

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS SOBRE MICROORGANISMOS  
DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS

Por

EDUARDO SÁNCHEZ GARCÍA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Julio, 2012

EFFECTO DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS SOBRE  
MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA  
EN ALIMENTOS

Comité de Tesis

---

Dr. José Santos García Alvarado  
Director de la tesis

---

Dr. Carlos E. Hernández Luna  
Secretario

---

Dra. Norma L. Heredia Rojas  
Vocal

---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Vocal

---

Dr. Ronald G. Labbé  
Vocal

---

Dra. Licet Villarreal Treviño  
Suplente

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVO GENERAL.....	4
4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
5. HIPOTESIS.....	6
6. ANTECEDENTES .....	7
6.1 Enfermedades transmitidas por alimentos .....	7
6.1.1. <i>Vibrio cholerae</i> .....	9
6.1.2. <i>Clostridium perfringens</i> .....	12
6.2 Extractos de plantas como antimicrobianos.....	14
6.3 Aislamiento e identificación de compuestos naturales.....	26
6.4 Mecanismos de acción de compuestos fitoquímicos.....	31
5. MATERIAL Y METODO.....	37

7.1 Material vegetal y preparación de los extractos.....	37
7.1.1 Material vegetal.....	37
7.1.2 Preparación de los extractos.....	38
7.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	20
7.3 Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana.....	40
7.4 Determinación del peso seco de los extractos con actividad antimicrobiana.....	40
7.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	41
7.6 Determinación de las concentraciones subletales sobre el crecimiento de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	41
7.7 Determinación del sitio blanco de acción antimicrobiana.....	42
7.7.1 Ensayo para determinar la integridad de la membrana bacteriana.....	42
7.7.2 Determinación del pH citoplásmico (pH <sub>in</sub> ).....	42
7.7.3 Determinación fluorométrica del potencial de membrana.....	44
7.7.4 Ensayo de bioluminiscencia para la determinación de ATP....	44
7.8 Purificación biodirigida de compuestos bioactivos.....	45
7.8.1 Extracción en reflujo tipo Soxhlet.....	45
7.8.2 Cromatografía en columna.....	46
7.8.3 Cromatografía en capa preparativa.....	47
7.8.4 Autobiografía.....	47
7.8.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	48

7.8.6 Determinación de la expresión de enterotoxinas de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> mediante PCR en tiempo real.....	49
7.9 Análisis estadístico.....	50
8. RESULTADOS .....	52
8.1 Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana.....	52
8.2 Determinación de la concentración mínima bactericida.....	56
8.3 Determinación del efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	57
8.4 Determinación del sitio blanco de acción antimicrobiana.....	59
8.4.1 Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre la integridad de la membrana de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	59
8.4.2 Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el pH citoplásmico de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	62
8.4.3 Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el potencial de membrana de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	65
8.4.4 Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre la síntesis de ATP de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	67
8.5 Purificación de los compuestos bioactivos.....	69
8.5.1 <i>Acacia farnesiana</i> (Huizache).....	69
8.5.1.1 Extracción tipo Soxhlet y actividad antimicrobiana del extracto de huizache.....	69

8.5.1.2 Cromatografía en columna y TLC del extracto de huizache.....	70
8.5.1.3 Selección de fracciones con actividad antimicrobiana.....	71
8.5.1.4 HPLC de las fracciones activas del extracto de huizache.....	71
8.5.1.5 Re-cristalización del compuesto aislado del huizache.....	73
8.5.1.6 Caracterización del compuesto aislado del huizache.....	74
8.5.2 <i>Opuntia ficus-indica</i> var Villanueva (Nopal).....	76
8.5.2.1 Extracción tipo soxhlet del extracto de nopal.....	76
8.5.2.2 Cromatografía en columna y TLC del extracto de nopal.....	77
8.5.2.3 Selección de fracciones con actividad antimicrobiana.....	78
8.5.2.4 Autobiografía del extracto de nopal.....	79
8.5.2.5 Obtención del compuesto puro.....	80
8.5.3 <i>Artemisia ludoviciana</i> (Estafiate) y <i>Ocimum basilicum</i> (Albahaca).....	83
8.5.3.1 Extracción tipo Soxhlet de los extractos de estafiate y albahaca.....	83
8.5.3.2 Evaluación antimicrobiana de los extractos de estafiate y albahaca.....	83

8.5.3.3 Cromatografía en columna de los extractos de huizache y albahaca.....	84
8.5.3.4 HPLC y PLC de los extractos de estafiate y albahaca.....	86
8.6 Mecanismo de acción de los compuestos aislados del huizache (metil galato) y nopal (Pro-OFi).....	87
8.6.1 Determinación de la CMB del metil galato y del Pro-OFi.....	87
8.6.2 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre la integridad de la membrana de <i>V. cholera</i> y <i>C. perfringens</i> .....	88
8.6.3 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre el pH citoplásmico de <i>V. cholera</i> y <i>C. perfringens</i> .....	89
8.6.4 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre el potencial de membrana de <i>V. cholera</i> y <i>C. perfringens</i> .....	92
8.6.5 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre la síntesis de ATP de <i>V. cholera</i> .....	93
8.6.6 Efecto de los extractos metanólicos del huizache, estafiate, albahaca y nopal sobre la expresión del gen de la enterotoxina ( <i>ctx</i> ) de <i>V. cholerae</i> .....	94
8.6.7 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre la expresión del gen de de la enterotoxina ( <i>ctx</i> ) de <i>V. cholerae</i> .....	95
9. DISCUSIÓN.....	96
10. CONCLUSIONES.....	108
LITERATURA CITADA.....	111
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	143

## **DEDICATORIA**

A Dios nuestro Señor, porque al trabajar bajo su manto, recibí aliento y consuelo para vencer los obstáculos que he encontrado en mi camino.

A mi Esposa, por su paciencia y comprensión.

A mi Madre, por sus consejos y apoyo.

A mi Padre, donde quiera que te encuentres.

A mis hermanos y sobrinos, por ser parte de mi vida.

A mi Familia Directa y Política.

Gracias a todos, por estar al pendiente de mi persona y mi trabajo de investigación. Gracias a todos ustedes soy lo que soy. Gracias de nuevo.



## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo de investigación.

A mis asesores Dr. Santos García y Dra. Norma Heredia, por sus enseñanzas y consejos y por orientarme de la mejor manera para ser un mejor Docente-Investigador y por permitirme formar parte de su equipo de investigadores.

Al M.C. Sergio García, por compartir su experiencia en cuestiones de fitoquímica y técnicas de separación y purificación de compuestos naturales, muchas gracias Maestro Sergio.

A la Dra. María del Rayo Camacho, por destinar parte de su tiempo en la elucidación de la molécula aislada en el presente trabajo.

Al original “Equipo Coy”, M.C. Esteban Maldonado (El Coy) †, M.C. Sandra Castillo, M.C. Mayela Robles, M.C. Aziel Escobar, M.C. Macario Padilla, QBP Erika Martínez, QBP Armando Hernández, antes alumnos ahora amigos.

Al Dr. Baldemar Escobar, por el tiempo invertido en las platicas de “Orientación Vocacional” y las palabras alentadoras que destinaba a mi persona.

A mis maestros, especialmente al Dr. Roberto Mercado, al Dr. Francisco Iruegas, y al Dr. Víctor Vargas.

A mis alumnos, exalumnos y demás personas con los que he convivido en el LABGEM.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Halos de inhibición presentados por diferentes extractos metanólicos de plantas en: (a) <i>V. cholerae</i> 569-B y (b) <i>C. perfringens</i> FD-1041.....	52
Fig. 2. Efecto de las concentraciones sub-letales, sobre el crecimiento de <i>V. cholerae</i> 569-B.....	58
Fig. 3. Efecto de las concentraciones sub-letales, sobre el crecimiento de <i>C. perfringens</i> FD-1041.....	58
Fig. 4. Efecto de extractos metanólicos sobre la viabilidad de la membrana de <i>V. cholerae</i> 569-B.....	61
Fig. 5. Efecto de extractos metanólicos sobre la viabilidad de la membrana de <i>C. perfringens</i> FD-1041.....	62
Fig. 6. Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el pH citoplásmico en las cepas 569-B y 1837 de <i>V. cholerae</i> .....	64
Fig. 7. Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el pH citoplásmico en las cepas FD-1041 y FD-1 de <i>C. perfringens</i> .....	64
Fig. 8. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre el potencial de membrana de <i>V. cholerae</i> 569-B y 1837.....	65
Fig. 9. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre el potencial de membrana de <i>C. perfringens</i> FD-1041 y FD-1.....	66
Fig. 10. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre la síntesis de ATP celular en <i>V. cholerae</i> 569-B y 1837.....	67
Fig. 11. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre la síntesis de ATP en <i>V. cholerae</i> 569-B y 1837.....	68
Fig 12. Efecto del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), metanólico (3) y acuoso (4) del huizache, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet contra <i>V. cholerae</i> 569-B.....	69

Fig 13. TLC de diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto metanólico de huizache, utilizando como eluente CHCl <sub>3</sub> :MeOH 8:2 y observadas con luz UV.....	70
Fig 14. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto de huizache, utilizando como eluente CHCl <sub>3</sub> :MeOH a) 9:1, b) 8:2, c) 7:3, d) 6:4, e) 1:1, f) MeOH, g) H <sub>2</sub> O y h) Ctr contra <i>V. cholerae</i> 569-B.....	71
Fig 15. Cromatograma de la separación de los compuestos presentes en la fracción activa, obtenida del extracto metanólico del huizache.....	72
Fig 16. Cromatografía que muestra el grado de pureza del compuesto aislado de la fracción activa del huizache.....	73
Figura 17. RMN <sup>1</sup> H del compuesto aislado del extracto metanólico del huizache.....	74
Fig. 18. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN <sup>13</sup> ; 100MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) del compuesto aislado del huizache.....	75
Fig 19. Estructura química del Metil Galato.....	76
Fig 20. Efecto del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), metanólico (3) y acuoso (4) del Nopal, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet.....	77
Fig 21. TLC de diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto metanólico de nopal, utilizando como eluente CHCl <sub>3</sub> :MeOH 7:3 y observadas con luz UV.....	77
Fig 22. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto de huizache, utilizando como eluente CHCl <sub>3</sub> :MeOH a) 9.5:0.5, b) 9:1, c) 8.5:1.5, d) 8:2, e) 7.5:2.5, f) 7:3, g) 6.5:3.5 h) 6:4, i) 5.5:4.5 j)1:1 k) MeOH y l) Ctr.....	78
Fig 23. TLC de diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto metanólico de nopal, utilizando como eluente CHCl <sub>3</sub> :MeOH 8:2 y observadas con luz UV.....	79

Fig 24. PLC de la fracción activa del nopal eluída con CHCl <sub>3</sub> :MeOH (7:3) y observada bajo luz UV.....	80
Fig 25. Autobiografía de la fracción activa del nopal eluída con CHCl <sub>3</sub> :MeOH (7:3).....	80
Figura 26. Placas de PLC de 20X20 eluída con CHCl <sub>3</sub> :MeOH (7:3), donde se muestra la banda activa que fue purificada.....	81
Fig 27. Cromatograma del compuesto aislado del nopal, mediante PLC.....	82
Fig 28. a) TLC del compuesto aislado del nopal y b) Actividad antimicrobiana del compuesto aislado al cual se le denominó Pro-OFi.....	82
Fig 29. Efecto del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), acuoso (3) y metanólico (4) del Estafiate, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet.....	83
Fig 30. Efecto antimicrobiano del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), acuoso (3) y metanólico (4), de la Albahaca, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet.....	84
Fig 31. Cromatografía en columna del extracto metanólico del estafiate obtenido mediante extracción en reflujo tipo Soxhlet y observada bajo luz UV.....	84
Fig 32. TLC de las fracciones del extracto metanólico del estafiate (a) y de las fracciones del extracto metanólico de la albahaca (b) obtenidos mediante cromatografía en columna y observadas bajo luz UV.....	85
Fig 33. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto de estafiate utilizando como eluente CHCl <sub>3</sub> (resuspendido en MeOH) (a), CHCl <sub>3</sub> :MeOH (b) 9:1 y 8:2 (c) y del extracto del albahaca utilizando como eluente CHCl <sub>3</sub> (resuspendido en MeOH) (d), CHCl <sub>3</sub> :MeOH (e) 9:1 y (f) 8:2. ....	85
Fig 34. Cromatograma del compuesto de interés semipurificado del extracto de estafiate mediante PLC.....	86
Fig 35. En la figura “a” se muestra la actividad original de la fracción antes del proceso de purificación, los halos de inhibición fueron de aproximadamente 2.0 cm. En la figura “b” se	

puede observar la reducción en la actividad antimicrobiana después del proceso de purificación.....	87
Fig. 36. Efecto de los compuestos aislados sobre la viabilidad de la membrana de <i>V. cholerae</i> 569-B. a) control; b) metil galato; c) Pro-OFi.....	89
Fig. 37. Efecto del Metil Galato y del extracto metanólico de huizache sobre el pHin de las cepas de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	90
Fig. 38. Efecto del Pro-OFi y del extracto metanólico del nopal sobre el pHin de las cepas de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	91
Fig. 39. Efecto de los compuestos aislados del huizache y del nopal sobre el potencial de membrana de las cepas de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	93
Fig. 40. Efecto de los compuestos aislados del huizache y del nopal sobre el potencial de membrana de las cepas de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	94
Fig. 41. Efecto de los extractos metanólicos del huizache, estafiate, albahaca y nopal sobre la expresión del gen <i>ctx</i> de <i>V. cholerae</i> .....	95
Fig. 42. Efecto de los compuestos aislados del huizache y del nopal sobre la expresión del gen <i>ctx</i> de <i>V. cholerae</i> .....	96

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas utilizadas durante el transcurso de esta investigación.....	37
Tabla 2. Combinación de solventes utilizados como eluente para la purificación de compuestos bioactivos mediante cromatografía en columna.....	46
Tabla 3. Combinación de solventes utilizados como fase móvil para la purificación de compuestos bioactivos mediante HPLC.....	48
Tabla 4.- Halos de inhibición de extractos de plantas acuosos, etanólicos y metanólicos, contra <i>V. cholerae</i> 569-B y 1837.....	54
Tabla 5. Halos de inhibición de extractos de plantas acuosos, etanólicos y metanólicos, contra <i>C. perfringens</i> FD-1041 y FD-1.....	55
Tabla 6 CMB´s parciales de los extractos metanólicos seleccionados contra <i>C. perfringens</i> FD-1041 y FD-1 y <i>V. cholerae</i> 569-B y 1837.....	56
Tabla 7. Concentraciones mínimas bactericidas de los extractos metanólicos seleccionados, contra <i>C. perfringens</i> y <i>V. cholerae</i> .....	57
Tabla 8. Efecto de la CMB aplicada a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de la membrana de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	60
Tabla 9. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre el pH <sub>in</sub> de diferentes cepas de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	63
Tabla 10. Comparación de la CMB obtenida de los extractos metanólicos del huizache y nopal con sus compuestos aislados metil galato y Pro OFi.....	88
Tabla 11. Efecto sobre el pH <sub>in</sub> de diferentes cepas de <i>V. cholerae</i> y <i>C. perfringens</i> .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetros
ctr	Control
°C	Grados Celsius
d	Días
Fig.	Figura
g	Gramos
h	Horas
mg/ml	Miligramos por Mililitro
ml	Mililitros
μl	Microlitros
min	Minutos
mm	Milímetros
μM	Micromolar

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de extractos de plantas y de dos compuestos aislados, sobre la integridad de la membrana, el pH citoplásmico, el potencial de membrana y sobre la síntesis de ATP, en dos cepas de *V. cholerae* y dos cepas de *C. perfringens*. Además para el caso de *V. cholerae* se evaluó el efecto de los extractos y de los compuestos aislados sobre la expresión del gen de la enterotoxina (*ctx*).

