

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES
SOBRE EL CRECIMIENTO, LA PRODUCCION DE
ENTEROTOXINA Y LA ESPORULACION DE
Clostridium perfringens.**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA:

Q.B.P. Mirna Esthela Araiza Mendoza

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MARZO DE 2001

c.1

2001

A7

.C54

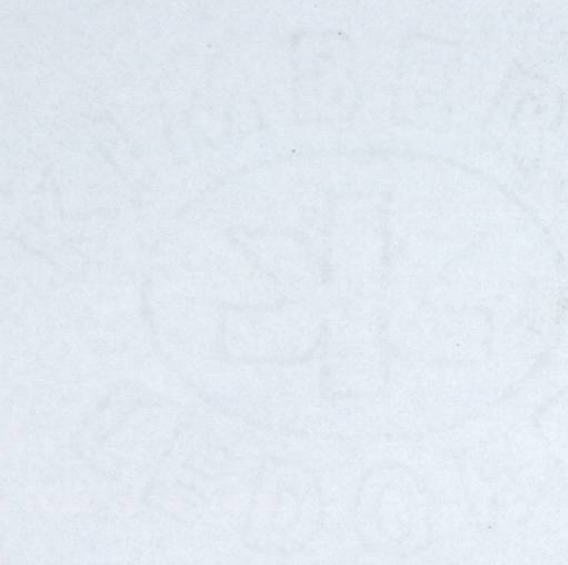
TM

QR201

Q.B.P. Mirra Esthela Araiza Mendoza



1080124322



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ESENCIA DE PLANTAS MEDICINALES SOBRE EL
CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINA Y LA
ESPORULACIÓN DE *Clostridium botulinum*

SE
EFFECTO DE LA
CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINA Y LA
LA ESPORULACIÓN DE *Clostridium botulinum*.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

Q.B.P. Mirna Esthela Araiza Mendoza.



TM

QR201

6C54

A7

2



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**EFFECTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES SOBRE EL
CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINA Y LA
ESPORULACIÓN DE *Clostridium perfringens*.**

T E S I S


**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA**

P R E S E N T A

Q.B.P. Mirna Esthela Araiza Mendoza

A P R O B A D A

COMISIÓN DE TESIS



Dra. Norma Laura Heredia Rojas
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Marivel Gómez Treviño
SECRETARIO



Dr. José Santos García Alvarado
VOCAL

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y las asesorías del Dr. José Santos García Alvarado y la Dra. Marivel Gómez Treviño.

Esta investigación fué financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 29359-B y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) proyecto SA 187-99.

DEDICATORIA

A MI PADRE CELESTIAL

A mi mamá porque siempre ha tratado de darme lo mejor
Porque me dió el gran ejemplo de que
siempre podemos salir adelante aún en contra de todo
si uno se lo propone
Gracias mamá porque cuando mi día fue pesado
siempre me escuchaste.

A Eduardo, gracias le doy a DIOS por haberme dado el corazón para amarte y
ponerte en mi camino, junto a ti la vida es especial y diferente,
la llenas de grandes alegrías e ilusiones.
Porque caminar junto a tí la vida es más fácil.

A mi abuelita Andrea, a mis tíos Rosy, Ricardo y Eva,
a mis primos David y Javier,
Que son mi familia, me brindan siempre su apoyo y me dan ánimos para
superarme, porque cuando estamos juntos me hacen recordar
que no todo en la vida son retos y trabajo.

Cariñosamente a la Sra. Rosalinda por que siempre me ofreció sus consejos,
su apoyo incondicional y estuvo al pendiente de mí, gracias por adoptarme
y recibirme con gran afecto cuando llego a su casa.

A mi amigo Paco, eres una gran persona,
Tus pláticas y consejos me ayudaron
a sobrellevar aquellos momentos difíciles,
y los especiales que solo pueden ser compartidos con un gran amigo.

El espacio es insuficiente para expresar lo que significan para mí,
GRACIAS!!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (PAICYT) por brindar la ayuda económica necesaria para la realización de esta investigación.

A la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y al Dr. José Santos García Alvarado por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigadores, por su paciencia, asesoría y enseñanzas durante mi formación profesional.

A la Dra. Marivel Gómez Treviño por haber aceptado formar parte de mi Comisión de Tesis y mejorar la presentación de este trabajo.

Al Q.B.P. Eduardo Sánchez García porque eres un gran profesional y tienes la disponibilidad de ayudarnos a todos incondicionalmente, además por aportar ideas durante la investigación que facilitaron la realización de la misma.

Al Q.B.P. Franciso Javier Sánchez Velázquez por que siempre me ofreciste tu ayuda profesional y sé que por siempre me apoyarás, mil gracias por que también contribuiste a la búsqueda de plantas y aportaste algunas para esta investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos Berenice, Belén, Ricardo, Adrián, Moisés, Alicia y muy especialmente a Geno, porque de cada uno de ustedes recibí ayuda en algún momento y me la brindaron, además aprendimos a trabajar en equipo y sobre todo porque comprendí que el ambiente de trabajo sería muy pesado si no hubiera contado con su amistad.

ÍNDICE

PÁGINA DE TÍTULO	I
COMISIÓN DE TESIS	II
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
ABSTRACT	I
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
Historia	7
Características del microorganismo	8
Reservorios	11
Enfermedades producidas	12
Enfermedades alimentarias producidas por <i>C. perfringens</i>	13
Enterotoxina (CPE)	16
Esporulación	20

Extractos de plantas	22
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
METODOLOGIA	27
Efecto sobre el crecimiento	28
Extracción	28
Activación de la cepa	29
Ensayos preliminares	29
Ensayos de CMI en medio ICC	30
Efecto sobre la producción de enterotoxina	31
Ensayos de CMI en medio Duncan-Strong	31
Obtención de sobrenadantes	31
Detección de enterotoxina mediante ELISA	32
Efecto sobre la esporulación	33
RESULTADOS	34
Efecto sobre el crecimiento	34
Efecto sobre la producción de enterotoxina	38
Efecto sobre la esporulación	39
DISCUSIONES	45
CONCLUSIONES	51
LITERATURA CONSULTADA	52

Lista de Figuras

- Figura 1.- Halos de inhibición producidos por 6 extractos etanólicos de plantas medicinales sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 36**
- Figura 2.- Efecto del extracto etanólico de Palo de Brasil al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas. 41**
- Figura 3.- Efecto del extracto acuoso de Palo de Brasil al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas..... 42**
- Figura 4.- Efecto del extracto etanólico de Guayabo al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas..... 43**
- Figura 5.- Efecto del extracto acuoso de Guayabo al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas. 44**

Lista de Tablas

Tabla 1.- Antígenos solubles en filtrados de cultivo de <i>C. perfringens</i> (Labbe, R., 1989)	10
Tabla 2.- Plantas medicinales analizadas.....	27
Tabla 3.- Efecto de diferentes extractos de plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> FD-1041	35
Tabla 4.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> FD-1041 por 4 extractos de plantas en medio ICC, utilizando dos diferentes tipos de solventes.	37
Tabla 5.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> FD-1041. por 4 extractos de plantas en medio DS, utilizando dos diferentes tipos de solventes.....	38
Tabla 6.- Efecto de 3 diferentes extractos de plantas a diferentes concentraciones sobre la producción de enterotoxina de <i>C. perfringens</i> FD-1041	39
Tabla 7.- Efecto de 3 extractos de plantas sobre la producción de esporas termoestables en <i>C. perfringens</i> FD-1041	40

Lista de Abreviaturas

$A_{600\text{ nm}}$	Absorbancia a 600 nm
A_w	Disponibilidad de agua
CO_2	Dióxido de Carbono
CPE	Enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
Eh	Potencial óxido-reducción
h	Horas
kDa	Kilodaltones
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minuto(s)
mg	miligramos
N	Normal
N_2	Nitrógeno (gas)
nm	Nanómetro(s)
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
ufc	Unidades formadoras de colonias
α	Alfa
β	Beta
ι	Iota
ϵ	Epsilon
μ	Micras
μl	Microlitros
%	Por ciento
>	Mayor de

ABSTRACT

Clostridium perfringens is an important bacterial pathogen responsible of a wide spectrum of human and veterinary diseases. *C. perfringens* type A food poisoning is the most common of these illnesses for humans. The illness is associated to the sporulation of the bacteria and the production of an intracellular enterotoxin. This enterotoxin plays a crucial role in the development of diarrhea which is the main symptom of food poisoning. In this work the effect of 15 extracts of plants used in the traditional medicine of México for the treatment of gastrointestinal disorders (*Acacia farnesiana* L., *Citrus aurantium* L., *Euphorbia postrata* Aiton, *Guazuma ulmifolia*, *Haematoxylon brasiletto* Karst., *Hyptis verticillata* Jacq., *Hyptis suaveolens*, *Lippia dulcis* Trev., *Psidium gajava* L., *Rhizophora mangle* L., *Solanum hindsianum*, *Solanum nigrum* L., *Tagetes erecta* L., *Taxodium mucronatum* Ten.) was determined on growth, enterotoxin production and sporulation of the enterotoxigenic strain *C. perfringens* FD-1041. For the preliminary antimicrobial assays, ethanolic and aqueous (phosphate buffer) extracts were tested using a diffusion method (wells in agar Muller-Hinton). Dilution methods were used to determine the minimal concentration of extracts that inhibited these metabolic processes. Growth was determined in Brain Heart Infusion (BHI) and Duncan-Strong medium (DS). Enterotoxin production was quantified by ELISA and spore formation by plate count. In the preliminary antimicrobial assay, 13 of these plants exhibited antimicrobial activity and four of them were selected for MIC. The most effective extracts that inhibited growth were those of *Haematoxylon brasiletto* 0.5, 2.8 mg/ml in BHI and 0.28, 2.6 mg/ml in DS), *Psidium*

guajava (1.06, 20 mg/ml in IBH and 6.16, 24 mg/ml in DS), *Euphorbia postrata* (1, 25 mg/ml in BHI and 11, 27.3 mg/ml in DS). Less effective was *Rhizophora mangle* (13.5, >50 in BHI and >50 in DS). Enterotoxin formation was no detected when 25, 50 or 75% of MIC for growth in DS were added to the media. Sporulation was more inhibited by *Euphorbia postrata* than by *Psidium guajava* and *Haemoatoxylon brasiletto*.

RESUMEN

Clostridium perfringens es una bacteria patógena, importante para humanos y animales. La intoxicación alimentaria por este microorganismo es una de las enfermedades gastrointestinales más comunes transmitidas por alimentos debido a la acción de una toxina, la cual produce desórdenes gastrointestinales dando como resultado los síntomas clínicos característicos que son la diarrea y los cólicos abdominales. La producción de enterotoxina se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de esporulación.

Debido a que en nuestro país la medicina tradicional es utilizada en muchas comunidades para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, en el presente trabajo determinamos el efecto de 15 extractos de plantas (*Acacia farnesiana* L., *Citrus aurantium* L., *Euphorbia postrata* Aiton, *Guazuma ulmifolia*, *Haematoxylon brasiletto* Karst., *Hyptis verticillata* Jacq., *Hyptis suaveolens*, *Lippia dulcis* Trev., *Psidium gajava* L., *Rhizophora mangle* L., *Solanum hindsianum*, *Solanum nigrum* L., *Tagetes erecta* L., *Taxodium mucronatum* Ten.) sobre el crecimiento, la producción de enterotoxina y la esporulación de *C. perfringens* FD-1041.

Se realizó una búsqueda de las plantas usadas comúnmente en la medicina tradicional para resolver problemas gastrointestinales, se realizaron extracciones con dos diferentes solventes, etanol (96%) y amortiguador de fosfatos. Para los ensayos preliminares los extractos fueron probados por la técnica de difusión en agar (perforaciones sobre el agar Muller-Hinton). La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos seleccionados fue determinada en medio Infusión Cerebro Corazón (ICC) y medio de

esporulación y producción de enterotoxina Duncan-Strong (DS) mediante métodos de dilución. La producción de enterotoxina fue cuantificada por la técnica de ELISA mientras que para demostrar el efecto de los extractos sobre el proceso de esporulación se realizaron cuentas viables de esporas.

Los resultados obtenidos mostraron que 13 de las plantas utilizadas ejercieron actividad antimicrobiana sobre *C. perfringens* debido a que inhibieron su crecimiento con al menos uno de los solventes utilizados, sin embargo se seleccionaron aquellas que demostraron actividad con ambos solventes para la determinación de la CMI. Los extractos que presentaron la mayor actividad antimicrobiana fueron *Haematoxylon brasiletto* (0.5, 2.8 mg/ml en ICC y 0.28, 2.6 mg/ml en DS), *Psidium guajava* (1.06, 20 mg/ml en ICC y 6.16, 24 mg/ml en DS) y *Euphorbia postrata* (1, 25 mg/ml en ICC y 11, 27.3 mg/ml en DS), con menor efectividad fue observados los extractos de *Rhizophora mangle* (13.5, >50 en ICC y >50 en DS). La presencia de enterotoxina no fue detectada a ninguna de las concentraciones probadas que fueron el 25, 50 y 75% de la CMI determinada en medio Duncan-Strong. El proceso de esporulación fue inhibido por los extractos etanólico y acuoso de *Euphorbia postrata* y una reducción de la esporulación conforme se incrementó la concentración de los extractos de *Psidium guajava* y *Haematoxylon brasiletto*.

