones Mundiales para tratar de contrarrestar este problema es la búsqueda y el desarrollo de nuevos antimicrobianos. La amplia diversidad estructural y funcional de componentes químicos derivados de plantas constituyen una alternativa prometedora para la caracterización de compuestos naturales con actividad antibacteriana.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de dos productos comerciales elaborados a partir de extractos de plantas, el CinnAcar[®] y el CitroBio[®], frente a distintas cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*, incluyendo las cepas de referencia y dos aislados clínicos MDR de cada especie de bacteria. El CinnAcar[®] es un extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), mientras que el CitroBio[®] es un extracto de frutos cítricos. Ambos productos son biodegradables y se aplican en cultivos agrícolas como bioinsecticidas, además de tener un registro ante COFEPRIS.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el CinnAcar[®] y el CitroBio[®] tienen actividad bactericida contra todas las cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* evaluadas. A pesar de que estudios previos han comprobado la actividad antibacteriana de extractos de canela y cítricos sobre cepas de *A. baumannii* (Bayoub *et al.*, 2010, Becerril *et al.*, 2012, Guerra *et al.*, 2012, Kaskatepe *et al.*, 2016) y *S. Typhimurium* (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013, Ramadan *et al.*, 2015, Solarte *et al.*, 2018, de Nova *et al.*, 2019), hasta nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en determinar el efecto bactericida de extractos de canela y cítricos sobre cepas clínicas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* MDR aisladas en México. Adicionalmente, cabe mencionar que el CinnAcar[®] y el CitroBio[®] también tuvieron actividad antibacteriana frente a cepas de referencia de las bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y contra bacterias de aguas residuales no identificadas, evidenciando el amplio rango de actividad antibacteriana que poseen dichos productos (datos no mostrados).

En estudios previos se ha demostrado la actividad antibacteriana que extractos de canela en forma de aceites esenciales presentan en contra de diferentes cepas de *S. Typhimurium* (Solarte *et al.*, 2018), así como de aislados clínicos MDR de *A. baumannii* (Becerril *et al.*, 2012, Guerra *et al.*, 2012, Kaskatepe *et al.*, 2016). Adicionalmente, un estudio reveló que un extracto de canela en etanol al 70% no presenta actividad antibacteriana frente a *S. Typhimurium* pero sí contra *E. coli* y *S. aureus* (Pastrana-Puche *et al.*, 2017). Asimismo, en el estudio realizado por Bayoub *et al.* (2010), los autores observaron que un extracto etanólico (etanol al 90%) de canela, produjo sólo una débil inhibición del crecimiento de una cepa de *A. baumannii*. Estos resultados evidencian que distintos componentes bioactivos pueden ser obtenidos por diferentes métodos de extracción y que la susceptibilidad de las bacterias frente a los mismos componentes puede variar. Por otro lado, la actividad antibacteriana de extractos comerciales de cítricos ha sido determinada anteriormente en cepas de *S. Typhimurium* (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013, de Nova *et al.*, 2019). Uno de estos productos comerciales es el BIOLL⁺[®], el cual es un extracto natural obtenido a partir de toronja, mandarina, bergamota y naranja dulce que es comercializado como suplemento alimenticio para animales en España (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013). El otro producto comercial es el BIOCITRO[®], el cual es un extracto de frutas cítricas obtenido a partir de cultivos orgánicos de toronja, tangerina (una variedad de mandarina), bergamota y naranja dulce, cuyo uso en el alimento o el agua está recomendado para el tratamiento de padecimientos digestivos del ganado (de Nova *et al.*, 2019). Asimismo, actividad anti-*S. Typhimurium* fue demostrada para extractos etanólicos (etanol al 99.5%) y metanólicos (metanol al 99.5%) de las frutas cítricas naranja y limón (Ramadan *et al.*, 2015). Para el caso de *A. baumannii*, se ha demostrado que un aceite esencial de limón inhibió el crecimiento de una cepa MDR de esta especie (Guerra *et al.*, 2012). Debido a que los productos CinnAcar[®] y el CitroBio[®] son de origen comercial, los métodos de extracción utilizados para obtenerlos son un secreto de fábrica, por lo que no pudimos tener acceso a dicha información. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos en este estudio y algunos reportados previamente, los cuales apoyan la teoría de que se podrían obtener compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento de cepas de bacterias patógenas MDR como *A. baumannii*, *S. Typhimurium* y otras, a partir de extractos de canela y de

cítricos, en el grupo de trabajo se tiene planeado preparar extractos de estas plantas utilizando diferentes disolventes y métodos de extracción. Asimismo, esto nos permitirá identificar el o los compuestos específicos que tienen la actividad bactericida en estos extractos.