De acuerdo a los resultados preliminares de la actividad antimicrobiana se seleccionaron 4 extractos metanólicos de plantas, 2 medicinales (huizache y estafiate) y 2 comestibles (albahaca y nopal), obteniendo CMB's en rangos de entre 0.5 – 0.9 mg/ml y de 2 – 3 mg/ml respectivamente, de acuerdo a la cepa probada. Utilizando una concentración de 10X la CMB, los extractos seleccionados afectaron significativamente la integridad de la membrana, disminuyeron el pH citoplásmico, modificaron el potencial de membrana y disminuyeron la síntesis de ATP celular.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en el aislamiento y purificación de compuestos con actividad antimicrobiana, se emplearon técnicas como cromatografía en capa preparativa, en columna y HPLC mediante las cuales se obtuvieron dos compuestos puros, uno aislado del extracto de huizache, el cual fue caracterizado metil galato y el otro aislado del extracto de nopal, el cual no ha podido ser caracterizado completamente, sin embargo se sabe que al igual que el metil galato también es de naturaleza fenólica. Los resultados obtenidos al evaluar el modo de acción de los compuestos aislados fueron similares al de los extractos metanólicos afectando significativamente la integridad de la membrana, disminuyendo el pH citoplásmico, modificando el potencial de membrana y disminuyendo la síntesis de ATP celular.

Ninguno de los extractos evaluados ni de los compuestos aislados afectaron la expresión del gen de la enterotoxina (*ctx*), en ambas cepas de *V. cholerae*.

Los resultados obtenidos durante esta investigación confirman que al menos los extractos metanólicos del huizache, estafiate, albahaca y nopal, son una fuente de compuestos



bioactivos los cuales pueden considerarse como alternativas para el tratamiento de *V. cholerae* y *C. perfringens*, o por otro lado como alternativas en la prevención de la contaminación de alimentos causada por estos microorganismos patógenos

## ABSTRACT

The search for natural antimicrobials to use in foods is encouraged by the high prevalence of food-borne diseases and the current popular preference of consuming all-natural foods. The mechanisms of action of most plant extracts with antimicrobial activity have been poorly studied.

In this work, changes in membrane integrity, membrane potential, internal pH (pH<sub>in</sub>), ATP synthesis in *V. cholerae* and *C. perfringens* cells were evaluated after exposure to extracts plants and isolated natural compounds. Expression of cholera toxin gene, was determined in *V. cholerae* cells.

Preliminary antimicrobial properties of methanolic, ethanolic, and aqueous plant extracts were evaluated using the hole-plate diffusion technique. A micro-dilution method was used to determine the minimal bactericide concentrations (MBC) of extracts showing the higher antimicrobial activity. For the experiments, 10X of MBC was used. Damage of *V. cholerae* and *C. perfringens* membrane was evaluated using the LIVE/DEAD BacLight kit, cFDA-SE was used to measure internal pH, membrane potential was determined with DiBAC<sub>4</sub>(3) and ATP was measured using ELITEN ATP detection kit. Expression of the cholera toxin gene was determined by qRT-PCR

The methanolic extracts of basil, nopal cactus, sweet acacia, and white sagebrush, were the most active against *V. cholera* and *C. perfringens* strains, with MBCs ranging from 0.5 to 3.0 mg/ml. Membrane integrity was affected by all selected extracts damaging 100% of the cells. The pH<sub>i</sub> showed a clear decrease from approximately pH<sub>in</sub> 7 to pH<sub>in</sub> 4. Membrane potential was affected; three plant extracts produced hiperpolarization and one extract depolarization. Cellular ATP production was reduced by 55 to 89% depending on extract and strain tested. The expression of *V. cholerae* enterotoxin gene was no inhibited during the treatment. All extracts exerted profound physiological changes that lead to bacterial death.

These four plant extracts could be regarded as alternatives to control *V. cholerae* contamination in foods, and in the treatment of diseases associated with this microorganism.

## INTRODUCCIÓN

Los cuadros de patología digestiva transmitidas por agua y alimentos, siguen siendo una causa importante de morbilidad e incluso mortalidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. El Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) estima que en el 2011, cuarenta y ocho millones de personas en EUA se enfermaron debido al consumo de alimentos contaminados, de los cuales 128,000 fueron hospitalizados y 3000 murieron como resultado de enfermedades alimentarias. Por otro lado en México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), reporta anualmente poco mas 4.7 millones de casos nuevos de infecciones intestinales.

*Vibrio cholerae* el agente causal de la enfermedad diarreica denominada cólera es considerado el patógeno mas importante del último siglo y se le considera una amenaza global actual a la salud del ser humano, debido a los incrementos de hasta un 115% en los reportes de casos alrededor del mundo.

*Clostridium perfringens* es el patógeno mas ampliamente distribuido en el medio ambiente y el CDC estima que en los EU, *C. perfringens* ocupa el tercer lugar como causante de enfermedades gastrointestinales siendo responsable de aproximadamente el 10% de las infecciones, solo superado por *Salmonella* (11%) y los Norovirus (58%).

En años recientes, se ha incrementado el interés por parte de la industria de los alimentos, en el uso de compuestos naturales como sustitutos de los antimicrobianos sintéticos. La búsqueda de estos compuestos se ha basado en métodos tradicionales de plaqueo en agares nutritivos, sin embargo estas técnicas no son del todo certeras debido a la posibilidad de encontrar células en estado viable no cultivable.

Debido a esto se han propuesto varios métodos para determinar la viabilidad microbiana que emplean colorantes fluorescentes, como el kit LIVE/DEAD BacLigth, el cual es útil para diferenciar células que presentan daño en la integridad de la membrana celular de aquellas que mantienen la membrana intacta. Otra metodología es la que emplea el

reactivo fluorescente CFDA-SE el cual es capaz de evaluar el pH celular, esta información es de gran valor, ya que la capacidad de las células para mantener el gradiente de pH (pH interno mayor al pH externo) puede ser utilizada para evaluar la correcta actividad fisiológica bacteriana. Por otro lado el DiBAC<sub>4</sub>(3), es utilizado para determinar el potencial de la membrana microbiana, en este caso la distribución del colorante dentro de la célula es resultado de un efecto de despolarización o de una hiperpolarización de la membrana celular bacteriana. Por último, dado la importancia del ATP producido por una célula, se ha utilizado el sistema kit ENLITEN luciferina/luciferasa para determinar cambios en la síntesis de esta molécula. Estas técnicas también pueden ser utilizadas para determinar el mecanismo de acción de compuestos naturales

Los programas sistemáticos de desarrollo de nuevos antimicrobianos a partir de fuentes naturales están basados en bioensayos de aislamiento dirigido, en donde el aislamiento de compuestos activos va acompañado de bioensayos de cada grupo de compuestos o de cada compuesto aislado, para seleccionar cual de ellos es el que presenta la actividad buscada, hasta obtener el compuesto activo puro y proseguir con su caracterización.

## **2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Debido a la necesidad de desarrollar antimicrobianos más efectivos y con menos efectos secundarios, aunado a la ya mencionada tendencia al consumo de productos naturales, los antimicrobianos tales como los obtenidos de plantas, han ido ganando importancia como alternativas reales para su aplicación en productos alimenticios

La originalidad de este trabajo radica en la elucidación del mecanismo de acción de esos compuestos biológicamente activos en *V. cholerae* y *C. perfringens* y la caracterización del o de los compuestos de plantas con actividad biológica.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo de acción de extractos de plantas y de sus compuestos activos sobre *Vibrio cholerae* y *Clostridium perfringens*

### 4. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Seleccionar extractos de plantas que presenten actividad antimicrobiana contra *V. cholerae* y *C. perfringens*.
- 2) Determinar la Concentración Mínima Bactericida de los extractos activos contra *V. cholerae* y *C. perfringens*.
- 3) Determinar el efecto de las concentraciones sub-inhedorias sobre el crecimiento de *V. cholerae* y *C. perfringens*.
- 4) Determinar la actividad biológica de los extractos, en la membrana celular de *V. cholerae* y *C. perfringens*.
- 5) Establecer el efecto de los extractos activos sobre el pH citoplásmico de *V. cholerae* y *C. perfringens*.
- 6) Establecer el efecto de los extractos activos sobre el potencial de membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*.
- 7) Establecer el efecto de los extractos activos sobre la síntesis de ATP de *V. cholerae*.
- 8) Determinar el efecto de los extractos sobre la síntesis de toxinas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

- 9) Realizar la caracterización del o de los compuestos con actividad antimicrobiana aislados de las plantas seleccionadas por su actividad
- 10) Determinar la concentración mínima bactericida de los compuestos aislados contra *V. cholerae* y *C. perfringens*.
- 11) Establecer el efecto de los compuestos aislados sobre la viabilidad de la membrana, el pH, el potencial de membrana y la síntesis de ATP.
- 12) Determinar el efecto de los compuestos aislados sobre la síntesis de toxinas de *V. cholerae*.



## **5. HIPOTESIS**

Los compuestos bioactivos aislados de extractos de plantas, tienen como sitio blanco la membrana y la síntesis de proteínas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

## 6. ANTECEDENTES

### 6.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.

Los cuadros de patología digestiva transmitidas por agua y alimentos, siguen siendo una causa importante de morbilidad e incluso mortalidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. (Helms, 2003). A estas patologías se les denomina Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA's) y son producidas por la ingestión de productos alimenticios y/o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos o sus toxinas, en cantidades tales, que afectan la salud del consumidor de forma individual o colectiva. Las ETA's, pueden ser producidas en cualquiera de las etapas de la cadena alimentaria (producción, transporte, almacenamiento, elaboración, distribución y consumo de alimentos). Sus síntomas más comunes son diarreas, dolores abdominales, náusea y vómitos, (ICMSF, 1996), pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc. (Rosas *et al.*, 2001)

La transmisión de enfermedades a través del consumo de alimentos es un problema de salud pública ya conocido; sin embargo, recientemente y en todo el mundo se ha constatado el aumento de su frecuencia, debido a cambios en las etiologías predominantes y en la dinámica epidemiológica. (Hyytiä *et al.*, 1999). Esto es probablemente se debe a los cambios actuales en la alimentación de la población como a los cambios en las técnicas de procesamiento de alimentos, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables y al aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento (Autio *et al.*, 1999; Millemann *et al.*, 2000) o por el empleo de materia prima contaminada, (Hielm *et al.*, 1998; Fach, 2002) pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado.

La contaminación de los alimentos es uno de los problemas de salud más extendida del mundo. El Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades de EUA (CDC) estima que en el 2011, cuarenta y ocho millones de personas en EUA se enfermaron debido al consumo de alimentos contaminados, de los cuales 128,000 fueron hospitalizados y 3000 americanos murieron como resultado de enfermedades alimentarias, principalmente niños, adultos mayores e inmunocomprometidos (CDC, 2011). Por otro lado en México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE 2010), reporta poco mas de 4.7 millones de casos nuevos de infecciones intestinales.

Debido a la importancia de estas enfermedades diversas instituciones trabajan en programas para aportar información detallada del diagnóstico, tratamiento y prevención de estas enfermedades (Fasano, 2000; Satcher, 2000). Como ejemplo tenemos la creación en Marzo de 2004, de la Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) la cual es una iniciativa conjunta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), concebida para promover el intercambio de información y la colaboración entre autoridades responsables de la inocuidad de los alimentos, en los planos nacional e internacional (INFOSAN, 2007). Dicho organismo es administrado y gestionado por el Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria de la OMS. La importancia de este tipo de organismos radica en que las autoridades en materia de inocuidad de los alimentos de todo el mundo han reconocido que el tema de la salubridad de los alimentos no sólo se debe abordar en el plano nacional sino que es necesaria una colaboración más estrecha de las autoridades nacionales en el plano internacional. Con frecuencia, los incidentes que afectan la inocuidad de los alimentos que se detectan y controlan en un país interesan a otros países; compartiendo experiencias es posible encararlos de un modo más eficaz y eficiente. Existen 177 países miembros de INFOSAN y México es miembro actual de dicho organismo. (INFOSAN, 2009)

En México con la finalidad de organizar y coordinar las actividades de vigilancia epidemiológica que involucran a los sectores público, social y privado que integran el

Sistema Nacional de Salud, a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-SSA2- 017-1994 y del acuerdo número 130 de la Secretaría de Salud, se crea el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), que es el conjunto de estrategias y acciones de vigilancia epidemiológica que permiten la producción de información epidemiológica útil para la salud pública y tiene como objetivo el generar y posicionar información de inteligencia epidemiológica relevante para la toma de decisiones en la promoción de la salud y la prevención y control de enfermedades de interés en salud pública (SINAVE, 2011).

### **6.1.1 *Vibrio cholerae***

El género *Vibrio* consiste en bacilos curvos Gram negativos, son anaerobios facultativos además de móviles por medio de un flagelo polar (Todar, 2009). Se han reportado 12 especies pertenecientes a este género, de las cuales *Vibrio cholerae* el agente causal de la enfermedad diarreica denominada cólera es la más importante (Tam *et al.*, 2010; Heymann, 2004). Este microorganismo es habitante común de medioambientes estuarinos, costeros y salobres (Colwell and Huq, 1994; Hendriksen *et al.*, 2011) donde generalmente permanece en un estado viable no cultivable (Alam *et al.*, 2007). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), menciona que aún que las infecciones causadas por *Vibrio* son raras en los Estados Unidos, son también, sumamente serias ya que se ha reportado un incremento a nivel mundial de un 115%, y pone en evidencia la carencia de medidas de control disponibles (CDC, 2010).