INTRODUCCIÓN

Clostridium perfringens es probablemente la bacteria anaerobia más estudiada por su importancia médica y amplia distribución en suelo, agua, alimento, intestino del hombre y animales y aire (Labbe, R., 1991).

El microorganismo es patógeno de humanos y animales. Dentro de las características más importantes presentadas por este patógeno se encuentran, su capacidad de crecer a temperaturas relativamente altas (43-45°C), de formar esporas y su corto tiempo de generación, los cuales son considerados como factores que contribuyen a su virulencia (McClane, B. A., 1996).

Históricamente a *C. perfringens* se le ha asociado con la gangrena gaseosa, sin embargo actualmente es también causa común de enfermedades asociadas con alimentos debido a la acción de una toxina producida por este patógeno (Todd, E. C., 1988).

La enterotoxina de *C. perfringens* consiste en un polipéptido de 35 kDa y es la responsable de la intoxicación por alimentos. Esta enfermedad se produce comúnmente por la ingestión de un gran número de células vegetativas del microorganismo que sobreviven el paso a través de la acidez del estómago, y esporula en el intestino, donde como consecuencia también producen la enterotoxina, provocando los desórdenes gastrointestinales y dando como resultado los síntomas clínicos, los cuales incluyen calambres abdominales severos, diarrea y náusea (Labbe, R. G., 1989).

En las últimas décadas para el control de muchos patógenos de alimentos se han utilizado un amplio rango de agentes preservativos ó productos farmacéuticos, sin embargo el

espectro de antimicrobianos que no ejerzan efectos colaterales es severamente limitado ya que muchos de ellos tienen gran toxicidad ó bien se ha visto un incremento en la resistencia del patógeno contra dichos agentes. Estos problemas sugieren la necesidad del desarrollo de nuevos preservativos ó agentes terapéuticos (Ingólfssdottir, K., 1985).

En base a lo anteriormente mencionado y debido a que desde hace mucho tiempo, se han usado empíricamente una gran cantidad de plantas medicinales con éxito y a las tendencias recientes del consumo de productos naturales, pensamos buscar plantas medicinales que se han usado empíricamente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en la medicina tradicional mexicana, que pudieran ser capaces de inhibir el crecimiento de *C. perfringens* así como algunos procesos metabólicos como lo son la producción de enterotoxina y esporulación. Esto podría representar una estrategia efectiva de prevención contra la intoxicación alimentaria producida por *C. perfringens*.

ANTECEDENTES

HISTORIA

C. perfringens es una de las bacterias anaerobias patógena para humanos más ampliamente distribuida y estudiada (Labbe, R. 1991).

En los últimos 90 años a *C. perfringens* se le ha relacionado con la gangrena gaseosa, sin embargo, la primera referencia de este patógeno como causa de diarrea crónica humana fue hecha a fines del siglo XIX. A partir de las décadas de 1940 a 1950 fue asociado como un importante agente causal de enfermedades transmitidas por alimentos con los estudios pioneros por Knox y Mc Donald en Inglaterra y McClung en estados Unidos, pero el interés en la intoxicación por alimentos por *C. perfringens* se manifestó hasta 1953 cuando Hobbs y colaboradores comenzaron a estudiar al microorganismo (Labbe, R. 1989; McDonel, J.L., 1986).

También se estableció que este microorganismo causa enfermedades veterinarias como la enterotoxemia clostridial en animales domésticos y la enfermedad del riñón pulposo en corderos entre otras, donde, las tasas de mortalidad han llegado a ser hasta de un 100% por lo que ha tenido un gran impacto económico (Miserez, R., 1998).

CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO

Familia: Bacillaceae Género: Clostridium

Anteriormente conocido como *C. welchii*, es una bacteria anaerobia, gram-positiva, formadora de esporas, encapsulada, no móvil y de tamaño variable dependiendo el medio de crecimiento, ya que en un medio rico en glucosa, aún en fase estacionaria, las células son relativamente cortas, mientras que en un medio de esporulación basado en almidón las células son más grandes (McClane, B. A. 1996, Labbe, R. 1989).

Las células vegetativas tienen una temperatura óptima de crecimiento relativamente alta con un rango de 43-45°C y pueden continuar creciendo hasta 50°C dependiendo del microambiente en donde se encuentre, ya que en los alimentos puede ser más alta de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del mismo. Por lo general temperaturas mayores a 50°C usualmente conducen a una rápida muerte celular, sin embargo algunas células pueden recuperarse de esas altas temperaturas, resultando en un crecimiento limitado, a esto se le conoce como "fenómeno fénix". Estas células no son tolerantes a la refrigeración o congelamiento por lo que su rango de crecimiento varía de 15 a 50°C (Labbe, R. 1989).

Esta bacteria se clasifica como un anaerobio obligado, sin embargo, no requiere un ambiente extremadamente reducido para crecer, ya que el microorganismo reduce su entorno por la producción de moléculas de ferredoxina que disminuyen el potencial de óxido-reducción (Eh) para su crecimiento, el pH óptimo es de 6 a 7, y es menos tolerante a bajos niveles de A_w puesto que su rango óptimo va de 0.93 a 0.97 a diferencia de otros patógenos gram positivos asociados a alimentos como *Staphylococcus aureus* (Hayes, P.R., 1992, McClane, B. 1997).

Se demostró que bajas concentraciones de nitrito de sodio y cloruro de sodio inhibieron el crecimiento del microorganismo cuando son usadas juntas. Además tienen un corto tiempo de generación de alrededor de 10 minutos, lo que permite su rápida multiplicación en los alimentos (Labbé, R., 1989).

Las esporas de *C. perfringens* son resistentes al calor, esto les permite sobrevivir a la incompleta cocción de los alimentos e incluso a la ebullición por lo que se les considera termotolerantes. La germinación de las esporas puede ser inducida cuando se les aplican temperaturas de 70 a 80°C durante 20 minutos dependiendo de la cepa, además de resistir bajas temperaturas. Las esporas son moderadamente susceptibles a hipoclorito de sodio al 1% y susceptibles a desinfectantes concentrados como el glutaraldehído por un prolongado tiempo de contacto. Fuera del hospedero la espora puede sobrevivir en alimentos como la carne hasta 330 días y en suelos mayores períodos de tiempo. La resistencia de estas estructuras a la radiación varía, puesto que las esporas aisladas de un brote de intoxicación por alimentos son más resistentes a la radiación que las esporas de cepas clásicas. Estas diferencias son similares a lo que ocurre con la alta resistencia al calor, por lo tanto una previa radiación al calor sensibiliza a las esporas a un subsecuente calentamiento (McClane, B. 1997, Labbé, R., 1989).

Las enfermedades ocasionadas por *C. perfringens* son generalmente mediadas por la producción de enzimas extracelulares o toxinas. Al menos 13 toxinas diferentes son expresadas por *C. perfringens* y en base a que una célula produce un subgrupo definido de estas toxinas, se formó un sistema de tipificación de toxinas (tabla 1) que es usado para clasificar a las cepas dentro de cinco tipos toxigénicos: A, B, C, D y E (McClane, B. A., 1996). Sin embargo su

virulencia ha sido asociada con su capacidad para expresar principalmente las toxinas alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ), e iota (ι) (Yoo, H.S., 1997).

Designación	Actividad	Ocurrencia en filtrados de <i>C. perfringens</i>				
		A	B	C	D	E
α	letal, necrotizante, hemolítica, lecitinasa C	+++	+	+	+	+
β	letal, necrotizante	-	+++	+++	-	-
γ	letal	-	+	+	-	-
δ	hemolítica, letal	-	+	++	-	-
ϵ	letal, necrotizante (activada por tripsina).	-	++	-	+++	-
η	letal (cuestionable)	+	-	-	-	-
θ	hemolítica (lábil del oxígeno, letal)	++-	+	+	+	+
ι	necrotizante, letal (activada por tripsina)	-	-	-	-	++
κ	colagenasa (letal, necrotizante, gelatinasa)	++	-	+	+-	+
λ	proteínasa	-	+++	-	+-	+
μ	hialuronidasa	+-	+	-	+-	-
ν	deoxiribonucleasa	+	+	+	+	+

+++ presente en la mayoría de las cepas, ++- o +- presente en algunas cepas. + limitado a muy pocas cepas, -: no presente

Tabla I.- Antígenos solubles en filtrados de cultivo de *C. perfringens* (Labbe, R. 1989).

Labbe en 1989 mencionó que una de las toxinas más importantes para humanos es la α toxina conocida también como fosfolipasa C ó lecitinasa, la cual es producida por todas las cepas y ha sido reconocida como uno de los más importantes factores de virulencia de este microorganismo, debido a que posee actividad de fosfolipasa y esfingomielinasa que son los responsables de la citotoxicidad, necrosis y hemólisis. Es una metaloenzima multifuncional y la principal causante de la gangrena gaseosa (Rood, J. I., 1991).

La β - toxina es producida por los tipos B y C mientras que la actividad de la ϵ toxina no ha sido completamente determinada, sin embargo en 1998 Miyamoto *et al*, demostraron que la epsilon toxina, fue capaz de ejercer una acción neurotóxica después de que se inyectó intravenosamente en animales de laboratorio, no obstante sus efectos no fueron tan peligrosos como los provocados por la toxina botulínica ó tetánica. Mientras que la iota toxina que es la última de las 4 principales toxinas letales producidas por *C. perfringens* está normalmente asociada con cepas tipo E (Rood, I. 1991).

Además la enterotoxina (CPE) es otra toxina producida por *C. perfringens* la cual es de gran importancia ya que esta involucrada con la intoxicación alimentaria (Meer, R.R., 1997) y es producida por el Tipo A mientras que los otros tipos son asociados con enfermedades de animales de granja (McClane, B. A., 1997).

Maryse (1997) mencionó que continuamente se han estado caracterizando nuevas toxinas producidas por este microorganismo, y el método de tipificación de cepas se basa en la neutralización de las toxinas con antisuero específico y determinando el patrón de neutralización por inyección de la antitoxina en ratones (Labbe, R. 1989). Por lo que es un método en desuso en la actualidad.

RESERVORIOS

Se ha reportado que *C. perfringens* tiene una amplia distribución en la microflora del suelo en niveles de 10^3 - 10^4 ufc/g aún en suelos de la antártida de donde se aisló en un

63% de las muestras y un 90% de las muestras de polvo. Los sedimentos marinos, agua y cualquier área sujeta a la contaminación fecal humana y de animales son también considerados como reservorios ya que este microorganismo se aisló del contenido intestinal en un rango de 10^3 - 10^4 esporas/g en heces de humanos sanos así como también los alimentos principalmente la carne de res y algunas especias (Labbe R.1991, Hayes, P.R., 1992).

ENFERMEDADES PRODUCIDAS

Netherwood (1998) mencionó que *C. perfringens* es una causa de enfermedades en un amplio rango de animales y humanos, puesto que diferentes cepas de este patógeno utilizan diferentes mecanismos patogénicos que son los responsables de los distintos síndromes por la elaboración de una gran variedad de toxinas.

Entre las enfermedades veterinarias que puede producir este patógeno se mencionó la disentería del cordero, enfermedad del riñón pulposo, y las enterotoxemias en una gran cantidad de animales como ovejas, borregos, lechones, corderos y en ganado vacuno (Labbe, R. 1989).

Con respecto a las enfermedades humanas se han reportado a la gangrena gaseosa, las enfermedades gastrointestinales no asociadas a alimentos como la diarrea crónica infantil, diarrea asociada a antibióticos y la diarrea esporádica, mientras que dentro de las

enfermedades transmitidas por alimentos se reportan la enteritis necrótica y la intoxicación alimentaria (McClane, B. A., 1997, Labbe, R. 1989, Collie, C. 1987).

ENFERMEDADES ALIMENTARIAS PRODUCIDAS POR *C. PERFRINGENS*.

C. perfringens actualmente causa dos enfermedades humanas diferentes que pueden ser transmitidas por alimentos. La enteritis necrótica y la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* tipo A. La enteritis necrótica también conocida como Darmbrand en Alemania ó pig-bel en Nueva Guinea, es una enfermedad relativamente rara de enteritis necrótica pero de gran severidad asociada a alimentos en países industrializados, esta enfermedad es causada por el tipo C y el factor de virulencia es la β -toxina (McClane, B.A. 1997).