Con respecto a las concentraciones bactericidas, la acción de los componentes del CinnAcar[®] fue similar en los dos microorganismos de estudio (*A. baumannii* y *S. Typhimurium*), ya que las CMB obtenidas para las correspondientes cepas de referencia y los aislados clínicos fueron idénticas, 0.759 g/L y 0.379 g/L, respectivamente; resultando ser más susceptibles a la acción inhibitoria del extracto de canela los aislados clínicos en comparación con las cepas de referencia. En un estudio previo se observó un rango de variación en los valores de la CMB del aceite de canela contra 30 cepas de *S. Typhimurium*, encontrándose CMB desde 0.312 g/L hasta 5 g/L, siendo la CMB de 1.25 g/L la más frecuente en las cepas evaluadas (Solarte *et al.*, 2018). Por otro lado, para aceite de canela, CMB de 0.2 g/L hasta 0.8 g/L fueron reportadas para aislados clínicos resistentes a antibióticos de *A. baumannii* (Becerril *et al.*, 2012). Asimismo, en otro estudio una CMI de 0.625 g/L para aceite esencial de canela fue reportada para una cepa MDR de *A. baumannii* (Guerra *et al.*, 2012). Así, las CMB para el extracto de canela (CinnAcar[®]) determinadas en nuestro estudio (0.379 g/L y 0.759 g/L) caen dentro del rango de CMB o CMI reportadas previamente para extractos de canela en *A. baumannii* y *S. Typhimurium*. Para el caso del CitroBio[®], las cepas de *A. baumannii* presentaron mayor susceptibilidad a los componentes del producto, en comparación con *S. Typhimurium*. La CMB para las tres cepas de *S. Typhimurium* evaluadas fue de 1/10,000 (equivalente a 100 ppm), mientras que para la cepa de referencia de *A. baumannii* fue de 1/40,000 (equivalente a 25 ppm) y para los aislados clínicos fue de 1/20,000 (equivalente a 50 ppm). En un estudio previo, evaluando el extracto de cítricos comercial BIOLL⁺[®] se determinaron CMI desde 20 hasta 80 ppm contra distintas cepas de *S. Typhimurium* (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013). En el mismo estudio, los autores mencionan que el BIOLL⁺[®] tiene una gran eficacia como agente antibacteriano, ya que sus CMI son muy bajas en comparación con las determinadas para otros compuestos antimicrobianos como los aceites esenciales (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013). Con la limitante de no poder comparar la composición del CitroBio[®] con el producto BIOLL⁺[®] y a pesar de representar

CMI y no CMB, las concentraciones a las que Alvarez-Ordóñez *et al.* (2013) reportaron una inhibición en el crecimiento de cepas de *S. Typhimurium* son equivalentes a las encontradas en el presente trabajo.

Interesantemente, el CinnAcar® y el CitroBio® afectaron de manera similar tanto a las cepas de referencia como a los aislados clínicos MDR de las dos especies de bacterias, lo cual sugiere que estos productos inhiben el crecimiento de las cepas evaluadas por un mecanismo diferente al que ejercen los distintos antibióticos a los cuales presentan resistencia.

Cabe mencionar que en el campo, el CinnAcar® y el CitroBio® son utilizados a una concentración de 1/50, por lo que la concentración propuesta en este trabajo para ser utilizados como antibacterianos es significativamente menor a la utilizada en la industria agrícola para el control de plagas, lo que asegura estar libre de efectos tóxicos.

De manera interesante, en el presente trabajo se comprobó que a una concentración de 4 veces la CMB, el CitroBio® ejerce su actividad antibacteriana a tiempos muy cortos, ya que con sólo 15 s de exposición, la viabilidad de todas las cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* evaluadas fue afectada. Este resultado abre la posibilidad de proponer un uso alternativo para este producto, por ejemplo como desinfectante, el cual podría aplicarse tanto en el ámbito clínico (para desinfectar dispositivos médicos) como en la industria agrícola y pecuaria (para desinfectar el estiércol que puede actuar como dispersor de bacterias MDR al ambiente).