*V. cholerae* puede ser dividido en serogrupos en base al antígeno O, y de los mas de 200 serogrupos que han sido reconocidos (Piarroux, 2011), pero solo los aislados pertenecientes a los grupos toxigénicos O1 y O139 son reconocidos por ser las cepas mas dominantes y patógenas y principales causantes del cólera epidémico (Maheshwari *et al.*, 2011). Sin embargo, los biotipos denominados “clásico” y El Tor, pertenecientes a *V. cholerae* O1 son los agentes causales de la mayoría de las epidemias a nivel mundial por lo que son reconocidos como los patógenos mas importantes del último siglo (WHO, 2010; Maheshwari *et al.*, 2011). Sin embargo, existen serogrupos denominados no-O1 y no-O139, los cuales han sido asociados a casos esporádicos de enfermedades

gastrointestinales, pero nunca han sido asociados a formas epidémicas de la enfermedad (Heymann, 2004). *V. cholerae* produce varias toxinas, una de las cuales es su principal factor de virulencia denominada enterotoxina del cólera, la cual consiste en una subunidad B no tóxica y una subunidad enzimáticamente activa o subunidad A, la cual está localizada dentro de la subunidad B (Zuckerman *et al.*, 2007). Además de la enterotoxina, los biotipos epidémicos sintetizan un “pili” que se encuentra co-regulado a la enterotoxina, el cual es fundamental para la colonización del epitelio intestinal (Thompson *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 2011).

La infección causada por *V. cholerae* comienza cuando una persona consume agua o alimentos contaminados con el patógeno. Después de pasar por la acidez del estómago, la bacteria coloniza el intestino delgado mediante el pili corregulado con la toxina (Taylor *et al.*, 1987) donde se multiplica hasta alcanzar concentraciones muy elevadas (Angelichio *et al.*, 1999). Ya en estas condiciones y adherida a la mucosa intestinal, produce la enterotoxina la cual es secretada a través de la membrana externa de la bacteria hacia el medioambiente extracelular afectando el transporte de iones de la célula epitelial (Maheshwari *et al.*, 2011), este efecto es debido a que la subunidad A de la toxina, entra a la célula del intestino, activando la enzima adenilto ciclasa, causando un incremento en la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPC), lo que ocasiona que las células de la mucosa expulsen grandes cantidades de agua y electrolitos (Zuckerman *et al.*, 2007; Todar, 2009) produciendo una diarrea severa característica del cólera (Maheshwari *et al.*, 2011).

El periodo de incubación de la enfermedad varía de algunas horas a 5 días con un promedio de 2-3 días. Los síntomas de la enfermedad son diarrea acuosa profusa comúnmente asociada a vómitos, calambres abdominales y musculares aunados a síntomas relacionados con deshidratación severa. Un paciente puede producir aproximadamente 1 litro de heces por hora, lo que las transforma en un liquido descolorido, sin olor y además viene acompañada de escamas y moco de las células epiteliales lo que la da una apariencia de “agua de arroz”. (Steffen *et al.*, 2003; Todar, 2009). Las complicaciones de la enfermedad se dan principalmente por la pérdida de líquidos y la deshidratación, causando rápida hipotensión, taquicardia y colapso vascular. Las complicaciones cardiacas y la falla en el sistema circulatorio son debidas a

la pérdida de potasio. (Sánchez and Taylor, 1997; Weinke *et al.*, 2008). Aunado a esto se presenta severa acidosis por la pérdida de bicarbonato en las heces lo que es exacerbado por hipotensión relacionada con la acidosis láctica y por falla renal. (Morris, 2011) El paciente se vuelve letárgico, con ojos y mejillas hundidas, además de presentar resequead de mucosas y membranas. También se presenta un decremento en la turgencia de la piel. (Sánchez and Taylor, 1997). Esto puede ocasionar la muerte del paciente en menos de 24 hr (Weinke *et al.*, 2008). Sin un tratamiento adecuado la tasa de mortalidad puede ser de entre 50 y 60% (Guidolin and Manning, 1987).

Existen reportes de que la dosis infectiva de *V. cholerae* es de entre  $10^5$ - $10^8$  microorganismos (Hunter, 2003; Zuckerman *et al.*, 2007). Sin embargo, la literatura reciente señala que el alimento o agua contaminados deben de tener en promedio  $10^6$  microorganismos (Maheshwari *et al.*, 2011).

La enfermedad del cólera es frecuentemente transmitida por vía fecal oral, por medio de agua y alimentos contaminados (Steffen *et al.*, 2003). Con respecto a esto, el agua contaminada es generalmente el vehículo primario de las epidemias del cólera (Thompson *et al.*, 2004; Taxue and Blake, 1992; Chakraborty *et al.*, 2000; Perez, 2003; Chomvarin *et al.*, 2007). Por otro lado, debido a que las especies de *Vibrio* son abundantes en medioambientes acuáticos (Kaisner, 2000), los alimentos como pescados y mariscos, resaltan en importancia, como vehículos de transmisión del cólera (Maheshwari *et al.*, 2011). Es común que este tipo de alimentos sean contaminados por *V. cholerae* cuando son descargadas a los embalses, aguas contaminadas provenientes del drenaje (ICMSF, 1998). Existen reportes de brotes ocasionados por el consumo de pescados y mariscos, incluyendo moluscos, crustáceos, cangrejos y ostras (Tobin-D'Angelo *et al.*, 2008; Senderovich *et al.*, 2010; Garate-Lizarraga *et al.*, 2006; Blake *et al.*, 1980). Otros alimentos involucrados en epidemias del cólera son las frutas y verduras, sobre todo cuando éstas son regadas con aguas no tratadas contaminadas con heces fecales (Maheshwari *et al.*, 2011).

El cólera es una amenaza global a la salud del ser humano, y con los reportes de incrementos en los casos de cólera, cada país pudiera enfrentar una posible epidemia que puede afectar además de la salud de la población, la estructura social y económica de muchos sectores del país o países afectados (WHO, 2010)

### 6.1.2 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* es un bacilo Gram positivo, no móvil, anaerobio con capacidad de formar esporas, las cuales se encuentran dentro del bacilo en forma subterminal (McClane *et al.*, 2006). De cualquier forma, *C. perfringens* tolera exposición moderada al aire, por lo que se le considera aerotolerante (O'Brien *et al.*, 2000). Se ha demostrado que este microorganismo posee el menor tiempo de generación ya que se tienen reportes de tiempo de generación de menos de 10 min (Willardsen *et al.*, 1979). Se le considera uno de los principales patógenos del ser humano (Li *et al.* 2011 ). De hecho el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) estima que en los Estados Unidos, *Clostridium perfringens* ocupa el tercer lugar como causante de enfermedades gastrointestinales siendo responsable de aproximadamente el 10% de las infecciones, solo superado por *Salmonella* (11%) y los Norovirus (58%) (CDC, 2011).

*C. perfringens* es el patógeno más ampliamente distribuido en el medio ambiente (Canard *et al.*, 1992) lo que por un lado explica la frecuente ocurrencia de infecciones causadas por este patógeno (Juneja *et al.*, 2010). Puede ser fácilmente aislado de suelo, agua, polvo, heces, alimentos (carne cruda de res y pollo), forma parte de la flora intestinal del ser humano y de animales (Das *et al.*, 2008; Juneja *et al.*, 2006; Labee y Heredia, 2001).

Los brotes de toxiinfecciones ocasionados por *C. perfringens* tipo A, son usualmente asociados a alimentos contaminados los cuales fueron enfriados lentamente o recalentados insuficientemente, cuando esto sucede las células vegetativas pueden incrementar su número rápidamente incluso a temperaturas de entre 40 y 50°C (Juneja *et al.*, 2010). La enfermedad es causada cuando el alimento consumido contiene aproximadamente  $10^6$  UFC/g de células vegetativas de *C. perfringens*, los síntomas típicos incluyen dolor abdominal agudo, náusea, y diarrea la cual se presenta después de 6-24 horas de haber consumido el alimento contaminado, generalmente la enfermedad es autolimitante y las muertes por la enfermedad son escasas (Brynstad *et al.*, 2002)

La virulencia de *C. perfringens* es atribuida a su capacidad de producir un arsenal de potentes toxinas, se han reportado al menos 16 diferentes, sin embargo, los aislados de *C. perfringens* nunca expresan todas las toxinas al mismo tiempo (McClane, 2007). Esto le da la capacidad de producir diferentes patologías que van desde lo histotóxico hasta enfermedades gastrointestinales tanto en humanos como en animales (Smedley *et al.*, 2004). Esta característica es comúnmente utilizada como un sistema de clasificación denominado toxinotipificación, el cual agrupa a los aislados de *C. perfringens* en 5 diferentes tipos (A, B, C, D, y E), basado en la producción de al menos una de las 4 principales toxinas letales alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) e iota ( $\iota$ ) (McClane, 2007). A este respecto mientras que todos los tipos de *C. perfringens* producen la  $\alpha$  toxina, los aislados del tipo B expresan además las toxinas  $\beta$  y la  $\epsilon$  el tipo C produce las toxinas  $\beta$  además de la  $\alpha$ , los aislados del tipo D producen la  $\epsilon$  y por último los aislados del tipo E producen la toxina  $\iota$  (McClane *et al.*, 2006).

Aproximadamente el 5% de todas las cepas aisladas de *C. perfringens* tipo A producen otra toxina importante desde el punto de vista patológico, denominada enterotoxina de *C. perfringens* (CPE) (Daube *et al.*, 1996). Estos aislados tipo A, CPE positivos son responsables de la toxi-infección ocasionada por *C. perfringens*, provocando síntomas gastrointestinales como diarreas, en humanos y animales (McClane, 2007). El primer reporte que se tiene de esta toxi-infección data de 1940, (McClung, 1945) y a la fecha se considera como una de las infecciones gastrointestinales mas comunes en países industrializados (CDC, 2011b). Además de esto las cepas CPA de *C. perfringens*, se han asociados a enfermedades gastrointestinales no asociadas a alimentos, tales como diarrea esporádica y diarrea asociada a antibióticos (Fisher *et al.*, 2006). Estas diarreas no asociadas a alimentos, producidas por aislados del tipo A, típicamente poseen el gen *cpe* en un plásmido mientras que las infecciones gastrointestinales asociadas a alimentos, el gen *cpe* se encuentra en el cromosoma (Sparks *et al.*, 2001). Existe cierta evidencia de que algunos de los factores de virulencia codificados en plásmidos, pueden ser transferidos horizontalmente (Parsons *et al.*, 2007), esto explicaría la fuerte asociación que existe entre los casos de diarrea asociada a antibióticos y diarrea esporádica, las cuales son causadas por cepas de *C. perfringens* que llevan el gen *cpe* en plásmido, a este respecto



existe la teoría que el plásmido puede ser transferido *in vivo* a cepas de *C. perfringens* de la microbiota normal del intestino (Sparks *et al.*, 2001) sin embargo, la transferencia conjugativa del plásmido ha sido demostrada *in vitro* pero la transferencia *in vivo* no se ha demostrado (Brynstad *et al* 2001).

La enterotoxina tiene actividad letal, citotóxica y enterotóxica (Hatheway, 1990) La biosíntesis de la enterotoxina (CPE) está temporalmente asociada a la esporulación (Duncan *et al.*, 1973; García-Alvarado *et al.*, 1992). La CPE no es secretada, sino que se acumula en el citoplasma y es liberada en el lumen intestinal cuando la esporulación es completada y la célula madre se lisa, liberando la espora madura y la toxina (Duncan *et al.*, 1973). Una vez liberada, la enterotoxina induce cambios morfológicos significativos en el epitelio intestinal causando los típicos síntomas de la diarrea característica causada por *C. perfringens* (Labee and Juneja, 2006). Para ocasionar esto la CPE se inserta en la membrana plasmática de los enterocitos uniéndose a un receptor celular proteico, de aproximadamente 90 kDa, que podría incluir ciertas proteínas de la familia de las claudinas (Veshnyakova *et al*, 2010), después de esto la CPE forma un par de complejos mas grandes uno de 155 kDa y otra de 200 kDa (Smedley *et al.*, 2007) el cual inicia las alteraciones en la permeabilidad de la membrana, provocando flujo de calcio hacia al interior de la célula, los niveles de calcio se incrementan rápidamente y la célula muere ya sea por apoptosis o por necrosis (Smedley and McClane, 2004) dependiendo de la concentración de la toxina y de ciertos iones como el calcio (Chakrabarti *et al.*, 2005).

## **6.2 Extractos de plantas como antimicrobianos**

Las enfermedades transmitidas por alimentos, son uno de los principales problemas de salud en México (González y Rojas, 2005) El uso de antimicrobianos (conservadores) en alimentos es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente, que en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, lo que redundo en un rechazo por parte de los consumidores de alimentos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones (Juneja *et al.*, 2012). Una de las alternativas actuales para el control de la proliferación de microorganismos patógenos o deteriorantes en

alimentos es el uso de sustancias derivadas de plantas debido a sus diversas aplicaciones (Baris *et al.*, 2006). Con respecto a esto las plantas medicinales y comestibles son una fuente inagotable de medicamentos modernos, nutracéuticos, suplementos alimenticios, medicina tradicional, intermediarios farmacéuticos y entidades químicas para el desarrollo de drogas sintéticas (Hammer *et al.*, 1999). Por lo que en años recientes, se ha incrementado el interés por parte de la industria de los alimentos, en el uso de extractos de plantas en alimentos procesados, debido a su potencial utilidad como sustitutos a los antimicrobianos sintéticos y además a que pueden incrementar las propiedades benéficas de los alimentos como su actividad antioxidante. A este respecto, se han realizado extractos de un gran número de plantas alrededor del mundo para determinar sus propiedades antimicrobianas (Dranghon, 2004). Este interés en el uso de productos naturales se ha incrementado no solo en lo que concierne a la industria de los alimentos sino también en el consumidor debido a la percepción negativa que se tiene hacia los aditivos químicos sintéticos (Rasooli, 2007; Torrado-Truiti *et al.*, 2003).

Algunos experimentos han mostrado que los extractos de *Prosopis juliflora*, tienen actividad inhibitoria contra de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus* (Aqeel *et al.*, 1989).

Desta en 1993, analizó las propiedades antimicrobianas de 63 extractos acuosos de plantas medicinales utilizadas en Etiopía, contra *S. aureus*, *S. gallinarum*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, de todos lo extractos solo 6 presentaron actividad antimicrobiana contra todas las cepas bacterianas probadas.

En 1994, Irobi *et al.*, realizaron extractos etanólicos y acuosos de la planta medicinal *Bridelia ferruginea*, encontrando actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. lactis*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *S. pyogenes* y *Klabsilella sp.*

También en 1994, Paulo *et al.*, demostraron la actividad antimicrobiana del extracto alcohólico de *Cryptolepis sanguinolenta* (una planta utilizada en la medicina tradicional del este de África), en contra de *Campylobacter sp* y *Vibrio cholerae*.