Labbe (1989) mencionó que la enteritis necrótica se ha presentado en adultos jóvenes de las tierras altas de Papua Nueva Guinea, se manifestó como una jejunitis hemorrágica necrotizante en donde la infección de los intestinos puede resultar en septicemia y muerte. Los alimentos implicados fueron la carne de cerdo contaminado con *C. perfringens* tipo C. Rood y Cole (1991) mencionaron que la β -toxina fue rápidamente inactivada por tripsina en el intestino delgado, sin embargo se descubrió que los camotes son un potente inhibidor de tripsina y son frecuentemente servidas con el puerco lo que puede contribuir a la incidencia del pigbel.

La intoxicación o envenenamiento por alimentos producido por *C. perfringens* es una enfermedad distribuída en todo el mundo, es difícil de reportar con exactitud su incidencia, ya que la mayoría de los casos no son notificados a los centros de salud dado que los síntomas no son muy severos y en ocasiones no perceptibles cuando una persona se enferma, por lo tanto

los datos disponibles representan una pequeña fracción del número real de casos (Labbe, R. 1989).

El Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC) reportó que entre 1967-1978 se presentaron 324 brotes por *C. perfringens* tipo A en Estados Unidos (Hatheway, C. 1980).

Todd (1995) estimó que 652,000 casos de intoxicaciones alimentarias por *C. perfringens* son transmitidas cada año en los Estados Unidos, con un promedio de 7.6 muertes por año y costos anuales de 123 millones de dólares, ubicándolo dentro de los primeros microorganismos patógenos de importancia en alimentos.

Esta enfermedad no solo se ha reportado en Estados Unidos también existen reportes en otros países como Israel, Finlandia, Dinamarca, Escocia, Suecia, Hungría, Portugal, Cuba, Holanda, Yugoslavia, Canadá, España, Inglaterra, Francia, Alemania, Japón y México. (Todd, E. 1995).

Bryan en 1980 mencionó que los brotes asociados a carne de res y ave son los más comunes, posteriormente McClane en 1985 reportó a la comida estilo mexicana, gravy y más recientemente, los frijoles así como alimentos con alta cantidad de proteína o almidón como vehículos de este patógeno.

En 1992, Hayes mencionó que las poblaciones más afectadas incluyeron comedores institucionales como escuelas, cafeterías, hospitales, guarderías y prisiones en donde grandes cantidades de alimento son preparados varias horas antes de servirse, por este motivo actualmente a *C. perfringens* se le conoce como "food service germ".

Los niños y los ancianos fueron los más susceptibles a la enfermedad con una mayor incidencia en los meses de verano, ya que se favorece el crecimiento del microorganismo cuando hay abusos de temperaturas durante la cocción, enfriamiento o almacenamiento inapropiado de los alimentos (McClane, B. A. 1997).

Los síntomas de esta enfermedad se manifiestan por un desorden intestinal caracterizado por calambre abdominal severo, seguido de diarrea y náusea. Estos se desarrollan de 6 a 24 horas después de la ingestión del alimento contaminado y se resuelve espontáneamente dentro de 12 a 24 horas (Hayes, P. R. 1992).

Labbe en 1991, mencionó que la patogénesis de esta enfermedad se desarrolla por la presencia de esporas viables en alimentos refrigerados o congelados en donde pueden germinar cuando el alimento es mal calentado y posteriormente no tiene un enfriamiento adecuado, o bien, la ingestión de alimentos contaminados con células vegetativas de *C. perfringens* enterotoxigénico lo que puede resultar en una intoxicación debido a que muchas de las células vegetativas mueren cuando se exponen a la acidez del estómago, pero las que sobreviven y entran al intestino delgado, pueden multiplicarse y esporular. Es durante la esporulación en el intestino delgado cuando la enterotoxina por *C. perfringens* (CPE) se expresa y es liberada al momento de la lisis de la célula madre, entonces la CPE se une rápidamente a las células epiteliales intestinales y produce daños morfológicos a las células causando una pérdida del fluido intestinal clínicamente manifestado como diarrea.

ENTEROTOXINA (CPE)

Los primeros antecedentes que se tienen con respecto a la enterotoxina fueron reconocidos por Hauschild en 1968 y Niilo en 1970, proporcionaron evidencias experimentales de que durante la intoxicación alimentaria no se presentaba invasión bacteriana a la mucosa y que la respuesta clínica podía ser reproducida por extractos libres de células de *C. perfringens* mediante la acción de un “factor enteropatogénico” producido por el microorganismo, y que estaba asociado con el crecimiento y la esporulación de las células de este patógeno bajo condiciones apropiadas. Niilo (1970), realizó las primeras observaciones de la probable acción de este “factor enteropatogénico” sobre corderos, conejos y cobayos en la inducción de signos y síntomas, concluyendo que el factor enteropatogénico actuaba sobre el intestino delgado causando incrementos en la permeabilidad capilar, vasodilatación y en la movilidad intestinal.

Posteriormente la principal evidencia de que la enterotoxina era la causa principal de la intoxicación alimentaria fue demostrada por Skjelkvale y Uemura en 1977 cuando humanos voluntarios ingirieron enterotoxina purificada y manifestaron los síntomas primarios de la enfermedad: la diarrea y el dolor abdominal.

Actualmente se sabe que la enterotoxina es un polipéptido de aproximadamente 320 aminoácidos con un peso molecular de 35,000 daltones, con un punto isoeléctrico de 4.3 y es lábil al calor puesto que puede ser inactivado al calentarlo durante 5 minutos a 60°C. La toxina es muy sensible a pH extremo pero resiste el tratamiento con algunas enzimas proteolíticas (Rood, J.I., 1991; McClane, B. A. 1988).

Con respecto a la acción in vivo de la enterotoxina, experimentos realizados por McDonel y Demers en 1982, demostraron en conejos que la diarrea causada por la enterotoxina fue debida a sus efectos sobre el intestino delgado y los dolores abdominales fueron consecuencia de un peristaltismo incrementado y una dramática constricción intestinal, también propusieron que la actividad biológica de la enterotoxina involucraba un proceso secuencial en donde la unión de la toxina a su receptor debe ser lo primero y más esencial de todos ellos, esta hipótesis se basó en que la CPE unida es inaccesible a proteasas que degradaría la toxina y su receptor en la célula hospedera.

Recientemente Labbé en 1990, Rood y Cole en 1991 y McClane en 1997 elucidaron el mecanismo de acción de la toxina. El evento inicial es la unión de la CPE a su receptor (proteína de membrana de 50 kDa) resultando en la formación de un complejo de 90kDa, lo cual produce cambios físicos a la molécula de CPE que le permite insertarse en la bicapa de la membrana. Posteriormente se forma un gran complejo de 160 kDa mediante una interacción entre el pequeño complejo y una proteína de 70 kDa de la célula hospedera. Este gran complejo sirve como poro por donde atraviesan pequeñas moléculas, lo cual ocasiona la pérdida de las propiedades normales de la membrana plasmática.

McClane en 1997, mencionó que dentro de los eventos secundarios de acción de la CPE se encontraba, la inhibición de la síntesis de proteínas, DNA y RNA, además de alteración de permeabilidad de grandes moléculas de 3 a 5 kDa, daños morfológicos evidentes y descamación de las células intestinales de la punta de las vellosidades, lo que resulta en una

disrupción de la integridad normal, estos efectos traen como consecuencia el desbalance del equilibrio normal coloide-osmótico.

Esta enfermedad se ha reportado que es de naturaleza autolimitante debido a que la diarrea producida se autocontrola por el barrido de la CPE no unida y células de *C. perfringens* del intestino, además de que la toxina afecta preferencialmente la punta de las vellosidades intestinales, que contiene a células viejas y pueden ser rápidamente remplazadas por células más jóvenes de manera natural (Labbé, R. 1989).

A diferencia de la toxina del cólera y la enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* se ha demostrado que la enterotoxina de *C. perfringens* no incrementa los niveles de AMP cíclico intestinal, ya que se ha determinado que inhibe la absorción de glucosa o produce un daño histopatológico directo sobre el intestino delgado. Sin embargo, se ha estimado que el daño intestinal provocado por la enterotoxina es tan rápido que su desarrolló va de 15 a 30 minutos después del tratamiento con la toxina (McClane, B. A., 1996).

El modelo actual de citotoxicidad mediada por la enterotoxina involucra dos fases que difieren en su dependencia al calcio. La fase inicial, independiente de calcio, es donde se manifiesta la alteración de la permeabilidad, pérdida de metabolitos de bajo peso molecular y iones. En la segunda etapa, es dependiente de calcio, se presenta el daño morfológico y alteraciones más extensas de permeabilidad, lo que resulta en la pérdida de solutos más grandes, se menciona además que una posible consecuencia del incremento en el flujo de calcio es el colapso del citoesqueleto que termina con la lisis de la célula (Rood y Cole 1991).

Para que la enfermedad pueda presentarse es necesario la presencia de un receptor específico sobre la superficie de la célula hospedera, de manera natural las células blanco son las del intestino humano, sin embargo, experimentos realizados en animales de diferentes especies como ratón, conejo y mono han demostrado su susceptibilidad a la enterotoxina e incluso se ha visto que puede afectar células de diferentes órganos como hígado y riñón (McDonel y McClane 1997).

Los estudios realizados por Katahira *et al* en 1997 indicaron que la enterotoxina se unió a células intestinales vía dos diferentes receptores (uno de alta y otro de baja afinidad) por lo que propusieron que la toxina utiliza proteínas relacionadas estructuralmente como receptores funcionales "in vivo" y que por este motivo otros órganos pueden ser blanco de la CPE.

McClane (1997) mencionó que el gene *cpe* que codifica para la enterotoxina, esta presente en plásmidos de muestras aisladas de origen veterinario, mientras que en los aislados de cepas causantes de intoxicación en alimentos el gene esta presente en regiones hipervariables del cromosoma. El origen de este gen es presumiblemente de un fago lisogénico o trasposon que se ha integrado en el cromosoma, sin embargo, posteriormente Collie y McClane en 1998 analizaron muestras de pacientes con intoxicación alimentaria provenientes de Norte América y Europa y encontraron que el gene de la enterotoxina (*cpe*) fue cromosomal, mientras que en las muestras aisladas de pacientes con enfermedades gastrointestinales humanas no asociadas a alimentos, el gene fue de origen episomal, con esto concluyeron que cepas de *C. perfringens cpe* positivas presentan diferentes subpoblaciones,

que pueden ser los responsables de la intoxicación alimentaria ó enfermedades humanas no asociadas a alimentos.

El proceso de esporulación y producción de enterotoxina está relacionado de manera importante. La toxina puede ser producida en grandes cantidades, llegando incluso a representar del 15 al 30% de la proteína total celular, después de 2 a 3 h de haber comenzado el proceso de esporulación. La enterotoxina se libera cuando la célula madre se desintegra para liberar a la espora madura (McClane, B. A., 1996).

Aunque las células vegetativas pudieran ser capaces de producir pequeñas cantidades de enterotoxina, esta no es significativa como para producir un cuadro patogénico. Se han realizado estudios para determinar si la enterotoxina juega un papel importante en el proceso de formación de esporas; Ryu y Labbe en 1989, encontraron solo pequeñas cantidades de enterotoxina están asociados con la espora, con lo cual concluyeron que la enterotoxina no tenía un papel estructural importante durante su formación.

ESPORULACIÓN

La esporulación es un aspecto importante de *Clostridium perfringens* por varias razones: es un importante factor de clasificación, sus esporas pueden sobrevivir procesos térmicos y si las condiciones presentes son adecuadas, las células vegetativas pueden desarrollarse, además de que grandes cantidades de enterotoxina, como se mencionó anteriormente, son producidas durante esta etapa (Labbe, R. 1989).

Una gran cantidad de medios complejos se han desarrollado para inducir la esporulación, sin embargo el más comunmente usado es el Duncan-Strong e incluso la adición de rafinosa incrementa los niveles de esporulación y producción de toxina (Labbe, R. 1989), Sacks y Thompson en 1977 realizaron estudios con methylxanthinas y demostraron que cuando estas son agregados al medio de cultivo, se favorece el proceso de esporulación, por lo tanto, las propiedades de resistencia de las esporas de *C. perfringens* dependen del medioambiente y los factores genéticos (Mc Clane, B. 1997).

Los factores más importantes que deben de considerarse durante la esporulación fueron resumidos por Labbe en 1989, mencionó que además del medio de cultivo, el rango de temperatura óptimo se encuentra entre 35-40°C pudiéndose alcanzar una esporulación máxima si se utilizan medios complejos de laboratorio en aproximadamente 7 horas, el rango de pH varía de 6 a 8, mientras que el rango para la actividad de agua es de 0.98-0.992.

La resistencia de las esporas al calor es una característica clara que contribuye a la habilidad del organismo para producir la intoxicación alimentaria puesto que sobrevive la incompleta cocción de los alimentos, en un medio como carne cocida en donde las esporas de *C. perfringens* pueden sobrevivir 1 hora durante ebullición (Mc Clane, B. 1997), otro importante aspecto es la resistencia de las esporas a la radiación (Labbe, R. 1989).