En cuanto al mecanismo de la actividad bactericida del CinnAcar® y CitroBio® sobre las cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* evaluadas, en el presente trabajo se monitoreó el efecto que una concentración mayor a la CMB (dilución 1/100) de los productos tuvo sobre la integridad de la membrana celular, comprobándose que el CitroBio® provocó la liberación de proteínas a través de la membrana, en contraste, el CinnAcar® no indujo la salida de proteínas. En estudios previos se ha determinado que el principal componente responsable de la actividad antibacteriana de la corteza de canela es el cinamaldehído, cuyo mecanismo de acción involucra la afectación a la superficie celular de las bacterias, así como la inhibición de la división celular y de la actividad de la ATPasa (Vasconcelos *et al.*, 2018). Los reportes acerca de la perturbación de la integridad de la membrana celular, manifestada en el aumento en la permeabilidad

y por lo tanto en la salida del contenido intracelular por efecto del cinamaldehído o del aceite esencial de canela sobre diferentes especies de bacterias son contrastantes, ya que no en todos los estudios se ha observado la fuga de componentes intracelulares tras la exposición a dichos compuestos (Helander *et al.*, 1998, Kwon *et al.*, 2003, Vasconcelos *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2018b). Lo anterior podría deberse a variaciones en los tiempos de exposición al compuesto, el método de extracción o purificación de los componentes, las condiciones de crecimiento o la cepa utilizada, entre otros. Así, el resultado observado en el presente trabajo, en el que el extracto de canela (CinnAcar[®]) no produjo la liberación de proteínas intracelulares en las bacterias evaluadas, concuerda con resultados de trabajos previos en donde no se ha observado la pérdida del contenido intracelular por efecto del cinamaldehído en *Bacillus cereus* (Kwon *et al.*, 2003), *S. Typhimurium* o *E. coli* (Helander *et al.*, 1998). Así, el mecanismo por el que el CinnAcar[®] provoca la muerte de las cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* evaluadas parece no involucrar daños en la envoltura celular. Generalmente, los extractos de plantas están compuestos por un gran número de constituyentes químicos, por lo que es altamente probable que la actividad antibacteriana se deba a diversos mecanismos de acción dirigidos a distintos blancos moleculares en la célula (Burt, 2004). Por otro lado, la composición de los extractos de cítricos incluye a flavonoides como la hesperidina, naringina, rutina, quercetina, así como ácido ascórbico y saponinas, los cuales han sido caracterizados como los responsables de conferir el efecto antimicrobiano (de Nova *et al.*, 2019). Estudios previos han confirmado la capacidad de extractos cítricos comerciales de inducir cambios drásticos en la permeabilidad de la envoltura celular de algunas bacterias, entre ellas *E. coli*, provocando la liberación del contenido intracelular (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013, de Nova *et al.*, 2019). Nuestros resultados revelan que la integridad de la membrana celular de las cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium* evaluadas fue afectada en respuesta a la exposición de los componentes del CitroBio[®], dicho deterioro podría consecuentemente llevar a la muerte celular. Cabe resaltar que el tamaño de las proteínas liberadas por efecto del CitroBio[®] fue comparativamente distinto al perfil originado como resultado de la sonicación de las células, ya que con el CitroBio[®] principalmente se liberaron proteínas menores a 55 KDa, mientras que en las bacterias sonicadas, las proteínas tuvieron tamaños más grandes, de hasta 130 KDa. Estos

resultados sugieren que la afectación a la membrana celular por efecto del CitroBio® no es de la misma naturaleza que la ruptura de las membranas provocada por el proceso de sonicación.

Está demostrado que las bacterias pueden desarrollar resistencia a antimicrobianos debido a la exposición continua y prolongada a dichos agentes. La frecuencia en la adquisición de resistencia dependerá del tipo de antimicrobiano y de la bacteria (Becerril *et al.*, 2012). Por tanto, una de las características que debería de tener un compuesto antimicrobiano ideal sería que no seleccionara bacterias resistentes a su acción en periodos cortos de tiempo. En este trabajo, después de 35 pases continuos en concentraciones subinhibitorias de los productos CinnAcar® y CitroBio®, no se detectó un incremento en la resistencia de *A. baumannii* a dichos productos, en contraste con los antibióticos ciprofloxacina y gentamicina, para los cuales desde los 4 y 10 días de exposición, respectivamente, se seleccionaron bacterias resistentes. Las concentraciones a las cuales la bacteria creció gradualmente en presencia de los antibióticos alcanzaron 32 veces (ciprofloxacina) y 8 veces (gentamicina) la CMI. Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Becerril *et al.* (2012), quienes no detectaron un incremento en la resistencia de algunas bacterias como *P. aeruginosa*, después de 50 pases secuenciales en concentraciones subinhibitorias de aceite de canela. Como ya se mencionó, debido a que por lo general la composición de los extractos vegetales es considerablemente heterogénea, es muy probable que la actividad antibacteriana ejercida se deba a su acción sobre varios blancos moleculares, por lo que es esperado que las bacterias raramente desarrollen un mecanismo de resistencia (Becerril *et al.*, 2012). Así, la disminuida capacidad de los extractos de plantas en generar resistencia en comparación con los antibióticos es una cualidad muy relevante de considerar.

La búsqueda de nuevos antimicrobianos parece ser una tarea que tendrá que ser permanente, pues las bacterias evolucionan constantemente de manera natural.