En 1995, Tassou *et al.*, demostraron el efecto antimicrobiano del aceite de menta, (*Menta piperita*) contra *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. Por otro lado,

también reportaron que la capsaicina, que es un compuesto extraído del chile, tiene efecto inhibitorio en contra de *Helicobacter pylori* así como contra *Candida albicans*.

Navarro *et al.*, en 1996, evaluaron 12 extractos metanólicos de plantas utilizadas en la medicina tradicional de Morelos, Mx. Contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, los resultados muestran que los extractos de *Eucalyptus globulus*, *Punica granatum*, *Artemisia mexicana* y *Bocconia arborea*, poseen fuerte actividad antimicrobiana contra los organismos probados.

También se demostró la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Terminalia marcoptera*, (una planta medicinal utilizada en Guinea), mostrando actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Campylobacter sp.* siendo esto muy importante para el tratamiento de enfermedades entéricas (Silva *et al.*, 1997).

Smith-Palmer *et al.*, en 1998, reportaron la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de canela, clavo, y tomillo en contra de *Campylobacter*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*, siendo *Campylobacter* el más resistente.

Satish *et al.*, en 1999, reportaron la actividad antimicrobiana de extractos acuosos de *Acacia arabica*, *Achras zapota*, *Lawsonia inermis* y *Viscum orientale* en contra de *Xantomonas campestris* bacteria que causa estragos en cultivos de plantas, ya que ocasiona manchas en las hojas o caída de éstas.

Ali-Shtayeh *et al.*, en 1998, realizaron un análisis de la actividad antimicrobiana de 20 plantas utilizadas como remedios folklóricos en Palestina, encontrando que el extracto etanólico de *Micromera nervosa* resultó ser el más efectivo mostrando actividad contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Tona *et al.*, en 1999, realizaron la evaluación antimicrobiana de 46 extractos acuosos de plantas medicinales comúnmente utilizadas en la medicina tradicional de Kinshasa, Congo, como remedios contra enfermedades gastrointestinales. Encontrando que solo 8 de las plantas presentaron actividad antidiarreica por sus buenas actividades antimicrobianas.

En 1999, Martínez-Vázquez *et al.*, realizaron extractos con diferentes tipos de solventes de *Byrsonima crassifolia* encontrando que el extracto de la raíz con acetato de etilo fue el que presentó mayor poder antimicrobiano, teniendo efecto sobre *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae* y *M. luteus*.

Ojala *et al.*, en el año 2000 realizaron un estudio antimicrobiano de extractos metanólicos de siete plantas que crecen en Finlandia, contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, encontrando que *Petroselinum crispum* y *Ruta graveolens* mostraron la mayor actividad contra todas las cepas probadas.

Cutter en el 2000, analizó el efecto antimicrobiano de extractos de plantas contra *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes* en un modelo de carne de res. Los extractos fueron además mezclados ya sea con citrato de sodio o cloruro de sodio, y cuando se trabajó con los extractos a 2.5% la reducción después de 7 días de almacenaje fue de entre 1.3 a 1.9 log para *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes* respectivamente, en el caso de *E. coli* no hubo inhibición de su crecimiento.

También en el 2000, Dickens *et al.*, examinaron el efecto de una mezcla de productos naturales a base de plantas denominado Protecta II, este producto fue utilizado para lavar pollos en canal, encontrando que una concentración del 2% (w/v) fue efectiva para disminuir las cuentas de *E. coli* y *C. jejuni* en poco más de 2 log ufc/ml.

En el año 2000, pero por Omar *et al.*, se analizó la actividad antimicrobiana de 14 árboles conocidos como de madera noble, encontrando inhibición de *S. aureus* y *B. subtilis*.

Cutter en el 2000, analizó el efecto antimicrobiano de extractos de plantas contra *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes* en un modelo de carne de res. Los extractos fueron además mezclados ya sea con citrato de sodio o cloruro de sodio, y cuando se trabajó con los extractos a 2.5% la reducción después de 7 días de almacenaje fue de entre 1.3 a 1.9 log para *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes* respectivamente, en el caso de *E. coli* no hubo inhibición de su crecimiento.

Rauha *et al.*, en el 2000, evaluaron el efecto antimicrobiano de 13 compuestos fenólicos y 29 extractos de plantas de Finlandia, los resultados indican que los compuestos fenólicos aislados fueron mas efectivos para inhibir el crecimiento de las cepas probadas, siendo la flavona, quercitina y naringenina los más efectivos, y con respecto a los extractos *Lythrum salicaria* inhibió el crecimiento de *C. albicans* por su parte los extractos de *Filipendula ulmaria*, *Epilobium angustifolium*, *Rubus chamaemorus* y *Rubus idaeus* fueron efectivos contra la mayoría de las cepas bacterianas como *E. coli*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis* y por ultimo los extractos de *Betula pubescens*, *Pinus sylvestris* y *Solanum tuberosum* afectaron solo a *S. aureus*.

En el 2001 Khan *et al.*, realizaron un fraccionamiento secuencial de los extractos etanólicos de *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* y *Sigesbekia orientalis*, el fraccionamiento lo realizaron con éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo y fueron evaluadas contra bacterias patógenas y levaduras. Los resultados mencionan que todas las fracciones incluyendo al extracto etanólico tuvieron un amplio espectro de actividad y las fracciones con acetato de etilo y éter de petróleo de *E. papuana* fueron los mas activos. No se observó actividad contra los hongos probados.

Lambert y Nichas en 2001, reportaron la acción bactericida del aceite esencial de orégano en contra de *P. aeruginosa* y *S. aureus* encontrando mayor susceptibilidad en *P. aeruginosa*.

En el 2001 Murillo-Alvarez *et al.*, realizaron la evaluación científica de 25 extractos de plantas etanólicos usados en la medicina tradicional de Baja California Sur Mx. Encontrando que *Aristolochia monticola*, *A. brevipes*, *Hymenoclea monogyra* y *Hymenoclea sp.* Fueron las plantas mas activas contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. faecalis* y *E. coli*.

En el 2002, Cos *et al.*, realizaron extractos de 45 plantas comunes en Rwanda y encontraron que algunas de ellas presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas como *Mycobacterium*, pero ninguna tuvo actividad contra Gram negativas.

Gill *et al.*, 2002, evaluaron la habilidad del aceite de cilantro (*Coriandrum sativum*) para controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenese* en jamón empacado al vacío. Los resultados indican que se necesita del 6% de aceite de cilantro para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* pero esto es solo durante una semana, por lo que al parecer la matriz del alimento no hace al aceite de cilantro un agente efectivo para el control de *L. monocytogenes*.

También en 2002, Kokoska *et al.*, realizaron un estudio de 16 plantas de Siberia, encontrando que 12 mostraron actividad contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Gupta *et al.*, en 2002, realizaron extractos con éter de petróleo y metanol de la planta *Eupatorium ayapana* a los cuales se les determinó la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y contra hongos. Los resultados indican que el extracto obtenido con éter de petróleo resultó ser mas activa que el extracto metanólico.

Goun *et al.*, en 2003, evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos realizados con diclorometano y metanol de 20 plantas de Indonesia, las cuales tiene reportes de usos etnobotánicos. Los extractos que mostraron actividad antimicrobiana fueron los *Determinalia catappa*, *Swietenia mahagoni*, *Phyllanthus acuminatus*, *Ipomea sp*, *Tylophora asthmatica* y *Hyptis brevipes*.

En el 2003 Fett y Cooke, disminuyeron el crecimiento de un coctel de 4 cepas de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, las cuales fueron inoculadas en semillas de alfalfa, cuando agregaron 5 productos comerciales a base de cítricos, en la mayoría de los casos se presentó una reducción de hasta 3.46 log.

En 2003, Satdive *et al.*, demostraron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Gymnema sylvestre*, contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Por otro lado los extractos no fueron activos contra *P. vulgaris* y *E. coli*.

La actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y acuosos de la planta *Cassia alata* fue evaluada por Somchit *et al.*, en 2003, contra *Staphylococcus aureus* y

*Escherichia coli*, ellos encontraron que los extractos acuosos mostraron mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* mostrando halos de inhibición de 16 mm contra 11 mm de los extractos etanólicos. *E. coli* no fue susceptible a ninguno de los dos extractos.

Khan *et al.*, en 2003, mencionaron que los extractos metanólicos de *Alstonia acholaris* y *Leea tetramera*, exhibieron un amplio espectro de actividad antibacteriana, y cuando se realizaron fraccionamientos del extracto metanólico, la fracción butanólica fue la mas activa de entre todas contra los hongos probados.

Kim y Fung en 2004, estudiaron el efecto del extracto soluble en agua del te de la raíz de pueraria, contra *E. coli O157:H7*, *Salmonella entérica*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus* en un modelo de carne molida y en sopa de hongos. Los resultados muestran que para el caso de la carne molida el crecimiento de *Salmonella entérica* y *L. monocytogenes* fue disminuido aproximadamente 1.5 log comparado con el control a 7 días y para el caso de la sopa de hongo, el crecimiento de todos los patógenos fue afectado en promedio 5 log comparado con el control a 5 días.

También en el 2004, Ahn *et al.*, evaluaron la actividad de los extractos de semilla de uva y de corteza de pino, sobre el crecimiento de *E. coli O157:H7*, *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes*, en un modelo de carne molida. Los resultados arrojan una CMI de entre 4 y 4.3 mg/ml de acuerdo a la cepa probada y cuando se realizaron las curvas de inhibición en la carne molida en promedio hubo una reducción de 1 log, con respecto al control a 9 días de tratamiento.

En el año 2004, Kim *et al.*, evaluaron la efectividad de extractos de te verde, negro dungglre y de jazmín contra el crecimiento de *E. coli O157:H7*, *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus*. Cuando se realizaron los estudios *in vitro* el té verde y de jazmín, fueron efectivos en disminuir el crecimiento de *L. monocytogenes*, y *S. aureus* entre 3 y 5 log respectivamente y para el caso de *E. coli O157:H7* y *Salmonella entérica* ningún extracto fue efectivo en reducir su crecimiento. Cuando se aplicaron los extractos a un modelo de carne molida, no hubo diferencia entre los tratamientos y el control.

Thiem y Goslinska en 2004, demostraron la actividad antimicrobiana de la fracción butanólica del extracto metanólico de *Rubus chamaemorus* en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Wiart *et al.*, en 2004, evaluaron la actividad antibacteriana y antifúngica de 72 extractos metanólicos de plantas utilizadas en la medicina tradicional de Malasia, encontrando que *Peristrophe tinctoria*, *Polyalthia lateriflora*, *Knema malayana*, *Solanum torvum*, *Celiosa argentea*, *Eclipta prostrata*, *Ancistrocladus tectorius*, *Dillenia suffruticosa*, *Piper stylosum* y *Rafflesia hasseltii*, presentaron un amplio espectro de actividad.

En el 2004 Rota *et al.*, examinaron la efectividad de aceites esenciales para inhibir el crecimiento de *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli O157:H7*, *Y. enterocolitica*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Los resultados arrojan que los aceites mas efectivos fueron los de *Satureja montana* y *Thymus vulgaris*.

Owais *et al.*, en 2005, evaluaron la actividad antimicrobiana de la planta *Withania somnifera*, utilizada en la medicina tradicional de la India, encontrando que los extractos acuosos y metanólicos mostraron fuerte actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, mas aún el extracto metanólico fue subsecuentemente fraccionado, encontrando que la fracción butanólica fue la mas efectiva contra *Salmonella*.

También en el 2005, Witkowska-Banaszczak, demostraron la actividad antimicrobiana de extractos realizados mediante decocción, infusión y etanol de *Viola tricolor*, en este caso todos los extractos probados presentaron buena actividad antimicrobiana.

En el 2006 Raybaudi-Massilia *et al.*, determinaron la actividad antimicrobiana de aceites esenciales del zacate limón, canela, geranio y palmarosa contra *Salmonella enteritidis*, *E. coli* y *Listeria innocua*. Los resultados indican que todas las cepas bacterianas fueron inhibidas a 1 µl/ml. Los aceites esenciales de zacate limón, canela y geranio fueron seleccionados por presentar la mayor actividad contra todas las cepas probadas, y fueron agregados a diferentes concentraciones a jugo de manzana, pera, y



melón, obteniendo reducciones significativas dependiente de la dosis, ya que para inhibir a *Salmonella enteritidis*, *E. coli* y *Listeria innocua* en jugo de manzana y pera se requirieron 2 µl/ml de los aceites seleccionados y en el caso del Melón entre 8 y 10 µl/ml.

Brandi *et al.*, en 2006, evaluaron el efecto antibacteriano del jugo de las hojas de *Brassica oleracea* sobre el crecimiento de bacterias enteropatógenas, mostrando efectividad al inhibir *Salmonella Enteritidis*, *E.coli* O157:H7, *E. coli* HB, *E.coli* no toxigénica, y *L. monocytogenes*, pero no mostró efecto contra *E. faecalis*. Los rangos de inhibición van desde la reducción de 1 log al emplear el 10% del jugo hasta 3 log con el 20% del jugo de *Brassica oleracea*.

Fisher y Phillips en 2006, investigaron la efectividad de los aceites esenciales y de algunos de los compuestos principales presentes en *Citrus limón*, *Citrus sinensis* y *Citrus bergamia* contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E.coli* O157:H7 y *C. jejuni*. Los resultados indican que en los de sobrevivencia, realizados en hojas de lechuga, el aceite esencial de *C. bergamia* resultó ser el mas activo contra las cepas probadas; estos resultados fueron similares a los obtenido en los ensayos con los compuestos aislados que son el citral y el linalool, en todos los casos se produjo una reducción de aproximadamente 6 log en los ensayos de sobrevivencia.

Valero y Frances, en 2006, evaluaron el efecto de las combinaciones de cinamaldehido, carvacrol y timol, sobre *Bacillus cereus*, *in vitro* y en un modelo alimenticio, ellos encontraron que al combinar 5 µl de cinamaldehido, 15 de carvacrol y 30 mg de timol por cada 100 ml de sopa de zanahoria inoculada con *Bacillus cereus*, el crecimiento del microorganismo fue completamente inhibido por mas de 60 días a 16 C, además el estudio de las propiedades organolépticas de la sopa de zanahoria, muestran que no se presentaron efectos adversos ni en el sabor ni en el aroma de la sopa y mas aún mencionan que el sabor fue mejorado.

En 2006 Sudhakar *et al.*, probaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las flores y hojas de *Cleome viscosa* y la raíz de *Gmelina asiática*, las dos plantas presentaron un alto espectro de actividad especialmente contra *E. coli*, *P.*

*vulgaris* y *P. aeruginosa*. Por otro lado, el extracto de las hojas de *C. viscosa*, mostró actividad antifúngica moderada.