Los factores que afectan la germinación de las esporas son de naturaleza ambiental y química, Ahmed y Walker en 1971, mencionaron que la germinación de las esporas de *C. perfringens* fue óptima a un pH de 6, temperatura de 30°C en un medio reducido y fue

necesaria la activación por calor, obtuvieron una máxima germinación cuando las esporas fueron calentadas 20 min a 75°C, además, una combinación de cloruro de sodio y cistina fueron más efectivos para una inducción rápida y completa de la germinación.

Debido a que las esporas son estructuras de resistencia, es necesario determinar su viabilidad, para esto, tradicionalmente han sido utilizadas técnicas de plaqueo después de una activación a altas temperaturas (75 a 80°C/ 15 a 20 min) para inducir su germinación e inactivar las células vegetativas (Labbe, R. 1989).

Con todos los antecedentes anteriormente mencionados es importante remarcar los problemas que *C. perfringens* puede causar en el área de alimentos y la salud, actualmente las medidas de control que se toman se basan en la cocción y recalentamiento adecuado de los alimentos, rápido enfriamiento y la manipulación higiénica de los mismos (Hayes, P. R. 1992), por lo tanto es necesario la búsqueda de alternativas eficientes que puedan ayudar al control de *C. perfringens*.

EXTRACTOS DE PLANTAS

Desde la existencia del hombre mismo, las plantas han sido el sostén de la especie humana y algunas de ellas han sido usadas como “medicinas” para curar malestares. El conocimiento heredado e intuitivo, según el cual, la planta es el medicamento idóneo para una enfermedad determinada, es uno de los aspectos más fascinantes de la naturaleza (Thomson, W., 1980). Al principio, las plantas medicinales fueron tomadas crudas, correctamente ya que su forma natural es sin duda la más simple y mejor. En las hierbas frescas, el contenido natural

de las enzimas, vitaminas y otros principios activos, se conservan de modo más perfecto (Díaz, J. L., 1976; Mazari. L. E., 1988).

Las plantas medicinales para el tratamiento de muchas enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos han sido utilizadas desde épocas muy antiguas (Ríos, G., 1989).

El primer registro escrito de la utilización terapéutica de las plantas, se remonta a más de 3,000 años A.C. en China. Otros datos demuestran que en el año 2,500 A.C. los sumerios conocían una diversidad de plantas usadas como terapéuticos. Algunos siglos después en el año de 1,400 A.C. se ha mencionado que los egipcios utilizaron extractos de plantas contra muchas enfermedades, también existen reportes similares de los Griegos y Romanos en el año 77 A.C., (Thomson, W., 1980).

En América los registros más antiguos están contenidos en el Código Badiano, el cual se remonta al año 1552. En 1571 se escribió otro libro por Francisco Hernández para constatar la sabiduría indígena sobre plantas medicinales (Lugo, E., 1992).

En las últimas décadas se han realizado análisis de plantas utilizadas en la cultura tradicional para proporcionar validez científica de su uso.

Aka, P. *et al* en 1999, estudiaron las actividades antidiarréicas de hojas de *Pentaclethra macrophylla* usada en la medicina tradicional de Nigeria. Con esta planta realizaron extractos acuosos y etanólicos, los cuales pudieron inhibir el crecimiento de microorganismos patogénicos comunes (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), además demostraron que las actividades antidiarréicas se debieron a la reducción del movimiento peristáltico del intestino de ratón al cual se le indujo experimentalmente la diarrea, en base a

esto, los investigadores mencionaron que el mecanismo probablemente fue musculotrópico como el de los espasmógenos.

Muchos de los principios activos de las plantas son sumamente complejos y de manera general se han clasificado en seis categorías: alcaloides, glucósidos, aceites esenciales (esencias), gomas, resinas, aceites grasos y sustancias antimicrobianas (Thomson, W., 1980).

Debido a la importancia del efecto inhibitorio como antimicrobiano de las plantas, es necesario conocer la composición química y naturaleza estructural del compuesto o fracción activa antimicrobiana de los extractos, entre las sustancias antimicrobianas se han detectado terpenoides volátiles, fenilpropanoides, quinonas, cumarinas, flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos así como glicósidos cianogénicos (Balandrin, M. F., 1985).

Ingólfssdottir, K. *et al* en 1985, evaluaron la actividad antimicrobiana de metabolitos de líquenes como preservativos potenciales, para esto realizaron una búsqueda de varias especies de líquenes y subsecuentemente aislaron y elucidaron los compuestos activos. Encontraron que la hidrólisis de productos de ciertos metabolitos de líquenes como los depsides fueron activos contra bacterias gram negativas, positivas y hongos. Los compuestos activos fueron identificados como metil β -orselinato y una mezcla de metil y etil orselinatos. Las concentraciones mínimas inhibitorias indicaron que la actividad de esos compuestos fue superior a los agentes preservativos comúnmente usados como el metil y propil p-hidroxibenzoatos.

En nuestro país se han realizado estudios para evaluar la acción microbiológica de plantas medicinales utilizadas por los Mayas en el sur de México (Mecker, M. *et al*, 1983) así como por los aztecas (Davidson, J. D., 1983).

Existe una amplia lista de plantas medicinales que se encuentran en nuestro país, su uso tradicional y eficiencia de estas plantas han sido transmitidos de generación en generación sin cambio. Debido a que actualmente se sigue validando el uso de estas plantas las cuales tienen un efecto antimicrobiano, en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, se ha realizado un extenso trabajo en la búsqueda de plantas con actividad, básicamente sobre bacterias y hongos de importancia en alimentos y en la salud como Fernández, S. M en 1996, Verastegui, M. A. en 1996, Lozano, M. S. en 1999, Sánchez, G. E. en 1999. Sin embargo sería de gran importancia realizar una revisión acerca de las plantas medicinales usadas en nuestro país para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales específicamente y demostrar que pudieran tener un efecto sobre el control del crecimiento, producción de enterotoxina y esporulación de *C. perfringens*. Esto ampliaría el conocimiento existente y proporcionaría una validación científica para aportar medidas preventivas futuras.

HIPÓTESIS:

Algunas plantas usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, evitan el crecimiento, la producción de enterotoxina o la esporulación de *C. perfringens*.

OBJETIVOS:

- 1) Determinar el efecto de extractos de plantas usadas en la medicina tradicional sobre el crecimiento de *Clostridium perfringens* FD-1041.
- 2) Demostrar el efecto de estos extractos sobre la producción de enterotoxina de *C. perfringens*.
- 3) Analizar su efecto sobre el proceso de esporulación.

METODOLOGÍA

Plantas utilizadas

Se comenzó con la revisión bibliográfica sobre las plantas comúnmente usadas en la medicina tradicional mexicana para resolver problemas gastrointestinales, así como también la parte de la planta que se recomienda utilizar. Posteriormente, se procedió a la adquisición de algunas de estas plantas en mercados populares del área metropolitana de Monterrey, N.L. para su posterior análisis. En la tabla 2, se presenta el material conseguido para la realización de los ensayos preliminares.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	PARTE UTILIZADA	USO TRADICIONAL
<i>Acacia farnesiana</i> L.	Huizache	Corteza	Antidiarréico, antiespasmódico
<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja agria	Hojas y Cáscara	Antidiarréico, vómitos, dolor estomacal, antiparasítico.
<i>Euphorbia postrata</i> Aiton.	Hierba de la golondrina	Hojas	Desórdenes digestivos (diarrea)
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Guazima	Semilla	Antidiarréico y disentería.
<i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.	Palo de Brasil	Corteza	Desórdenes digestivos
<i>Hyptis suaveolens</i> L.	Hierba del burro	Ramas	Antidiarréico, disentería, dolor estomacal.
<i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	Hierba del negro	Ramas	Antidiarréico, disentería.
<i>Lippia dulcis</i> Trev.	Hierba dulce, Orozuz	Hojas	Antidiarréico
<i>Psidium guajava</i> L.	Guayaba	Hojas	Desórdenes gastrointestinal
<i>Rhizophora mangle</i> L.	Mangle rojo	Raíz	Antidiarréico, Disentería

<i>Solanum hindsianum</i>	Mariola	Ramas	Antidiarréico
<i>Solanum nigrum</i> L.	Hierba mora	Hojas	Antidiarréico
<i>Tagetes erecta</i> L.	Cempasuchitl	Hojas	Dolor estomacal, diarrea, indigestión
<i>Taxodium mucronatum</i> Ten.	Ahuehuate	Corteza	Antidiarréico

Tabla 2.-Plantas medicinales analizadas.

EFFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO

Extracción

Las plantas secas (ramas y hojas) se trituraron en licuadora, en el caso de la corteza se cortó hasta obtener pequeños pedazos, se pesaron 20 gramos y se agregaron poco a poco 100 ml del solvente (amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7 a 65°C ó alcohol etílico al 96%), se dejó reposar por espacio de 8 horas en refrigeración en el caso de los extractos acuosos ó 24 horas a temperatura ambiente para extractos alcohólicos, transcurrido este tiempo, el extracto se filtró con papel Wathman No. 1. Para los extractos etanólicos, el filtrado se colocó en placas de vidrio hasta sequedad a temperatura ambiente, y posteriormente la resuspensión se realizó con amortiguador de fosfatos, mientras que para los extractos acuosos no fue necesario dejarlos secar a temperatura ambiente, posteriormente ambos extractos fueron esterilizados por filtración (usando membranas de 0.45 μ) y se mantuvieron en refrigeración hasta que se realizaron los ensayos preliminares por un tiempo no mayor de 7 días.

Activación de la cepa:

Se utilizó la cepa enterotoxigénica de *C. perfringens* FD-1041 la cual fue proporcionada por el Dr. Stanley Harmon de la FDA (Food and Drug Administration), E.U.A. Esta cepa se mantuvo como cultivo esporulado de reserva en medio de carne cocida (Difco) a -20°C .

A partir de nuestro cultivo de reserva, se tomó una alícuota y se colocó en un tubo con 10 ml de caldo con tioglicolato (Difco). Posteriormente se sometió un choque térmico a $75^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$, se enfrió a temperatura ambiente y se incubó a 37°C por 16 h.

Ensayos preliminares:

Para la selección de extractos, se preparó agar Muller-Hinton el cual se utilizó para sembrar 200 μl del microorganismo por el método de difusión, inmediatamente después de solidificar el medio inoculado, se realizaron perforaciones con un vial en el y se agregaron los diferentes extractos (100 μl). Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (95:5%) durante 24 h. Al finalizar este período se observaron las placas para la detección y medición de halos de inhibición producidos alrededor del pozo y descartando falsos positivos al compararlo con su control. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

En base a los ensayos preliminares se seleccionaron aquellos extractos que inhibieran el crecimiento del microorganismo con los dos diferentes tipos de solvente para determinar su concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del crecimiento (CMI) en medio Infusión Cerebro Corazón (ICC):

Extracción. Se prepararon los extractos de la manera anteriormente mencionada con la diferencia de que estos fueron concentrados utilizando un rotavapor (BUCHI R-3000) a 65°C y 30% de rotación. Para el caso de los extractos etanólicos se concentraron hasta una pequeña porción del concentrado y este se dejó evaporar a temperatura ambiente en placas de vidrio hasta sequedad total. Posteriormente se resuspendió con amortiguador de fosfatos para después filtrarlos.

En el caso de los extractos acuosos, estos se concentraron hasta una mínima cantidad en el rotavapor (50 ml), finalmente, ambos tipos de extractos se esterilizaron por filtración (usando membranas de 0.45 μ) y se tomaron alícuotas las cuales fueron colocadas en tubos de vidrio previamente tarados para determinar, por peso seco, la concentración del extracto. Finalmente se mantuvieron en refrigeración hasta que se realizaron los ensayos de CMI por un tiempo no mayor de 7 días.

La CMI, la cual se definió como la concentración mínima del extracto capaz de inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo, fue determinada utilizando 2.5 ml de caldo infusión cerebro corazón (ICC) al 2x en tubos de 13x100. Posteriormente se le adicionó el extracto en diversas concentraciones, los tubos se agitaron levemente y se les adicionaron 50 μ l del cultivo de la cepa activada (1×10^7). Finalmente estos fueron incubados a 37°C/24 hrs. Los ensayos se comenzaron a realizar utilizando rangos

amplios hasta acercarnos a la mínima concentración en donde no se observó presencia de turbidez. Para determinar que la CMI fuera bactericida y no bacteriostática, los tubos en donde se detectó la CMI fueron resembrados en tubos con medio ICC y posteriormente incubados 24hrs/37°C para observar la presencia de crecimiento. Los ensayos se realizaron por triplicado.

EFFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINA

Determinación de CMI en el medio de esporulación y producción de enterotoxina Duncan-Strong:

Estos ensayos se realizaron tal como se especificó en el punto anterior, solo que en este caso el medio utilizado fue el Duncan-Strong (D-S) al 2x. En este medio, los ensayos también se realizaron por triplicado.