9. CONCLUSIONES

- Los productos CinnAcar® y CitroBio® presentaron actividad antibacteriana contra cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*, incluidas cepas multirresistentes a antibióticos.
- La concentración mínima bactericida del producto CinnAcar® fue de 0.379-0.759 g/L en las diferentes cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*.
- La concentración mínima bactericida del producto CitroBio® fue de 1/10,000-1/40,000 (V/V) en las diferentes cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*.
- A una concentración de 4 veces la concentración mínima bactericida, el CitroBio® presentó actividad antibacteriana contra cepas de *A. baumannii* y *S. Typhimurium*, desde los 15 s de exposición.
- Se encontró como posible mecanismo bactericida del CitroBio® el daño a la integridad de la membrana celular de las bacterias, lo que produjo cambios en su permeabilidad.
- La exposición a los productos CinnAcar® o CitroBio® no logró seleccionar bacterias de *A. baumannii* resistentes a éstos en un lapso de 35 días.

10. PERSPECTIVAS

- Ampliar el estudio de la actividad antibacteriana y la resistencia de los productos CinnAcar® y CitroBio® a otras especies de bacterias catalogadas como prioritarias por la OMS.
- Determinar la posible sinergia de los productos CinnAcar® y CitroBio®.
- Probar la actividad antibacteriana de los productos CinnAcar® y CitroBio® en superficies inertes (mesas o material de laboratorio, pisos) y en estiércol de animales de granja.

11. REFERENCIAS

- Abreu, A.C., A.J. McBain & M. Simoes, (2012) Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep* **29**: 1007-1021.
- ACS & RCS, (1999) American Chemical Society and Royal Society of Chemistry. The discovery and development of penicillin 1928-1945. Commemorative booklet. (PDF).
- Acuña, L.G., (2002) Descubrimiento de la penicilina: un hito de la medicina, cómo el azar puede ayudar al científico. *Rev Méd Clín Condes* **13**: 30-34.
- Alvarez-Ordóñez, A., A. Carvajal, H. Arguello, F.J. Martínez-Lobo, G. Naharro & P. Rubio, (2013) Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *J Appl Microbiol* **115**: 50-60.
- Andersson, D.I. & D. Hughes, (2014) Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **12**: 465-478.
- Andersson, D.I. & D. Hughes, (2017) Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Microbiol Spectr* **5**.
- Aslam, B., W. Wang, M.I. Arshad, M. Khurshid, S. Muzammil, M.H. Rasool, M.A. Nisar, R.F. Alvi, M.A. Aslam, M.U. Qamar, M.K.F. Salamat & Z. Baloch, (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist* **11**: 1645-1658.
- Baba, J., S.B. Mohammed, Y. Ya'aba & F.I. Umaru, (2018) Antibacterial activity of sweet orange *Citrus sinensis* on some clinical bacteria species isolated from wounds. *J Family Med Community Health* **5**: 1154.
- Balaban, N.Q., S. Helaine, K. Lewis, M. Ackermann, B. Aldridge, D.I. Andersson, M.P. Brynildsen, D. Bumann, A. Camilli, J.J. Collins, C. Dehio, S. Fortune, J.M. Ghigo, W.D. Hardt, A. Harms, M. Heinemann, D.T. Hung, U. Jenal, B.R. Levin, J. Michiels, G. Storz, M.W. Tan, T. Tenson, L. Van Melderen & A. Zinkernagel, (2019) Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol* **17**: 441-448.
- Barber, M. & M. Rozwadowska-Dowzenko, (1948) Infection by penicillin-resistant staphylococci. *The Lancet* **October 23**: 641-644.
- Bayoub, K., T. Baibai, D. Mountassif, A. Retmane & A. Soukri, (2010) Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *Afr J Biotechnol* **9**: 4251-4258.
- Becerril, R., C. Nerin & R. Gomez-Lus, (2012) Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathog Dis* **9**: 699-705.
- Belloso, W.H., (2009) Historia de los antibióticos. *Rev Hosp Ital B Aires* **29**: 102-111.
- Bengtsson-Palme, J., E. Kristiansson & D.G.J. Larsson, (2018) Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **42**.
- Berendonk, T.U., C.M. Manaia, C. Merlin, D. Fatta-Kassinos, E. Cytryn, F. Walsh, H. Burgmann, H. Sorum, M. Norstrom, M.N. Pons, N. Kreuzinger, P. Huovinen, S. Stefani, T. Schwartz, V. Kisand, F. Baquero & J.L. Martinez, (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* **13**: 310-317.
- Blair, J.M., M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu & L.J. Piddock, (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**: 42-51.
- Borges, A., A.C. Abreu, C. Dias, M.J. Saavedra, F. Borges & M. Simoes, (2016) New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms. *Molecules* **21**.