García *et al.*, en 2006, probaron 32 extractos de plantas medicinales comúnmente utilizadas en México, de las cuales el extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* y *Acacia farnesiana* inhibieron efectivamente el crecimiento de 2 cepas de *V. cholerae*, presentando CMB's de entre 4-7 mg/ml dependiendo de la cepa probada. Además evaluaron concentraciones sub-inhedorias encontrando que concentraciones del 50 y 75% de la CMB inhibieron efectivamente la síntesis de enterotoxina y la adhesión a células CHO.

En 2006, Kuete *et al.*, realizaron extractos metanólicos de la planta *Tridesmostemon omphalocarpoides*, que es una planta utilizada en la medicina tradicional de Camerún. Los extractos fueron activos contra 9 microorganismos ensayados.

En 2007 Salud-Perez *et al.*, determinaron la actividad antimicrobiana de extractos clorofórmicos, metanólicos y acuosos de la corteza de 5 árboles, *Gymnanthes lucida*, *Gliricidia sepium*, *Lysiloma divaricata*, *Lysoma tergemina* y *Coccoloba cozumelensis*, contra *S. lutea*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *S. choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. pumillus*, *S. typhimurium*, *P. vulgaris*, *V. cholerae* y *C. albicans*. Los resultados indican que los extractos metanólicos de las especies de *Lysiloma* y de *G. sepium*, presentaron actividad antimicrobiana contra, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. pumillus*, y *V. cholerae*.

Molina-Salinas *et al.*, en el 2007, evaluaron el potencial antimicrobiano de 14 plantas utilizadas en el noreste de México para el tratamiento de infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Micobacterium tuberculosis*. Los resultados indican que el extracto metanólico de *Leucophyllum frutescens* y el extracto acetato de etilo de *Chrysanthina mexicana* fueron las más activas contra *M. tuberculosis*.

Hannan *et al.*, en 2008, evaluaron el efecto antimicrobiano de extractos metanólicos de la planta *Nigella sativa* contra especies de *Staphylococcus aureus*

resistentes a la meticilina, encontrando que todas las cepas probadas resultaron sensibles al extracto de *N. sativa*.

En el 2008, Gamboe *et al.*, realizaron extractos etanólicos de 74 plantas comunes en Phoenix Ar. De las cuales 4 fueron muy efectivas contra *S. aureus* y solo 1 contra *P. aeruginosa*.

También en el 2008, Moreno *et al.*, examinaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos y hexánicos de 30 plantas utilizadas en la medicina tradicional por 6 grupos nativos de Sonora, Mx. Los microorganismos evaluados fueron *S. typhimurium*, *Shigella flexneri* y dos cepas de *Escherichia coli*. Ellos encontraron que 15 extractos metanólicos presentaron actividad contra al menos una cepa bacteriana y además 6 de los extractos metanólicos fueron efectivos contra todas las cepas probadas.

Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, en el 2009 evaluaron el efecto del aceite del ajo elefante, contra varias cepas de *Vibrio cholerae*. Los resultados indican que el efecto antimicrobiano *in vitro* estuvo en un rango de entre 3.13-25 µg/ml, dependiendo de la cepa. Además cuando se evaluó su efecto en salchicha de cerdo, las cuentas de *V. cholerae* fueron reducidas a concentraciones de 1000 y 1500 ppm durante 5 días que duró en estudio.

También en 2009, Acharyya *et al.*, realizaron extractos metanólicos de 9 plantas utilizadas en la medicina tradicional Indú y los probaron contra 11 cepas de bacterias enteropatógenas incluyendo serotipos de *V. cholerae* multidroga-resistentes. Todos los extractos evaluados presentaron actividad contra al menos una de las cepas bacterianas probadas, destacando *Terminalia chebula* y *Syzygium cumini*, por inhibir todas las cepas incluyendo las cepas multidroga-resistentes de *V. cholerae*, presentando CMB's de entre 0.25-32 mg/ml.

En 2010, Valarmathy *et al.*, realizaron extractos etanólicos de las hojas de *Moringa oleífera*, *Musa paradisiaca*, *Azardiratica indica*, *Cynodon dactylon*, *Alternanthera sennilis*, y *Anisochilus carnosus*, para evaluar sus propiedades antimicrobianas contra *E. coli*, *B. subtilis*, *V. cholerae*, y *K. pneumoniae*. Los resultados

indican que el extracto etanólico de *Azardiratica indica*, presentó el mejor efecto antimicrobiano incluso mejor que la penicilina utilizada como control.

Shina, *et al.*, en 2010, evaluaron extractos realizados con éter de petróleo, cloroformo y etanol de las hojas de *Gymnema sylvestris*, contra bacterias Gram positivas como *B. subtilis*, *S. aureus* y *M. luteus*, y Gram negativas como *E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae* y *S. flexneri*. Los resultados de los ensayos indican que todos los tipos de extractos tuvieron actividad inhibitoria contra todas las cepas probadas, cuando se trabajaron a concentraciones mayores a 40 mg/ml.

Rahim, *et al.*, en 2010, demostraron que el extracto acuoso de *Psidium guajava* a 10 mg/ml inhibe completamente el crecimiento de cepas multiresistentes de *V. cholerae*, cuando se agrega al suero oral de rehidratación, por lo que los investigadores sugieren que este extracto ofrece un gran potencial como medicina tradicional en el tratamiento y control del cólera epidémico.

Chitemerere and Mukanganyama, en 2011, analizaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de 19 plantas en Zimbabwe, encontrando que al menos 8 extractos exhibieron actividad antimicrobiana, presentando CMB con rangos de 0.05-0.5 mg/ml, contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus*, y *B. subtilis*. Las plantas más activas fueron *Mangifera indica*, *Callistemon citrinus*, y *Vernonia adoensis*.

También en 2011, Biswas *et al.*, demostraron que el extracto etanólico de *Musa paradisiaca* fue efectivo para controlar el crecimiento de *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *S. typhi*, *V. cholerae*, y *S. flexneri* a una concentración de 500 µg/disco, presentando halos de inhibición de aproximadamente 10-12.45 mm.

Tamil *et al.*, en 2011, realizaron extractos metanólicos de hojas y semillas de *Bixa orellana* y los probaron contra *S. aureus*, *S. typhi*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *V. cholerae*, *M. catarrhalis*, *Acinetobacter* sp, *Brucella* sp, *C. albicans*, *A. niger*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados indican que el extracto de las hojas a una concentración de 1000 µg/ml, presentó actividad antimicrobiana contra todas las cepas bacterianas y fúngicas, en especial contra *S. typhi*, *Acinetobacter* sp, *T.*

*mentagrophytes* y *T. rubrum*, por su parte el extracto de semilla resultó ser menos efectivo que el de las hojas. La CMI del extracto de hojas fue en promedio de 31.25 µg/ml contra las bacterias probadas.

Geetha *et al.*, en 2011, realizaron extractos etanólicos y acuosos de *Acacia catechu*, para evaluarlos contra *S. typhi*, *S. flexneri*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*, los resultados muestran que todas las concentraciones evaluadas (100, 150 y 200 µg/ml) de los extractos acuosos y etanólicos fueron efectivas para inhibir el crecimiento de todas las cepas probadas.

### **6.3 Aislamiento e identificación de compuestos naturales**

Existe un marcado interés en la investigación sobre los productos naturales. Y en la actualidad con el entendimiento en la fitoquímica y el desarrollo de las técnicas de separación y de las técnicas de espectrofotometría la investigación en este campo ha proveído nuevos escalafones en el descubrimiento de compuestos naturales con actividad biológica (Sarker *et al.*, 2005).

Muchos reportes indican que este tipo de descubrimientos fitoquímicos, representan una fuente invaluable de nuevos compuestos bioactivos, y ciertamente los productos naturales juegan un papel crucial en el cumplimiento de la demanda actual de productos mas naturales, por lo que se requiere de mas investigación ya que muchas de estas aplicaciones permanecen aún inexploradas (Cragg *et al.*. 2001).

En el año 2000, Longanga *et al.*, determinaron los principales compuestos presentes en 6 plantas medicinales de uso común el área de Lomela, Congo. Encontrando que presentaban taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroides, triterpenos y azúcares reductores, además determinaron que tres de las plantas que presentaron en mayor cantidad flavonoides y taninos fueron las que presentaron mayor actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las hojas, raíces y corteza de la planta *Symplocos cochinchensis*, fue evaluada por Khan *et al.*, en 2001,

encontrando que todos los extractos presentaron un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además realizaron el fraccionamiento secuencial de los extracto metanólicos encontrando que la actividad antimicrobiana se incrementaba conforme se realizaban semipurificaciones. No hubo actividad de los extractos contra hongos filamentosos.

En 2001 Ramesh *et al.*, determinaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de raíz de la planta *Drynaria quercifolia* el cual mostró un gran espectro de actividad dosis dependiente, además lograron aislar 6 compuestos principales como friedelina, epifriedelinol, beta-amyrina, beta-sitosterol, beta-sitosterol-3-beta-D-glucopyranosido y naringina.

Cottiglia *et al.*, en 2001, evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la planta *Daphne gnidium*, mostrando actividad contra *Bacillus lentus* y *E. coli*. Además evaluaron la actividad de 4 coumarinas y 7 flavonoides presentes en el extracto metanólico siendo la daphnetina, genkwanina y 2,5,7,4-tetrahydroxyisoflavonol, los mas activos.

Thangadurai *et al.*, en 2002 caracterizaron los componentes del aceite esencial de la planta *Decalepsis hamiltonii* y encontraron que estaba constituido principalmente por 2-hidroxy-4-metoxibenzaldehido, 4-O-metilresorcilaldehido, alcohol bencílico, y alpha-atlantone. Estos exhibieron fuerte actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *bacillus megaterium*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *M. roseus* y *S. aureus*.

En 2002 Friedman *et al.*, evaluaron la eficacia antimicrobiana de aceites esenciales y de sus constituyentes principales aislados, sobre *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. entérica*. Los resultados indican que de 96 aceites esenciales y 23 compuestos aislados, 27 aceites y 12 compuestos fueron efectivos en inhibir el crecimiento de las cuatro cepas ensayadas. Los aceites mas activos contra *C. jejuni* fueron los de clavel, jengibre, jazmín, patchouil, gardenia, cedro, semilla de zanahoria, semilla de apio, artemisa, nardo, naranja agria, los cuales presentaron valores de BA50 (actividad bactericida del 50%) de entre 0.003-0.009. En el caso de *E. coli* los aceites mas efectivos fueron el de orégano, tomillo, canela, laurel, palmarosa, clavo, zacate

limón y pimienta de Jamaica los cuales presentaron una BA50 de entre 0.046-0.14. Para *L. monocytogenes* el aceite de gardenia, cedro, laurel, clavo, orégano, canela, pimienta de Jamaica, tomillo y patchuli presentaron una BA50 de entre 0.057-0.092 y para *S. Enterica* el tomillo, orégano, canela, calvo, pimienta de Jamaica, laurel, palmarosa y mejorana con BA50 de 0.045-0.14. Con respecto a los compuestos aislados los que tuvieron actividad contra todas las cepas fueron cinamaldehído, estragol, carvacrol, eugenol y timol.

En 2003 Khan y Omoloso, realizaron particiones secuenciales de *Petrocarpus indicus* utilizando éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, butanol y metanol, y al evaluar las propiedades antimicrobianas de las fracciones obtenidas se encontró que todas exhibieron un amplio espectro de actividad. Ninguna fue efectiva contra hongos filamentosos.

Dadalioglu y Evrendilek, en 2004, determinaron la composición y los efectos inhibitorios del aceite esencial del orégano turco, encontrando carvacrol, 1,8-cineole, fenchone y trans-anetole, todos ellos mostraron actividad inhibitoria muy fuerte.

En el año 2004, Chorianopoulos *et al.*, determinaron los componentes principales de los aceites esenciales del orégano, timol y satureja, encontrando como principales componentes a varios monoterpenos hidrocarbonados y a compuestos fenólicos, el ensayo antimicrobiano arrojó como resultado que solo se necesitan 5µl de los aceites esenciales para causar un remarcable efecto antimicrobiano.

Wart *et al.*, en 2004, mencionó que al obtener fracciones solubles en diferentes solventes mediante la purificación del extracto etanólico de *Piper porphyrophyllum*, la actividad antimicrobiana se incrementó, especialmente en la fracción soluble en agua.

También en el 2004, Skocibusic y Bezic, realizaron un estudio donde aislaron los principales componentes de las plantas *Satureja montana* y *S. cuneifolia*, encontrando que para la primera los principales compuestos aislados fueron carvacrol, p-cimeno, borneol, timol entre otros y para la segunda beta-cubebeno, limoneno y alpha-pineno, y al evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos, estos mostraron gran actividad antimicrobiana contra cepas como *E. coli* y *S. aureus*.

En ese mismo año Maatta-Riihinen *et al.*, (2004), Utilizaron HPLC-MS para determinar los compuestos fenólicos presentes en la frambuesa, en la fresa y en la zarzamora encontrando que la quercetina fue uno de los compuestos mas abundantes además se encontró ácido elágico y ácido gálico, y según la literatura todos estos son responsables de las propiedades antimicrobianas de los extractos de plantas.

De Leo *et al.*, en 2004, aislaron 8 compuestos fenólicos de la planta *Baseonema acuminatum*, y evaluaron las propiedades antimicrobianas de todos ellos. Los resultados muestran que tres de los compuestos nuevos mostraron actividad antifúngica contra 3 especies de *C. albicans* mostrando MIC de 25-100 µg/ml, otro compuesto resultó ser el mas efectivo inhibiendo a dos cepas de *C. albicans* pero a una concentración de 12.5-25 µg/ml y los menos efectivos fueron cuatro , que presentaron inhibición muy reducida de las cepas de *C. albicans*. Ninguno de los aislados presentaron actividad contra bacterias.

Puupponen-Pima *et al.*, en 2005, determinaron que los compuestos fenólicos presentes en frutos como la fresa, el arándano y la frambuesa, presentan actividad inhibitoria selectiva contra patógenos gastrointestinales de humanos como *Salmonella* y *Staphylococcus*. Determinado que las elagitaninos, tienen fuertes propiedades antimicrobianas

En el 2006, Hazzit *et al.*, determinaron la composición del aceite esencial del orégano y del tomillo oriundos de la región de Algeria en el norte de África, encontrando como componentes principales p-cimeno, gama-terpineno, timol, y carvacrol, además cuando se evaluaron sus propiedades antimicrobianas mostraron muy buena actividad inhibitoria, menos con las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* las cuales presentaron cierto grado de resistencia.