Obtención de sobrenadantes:

Para esto, los sobrenadantes fueron obtenidos para cuantificar en ellos la toxina. Se prepararon tubos con 2.5 ml de medio D-S (2x), se les adicionó el extracto (25, 50 y 75% de la CMI) y posteriormente se inocularon con la bacteria (50 µl con 1×10^7 células). Se incubaron a 37°C/24 hrs. Después, los cultivos fueron centrifugados a 5,000 rpm/10 min. Una vez recuperados, se tomaron alícuotas de 4.5ml y fueron colocadas en viales y se

liofilizaron con la finalidad de concentrarlos y fueron mantenidos en congelación a -20°C . Posteriormente fue determinada la concentración de enterotoxina mediante una técnica de ELISA.

Detección de enterotoxina mediante ELISA:

Los liofilizados fueron resuspendidos en $500\ \mu\text{l}$ de amortiguador de fosfatos ($0.02\ \text{M}$ pH 7).

Para la realización de la curva estándar se utilizaron $20\ \mu\text{l}$ de estándar de enterotoxina y se realizaron diluciones seriadas utilizando como diluyente amortiguador de carbonatos $50\ \text{mM}$ pH 9.6 y se colocaron en placas de microtitulación, para el caso de las muestras problema se agregó $100\ \mu\text{l}$ de los sobrenadantes en la placa. Esta se incubó en cámara húmeda durante 3 horas, posteriormente la placa se lavó 5 veces con amortiguador PBS con tween 20, pH 7.4 (amortiguador de lavado), inmediatamente después se adicionaron $100\ \mu\text{l}$ de antisuero de conejo en una dilución de 1:500 con PBS, la placa se llevó a incubar 1.5 h en cámara húmeda. Al transcurrir este tiempo se lavó 5 veces la placa y se le agregaron $100\ \mu\text{l}$ de anticuerpo IgG de cabra contra IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (diluído 1:1000 con amortiguador PBS con tween 20 y con polivinilpirrolidona al 2% y albúmina sérica bovina al 0.2%). La placa nuevamente se incubó 1.5 h en cámara húmeda y se realizaron 5 lavados. Finalmente se adicionaron $200\ \mu\text{l}$ del substrato (1 tableta de p-Nitrofenil fosfato, disódico de 5 mg en 5 ml de amortiguador de carbonatos $50\ \text{mM}$ pH 9.6 con $10\ \text{mM}$

de $MgCl_2$). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con 100 μ l de NaOH 4N. Se obtuvo la densidad óptica utilizando un lector de microplacas Modelo 550 (BIO-RAD) a 415 nm.

Para estos ensayos los controles negativos fueron sobrenadantes de medio D-S con extracto sin inocular y como control positivo, sobrenadantes sin extracto pero inoculados con la bacteria.

La concentración de la toxina presente en las muestras se determinó al interpolar en las curvas de calibración con los estándares de enterotoxina en cada ensayo. Los experimentos se realizaron 3 veces por duplicado.

EFFECTO SOBRE LA ESPORULACIÓN

Para estos ensayos se utilizaron tubos con 2.5 ml de medio DS al 2x a los cuales previamente se habían adicionado los extractos (25, 50 y 75% de la CMI), y posteriormente se inocularon con 50 μ l de la cepa activada de *C. perfringens* FD-1041. Estos cultivos se incubaron a 37°C/24 hrs y al término de este período se realizaron observaciones al microscopio de contraste de fases de cada una de las preparaciones. Posteriormente se aplicó un choque térmico (75°C/15 min) y se determinó el número de esporas termoresistentes presentes por el método de cuenta viable en placa (CVP), incubándose las placas a 37°C en una atmósfera de $N_2:CO_2$ (95:5%) durante 24 h. Los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

EFFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO

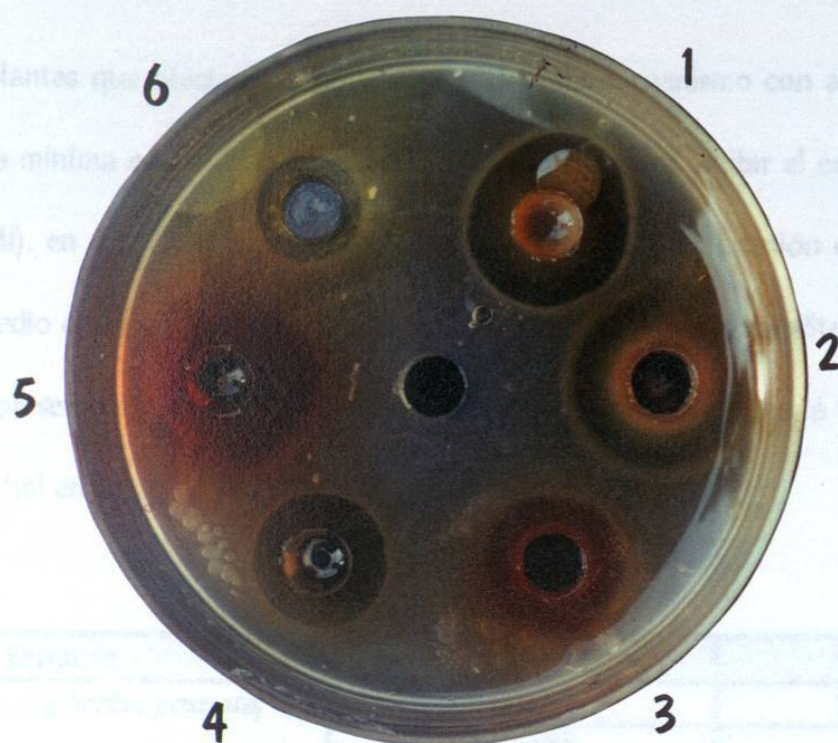
Para el comienzo de los experimentos de laboratorio fue necesario realizar una búsqueda en la literatura de las plantas comúnmente usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diarreas o desórdenes digestivos (Tabla 2). Posteriormente, se procedió a la colecta de estas plantas en mercados populares del área metropolitana de Monterrey, N.L. Las plantas obtenidas fueron procesadas y se realizaron extractos etanólicos y acuosos para evaluar si presentaban una acción inhibitoria sobre el crecimiento de *C. perfringens* (Tabla 3). Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla 2, en donde se puede observar que al menos una de las extracciones de cada planta inhibieron el crecimiento del microorganismo, sin embargo solo se seleccionaron las plantas que presentaron efecto con ambos tipos de solventes.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	EXTRACTO ETANOLICO	EXTRACTO ACUOSO
<i>Acacia farnesiana</i> L.	Huizache	✓ ✓	NI
<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja agria	Hojas: ✓ ✓ Cáscara: NI	Hoja ✓ ✓ ✓ Cáscara ✓ ✓
<i>Euphorbia postrata</i> Aiton.	Hierba de la golondrina	✓ ✓	✓
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Guazima	✓	NI
<i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.	Palo de Brasil	✓	✓ ✓ ✓
<i>Hyptis suaveolens</i> (L)	Hierba del burro	NI	✓
<i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	Hierba del negro	NI	NI
<i>Lippia dulcis</i> Trev.	Hierba dulce, Orozuz	NI	NI
<i>Psidium guajava</i> L.	Guayaba	✓ ✓	✓ ✓
<i>Rhizophora mangle</i> L.	Mangle rojo	✓ ✓	✓
<i>Solanum hindsianum</i>	Mariola	✓ ✓	NI
<i>Solanum nigrum</i> L.	Hierba mora	✓	NI
<i>Tagetes erecta</i> L.	Cempasuchitl	✓ ✓	NI
<i>Taxodium mucronatum</i> Ten.	Ahuehete	✓ ✓	NI

Diámetros de inhibición: 0.1-0.5 mm ✓ 0.6-1 mm ✓ ✓ 1.1-1.5 mm ✓ ✓ ✓ 1.6-2 mm ✓ ✓ ✓ ✓

NI: No inhibición

Tabla 3.- Efecto de diferentes extractos de plantas sobre el crecimiento de *Clostridium perfringens* FD-1041.



1.-*Acacia farnesiana*

2.-*Citrus aurantium*

3.-*Euphorbia postrata*

4.-*Haematoxylum brasiletto* Karst.

5.-*Psidium guajava*

6.-*Rhizophora mangle*

Figura 1. Halos de inhibición producidos por 6 extractos etanólicos de plantas medicinales sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1041.

De las plantas que afectaron el crecimiento del microorganismo con ambos solventes, determinamos la mínima concentración de extracto necesaria para inhibir el crecimiento de *C. perfringens* (CMI), en dos diferentes medios de cultivo, que fueron: infusión cerebro corazón (ICC) y en el medio de esporulación y producción de enterotoxina Duncan-Strong (D-S). Estos resultados son presentados en las Tablas 4 y 5, en donde se observa que la CMI varió entre 0.5 a >50 mg/ml en medio ICC y de 0.28 a >70 mg/ml en DS.

EXTRACTO	ETANÓLICOS	ACUOSOS
Golondrina (<i>Euphorbia postrata</i>)	1±0.7	25 ±8.6
	1±0.40*	25±5*
Palo de Brasil (<i>Haematoxylon brasiletto</i>)	0.5±0.2	2.8 ±0.28
	0.5 ±0.11*	2.8 ±0.17*
Guayabo (<i>Psidium guajava</i>)	1.06±0.513	20±10
	1.06±0.29*	20±5.7*
Mangle (<i>Rhizophora mangle</i>)	13.5 ±2.12	>50
	13.5±1.5*	>50

* error estándar

Tabla 4.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del crecimiento de *Clostridium perfringens* FD-1041 por 4 extractos de plantas en medio ICC, utilizando dos diferentes tipos de solventes.

EXTRACTO	ÉTANÓLICOS	ACUOSOS
Golondrina (<i>Euphorbia postrata</i>)	11±5.3	27.3±9.29
	11±3.0*	27.3±5.36*
Palo de Brasil (<i>Haematoxylon brasiletto</i>)	0.28±0.029	2.6±0.577
	0.28±0.016*	2.6±0.33*
Guayabo (<i>Psidium guajava</i>)	6.16±3.17	24±6.5
	6.16±1.83*	24±3.78*
Mangle (<i>Rhizophora mangle</i>)	>50	>70
	>50	>70

* error estándar

Tabla 5.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del crecimiento de *Clostridium perfringens* FD-1041 por 4 extractos de plantas en medio DS, utilizando dos diferentes tipos de solventes.

EFFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINA

En base a los resultados obtenidos con respecto a la CMI en medio DS, utilizamos la técnica de ELISA para determinar la producción de enterotoxina a diferentes concentraciones de extractos. No detectamos toxina en ninguna de las concentraciones probadas de los diferentes extractos (tabla 6).

EXTRACTO	25%	50%	75%
ETANÓLICOS			
PALO DE BRASIL	0	0	0
GUAYABO	0	0	0
GOLONDRINA	0	0	0
ACUOSOS			
PALO DE BRASIL	0	0	0
GUAYABO	0	0	0
GOLONDRINA	0	0	0
CONTROL (+)		10 ng	

Tabla 6.- Efecto de 3 diferentes extractos de plantas a diferentes concentraciones sobre la producción de enterotoxina de *C. perfringens* FD-1041.

EFFECTO SOBRE LA ESPORULACIÓN

Los resultados de estos ensayos son reportados en la tabla 7, en donde encontramos que en el caso de los extractos de guayabo y palo de brasil la producción de esporas termoestables disminuyó notablemente al agregar cantidades de extracto, mientras que en los extractos de Golondrina (etanólico ó acuoso) no se apreció esporulación en ninguna de las concentraciones probadas.

EXTRACTO	25%	50%	75%
ETANÓLICOS			
PALO DE BRASIL	8.4×10^5 ufc \pm 5.6×10^5	5.2×10^5 ufc \pm 2.2×10^5	6.5×10^3 ufc \pm 4.0×10^3
	8.4×10^5 ufc \pm 3.2×10^5 *	5.2×10^5 ufc \pm 1.1×10^5 *	6.5×10^3 ufc \pm 2.0×10^3 *
GUAYABO	2.1×10^3 ufc \pm 1.4×10^3	0	0
	2.1×10^3 ufc \pm 6.1×10^2 *	0	0
GOLONDRINA	0	0	0
ACUOSOS			
PALO DE BRASIL	3.5×10^5 ufc \pm 6.3×10^5	4.4 ufc \pm 5.2	0
	3.5×10^5 ufc \pm 2.0×10^5 *	4.4 ufc \pm 1.7 *	0
GUAYABO	1.5×10^2 ufc \pm 7×10^1	6×10^1 ufc \pm 1.4×10^1	0
	1.5×10^2 ufc \pm 5×10^1 *	6×10^1 ufc \pm 1.0×10^1 *	0
GOLONDRINA	0	0	0
CONTROL (+)		7.1×10^8 ufc \pm 1.0×10^9	
		7.1×10^8 ufc \pm 3.5×10^8 *	

* error estándar

Tabla 7.- Efecto de 3 extractos de plantas sobre la producción de esporas termoestables en *C. perfringens* FD-1041.