- Burt, S., (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* **94**: 223-253.
- Cabello, F.C., (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* **8**: 1137-1144.
- Cabrera, C.E., R.F. Gómez & A.E. Zúñiga, (2007) La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* **38**: 149-158.
- Cassini, A., L.D. Hogberg, D. Plachouras, A. Quattrocchi, A. Hoxha, G.S. Simonsen, M. Colomb-Cotinat, M.E. Kretzschmar, B. Devleeschauwer, M. Cecchini, D.A. Ouakrim, T.C. Oliveira, M.J. Struelens, C. Suetens, D.L. Monnet & A.M.R.C.G. Burden of, (2019) Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* **19**: 56-66.
- CDC, (2013) Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. (PDF).
- Chimnoi, N., N. Reuk-Ngam, P. Chuysinuan, P. Khlaychan, N. Khunnawutmanotham, D. Chokchaichamnankit, W. Thamniyom, S. Klayraung, C. Mahidol & S. Techasakul, (2018) Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: Antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. *Microb Pathog* **118**: 290-300.
- CLSI, (2017) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Wayne, Pennsylvania, USA. (PDF).
- Cohen, M.L., (2000) Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406**: 762-767.
- Colín-Castro, C., T. Chávez-Heres, J.J. Magaña & R. Franco-Cendejas, (2017) Microorganismos bacterianos asociados a infección del torrente sanguíneo en pacientes con quemaduras de un centro de referencia de la Ciudad de México. *Investigación en Discapacidad* **6**: 50-56.
- Cowan, M.M., (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**: 564-582.
- Cox, G. & G.D. Wright, (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* **303**: 287-292.
- Cycon, M., A. Mroziak & Z. Piotrowska-Seget, (2019) Antibiotics in the Soil Environment-Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Front Microbiol* **10**: 338.
- Da Silva, G.J. & S. Domingues, (2016) Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms* **4**.
- de Nova, P.J.G., A. Carvajal, M. Prieto & P. Rubio, (2019) *In vitro* Susceptibility and Evaluation of Techniques for Understanding the Mode of Action of a Promising Non-antibiotic Citrus Fruit Extract Against Several Pathogens. *Front Microbiol* **10**: 884.
- Dixon, R.A., (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- ECDC, (2012) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012. Stockholm: ECDC, 2014.
- Fernández-Riverón, F., J. López Hernández, L.M. Ponce Martínez & C. Machado Betarte, (2003) Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit* **32**: 44-48.
- Fleming, A., (1945) Alexander Fleming. Penicillin. Nobel Lecture. December 11, 1945. PDF: 83-93.
- Fleming-Dutra, K.E., A.L. Hersh, D.J. Shapiro, M. Bartoces, E.A. Enns, T.M. File, Jr., J.A. Finkelstein, J.S. Gerber, D.Y. Hyun, J.A. Linder, R. Lynfield, D.J. Margolis, L.S. May, D. Merenstein, J.P. Metlay, J.G. Newland, J.F. Piccirillo, R.M. Roberts, G.V. Sanchez, K.J. Suda, A. Thomas, T.M. Woo, R.M. Zetts & L.A. Hicks, (2016) Prevalence of Inappropriate Antibiotic Prescriptions Among US Ambulatory Care Visits, 2010-2011. *JAMA* **315**: 1864-1873.
- Fournier, P.E. & H. Richet, (2006) The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* **42**: 692-699.