En este mismo año, Pereira *et al.*, determinaron la composición fenólica y las propiedades antimicrobianas de diferentes aceitunas, los resultados mencionan que se identificaron 7 compuestos, hidroxitirosol, tirosol, 5-O-cafeoilquinic, verbascosido, luteolin 7-O-glucosido, rutin y luteolin. Todas las fracciones presentaron actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa*.



Ooi, *et al.*, en el 2006, determinaron que el cinamaldehido es el principal componente de la planta *Cinnamomum cassia*, la cual se utiliza en la medicina tradicional China, además evaluaron el efecto antimicrobiano tanto del extracto como del compuesto aislado, contra bacterias Gram positivas y Gram negativas además de 4 especies de levaduras, 4 hongos filamentosos y 3 dermatofitos, encontrando que ambos fueron capaces de inhibir a todos los microorganismos probados arrojando CMI's con rangos de 75-600 µg/ml, para las bacterias, 100-450 µg/ml para las levaduras, 75-150 µg/ml para los hongos filamentosos y por último 18.8-35.5 µg/ml para los dermatofitos.

Kuete *et al.*, en 2007, aislaron 9 compuestos del extracto metanólico de la planta *Vismia laurentii*, determinando la actividad antimicrobiana tanto del extracto metanólico como de los compuestos aislados contra 6 especies de bacterias Gram positivas y 12 de Gram negativas encontrando que los valores de MIC fueron de 19 µg/ml para el extracto y de 1.2 µg/ml para los compuestos aislados.

Tambien en 2007, Kuete *et al.*, aislaron 8 compuestos de la planta *Treculia obovoidea* determinando que los compuestos aislados que presentaron actividad antimicrobiana fueron presentando valores de MIC muy por debajo de los obtenidos con el extracto crudo.

Hernández *et al.*, en 2007, evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cordia curassavica*, que es una planta utilizada en la medicina tradicional de México para tratar diversas enfermedades entre ellas las gastrointestinales, el aceite esencial mostró buena actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, además se aislaron e identificaron los compuestos del aceite esencial, encontrando 4 como los principales incluyendo 4-methyl, 4-ethenil-3-(1-methyl ethenyl)-1-(1-methyl metanol) ciclohexano, beta-eudesmol, spathulenol y cadina dieno.

En el 2008, Avila-Sosa *et al.*, evaluaron fracciones obtenidas del orégano Mexicano, las cuales fueron evaluadas contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus*. Las fracciones fueron obtenidas por diferencias en polaridad y separadas como fenólicas y no-fenólicas. La fracción fenólica fue la que presentó mayor actividad contra los

microorganismos probados y solo una fracción no-fenólica presentó actividad contra *B. cereus*.

Kuete *et al.*, pero ahora en 2008, realizaron el aislamiento de flavonoides de las plantas *Ficus cordata* y *Ficus chlamydocarpa*, los compuestos fueron identificados por HPLC-MS, y encontraron que la laburnetina, fue el compuesto que presentó mayor actividad contra las cepas probadas incluyendo a *Mycobacterium tuberculosis*.

En 2009, Savikin *et al.*, utilizaron HPLC para el aislamiento de los compuestos presentes en extractos metanólicos de *Gentiana lutea*, determinando que los compuestos aislados, mangiferina, isogentisina y gentiopicrina así como el extracto completo presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, obteniendo valores de MIC en rangos de 0.12-0.31.

En el 2010, Elavazhagan y Arunachalam, realizaron un estudio fitoquímico y antibacteriano, de la semilla de *Memecylon edule*, donde realizaron extractos consecutivos con hexano, cloroformo, acetato de etilo y etanol, encontrando que el extracto clorofórmico y con acetato de etilo fueron los mas efectivos para inhibir las cepas bacterianas probadas, incluyendo a *V. cholerae*. El análisis fitoquímico mostró la presencia de compuestos fenólicos y triterpenos que al parecer son los responsables de la actividad antimicrobiana.

#### **6.4 Mecanismos de acción de compuestos fitoquímicos**

Los mecanismos de acción de los fitoquímicos están definidos de acuerdo a la acción en la estructura bacteriana. Entre los niveles de interacción se encuentran: 1) interacción con componentes celulares externos e 2) interacción con componentes citoplasmáticos (Neidhardt *et al.*, 1990).

Interacción con componentes celulares externos

El fenómeno de la impermeabilidad celular es particularmente importante en la resistencia a fitoquímicos por bacterias Gram-negativas y micobacterias. Se ha

observado que la presencia de una membrana exterior en Gram negativas que posee gran cantidad de lípidos, dificulta la entrada y acción de compuestos hidrofílicos (Neidhardt *et al.*, 1990). Por lo que uno de los principales efectos de los fitoquímicos que se han reportado en la célula bacteriana, es producir un cambio en la hidrofobicidad celular.

Los compuestos fenólicos son hidrofóbicos por naturaleza y son activos contra membranas. Se ha demostrado que los aceites esenciales de plantas (orégano, tomillo y árbol del té) o con sus constituyentes fenólicos (carvacrol, eugenol y timol) actúan contra patógenos bacterianos y levaduras, de modo que estos compuestos perturban la membrana celular resultando en una pérdida en el control quimiosmótico y por lo tanto la muerte celular (Lambert *et al.*, 2001).

Algunos fitoquímicos tales como los fenoles, alcoholes y bisbiguanidas son pequeñas moléculas que se ha visto pueden penetrar a la célula con facilidad. Las bacterias Gram positivas son generalmente sensibles a esta clase de agentes antimicrobianos (Rusell *et al.*, 1999).

Está bien establecido que al desestabilizar la membrana citoplasmática se altera la barrera de la permeabilidad originando la liberación de componentes intracelulares, potasio, fosfatos inorgánicos, proteínas y ácidos nucleicos, lo cual se refleja en un efecto bacteriostático (Lambert and Hammond, 1973). También puede haber disipación de protones, lo cual altera el transporte activo, fosforilación oxidativa y por consiguiente la síntesis de ATP en bacterias (Hugo, 1978).

#### Interacción con constituyentes citoplásmicos

##### *Ribosomas.*

Los ribosomas son responsables de la traducción de ARN mensajero. Algunos fitoquímicos (como el peróxido de hidrógeno y la proflavina) pueden actuar sobre ribosomas (Miall *et al.*, 1967). Además se ha encontrado que la proflavina inhibe la síntesis de polinucleótidos en *E. coli* (Kadohama *et al.*, 1971).

Los avances en el entendimiento y comprensión del modo de acción de los antimicrobianos naturales, y en las aplicaciones experimentales necesarias para evidenciar la bioactividad de los extractos de plantas y de sus compuestos aislados, son imprescindibles tanto para lograr su aplicación como conservadores naturales de alimentos, particularmente para el uso potencial en sistemas que emplean tecnologías de múltiples barreras. (Fitzgerald *et al.*, 2005), así como para incrementar la probabilidad de encontrar nuevos antimicrobianos terapéuticos (González-Lamonte *et al.*, 2009).

Uno de los primeros reportes del mecanismo de acción de compuestos naturales aislados de plantas lo realizó Korhonen en 1980, donde menciona que los isotiocianatos afectan la función de las enzimas que presentan aminoácidos con grupos sulfhidrilos, causando una inhibición de su poder catalítico. Además trabajó con el compuesto alil-isotiocianato, encontrando que el efecto antibacteriano se debe a la acción de dicho compuesto sobre la membrana microbiana causando pérdida de metabolitos celulares inhibiendo el crecimiento de la bacteria en cualquier etapa de su desarrollo.

En 1984, Conner y Beuchat, mencionaron que el mecanismo de acción antimicrobiano del aceite esencial del orégano puede ser debido al efecto de sus componentes como el carvacrol y timol, sobre sistemas enzimáticos incluyendo a aquellas involucradas en la producción de energía, tiempo después en 1991, Denyer y Hugo, determinaron que el aceite esencial del orégano impacta directamente a la membrana celular, afectando proceso como la permeabilidad y la fuerza protón motriz, causando la inhibición del microorganismos.

En 1999 Haraguchi *et al.*, demostraron que las retrocalconas aisladas de la raíz de *Glycyrriza inflata* mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas. En su estudio encontraron que estos compuestos causan una oxidación de NADH en la membrana bacteriana, afectando los citocromos de la cadena transportadora de electrones e inhibiendo el consumo de oxígeno en bacterias susceptibles.

Trombetta *et al.*, en 2002, determinaron el mecanismo de acción antibacteriana de compuestos del grupo de los alpha, beta-aldehidos insaturados. Ellos evaluaron la

liberación del compuesto carboxyfluoresceína atrapado en liposomas de fosfatidilcolina. Los resultados muestran que con excepción de uno (hexanal) todos causaron liberación de carboxyfluoresceína de los liposomas.

Kim *et al.*, en el 2004, reportaron que la alicina, compuesto aislado del ajo, afecta el metabolismo microbiano inactivando las proteínas que presentan grupos –SH, oxidando los grupos “tiols” y transformándolos a enlaces disulfuros (S-S). Existiendo una inhibición competitiva con los grupos sulfhidrilos de la cisteína y del glutatión.

De Leon *et al.*, en 2005, aislaron el compuesto 6-oxofenolico triterpenoide de la planta *Maytenus blepharodes* y demostraron que el efecto antimicrobiano se debe a la inhibición de la síntesis de la pared celular, esto lo observaron por la inhibición total de la incorporación del precursor acetil-d-(1-<sup>14</sup>C) glucosamina.

En el mismo año, Lin *et al.*, determinan que cuando se aplica una mezcla de extractos con alto contenido de compuestos fenólicos, como el orégano y el arándano, las propiedades antimicrobianas de la mezcla se incrementan de manera sustancial, además realizaron un estudio donde determinan que la inhibición de *Helicobacter pylori*, se debe a que los extractos alteran la producción de energía mediante la inhibición de la enzima prolin-deshidrogenasa la cual está presente en la membrana citoplásmica del microorganismo además mencionan que existe una marcada inhibición de la ureasa lo cual también afecta al microorganismo.

En el 2005, Fitzgerald *et al.*, trabajaron con la vainilla, compuesto aislado del aceite de vainilla, encontrando que este compuesto es activo principalmente contra la membrana, causando disipación del gradiente de iones y por consiguiente inhibiendo la respiración celular.

En el 2006, Oussalah *et al.*, determinaron el mecanismo de acción antimicrobiano de los aceites esenciales de *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia* y *Satureja montana*, encontrando que todos los aceites esenciales probados afectaron la integridad de la membrana bacteriana y además fueron capaces de inducir la pérdida de ATP

intracelular y reducir significativamente el pH intracelular de *E. coli* 157:H7 y *L. monocytogenes*.

Nohynek *et al.*, demostraron en el 2006, el modo de acción antimicrobiano de compuestos fenólicos aislados de la frambuesa y de la fresa, los compuestos son del grupo de los elagitaninos, los cuales son capaces de desintegrar literalmente la membrana de diferentes cepas de *Salmonella*, esto lo determinaron por la liberación al medio de C<sup>14</sup> galactosa-LPS. Tiempo después lo mismo se demostró para *E. coli*.

Gill y Hooley en 2006, determinaron que la actividad antimicrobiana de compuestos aislados de plantas como el eugenol, carvacrol y cinamaldehído afectan la viabilidad de la membrana de microorganismos. Además causan rápida utilización de ATP celular y liberación del mismo, además causan permeabilidad no específica de la membrana citoplásmica.

En un estudio realizado por Brijesh *et al.*, en 2006, donde realizaron extractos acuosos de *Pongamia pinnata*, se evaluaron la actividad antimicrobiana además de la capacidad de colonización y producción de toxinas por microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales. Los resultados indican que los extractos no presentaron actividad antimicrobiana, sin embargo, se observó una marcada reducción de la producción de enterotoxina de *V. cholerae* además de afectar la adhesión de *E. coli* a células epiteliales de intestino.

Sharma *et al.*, en 2009, realizaron extractos acuosos, metanólicos, acetónicos y etanólicos, encontrando que el extracto etanólico fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana presentando CMI de 2.5-20 mg/ml, además utilizando HPLC lograron aislar e identificar el ácido gálico, presente en los extractos etanólicos de *Syzygium cumini*, *Lawsonia inermis* y *Terminalia bellerica*, el cual proponen como responsable de la inhibición de *V. cholerae*

Sánchez *et al.*, en 2010, demostraron que los extractos metanólicos de nopal, huizache, estafiate y albahaca, afectan la viabilidad de la membrana, disminuyen el pH intracelular, afectan el potencial de membrana causando hiperpolarización y despolarización de la misma de acuerdo al extracto probado además de disminuir la

síntesis de ATP, de *V. cholerae*, cuando se utilizan concentraciones de 10X la CMB, causando la pérdida de homeostasis celular y por lo tanto la muerte del microorganismo.

Desde hace tiempo se ha trabajado en nuestro laboratorio en la búsqueda de extractos de plantas con actividad contra bacterias enteropatógenas. A la fecha se han analizado más de 500 plantas, habiendo encontrado resultados satisfactorios con varias de éstas, sin embargo, en 3 de ellas, los resultados han sido muy alentadores. Hemos establecido que extractos de *Haematoxylon brasiletto*, *Acacia farnesiana* y *Artemisia ludoviciana* actúan inhibiendo el crecimiento de *Vibrio cholerae* y *C. perfringens* (Alarcón Flores, 2002 y Araiza Mendoza, 2001), aún mas, se estableció que cuando concentraciones menores a la concentración mínima bactericida (CMB) de estos extractos se agregaban a los microorganismos, provocaban la inhibición de la producción de sus toxinas (García *et al.*, 2005a y Garcia *et al.*, 2002). Para el caso de *H. brasiletto* se ha establecido que el compuesto responsable de tal actividad es un dímero de brasileína, el cual es de característica polifenólica (por publicarse).

## 7. MATERIAL Y METODO

### 7.1 Material vegetal y preparación de los extractos

#### 7.1 Material vegetal.

La mayoría de las plantas utilizadas en este trabajo fueron adquiridas en supermercados del área metropolitana de la ciudad de Monterrey N.L. con excepción del Huizache y el Mezquite los cuales fueron colectados en los jardines de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y del Nopal que fue obtenido del campo experimental de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas utilizadas en el transcurso de esta investigación.