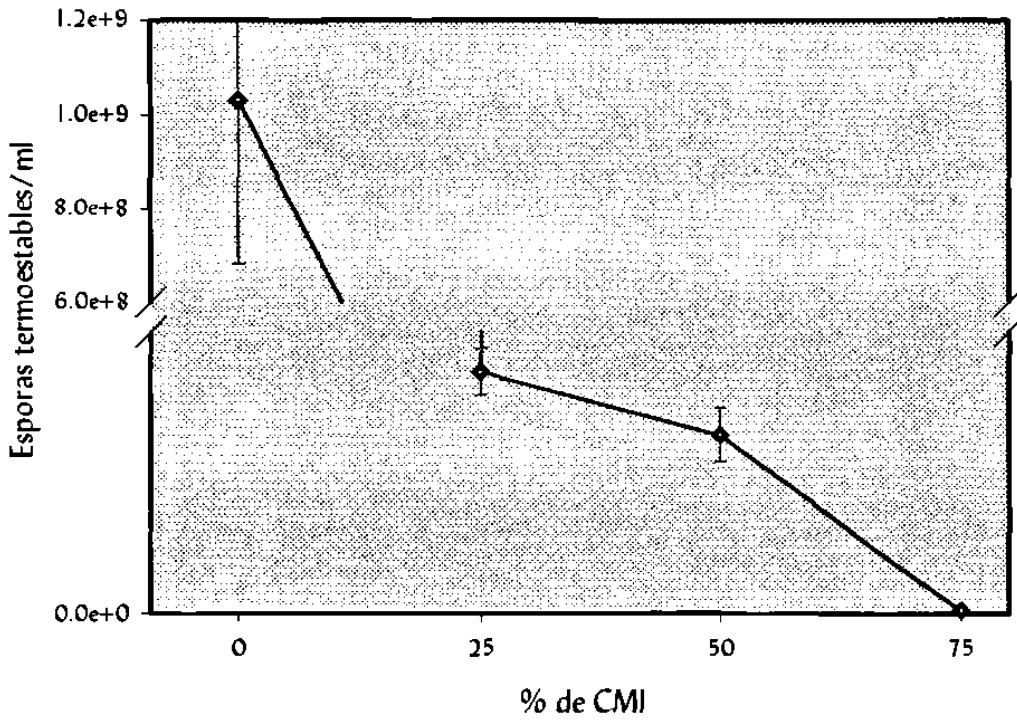


Figura 2.- Efecto del extracto etanólico de Palo de brasil al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas.

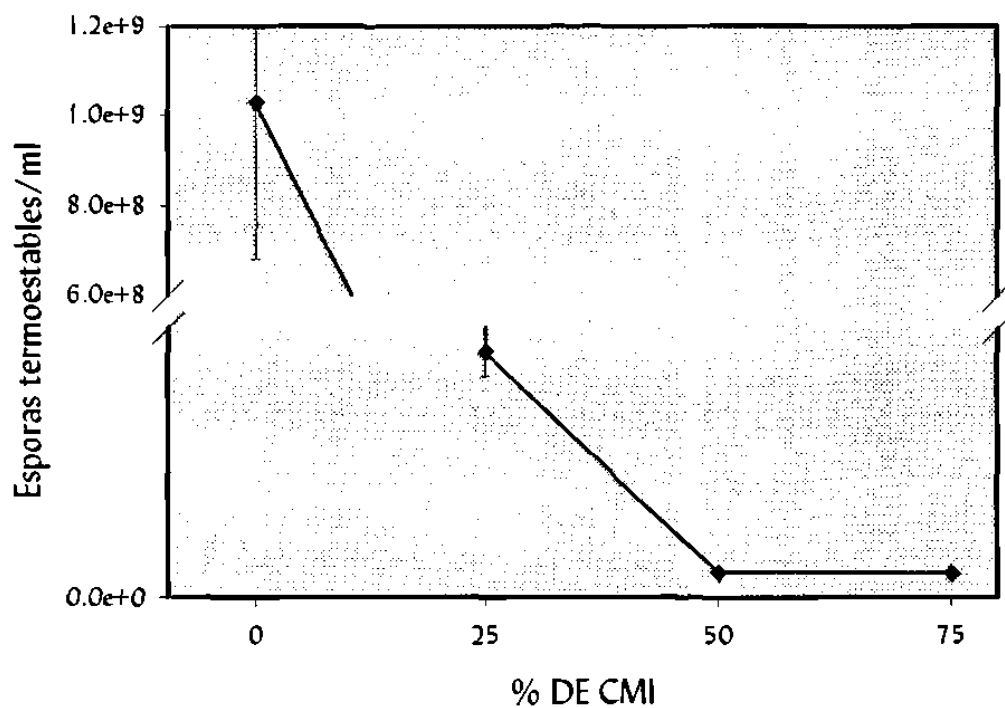


Figura 3.- Efecto del extracto de Palo de Brasil acuoso al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas

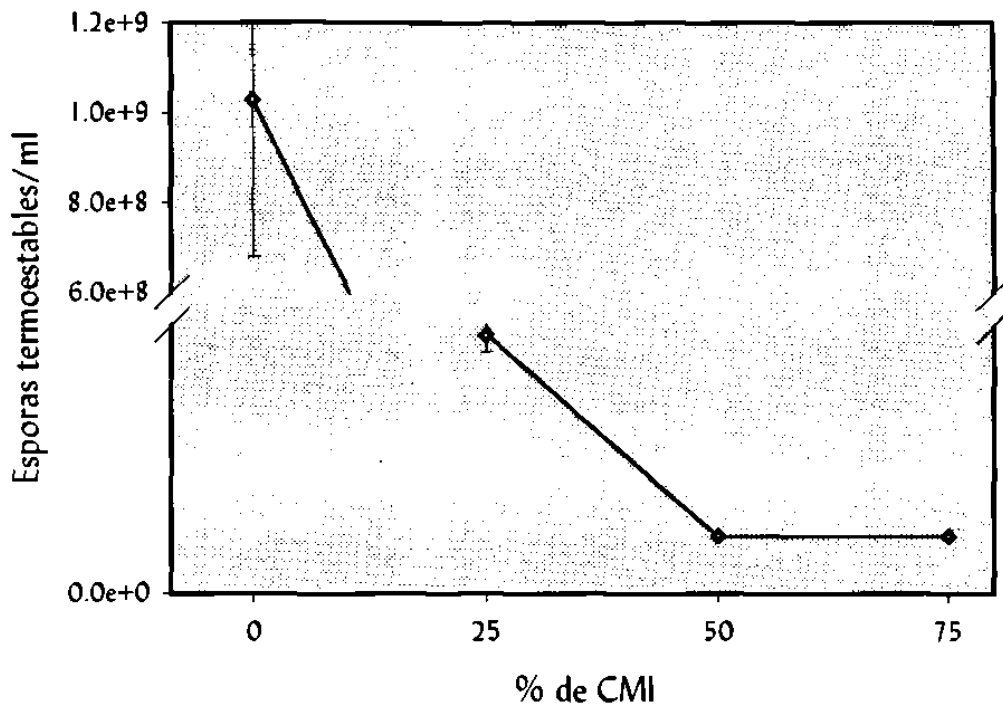


Figura 4.- Efecto del extracto etanólico de Guayabo al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas.

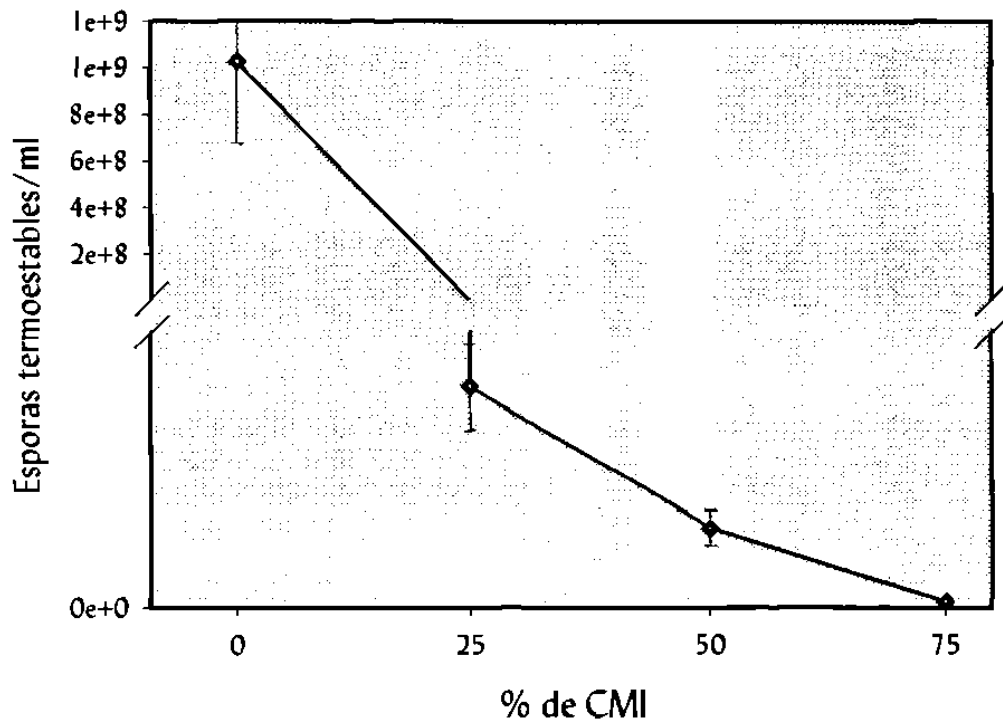


Figura 5.- Efecto del extracto acuoso de Guayabo al 25, 50 y 75% de la CMI sobre la formación de esporas

DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un gran problema de enormes costos económicos. Los patógenos asociados a alimentos ocurren ampliamente en la naturaleza y es difícil de prevenirlos. Una manera de controlar su crecimiento es usar agentes antimicrobianos. Es por esto que en el presente trabajo nos dedicamos al monitoreo y análisis de plantas usadas en la medicina popular para el control del crecimiento y otros procesos metabólicos de *C. perfringens* causante de una intoxicación alimentaria.

En el comienzo del presente trabajo se seleccionaron 14 plantas medicinales en mercados populares del área metropolitana de Monterrey, N.L, para la extracción de compuestos activos se utilizaron dos diferentes solventes: amortiguador de fosfatos y etanol. De estas, *Hyptis verticillata* (hierba del negro) y *Lippia dulcis* (Hierba dulce) no demostraron efecto contra el crecimiento de *C. perfringens*, sin embargo en el resto de las plantas con al menos un tipo de extracto se inhibió el crecimiento del microorganismo en los ensayos preliminares.

En la elaboración de extractos acuosos tratamos de asemejar la más frecuente forma de ingestión por la medicina tradicional, a base de infusiones, en nuestros experimentos manejamos temperaturas de aproximadamente 65°C para la extracción de compuestos activos (Brantner, A. Q. 1994). Con la extracción etanólica debido a la naturaleza del solvente se pueden obtener compuestos polares y algunos de polaridad intermedia, incrementando la probabilidad de detectar una mayor cantidad de compuestos (Dominguez, X. A., 1988). Esto pudiera ser la causa probable de observar una mejor respuesta en el efecto inhibitorio con los extractos etanólicos en comparación con los acuosos.

El rango de variabilidad de los resultados en el estudio dependen de diversos factores, entre estos podemos citar el método y medio de cultivo utilizado. Para los ensayos preliminares utilizamos el método de difusión del microorganismo con el extracto en perforaciones en agar Muller Hinton. Al utilizar este método pueden presentarse algunas desventajas, puesto que los extractos que tienen un bajo poder de difusión no lo realizan libremente, lo que puede

proporcionar una interpretación errónea de los resultados negativos, por otro lado, los extractos que no mostraron efecto sobre el crecimiento, pudieran presentarlo bajo otras condiciones de prueba y con diferentes solventes.

Otros factores que pueden influir en los resultados incluyen los métodos de extracción, volumen de inóculo, pH y tiempo de incubación (Kinghorn, A. D. 1994). Algunas propiedades biológicas de las plantas pueden alterar la cantidad de compuestos activos, ya que estos pueden variar según la etapa de desarrollo. Thomson en 1989 mencionó que con frecuencia la floración coincide con un incremento en el contenido de estos compuestos, así como la temporada de lluvias que puede ocasionar una disolución de los compuestos por lo que se pueden encontrar en menor cantidad, lo cual trae como consecuencia que las plantas colectadas no exhiban la misma actividad biológica que la observada en extracciones anteriores, de manera que es importante considerar el ambiente natural de una planta de interés así como su localización.