- Fridkin, S., J. Baggs, R. Fagan, S. Magill, L.A. Pollack, P. Malpiedi, R. Slayton, K. Khader, M.A. Rubin, M. Jones, M.H. Samore, G. Dumyati, E. Dodds-Ashley, J. Meek, K. Yousey-Hindes, J. Jernigan, N. Shehab, R. Herrera, C.L. McDonald, A. Schneider, A. Srinivasan, C. Centers for Disease & Prevention, (2014) Vital signs: improving antibiotic use among hospitalized patients. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **63**: 194-200.
- Galanis, E., D.M.A. Lo Fo Wong, M.E. Patrick, N. Binsztein, A. Cieslik, T. Chalermchaikit, A. Aidara-Kane, A. Ellis, F.J. Angulo & H. Wegener, (2006) Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis* **12**: 381-389.
- García, K., (2016) Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 *in vitro*. *Rev Simiykita* **2**: 9-15.
- Goossens, H., M. Ferech, R. Vander Stichele & M. Elseviers, (2005) Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet* **365**: 579-587.
- Guardabassi, L. & J.F. Prescott, (2015) Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **45**: 361-376, vii.
- Guerra, F.Q., J.M. Mendes, J.P. Sousa, M.F. Morais-Braga, B.H. Santos, H.D. Melo Coutinho & O. Lima Ede, (2012) Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Nat Prod Res* **26**: 2235-2238.
- Gupta, C., A.P. Garg, R.C. Uniyal & A. Kumari, (2008) Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. *Afr J. Microbiol Res* **2**: 247-251.
- Harding, C.M., S.W. Hennon & M.F. Feldman, (2018) Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* **16**: 91-102.
- Hecker, M.T., D.C. Aron, N.P. Patel, M.K. Lehmann & C.J. Donskey, (2003) Unnecessary use of antimicrobials in hospitalized patients. *Arch Intern Med* **163**: 972-978.
- Helander, I.M., H.-L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E.J. Smid, L.G.M. Gorris & A. von Wright, (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* **46**: 3590-3595.
- Heuer, O.E., H. Kruse, K. Grave, P. Collignon, I. Karunasagar & F.J. Angulo, (2009) Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* **49**: 1248-1253.
- Hollis, A. & Z. Ahmed, (2013) Preserving antibiotics, rationally. *N Engl J Med* **369**: 2474-2476.
- Hollis, A. & Z. Ahmed, (2014) The path of least resistance: paying for antibiotics in non-human uses. *Health Policy* **118**: 264-270.
- Holmes, A.H., L.S.P. Moore, A. Sundsfjord, M. Steinbakk, S. Regmi, A. Karkey, P.J. Guerin & L.J.V. Piddock, (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* **387**: 176-187.
- Howard, A., M. O'Donoghue, A. Feeney & R.D. Sleator, (2012) *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* **3**: 243-250.
- Ilyas, B., C.N. Tsai & B.K. Coombes, (2017) Evolution of *Salmonella*-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 428.
- Juárez, J.R., A.J. Castro, J.F. Jaúregui, J.V. Lizano, M. Carhuapoma, F.F. Choquesillo & e. al., (2010) Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e Investigación* **13**: 9-13.
- Kaskatepe, B., M.E. Kiymaci, S. Suzuk, S.A. Erdem, S. Cesur & S. Yildiz, (2016) Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Industrial Crops and Products* **81**: 191-194.
- Kwon, J.A., C.B. Yu & H.D. Park, (2003) Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Lett Appl Microbiol* **37**: 61-65.

- Li, J., J. Cao, Y.G. Zhu, Q.L. Chen, F. Shen, Y. Wu, S. Xu, H. Fan, G. Da, R.J. Huang, J. Wang, A.L. de Jesus, L. Morawska, C.K. Chan, J. Peccia & M. Yao, (2018) Global Survey of Antibiotic Resistance Genes in Air. *Environ Sci Technol* **52**: 10975-10984.
- Lin, M.F. & C.Y. Lan, (2014) Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases* **2**: 787-814.
- Liu, Q., X. Meng, Y. Li, C.N. Zhao, G.Y. Tang & H.B. Li, (2017) Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *Int J Mol Sci* **18**.
- Luyt, C.-E., N. Bréchet, J.-L. Trouillet & J. Chastre, (2014) Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit care* **18**.
- Magiorakos, A.P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber & D.L. Monnet, (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **18**: 268-281.
- Mandalari, G., R.N. Bennett, G. Bisignano, D. Trombetta, A. Saija, C.B. Faulds, M.J. Gasson & A. Narbad, (2007) Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *J Appl Microbiol* **103**: 2056-2064.
- Marston, H.D., D.M. Dixon, J.M. Knisely, T.N. Palmore & A.S. Fauci, (2016) Antimicrobial Resistance. *JAMA* **316**: 1193-1204.
- Martin-Aspas, A., F.M. Guerrero-Sanchez, F. Garcia-Colchero, S. Rodriguez-Roca & J.A. Giron-Gonzalez, (2018) Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. *Infect Drug Resist* **11**: 861-872.
- Mathew, A.G., R. Cissell & S. Liamthong, (2007) Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis* **4**: 115-133.
- McEwen, S.A. & P.J. Fedorka-Cray, (2002) Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* **34 Suppl 3**: S93-S106.
- McManus, P.S., V.O. Stockwell, G.W. Sundin & A.L. Jones, (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 443-465.
- Negi, P. & G. Jayaprakasha, (2001) Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extracts. *European Food Research and Technology* **213**: 484-487.
- Nnadozie, C.F. & O.N. Odume, (2019) Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ Pollut* **254**: 113067.
- O'Neill, J., (2014) Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. (PDF).
- O'Neill, J., (2015a) Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The Review on Antimicrobial Resistance. (PDF).
- O'Neill, J., (2015b) Rapid diagnostics: stopping unnecessary use of antibiotics. The Review on Antimicrobial Resistance. (PDF).
- Ohl, C.A. & V.P. Luther, (2011) Antimicrobial stewardship for inpatient facilities. *J Hosp Med* **6 Suppl 1**: S4-15.
- OMS, (2013) Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional, 2014-2023. (PDF).
- Pan, M. & L.M. Chu, (2017) Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Sci Total Environ* **599-600**: 500-512.
- Partridge, S.R., S.M. Kwong, N. Firth & S.O. Jensen, (2018) Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* **31**.