Nombre Común	Nombre Científico	Parte Utilizada
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> (L.)	Toda la Planta
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i> (L.)	Toda la Planta
Anís	<i>Tagetes filifolia</i> (Lag.)	Fruto
Arándano	<i>Vaccinium macrocarpon</i> (Ait.)	Fruto
Cacahuete	<i>Arachis hypogaena</i> (L.)	Fruto
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i> (L.)	Fruto
Camote	<i>Ipomoea batatas</i> (L.)	Fruto
Chicozapote	<i>Manilkara zapota</i> (L.)	Fruto
Chile Poblano	<i>Capsicum annuum</i> (L.)	Fruto
Ciruella	<i>Prunus salicina</i> (L.)	Fruto
Coco	<i>Cocos nucifera</i> (L.)	Fruto
Colinabo	<i>Brassica napus</i> (L.)	Raíz
Durazno	<i>Prunus persica</i> (L.)	Tallo y Hojas
Esparrago	<i>Asparagus officinalis</i> (L.)	Fruto



Estafiate	<i>Artemisia ludoviciana</i> (Nutt.)	Toda la Planta
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i> (L.)	Fruto
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	Ramas
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i> (Planch.)	Fruto
Mango	<i>Mangifera indica</i> (L.)	Fruto
Melón	<i>Cucumis melo</i> (L.)	Fruto
Mezquite	<i>Prosopis glandulosa</i> (Torr.)	Ramas
Nopal	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.)	Cladodios
Palma china	<i>Yucca filifera</i> (Chabaud.)	Flor
Piña	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	Fruto
Uva	<i>Vitis labrusca</i> (L.)	Fruto
Yerbabuena	<i>Mentha spicata</i> (L.)	Toda la Planta
Zacate Limón	<i>Cymbopogon citratus</i> (Stapf.)	Tallo y Hojas

Todas las plantas fueron secadas en una estufa de recirculación de aire a 50°C (Novatech) para posteriormente ser trituradas en un molino para grano marca Molino del Rey.

### 7.1.2 Preparación de los extractos.

Para la obtención de los extractos, 100 g de planta seca y triturada fueron colocados en frascos de vidrio con tapón de rosca a los cuales se les agregaron 500 ml de agua destilada (dH<sub>2</sub>O), etanol al 96% (EtOH) o metanol absoluto (MeOH). Los extractos acuosos fueron macerados durante 16 h a 4°C y por otro lado los extractos alcohólicos fueron macerados durante 24 h a temperatura ambiente. Después del periodo de maceración tanto los extractos acuosos como los alcohólicos fueron filtrados utilizando papel Whatman no. 1. Los filtrados fueron después concentrados en un rotavapor (Buchi R3000) hasta sequedad. Los extractos secos fueron subsecuentemente resuspendidos en no más de 15 ml del solvente utilizado para la extracción primaria (dH<sub>2</sub>O, EtOH o MeOH). Todos los extractos concentrados fueron esterilizados mediante filtración

utilizando membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore), y almacenados a 4°C (por no más de 12 semanas) en viales ámbar hasta su uso. Durante el periodo de almacenamiento en refrigeración la actividad de los extractos fué evaluada mensualmente (Sánchez *et al.*, 2010).

## **7.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.**

En este estudio fueron utilizadas dos cepas de microorganismos Gram negativos: *Vibrio cholerae* clásica O1 cepa 569-B y *V. cholerae* El Tor O139 cepa AI-1837, las cuales fueron donadas por la Dra. Elisa Elliot de la Food and Drug Administration (FDA), Washington DC. Además de dos Gram positivos: *Clostridium perfringens* FD-1041 y *C. perfringens* FD-1, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Ronald G. Labbé del Department of Food Science, University of Massachusetts, Boston US.

Las cepas de *V. cholerae* fueron mantenidas en tubos con Agar Luria-Bertani (Difco) a temperatura ambiente, realizando resiembras periódicas cada dos meses. Para la activación de cada una de las cepas se tomó una asada del medio de reserva y se sembraron en 5 ml de Caldo Luria-Bertani. Los tubos fueron incubados durante 18 h a 37°C. Además las cepas fueron conservadas en alícuotas de 0.5 ml de caldo LB en ultracongelación a -80°C utilizando glicerol como crioprotector y para recuperar los cultivos se tomó una asada del medio congelado y se sembraron por estría simple en placas con agar LB, las placas fueron incubadas 24 h a 37°C.

Para el caso de *C. perfringens*, las esporas de ambas cepas fueron mantenidas en medio de carne cocida (Difco) en un congelador a -20°C y para la activación de las cepas, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se sembraron 3 gotas del medio de reserva descongelado, en tubos con 5 ml de Caldo Tioglicolato (Bioxon), después de esto se les aplicó un choque térmico de 75°C por 15 min, para ayudar a la germinación de las esporas. Los tubos fueron incubados durante 18 h a 37°C.

## **7.3 Evaluación preliminar de actividad antimicrobiana.**

Para evaluar en forma preliminar el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas previamente obtenidos, sobre el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el método de difusión del pozo en agar (García *et al*, 2006). Para el caso de *V. cholerae*, el método utilizado consistió en sembrar por extensión, con la ayuda de un asa de Driglasky, 100 µl de las cepas activadas, sobre placas Petri con agar Luria-Bertani. Posteriormente se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo Durham invertido (aprox. 6 mm de diámetro) y el agar fue retirado con la ayuda de una espátula estéril. En cada pozo se agregaron 100 µl de los extractos a evaluar; como control se agregó a uno de los pozos 100 µl del solvente en el cual iban resuspendidos los extractos. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24h. Y para *C. perfringens* se utilizó la misma metodología, con la variante de utilizar Agar para Cuenta en Placa (Bioxon) en lugar de Agar LB, además de que las placas fueron sembradas por difusión e incubadas en una olla de anaerobiosis con atmósfera modificada 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de Nitrogeno, de igual forma se incubaron a 37°C por 24h.

El efecto antimicrobiano del extracto se evidenció mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo. De todas las plantas probadas se seleccionaron aquellas que presentaron dicha inhibición, para realizar los ensayos posteriores.

#### **7.4 Determinación del peso seco de los extractos con actividad antimicrobiana**

Para obtener el peso seco de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana en la evaluación preliminar, se tomó 1ml de cada uno de ellos y se colocaron en tubos de ensaye previamente tarados; estos fueron colocados en una estufa a 50°C hasta obtener de nuevo un peso constante. Después se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la concentración del extracto (García *et al.*, 2005) en mg/ml según la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco (mg/ml)} = \text{Peso del tubo con el extracto} - \text{Peso del tubo tarado}$$

#### **7.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).**

Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el método propuesto por Sánchez *et al.*, 2010 en el cual para las cepas *V. cholerae*, se utilizaron tubos con 2 ml de caldo Luria Bertani (LB), y para las cepas de *C. perfringens* tubos con 2 ml de caldo Tioglicolato (Bioxon). A cada uno de los tubos agregaron diferentes concentraciones de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana y a los cuales se les determinó el peso seco. Después los tubos fueron inoculados con 20 µl del microorganismo ajustado a una concentración final aproximada de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Los cultivos se incubaron a 37°C por 24h, considerando que para el caso de *C. perfringens* la incubación se llevó a cabo en una olla de anaerobiosis con atmósfera modificada a 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de Nitrógeno, como previamente se mencionó. Trascurrido este tiempo, se tomaron 100 µl de cada tubo que no presentara crecimiento aparente y se realizó una siembra por extensión en placas de agar Luria-Bertani para *V. cholerae* y ACP para *C. perfringens*. Como controles se utilizaron dH<sub>2</sub>O, EtOH, MeOH y Tetraciclina. Las placas se incubaron de acuerdo a la metodología antes descrita. Pasado el tiempo de incubación se determinó la CMB la cual se definió como la concentración mas baja del extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano.

#### **7.6 Determinación del efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de *V. cholerae* y *C. perfringens*.**

Para esto se utilizaron concentraciones del 25, 50 y 75% de la CMB previamente determinada. Dichas concentraciones se colocaron en tubos con caldo LB y Tioglicolato, dependiendo del género bacteriano probado. Después de inocular los medios con las concentraciones subletales se incubaron por 24h a 37°C. Para el conteo microbiano se tomó una alícuota de 100µl y se realizaron diluciones decimales seriadas con solución salina fisiológica estéril (0.85% NaCl) (Ravishankar *et al.*, 2008), de cada dilución se tomó una alícuota (100 µl) y se realizó una siembra por extensión en los medios y condiciones de incubación previamente descritas. Pasado el tiempo de incubación se contaron las colonias y el resultado se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Como controles de crecimiento se utilizaron las cepas que no tuvieron

contacto con el extracto (control) y las cepas incubadas con el solvente utilizado para los extractos (blanco).

## **7.7 Determinación del sitio blanco de acción antimicrobiana**

### **7.7.1 Ensayo para determinar la integridad de la membrana bacteriana**

La integridad de la membrana bacteriana fue determinada utilizando el LIVE/DEAD BacLight Kit (Molecular Probes, Eugene, Or). Para esto se utilizaron concentraciones de los extractos, iguales o superiores a la CMB (1X, 5X, 10X y 20X la CMB) las concentraciones superiores a la CMB se utilizaron para asegurar la detección de los cambios en la integridad de la membrana en un corto periodo de tiempo. La metodología se realizó de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor del Kit, donde se menciona que los colorantes fluorescentes Ioduro de Propidium y Syto 9 deben ser mezclados en proporciones iguales. Para esto se realizó un stock mezclando 3  $\mu$ l de cada uno de los colorantes, la cual fue agregada a 1 ml del cultivo tratado con las concentraciones de los extractos mencionadas anteriormente. Los cultivos se dejaron en oscuridad durante 15 min, para posteriormente tomar 5  $\mu$ l y colocarlos en un portaobjetos, inmediatamente después se colocó el cubreobjetos correspondiente y se realizaron observaciones utilizando un microscopio de fluorescencia (Axioskop 40, Carl Zeiss) equipado con un juego de filtros que simultáneamente detecta los dos fluorógenos en la mezcla (Silva *et al.*, 2008).

### **7.7.2 Determinación del pH citoplásmico ( $pH_{in}$ )**

Para la determinación del  $pH_{in}$ , se utilizó la sonda fluorescente carboxyfluoresceína diacetato succinimidyl ester (cFDA-SE; Molecular Probes, Eugene, OR), y para esto se utilizaron tubos con 5 ml de caldo LB para *V. cholerae* y de Tioglicolato para *C. perfringens*. Los tubos fueron inoculados al 1% con las cepas previamente activadas, y posteriormente fueron nuevamente incubados a 37°C durante 3 horas. Después del periodo de incubación las células fueron cosechadas por

centrifugación a 1,500 X g durante 10 min, posteriormente fueron lavadas con 10 ml de amortiguador HEPES 50 mM con EDTA al 5mM, pH 8. El paquete celular fue resuspendido nuevamente en 10 ml del mismo amortiguador al cual se le agregó la sonda fluorescente cFDA-SE al 1  $\mu$ M. Las células junto con la sonda fueron incubadas durante 10 min a 37°C, después de la incubación se realizó un lavado por centrifugación con amortiguador de fosfatos 50 mM con MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7, posteriormente la células fueron resuspendidas en 10 ml del mismo amortiguador. Por último se realizó una incubación durante 30 min a 37°C con glucosa a una concentración final de 10 mM, para eliminar la sonda que no fue incorporada a la célula (Breeuwer *et al.*, 1996).

Para el ensayo de determinación del pH<sub>in</sub>, se tomaron 3 ml de las células cargadas con la prueba fluorescente y se colocaron en cubetas de poliestireno (VWR, West Chester, PA), posteriormente las cubetas fueron colocadas en un espectrofluorometro (VersaFluor, BioRad, Hercules CA), y por último se agregaron los extractos a una concentración final de 10X la CMB. La fluorescencia fue medida inmediatamente después de agregar los extractos y cada minuto durante los siguientes 10 min, utilizando una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Después de transcurridos los 10 min del ensayo, las células fueron filtradas a través de una membrana de nitrocelulosa (Millipore) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ l, para posteriormente obtener la fluorescencia del sobrenadante y restársela a la primer lectura (Breeuwer *et al.*, 1996).

Por último para cuantificar las variaciones en el pH<sub>in</sub>, se realizó una curva de calibración, utilizando células de *V. cholerae* y *C. perfringens*, marcadas con cFDA-SE, para esto se utilizaron amortiguadores de glicina (50 mM), ácido cítrico (50 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O (50 mM) y KCl (50 mM), todos ajustados a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10), la fluorescencia fue registrada después de equilibrar el pH<sub>in</sub> y el pH<sub>ext</sub>, con la adición de valinomicina (1  $\mu$ mol/L; Sigma-Aldrich) y nigericina (1  $\mu$ mol/L; Sigma-Aldrich) (Breeuwer *et al.*, 1996).

### **7.7.3 Determinación Fluorométrica del Potencial de Membrana**

Para esto se utilizaron tubos con 3 ml de caldo LB para *V. cholerae* y de Tioglicolato para *C. perfringens*. Ambos medios fueron preparados al 0.5X e inoculados al 1%, después del periodo de incubación (37°C/18h), los cultivos fueron ajustados aproximadamente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Después de esto, se agregó la sonda fluorescente sensible a los cambios en el potencial de membrana denominada, bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (Molecular Probes, Eugene, OR) a una concentración de 1 mM, los tubos fueron incubados por 5 min para posteriormente agregar los extractos a una concentración de 10X la CMB. Después de incubarlos por 5 minutos adicionales, se registraron las lecturas con la ayuda de un espectrofluorometro (VersaFluor, BioRad, Hercules CA), utilizando una longitud de onda de excitación y emisión de 492 nm y 515 nm. En este caso también se corrigieron las lecturas, restando la fluorescencia obtenida del sobrenadante de la forma que se explicó anteriormente (Pag *et al.*, 2004).

#### **7.7.4 Ensayo de bioluminiscencia para determinación de ATP celular**

La determinación de ATP se realizó mediante el Kit de bioluminiscencia ENLITEN (Promega, Madison, WI). En este caso cultivos de *V. cholerae* previamente activados (18h de incubación) fueron inoculados en tubos con 5 ml de caldo LB, después de esto se incubaron por 3.5h adicionales hasta alcanzar una densidad celular de  $1 \times 10^7$ , posteriormente se agregaron los extractos a una concentración de 10X la CMB y se incubaron por 15 min. Después de esto se tomaron 0.5 ml de los cultivos a los cuales se les agregaron 250  $\mu$ l de ácido perclórico frío al 24% (vol/vol). La mezcla se mantuvo en hielo por 20 min para después ser centrifugada a 10,000 X g por 5 min. Los sobrenadantes (500  $\mu$ l) fueron separados y neutralizados con 125  $\mu$ l de KOH 4N, para después colocarlos en hielo durante 30 min. La cuantificación del ATP se llevó a cabo tomando 50  $\mu$ l del sobrenadante los cuales fueron colocados en placas blancas de 96 pozos (Nunc, Copenhagen, Denmark), posteriormente a cada pozo se les agregaron 100  $\mu$ l de Tris 10 mM, pH 8, y por último se agregaron 100  $\mu$ l, del reactivo Enliten Licifera/Lucifereasa (Promega, Madison, WI). Después de 10 min de incubación la emisión de luz (bioluminiscencia) fue determinada utilizando un Multilabel Reader

modelo Victor X2 (PerkinElmer). Los resultados obtenidos fueron comparados con una curva de calibración previamente realizada utilizando diluciones decimales del reactivo rATP, 10mM (Promega, Madison, WI) (Yuroff *et al.*, 2003).