En base a los ensayos preliminares que analizamos, seleccionamos aquellas plantas que inhibieran el crecimiento del microorganismo con los dos diferentes solventes, los resultados de las hojas de *Citrus aurantium* (naranja agria) no fueron reportados debido a que se necesitaron grandes cantidades de extracto durante los ensayos preliminares para determinación de CMI por lo que fue descartado. Los resultados de la CMI en medio Infusión Cerebro Corazón (ICC) fueron mostrados en la tabla 3, donde observamos que los extractos etanólicos mostraron un mayor efecto inhibitorio puesto que con menores cantidades de extracto se controló el crecimiento del microorganismo a diferencia de los acuosos. Cabe remarcar que el extracto etanólico de *Haematoxylon brasiletto* (Palo de Brasil) fue el que mostró mayor actividad antimicrobiana, posteriormente *Euphorbia postrata* (golondrina), hojas de *Psidium guajava* (guayabo) y finalmente *Rhizophora mangle* (Mangle rojo). En los extractos acuosos se observó que el Palo de Brasil presentó mayor actividad, seguido de hojas de Guayabo, Golondrina y Mangle.

Cuando realizamos la determinación de la CMI en medio Duncan-Strong (con rafinosa), el cual es un medio comúnmente usado para inducir la esporulación debido a que su contenido

nutricional es menor que otros medios como el ICC, observamos que el extracto acuoso y etanólico de Palo de Brasil fue el de mayor actividad, posteriormente los extractos de hojas de guayabo, golondrina y mangle. Observamos que experimentos anteriores, los extractos acuosos ejercieron menor poder antimicrobiano que los etanólicos.

La CMI en medio ICC fueron diferentes en cuanto a las detectadas en Duncan-Strong, esto se pudo presentar debido a que el método de dilución utilizado para el ensayo es afectado por distintos factores como el medio de crecimiento, contenido catiónico y de proteína, lo que puede influir sobre el metabolismo del microorganismo y responder de diferente manera (Masako, L. 1989).

En la literatura se menciona que la CMI es una concentración del antimicrobiano en la que una pequeña proporción del inóculo original puede permanecer viable y sobrevivir al crecimiento si el microorganismo se subcultiva en medios libres del inhibidor. Masako *et al* 1989, recomienda utilizar el método de cuenta viable de células en placa para determinar si la inhibición del crecimiento por los extractos es bactericida o bacteriostática en nuestros ensayos resembramos los tratamientos en tubos con medio ICC y no se detectó crecimiento del microorganismo por lo que presumiblemente las concentraciones determinadas fueron bactericidas.

Para la segunda etapa de este trabajo se continuó con tres extractos debido a que la CMI en el medio Duncan-Strong para el Mangle rojo fue muy alta y no resultaba práctico continuar con su determinación. Establecimos el efecto de los extractos etanólicos y acuosos de Palo de Brasil, Hojas de guayabo, y Golondrina a las concentraciones del 25, 50 y 75% de la CMI en Duncan- Strong, estos fueron presentados en la Tabla 4. No detectamos presencia de enterotoxina mediante la técnica de ELISA utilizada. Con respecto al método, Granum *et al* en 1984 mencionaron que falsos resultados negativos en cuanto a la detección de toxina pueden presentarse de acuerdo a la variantes de la técnica de ELISA utilizada ya que no se presenta el mismo límite de detección, por lo que un método adecuado para la detección de enterotoxina en sobrenadantes debe ser evaluado. Posteriormente Berry *et al* en 1988 evaluaron los

métodos de ELISA, RPLA y células Vero para la detección de enterotoxina y determinaron que el método de ELISA fue la técnica más específica, sensible y reproducible.

El efecto de los extractos sobre la producción de toxina no solo se ha evaluado en *C. perfringens*, Jacora *et al* en 1979, evaluaron el efecto del aceite gálico y de cebolla sobre la producción de toxina por *Clostridium botulinum* en carne y demostraron que estos extractos fueron capaces de inhibir la producción de toxina de *C. botulinum* tipo A. Nosotros encontramos que los extractos probados inhibieron totalmente la producción de la toxina.

En cuanto a la determinación del efecto de los extractos sobre la esporulación observamos que el extracto etanólico de Palo de Brasil disminuyó la esporulación conforme se incrementaba la concentración del extracto, sin embargo las observaciones al microscopio al 25% de la CMI de Palo de Brasil se apreciaron bacilos con esporas y esporas libres, mientras que al 50 y 75% bacilos sin espora y una menor cantidad de esporas libres.

El extracto acuoso de Palo de Brasil, demostró una marcada reducción en el número de células al 25 al 50% de la CMI y ausencia de crecimiento de colonias a la concentración del 75% del CMI. Sin embargo, al microscopio se observaron bacilos esporulados al 25% de la CMI, principalmente bacilos sin espora y una pequeña proporción de bacilos con espora al 50%, mientras que al 75% se observaron únicamente bacilos no esporulados. Este comportamiento se presentó igualmente con los extractos de Guayabo.

Los resultados anteriores pueden sugerir que a mayores concentraciones de los extractos utilizados se retardó el proceso de esporulación de *C. perfringens*, cabe la probabilidad de que a mayores concentraciones de los extractos se retardará el proceso de esporulación y a la vez la síntesis de toxina. Además, en algunos extractos como el caso de Palo de Brasil acuoso y Guayabo tanto acuoso como etanólico en donde se observaron bacilos esporulados pero no esporas libres, es probable que se sintetizara la enterotoxina pero no fue liberada por lo que no pudo detectarse en los sobrenadantes, de manera que es necesario de la lisis de la célula madre para su liberación y detección. Los resultados reportados del conteo de esporas pudieron ser consecuencia de la lisis de la célula madre inducida por el choque térmico aplicado y también por la germinación de las esporas libres. En particular los extractos de Palo

de Brasil y Hojas de Guayabo ejercieron un efecto sobre la disminución de la esporulación pero no en la viabilidad de la esporas.

Comprobamos que otros extractos tienen acción más potente contra la esporulación como el caso del extracto de Golondrina, donde se produjo la inhibición de la esporulación a las concentraciones utilizadas; Esto fue corroborado con las observaciones microscópicas en donde solo se observaron bacilos sin espora.

Los resultados reportados en esta investigación son base para futuros experimentos. En este trabajo utilizamos extractos crudos de los cuales no se separaron los compuestos antimicrobianos, sin embargo es necesario continuar con estos ensayos y determinar el o los compuestos que llevan a cabo la actividad biológica antimicrobiana.

Es necesario también determinar la estabilidad de la actividad biológica del extracto, puesto que algunas sustancias pueden ser termolábiles o hidrolíticamente inestables (Kingham. A. D, 1994), Paz *et al* en 1995, mencionaron que los extractos deben ser evaluados durante un período de 6 meses para verificar su actividad. En nuestra investigación observamos que algunos extractos pierden su capacidad antimicrobiana con el tiempo como fue en el caso del extracto de Palo de Brasil.

Rocio *et al* en 1989, mencionaron que los agentes antimicrobianos aislados de plantas pueden actuar como reguladores del metabolismo intermedio, al activar o bloquear una acción enzimática, remover ó neutralizar un inhibidor que influye en la toma de nutrientes en el medio ó afectando la síntesis de enzimas a nivel nuclear o ribosomal, cambiando estructuras de membrana o sustituyendo un factor limitante en el metabolismo intermedio. Por lo que sería de gran importancia una vez caracterizado el o los compuestos activos, determinar su acción a nivel molecular.

Sin embargo, junto con lo anterior un aspecto sumamente importante es definir la toxicidad del compuesto a fin de establecer el posible potencial de la planta o el riesgo que acompaña la administración oral. Estudios realizados por Balandrin en 1985 demostraron la presencia de diterpenos esteroides en especies de *Euphorbia*, los cuales son potentes irritantes y cocarcinógenos.

La evaluación del modo de acción antidiarréico de los extractos de hojas de Guayabo fue reportado por Caceres en 1990 y Meckes, M en 1997, mencionaron que las hojas de Guayabo contienen quercetina, una droga capaz de inhibir contracciones del ileum "in vitro" por una estimulación transneuronal eléctrica lo que induce a una disminución del peristaltismo en el intestino delgado. La potente actividad de esta planta como antimicrobiano había sido anteriormente evaluada por Masako *et al* en 1989 contra enterobacterias, sin embargo no se tenían reportes contra *C. perfringens*. Ambos efectos del extracto de las hojas de Guayabo podrían justificar su uso en la medicina tradicional.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo proporcionaron una base científica para el uso popular de plantas antidiarréicas desde el punto de vista microbiológico al evaluar su efecto sobre *C. perfringens* el cual es de gran problemática en la industria de alimentos y salud pública.

Como punto final de discusión podemos confirmar la hipótesis propuesta al inicio de este trabajo, al demostrar que algunas plantas usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, evitan el crecimiento, la producción de enterotoxina o la esporulación de *C. perfringens*. La hipótesis fue aceptada.

CONCLUSIONES

El crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 fue inhibido por 13 extractos de plantas medicinales.

Los extractos etanólicos y acuosos de *Hyptis verticillata* (hierba del negro) y *Lippia dulcis* (Hierba dulce) no ejercieron efecto sobre el crecimiento del microorganismo.

Los extractos etanólicos presentaron un mayor efectos inhibitorio que los extractos acuosos.

El extracto etanólico de *Haematoxylon brasiletto* ejerció una mayor actividad antimicrobiana, mientras que el extracto acuoso de *Euphorbia postrata* presentó la menor actividad en medio ICC y Duncan Strong.

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias variaron según el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *C. perfringens* FD-1041.

No se detectó producción de enterotoxina por *C. perfringens* FD-1041 a un 25, 50 y 75% de la CMI de los extractos etanólicos y acuosos de *Haematoxylon brasiletto*, *Euphorbia postrata* y *Psidium guajava*.

El extracto de *Euphorbia postrata* inhibió el proceso de esporulación de *C. perfringens* FD-1041.

Los extractos de *Haematoxylon brasiletto* y *Psidium guajava* disminuyeron la producción de esporas termoestables dosis dependientes.

LITERATURA CONSULTADA

- Ahmed, M. and H. W. Walker. 1971. Germination of spores of *Clostridium perfringens*. J. Milk Food Technol. 34(7):378-387.
- Akah, P. A., C. N. Aguwa and R. U. Agu. 1999. Studies on the Antidiarrhoeal properties of *Pentaclethra macrophylla* leaf extracts. Phytother. Res. 13:292-295.
- Ando, Y. 1974. Ionic germination of spores of *Clostridium perfringens* Type A. Japan J. Microbiol. 18(6):433-439.
- Ando, Y. 1980. Mechanism of nitrite-induced germination of *Clostridium perfringens* spores. J. Appl. Bacteriol. 49:527-535.
- Babic, I., C. Nguyen, M. J. Amiot and S. Aubert. 1994. Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on food-borne bacteria and yeast. J. Appl. Bacteriol. 76:135-141.
- Balandin, M. F., J. A. Klocke, E. S. Wortele and W. H. Bollinger. 1985. Natural Plant Chemicals. Sources of Industrial and medicinal Materials. Science 228: 1154-1160.
- Baelen, D. A. and L. A. Devriese. 1987. Presence of *Clostridium perfringens* enterotoxin in intestinal samples from farm animals with diarrhoea of unknown origin. J. Vet. Med. 34:713-716.
- Bean, N. and P. M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. J. Food. Prot. 53(9):804-817.
- Berry, P.R., J. Crodhouse, S. Hughes, B. Bartholomew and R. J. Gilbert. 1988. Evaluation of ELISA, RPLA and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens. J. Clin. Pathol. 41:458-461.

Brantner, A. 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 44:35-40.

Brett, M. M., J. C. Rodhouse, T. J. Donovan, G. M. Tebbutt and D. N. Hutchinson. 1992. Detection of *C. perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* 45:609-611.

Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch and H. E. Larson. 1984. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet.* 11:305-307.

Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch, M. F. Stringer, G. N. Watson, R. K. T. Williams, D. V. Seal and K. Sullens. 1985. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *J. Med. Microbiol.* 20:363-372.

Bryan, F. L. 1980. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *J. Food Prot.* 43(2) 140-150.

Caceres, A., O. Cano, B. Samayoa and L. Aguilar. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening of 84 plants against enterobacterias. *J. Ethnopharmacol.* 30:55-73.

Caceres, A., L. Fletes and L. Aguilar. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *J. Ethnopharmacol.* 38:31-38.

Carson, C. F. and T. V. Riley. 1993. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16:49-55.