- Pastrana-Puche, Y.I., A.M. Durango-Villadiego & D. Acevedo-Correa, (2017) Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* **15**.
- Pérez Morales, D. & V.H. Bustamante Santillán, (2018) Crisis mundial por bacterias patógenas resistentes a antibióticos. Si no hay acciones hoy, no habrá cura mañana. *Biotecnología en Movimiento*: 3-5.
- Pérez-Cano, H.J. & A. Robles-Contreras, (2013) Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica* **4**: 187-191.
- Pikkemaat, M.G., H. Yassin, v.d.F.-K.H. J. & B.J.A. Berendsen, (2016) Antibiotic residues and resistance in the environment. *RIKILT Wageningen UR report 2016.009*: 32 pp.
- Powers, J.H., (2004) Antimicrobial drug development--the past, the present, and the future. *Clin Microbiol Infect* **10 Suppl 4**: 23-31.
- PUCRA, (2018a) Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México. Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. Agosto 2018.
- PUCRA, (2018b) Programa Universitario de Investigación en Salud. Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. Primera Edición, 2018.
- Qureshi, Z.A., L.E. Hittle, J.A. O'Hara, J.I. Rivera, A. Syed, R.K. Shields, A.W. Pasculle, R.K. Ernst & Y. Doi, (2015) Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis* **60**: 1295-1303.
- Ramadan, H., B. Min, A.K. Tiwari, G. Reddy, A. Adesiyun, A. Hinton & W. Abdela, (2015) Antimicrobial activity of pomegranate, orange and lemon peel extracts against food-borne pathogens and spoilage bacteria *in vitro* and on poultry skin. *Int J Poult Sci* **14**: 229-239.
- Ranasinghe, P., S. Pigera, S. Premakumara, P. Galappaththy, G.R. Constantine & P. Katulanda, (2013) Medicinal properties of true cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complem Altern M* **13**.
- Rantala, M., K. Holso, A. Lillas, P. Huovinen & L. Kaartinen, (2004) Survey of condition-based prescribing of antimicrobial drugs for dogs at a veterinary teaching hospital. *Vet Rec* **155**: 259-262.
- Rice, L.B., (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* **197**: 1079-1081.
- Roope, L.S.J., R.D. Smith, K.B. Pouwels, J. Buchanan, L. Abel, P. Eibich, C.C. Butler, P.S. Tan, A.S. Walker, J.V. Robotham & S. Wordsworth, (2019) The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute. *Science* **364**.
- Ross, M.S.F., (1976) Analysis of cinnamon oils by high-pressure liquid chromatography. *J Chromatogr* **118**: 273-275.
- Sanchez-Vargas, F.M., M.A. Abu-El-Haija & O.G. Gomez-Duarte, (2011) Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis* **9**: 263-277.
- Sarmah, A.K., M.T. Meyer & A.B. Boxall, (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **65**: 725-759.
- Sharma, A., R.D.C. Flores-Vallejo, A. Cardoso-Taketa & M.L. Villarreal, (2017) Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol* **208**: 264-329.
- Solarte, A.L., R.J. Astorga, F.C. de Aguiar, C. De Frutos, B. Barrero-Dominguez & B. Huerta, (2018) Susceptibility Distribution to Essential Oils of *Salmonella enterica* Strains Involved in Animal and Public Health and Comparison of the Typhimurium and Enteritidis Serotypes. *J Med Food* **21**: 946-950.
- Spengler, G., A. Kincses, M. Gajdacs & L. Amaral, (2017) New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules* **22**.

- Starr, M.P. & D.M. Reynolds, (1951) Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *Am J Public Health Nations Health* **41**: 1375-1380.
- Stockwell, V.O. & B. Duffy, (2012) Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev sci tech Off int Epiz* **31**: 199-210.
- Suda, K.J., L.A. Hicks, R.M. Roberts, R.J. Hunkler & L.H. Danziger, (2013) A national evaluation of antibiotic expenditures by healthcare setting in the United States, 2009. *J Antimicrob Chemother* **68**: 715-718.
- Tacconelli, E., E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outterson, J. Patel, M. Cavaleri, E.M. Cox, C.R. Houchens, M.L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini, A.O. Aboderin, S.S. Al-Abri, N. Awang Jalil, N. Benzonana, S. Bhattacharya, A.J. Brink, F.R. Burkert, O. Cars, G. Cornaglia, O.J. Dyar, A.W. Friedrich, A.C. Gales, S. Gandra, C.G. Giske, D.A. Goff, H. Goossens, T. Gottlieb, M. Guzman Blanco, W. Hryniewicz, D. Kattula, T. Jinks, S.S. Kanj, L. Kerr, M.-P. Kieny, Y.S. Kim, R.S. Kozlov, J. Labarca, R. Laxminarayan, K. Leder, L. Leibovici, G. Levy-Hara, J. Littman, S. Malhotra-Kumar, V. Manchanda, L. Moja, B. Ndoye, A. Pan, D.L. Paterson, M. Paul, H. Qiu, P. Ramon-Pardo, J. Rodríguez-Baño, M. Sanguinetti, S. Sengupta, M. Sharland, M. Si-Mehand, L.L. Silver, W. Song, M. Steinbakk, J. Thomsen, G.E. Thwaites, J.W.M. van der Meer, N. Van Kinh, S. Vega, M.V. Villegas, A. Wechsler-Fördös, H.F.L. Wertheim, E. Wesangula, N. Woodford, F.O. Yilmaz & A. Zorzet, (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* **18**: 318-327.
- Tajkarimi, M.M., S.A. Ibrahim & D.O. Cliver, (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* **21**: 1199-1218.
- Torres-Alvarez, C., A. Núñez González, J. Rodríguez, S. Castillo, C. Leos-Rivas & J.G. Báez-González, (2016) Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *CyTA - Journal of Food*: 1-7.
- Uddhav, S.B. & M.S. Sivagurunathan, (2016) Antibiotic susceptibility testing, a review on current practices. *Int J Pharm* **6**: 11-17.
- Van Boeckel, T.P., S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B.T. Grenfell, S.A. Levin & R. Laxminarayan, (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases* **14**: 742-750.
- Vasconcelos, N.G., J. Croda & S. Simionatto, (2018) Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog* **120**: 198-203.
- Ventola, C.L., (2015) The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats. *P & T* **40**: 277-283.
- Vivanco, J.M., E. Cosio, V.M. Loyola-Vargas & H.E. Flores, (2005) Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia Febrero*: 68-75.
- Wang, R., L. van Dorp, L.P. Shaw, P. Bradley, Q. Wang, X. Wang, L. Jin, Q. Zhang, Y. Liu, A. Rieux, T. Dorai-Schneiders, L.A. Weinert, Z. Iqbal, X. Didelot, H. Wang & F. Balloux, (2018a) The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun* **9**: 1179.
- Wang, Y., Y. Zhang, Y.Q. Shi, X.H. Pan, Y.H. Lu & P. Cao, (2018b) Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog* **116**: 26-32.
- WEF, (2013) World Economic Forum. Global Risks 2013, Eighth Edition. (PDF).
- Weiman, S., (2016) Antibiotic resistance spreads through diverse species and habitats, part I. *Microbe* **11**: 201-207.
- WHO, (2017) World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. (PDF).

- Wiesner, M., E. Calva, M. Fernandez-Mora, M.A. Cevallos, F. Campos, M.B. Zaidi & C. Silva, (2011) Salmonella Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiol* **11**: 9.
- Wiesner, M., M.B. Zaidi, E. Calva, M. Fernandez-Mora, J.J. Calva & C. Silva, (2009) Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican Salmonella enterica serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol* **9**: 131.
- Witte, W., (2000) Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int J Antimicrob Agents* **16**: S19-S24.
- Woerther, P.L., C. Burdet, E. Chachaty & A. Andremont, (2013) Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* **26**: 744-758.
- Woolhouse, M.E.J. & M.J. Ward, (2013) Sources of antimicrobial resistance. *Science* **341**: 1460-1461.
- Wright, G.D., (2014) Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol* **60**: 147-154.
- Wright, G.D., (2016) Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol* **24**: 862-871.
- Xiong, W., Y. Sun & Z. Zeng, (2018) Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environ Sci Pollut Res Int* **25**: 18377-18384.
- Zaidi, M.B., V. Leon, C. Canche, C. Perez, S. Zhao, S.K. Hubert, J. Abbott, K. Blickenstaff & P.F. McDermott, (2007) Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant bla_{CMY-2} Salmonella Typhimurium in Mexico. *J Antimicrob Chemother* **60**: 398-401.
- Zipperer, A., M.C. Konnerth, C. Laux, A. Berscheid, D. Janek, C. Weidenmaier, M. Burian, N.A. Schilling, C. Slavetinsky, M. Marschal, M. Willmann, H. Kalbacher, B. Schitteck, H. Brotz-Oesterhelt, S. Grond, A. Peschel & B. Krismer, (2016) Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **535**: 511-516.