- Chitra, N. and M. Sakaguchi. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* 58(3):280-283.
- Chung, K. T., S. E. Stevens, W. F. Lin and C. L. Wei. 1993. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:29-32.
- Collie, R. E, J. F. Kokai-Kun and B. McClane. 1998. Phenotypic characterization of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from non foodborne human gastrointestinal diseases. *Anaerobe*:70-81.
- Collie, R. E and B. McClane. 1998. Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. *J. Clin. Microbiol.* 36(1):30-36.
- Craven, S. E. 1988. Increased sporulation of *Clostridium perfringens* in a medium prepared with the pre-reduced anaerobically sterilized technique or with carbon dioxide or carbonate. *J. Food. Prot.* 51(9):700-706.
- Davidson, J. D. and B. M. Ortiz. 1983. The antibacterial properties of Aztec wound remedy. *J. Ethnopharmacol.* 8(2):149-161.
- Díaz, J.L. 1976. Índice y Sinonimia de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas I. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales, A.C. México.
- Domínguez, X. A. 1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1ª edición. LIMUSA, México D. F. pp. 12.
- Duncan, Ch. L. 1973. Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *Clostridium perfringens* Type A. *J. Bacteriol.* 113(2): 932-936.

- Fernandez-Salazar, F. M. 1996. Inhibición de especies de *Listeria* por extractos de plantas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Giugliano, L., M. F. Stringer and B. S. Drasar. 1983. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin by tissue culture and double-gel diffusion methods. J. Med. Microbiol. 16:233-237.
- Goldner, S., M. Solberg, S. Jones and L. Post. 1986. Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 52(3):407-412.
- Granum, P. E., W. Telle, O. Olsvik and A. Stavn. 1984. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* during sporulation and vegetative growth. J. Food Microbiol. 1:43-49.
- Kinghorn, A. D. 1994. The Discovery of natural plants with therapeutic potential. *In* Gullo, V. P.(ed).1994.The Discovery of natural products with therapeutic potential. Butterworth-Heineman Press. Kenilworth, New Jersey. Pp: 81-108.
- Hardy, S. P., M. Denmead, N. Parek and P. E. Granum. 1999. Cationic currents induced by *Clostridium perfringens* Type A enterotoxin in human intestinal CaCo-2 cells. Bacterial Pathol. 48(3):235-243.
- Hatheway, C. L., D. N. Whaley and V. R. Dowell. 1980. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness. Food Tech. 77-79.
- Hauschild, a. H. and R. Hilsheimer. 1971. Purification and characteristics of the enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A. Can. J. Microbiol. 17:1425-1433.
- Hayes, P.R. 1992. Food Microbiology and Higiene. 2nd. Edition. Elsevier Science Publishers, LTD. Great Yarmouth, England. Pp: 39-43.

- Heredia, N.L., R. G. Labbé and J. S. García. 1998. Alteration in sporulation, enterotoxin production, and protein synthesis by *Clostridium perfringens* Type A following heat shock. *J. Food Prot.* 61(2): 1143-1147.
- Hobbs, B. D., M. E. Smith, C. L. Oakley, G. H. Warrack and J. C. Cruickshank. 1973. *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.* 51:75-101.
- Ingólfssdóttir, K., S. F. Bloomfield and P. Hylands. 1985. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 28(2):289-292.
- Jacora, C., S. Notermans, N. Gorin and E. H. Kampelmacher. 1979. Effect of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. *J. Food Prot.* 42(3):222-224.
- Jarmund, T. and W. Telle. 1982. Binding of *Clostridium perfringens* enterotoxin to hepatocytes, small intestinal epithelial cells and Vero cells. *Microbiol. Immunol.* 90: 377-381.
- Jackson, S., D. Yip-Chuck, J. Clark and M. Brodsky. 1986. Diagnostic importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin analysis in recurring enteritis among elderly, chronic care patients. *J. Clin. Microbiol.* 23(4):748-751.
- Kandil, O., N. M. Radwan, A. B. Hassan, A. M. Amer, H. A. El-Banna and W. M. M. Amer. 1994. Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *J. Ethnopharmacol.* 44:19-24.
- Katahira, J., N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda and N. Sugimoto. 1997. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Cell Biol.* 136(6): 1239-1247.

- Katahira, J., H. Sugiyama, N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda and N. Sugimoto. 1997. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors *in Vivo*. J. Biol.Chem. 272(42):26652-26658.
- Kofitsyo, S, L. Thorsen, T. Sorensen, J. Reseland, O. Olsvik and P. Granum. 1991. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA. J. Food Microbiol. 12:313-322.
- Kyong, B. and R. Labbé. 1990. Proteolysis of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin during purification. Infect. Immun. 58(6): 1999-2001.
- Labbe, R. and Ch. Duncan. 1977. Spore coat protein and enterotoxin synthesis in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 713-715.
- Labbe, R. and L. Nolan. 1981. Stimulation of *Clostridium perfringens* enterotoxin formation by caffeine and theobromine. Infect. Immun. 34(1):50-54.
- Labbé, R.G. 1989 *Clostridium perfringens*. IN Doyle M.P. (Ed) Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker Inc. New York. Pp.198-205.
- Labbé R. 1980. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. Food Tech. 25: 89-90.
- Labbe, R. 1991. *Clostridium perfringens*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74(4):711-714.
- Levine, W., J. F. Smart, D. Archer, N. Bean and R. Tauxe. 1991. Foodborne Disease Outbreaks in nursing homes, 1975 through 1987. JAMA. 226(15):2105-2109.

Lugo, E.E. 1992. Introducción al estudio de las plantas medicinales, la interacción del medio con la cultura. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.

Luterodt, G. D. 1989. Inhibition of release of acetylcholine by quercetin as a posible made of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. J. Ethnopharmacol. 25:235-247.

Mazari, L. E, B. F. Peñafiel y R. Bye. 1988. Selección de Plantas Medicinales de México. 1a. edición. LIMUSA. México, D.F., Pág: 74.

Makoto, S. 1990. Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods, and the natural environment in Japan. J. Food Prot. 53(2):115-118.

Masako, T., S. Okubo, R. Hiyoshi and T. S. Shimamura. 1989. The bactericidal activity of tea and coffe. Lett. Appl. Microbiol. 8:123-125.

McKillop, E. J. 1960. Bacterial contamination of hospital food with special reference to *Clostridium welchii* food poisoning. J. Hyg. 57(1): 31-46.

McClane, B. A. 1997. *Clostridium perfringens*. IN Doyle, M. P., L. R. Beuchat and T. J. Montville (ed). 1997. Food Microbiology Fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, D. C. PP305-324.

McClane, B. and R. J. Strouse. 1983. Rapid detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Microbiol. 19(2):112-115.

McDonel, J.L. 1986. Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E,. In Dorner, F. and H. Drews (Ed). Pharmacology of bacterial toxins. Pergamon Press, Oxford. pp. 477-517.

McDonel, J. and T. Asano. 1975. Analysis of unidirectional fluxes of sodium during diarrhea induced by *Clostridium perfringens* enterotoxin in the rat terminal ileum. *Infect. Immun.* 11(3): 526-529.

McDonel, J.L. and G. William Demers. 1982. In Vivo Effects of enterotoxin from *Clostridium perfringens* Type A in the rabbit colon: binding vs. biologic activity. *J. Infect. Dis.* 145(4): 490-494.

McDonel, J. L. and T. Asano. 1975. Analysis of unidirectional fluxes of sodium during diarrhea induced by *Clostridium perfringens* enterotoxin in the rat terminal ileum. *Infect. Immun.* 11(3): 526-529.

Mecker, M. 1995. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the maya people of southern Mexico. *Phytother. Res.* 9(4): 244-250.

Meckes, M., J. Torres, F. Calzada, J. Rivera, M. Camorlinga, H. Lomus and G. Rodríguez. 1997. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum* a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytother. Res.* 11:128-131.

Meer, R.R., J. G. Songer and D.L. Park. 1996. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 150: 75-94.

Miwatani, T., T. Honda, S. Arai and A. Nakayama. 1978. Mode of lethal activity of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Japan J. Med. Sci. Biol.* 31:221-223.

Mpamugo, O., T. Donovan and M.M. Brett. 1995. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic cases of diarrhoea. *J. Clin. Microbiol.* 43:442-445.

Netherwood, T., M. Binns, H. Townsend, J. L. N. Wood, J. A. Mumford and N. Chanter. 1998. The *Clostridium perfringens* enterotoxin from equine isolates its characterization, sequence and role in foal diarrhoea. *Epidemiol. Infect.* 120:193-200.

- Niilo, L. 1970. Mechanism of action of the enteropathogenic factor of *C. perfringens* type A. *Infect. Immun.* 3(1):100-106.
- Notermans, S., C. Heuvelman, H. Beckers and T. Uemura. 1984. Evaluation of the ELISA as tool in diagnosing *Clostridium perfringens* enterotoxins. *Zbl. Bakt. Hyg.* 179:225-234.
- Orjan, O., P. Einar and B. P. Berdal. 1982. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by ELISA. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect.* 90:445-447.
- Paz, A. E., M. P. Cerdeiras, J. fernández, F. Ferreira, P. Moyna, M. Soubes, A. Vázquez, S. Vero and L. Zunino. 1995. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 45:67-70.
- Recio, M. C. and J. L. Ríos. 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother. Res.* 3(4):117-121.
- Ríos, J. L., M. C. Recio and A. Villar. 1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area. *J. Ethnopharmacol.* 21:139-152.
- Rodríguez, R. L., N. L. Heredia, R. Labbe, S. García-Alvarado. 1998. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in species used in Mexico by Dot Blotting using a DNA probe. *J. Food. Prot.* 61(2):201-204.
- Rood, I. J. and S. T. Cole. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* 55(4): 621-648.
- Ryu, S. and R. G. Labbe. 1989. Coat and enterotoxin-related proteins in *Clostridium perfringens* spores. *J. Microbiol.* 135:3109-3118.

Sacks, L. E. and P. A. Thompson. 1977. Increased spore yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxanthines. *Appl. Environ. Microbiol.* 34(2):189-193.

Sánchez, G. E. 1999. Actividad inhibitoria de extractos de plantas sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL..

Sánchez, G. C. 1995. Efecto de extractos de 33 plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L..

Santos, F. A., G. M. Cunha, G. S. B. Viana, V. S. N. Rao, A. N. Manoel and E. R. Silveira. 1997. Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. *Phytother. res.* 11:67-69.

Stark, R. and Ch. L. Duncan. 1972. Purification and biochemical properties of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* 6(5):662-673.

Stelma, G. N., J. H. Johnson and D. B. Shah. 1985. Detection of enterotoxin in colonies of *Clostridium perfringens* by a solid phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Food Prot.* 48(3):227-231.

Sunagawa, H., K. Takeshi, K. Kameyama and I. Ando. 1987. Incidence of *Clostridium perfringens* in human feces and enterotoxin production and spore-germination of the isolates. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 28(2):119-124.

Thomson, W. A. 1980. Guía práctica ilustrada de Las Plantas Medicinales. 1a edición. Editorial Blume, S. A., México, D.F. pp. 13-17.

Todd, E. C. 1988. Preliminary Estimates of costs of Foodborne Disease in the United States. J. Food Prot. 52(8): 595-601.

Todd, E. 1990. Foodborne illness. Epidemiology of foodborne illness: North America. Lancet. 29: 788-859.

Tood, E. 1995. Worldwide Surveillance of foodborne disease: The Need to improve. J. Food Prot. 59(1):82-92.

Uemura, T., G. Sakaguchi, T. Itho, K. Okazawa and S. Sakai. 1975. Experimental diarrhea in cynomolgus monkeys by oral administration with *C. perfringens* type A viable cells or enterotoxin. J. Med. Sci. Biol. 28:165-177.

Uemura, T. 1977. Incidence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in healthy humans in relation to the enhancement of enterotoxins production by heat treatment. J. Bacteriol. 44: 411-419.

Vela, F. M., N. L. Heredia, P. Feng and S. García-Alvarado. 1999. DNA probe analysis for the carriage for enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in feces of mexican subpopulations. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 35:101-104.

Verástegui, M. A., C. A. Sánchez, N. L. Heredia and J. S. García- Alvarado. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. J. Ethnopharmacol. 52: 175-177.

Wada, A., Y. Masuda, M. Fukayama, T. Hatakeyama, Y. Ynagawa, H. Watanabe and T. Inamatsu. 1996. Nosocomial Diarrhoea in the elderly due to enterotoigenic *Clostridium perfringens*. Microbiol Immunol. 40(10):767-771.

Wilson, K. 1983. Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium perfringens* spore germination. J. Clin. Microbiol. 18(4):1017-1019.

Wimsatt, J. C., S. M. Harmon and D. B. Shah. 1986. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin in stool specimens and culture supernatants by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 4:307-313.

Whitaker, J. and P. E. Granum. 1980. The role of amino groups in the biological and antigenic activities of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Food Biochem. 4:201-217.

Yashpe, J., R. Segal, A. Breuer and J. Erdreich. 1979. Antibacterial activity of *Artemisia herba-alba*. J. Phar. Sci. 68(7):924-925.

Zhao, Y. and S. B. Melville. 1998. Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 180(1): 136-142.