## **7.8 Purificación biodirigida de los compuestos bioactivos.**

### **7.8.1 Extracción en reflujo tipo soxhlet.**

Para realizar la purificación de los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana contra las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*, se realizaron extracciones sucesivas de 450 g de las plantas secas y trituradas, utilizando la extracción en reflujo Soxhlet, comenzando con hexano, seguido de cloroformo, acetonitrilo, metanol y por último agua destilada. Los solventes fueron dejados en reflujo durante 24 h. Después de esto los extractos fueron concentrados hasta sequedad utilizando un rotavapor (Buchi R3000), posteriormente fueron resuspendidos en el solvente apropiado para determinar el rendimiento de cada una de las extracciones, aunado a esto se realizaron las evaluaciones antimicrobianas de los extractos obtenidos mediante la técnica de difusión del pozo en agar, previamente mencionada, para los extractos realizados con solventes polares (acetonitrilo, metanol y dH<sub>2</sub>O) y para el caso de los extractos realizados con solventes no polares (hexano y cloroformo) se utilizó la técnica de difusión con discos de papel filtro, los cuales fueron impregnados con 50 µl de los extractos, se dejaron a temperatura ambiente durante 15 min para evaporar el solvente y posteriormente fueron colocados sobre agar LB y ACP los cuales fueron respectivamente inoculados con las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*, e incubados de acuerdo a la metodología previamente descrita.

### **7.8.2 Cromatografía en columna.**

Los extractos que presentaron actividad antimicrobiana contra las cepas probadas, fueron purificados primeramente mediante cromatografía en columna, utilizando Silica Gel 60Å formando una malla de 200-400 µm (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Los extractos fueron eluidos haciendo pasar por la columna 1 L de diferentes



combinaciones de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y metanol (MeOH), colectando el solvente eluido en porciones de 250 ml. Las combinaciones utilizadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Combinación de solventes utilizados como eluente para la purificación de compuestos bioactivos mediante cromatografía en columna.

% de $\text{CHCl}_3$	% de MeOH
100	0
95	5
90	10
85	15
80	20
75	25
70	30
65	35
60	40
55	45
50	50
0	100

Todas las fracciones obtenidas fueron colocadas a temperatura ambiente y en platos de vidrio para evaporar el solvente, una vez concentradas, las fracciones secas fueron resuspendidas en no más de 10 ml de MeOH y fueron colocadas en vasos de precipitado de 30 ml. A estas fracciones se les evaluó la pureza mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando cromatofolios de aluminio con Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt Germany), con la finalidad de juntar las fracciones que tuvieron un alto grado de similitud (superior al 95%). A todas las fracciones resultantes se les determinó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión del pozo en agar la cual fue previamente descrita, con esto fueron seleccionadas las fracciones activas para continuar con el proceso de purificación.

### **7.8.3 Cromatografía en capa preparativa.**

Dichas fracciones activas fueron subsecuentemente purificadas mediante cromatografía en capa preparativa (PLC), utilizando Silica Gel Tipo G de 5-15  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Para esto 25g de silica fueron resuspendidos en 50 ml de  $\text{dH}_2\text{O}$ , la suspensión resultante fue colocada en placas de vidrio de 20X20 cm, previamente lavadas y desengrasadas, dichas placas fueron dejadas en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche, para eliminar el exceso de humedad, transcurrido este tiempo las placas fueron activadas en una estufa a  $80^\circ\text{C}$  durante 1h. Los extractos fueron colocados en la parte inferior de las placas aproximadamente a 1.5 cm del borde, con la ayuda de un tubo capilar, aplicando puntos consecutivos para formar una línea continua a lo ancho de la placa. Este proceso se repitió al menos 5 veces. Las placas fueron eluidas utilizando como fase móvil  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  a diferentes proporciones para seleccionar la mezcla mas eficiente en la separación de los compuestos presentes en las fracciones. Las placas fueron retiradas del sistema cuando la fase móvil se encontraba aproximadamente a 1.5 cm del borde superior de la placa, una vez retiradas se realizaron observaciones bajo luz UV para observar con mayor claridad la separación de las bandas.

### **7.8.4 Autobiografía.**

Además, se prepararon placas de 5X20 cm, las cuales recibieron el mismo tratamiento descrito, sin embargo estas placas fueron utilizadas para realizar la técnica denominada autobiografía, la cual consiste en aplicar una capa de agar sobre la cromatografía previamente desarrollada, para el caso de *V. cholerae* el medio utilizado fue agar LB y el microorganismo fue sembrado por extensión y en el caso de *C. perfringens* el ACP fue inculcado al 1%, antes de colocarlo sobre la placa cromatográfica, después se colocaron las placas en cámara húmeda y se incubaron de acuerdo a las condiciones para cada microorganismo. Después del periodo de incubación, se buscaron zonas de inhibición las cuales son evidencia de la localización del compuesto activo buscado. Por último se determinó el RF de la inhibición el cual fue

utilizado como parámetro para localizar el compuesto activo en las placas de 20X20 cm, una vez determinado esto se procedió a raspar la zona seleccionada. La silica recuperada fue lavada primero con 15 ml de CHCl<sub>3</sub> y después con 15 ml de MeOH, dichos lavados fueron mezclados y evaporados a temperatura ambiente. La fracción resultante fue resuspendida en MeOH y sometida a TLC para evaluar pureza y al ensayo antimicrobiano mediante la técnica del pozo en agar.

### 7.8.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Por último las fracciones semipuras obtenidas de la manera previamente descrita, fueron purificadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para esto se utilizó un equipo Varian el cual cuenta con dos bombas isocráticas PrepStar modelo 218, un detector de arreglo de diodos PorStar Modelo 335 y un colector de fracciones ProStar Modelo 701 se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de solventes utilizando hexano:acetona y MeOH:H<sub>2</sub>O, dependiendo de la fracción que se va a purificar Tabla 3.

Tabla 3. Combinación de solventes utilizados como fase móvil para la purificación de compuestos bioactivos mediante HPLC.

Hexano	Acetona	MeOH	H <sub>2</sub> O
100	0	100	0
95	5	95	5
90	10	90	10
85	15	85	15
80	20	80	20
75	25	75	25
70	30	70	30
65	35	65	35
60	40	60	40
55	45	55	45

50	50	50	50
0	100	0	100

### 7.8.6 Determinación de la expresión de enterotoxinas de *V. cholerae* y *C. perfringens* mediante PCR Tiempo Real

Primeramente se realizó una búsqueda en el GenBank para determinar si las secuencias de los iniciadores seleccionados se encontraban en el gen de las toxinas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

Los iniciadores utilizados en las cepas de *V. cholerae* estaban dirigidos al gen de la enterotoxina (*ctx*), *ctxA-F* 5'-ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC-3' *ctxA-R* ATA CCA TCC ATA TAT TTG GGA G-3', y *ctxAB-F* TGA AAT AAA GCA GTC AGG TG-3' *ctxAB-R* CTG ATT TGT GTG CAG AAT ACC.

Y para el caso de *C. perfringens* se buscó la expresión de gen de la enterotoxina (*cpe*), *cpe-F* 5'-GGA GAT GGT TGG ATA TTA GG-3' y *cpe-R* 5'-GGA CCA GCA GTT GTA GAT A-3'.

La estandarización de las condiciones del PCR se realizó en un Termociclador ThermoHybaid (Franklin, MA) modelo PCR Express, mediante el cual se estandarizaron parámetros como la temperatura y la concentración de MgCl<sub>2</sub> mas adecuadas para la reacción. Para esto el equipo fue programado para realizar un gradiente de temperatura de 15°C partiendo de 52°C, además se probaron concentraciones de MgCl<sub>2</sub> que fueron desde 1.5 mM hasta 4.5 mM. La mezcla de reacción consistió en 5 µl del amortiguador para PCR, 3.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl del primer *ctx-F*, 0.5 µl del primer *ctx-R*, 0.5 µl de dNTP's 50 mM y agua miliq para completar un volumen final de 25µl.

Después de estandarizar las condiciones para el PCR, nos dispusimos a determinar el efecto de los extractos sobre la expresión de los genes de las toxinas mencionadas, mediante PCR tiempo real (qRT-PCR), para llevar a cabo esto se utilizaron concentraciones del 25, 50 y 75% de la CMB previamente determinada.

Dichas concentraciones se colocaron en tubos con caldo LB y Tioglicolato, dependiendo del género bacteriano probado. Después de inocular los medios con las concentraciones subletales se incubaron por 24h a 37°C en los medios y condiciones de incubación previamente descritas, posteriormente se realizó la extracción de RNA con el reactivo TriReagent (Sigma) el cual se basa en una solución de fenol y tiocianato de guanidina, después de seguir la metodología recomendada por el fabricante, el RNA es recuperado de la fase acuosa, una vez obtenido el RNA fue congelado a -80°C. Posteriormente se realizó el qRT-PCR en un iQ5 Multicolor Real-Time PCR detection system (Bio Rad), el equipo fue programado para realizar el qRT-PCR en un solo paso con la ayuda del Kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen), el cDNA fue sintetizado con aproximadamente 1µg de RNA a 37°C por 60 min, seguido por una incubación a 95°C por 5 min. Las condiciones previamente estandarizadas para el PCR tiempo real fueron 95°C por 30 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min hasta completar 30 ciclos y con un paso final de extensión de 72°C por 1 min.

### **7.9 Análisis Estadístico.**

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado, al menos en tres repeticiones. El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 10.0, (SPSS Inc., Chicago IL). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Varianza y mediante comparación múltiple de medias, con un valor de significancia  $P \leq 0.05$ .



## . RESULTADOS

### 8.1 Evaluación preliminar de actividad antimicrobiana.

En el presente estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos (81 en total), en contra de dos cepas de *Vibrio cholerae* y dos cepas de *Clostridium perfringens*, preparados a partir de 27 plantas. Nuestros resultados preliminares indican que 27 de los 81 extractos analizados presentaron actividad antimicrobiana en diferentes niveles (Fig. 1).

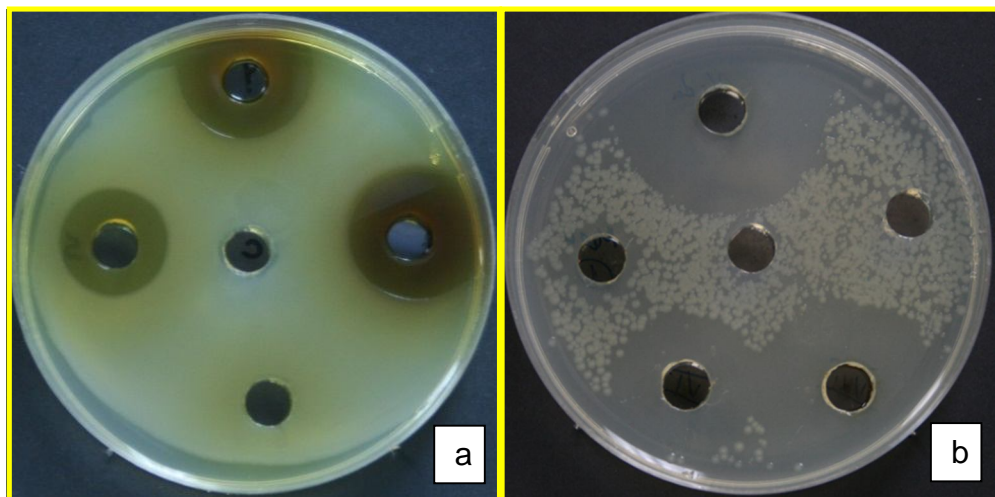


Fig. 1.- Halos de inhibición presentados por diferentes extractos metanólicos de plantas en: (a) *V. cholerae* 569-B y (b) *C. perfringens* FD-1041.

Las cepas de *V. cholerae* aparentemente fueron menos sensibles a la actividad antimicrobiana de todos los tipos de extractos, así también cabe señalar que los extractos acuosos fueron los menos activos, a este respecto únicamente el mango, la piña y la uva, mostraron pobre actividad antimicrobiana, ya que los halos de inhibición encontrados presentaron rangos de entre 0.7 y 0.9 cm. Por otra parte 8 de los extractos etanólicos (albahaca, alcachofa, estafiate, huizache, mango, mezquite, nopal y uva) presentaron halos de inhibición de entre 1.0 a 1.6 cm, y por último los extractos metanólicos fueron los que presentaron mayor actividad antimicrobiana, ya que 16 de los extractos (albahaca, alcachofa, chicozapote, chile poblano, ciruela, durazno, esparrago, estafiate,

frambuesa, huizache, kiwi, mango, mezquite, nopal, piña y zacate limón) presentaron halos de inhibición con rangos de entre 1.0 a 2.5 cm, contra *V. cholerae* (Tabla 1).

TABLA 1 EN LA SIGUIENTE HOJA



Tabla 1.- Halos de inhibición de extractos de plantas acuosos, etanólicos y metanólicos, contra *V. cholerae* 569-B y 1837.

Nombre Común	Nombre Científico	Zona de Inhibición (cm) de diferentes extractos contra <i>V. cholerae</i>					
		Acuoso		Etanólico		Metanólico	
		1837	569-B	1837	569-B	1837	569-B
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> (L.)	NI	NI	1.3±0.1	1.4±0.2	2.2±0.2	1.6±0.1
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i> (L.)	NI	NI	1.3±0.1	1.2±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1
Anís	<i>Tagetes filifolia</i> (Lag.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Arándano	<i>Vaccinium macrocarpon</i> (Ait.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cacahuete	<i>Arachis hypogaena</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Camote	<i>Ipomoea batatas</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Chicozapote	<i>Manilkara zapota</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.8±0.1	2±0.1
Chile Poblano	<i>Capsicum annuum</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.7±0.2	1.5±0.06
Ciruella	<i>Prunus salicina</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.3±0.2	1.3±0.2
Coco	<i>Cocos nucifera</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Colinabo	<i>Brassica napus</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Durazno	<i>Prunus persica</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.1±0.1	1.3±0.2
Esparrago	<i>Asparagus officinalis</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.2±0.1	1.5±0.2
Estafiate	<i>Artemisia ludovisiana</i> (Nutt.)	NI	NI	1.2±0.2	1.2±0.3	2.4±0.1	2.2±0.2
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.7±0.2	1.9±0.1
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	NI	NI	1.4±0.1	1.5±0.1	2.7±0.3	2.4±0.2
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i> (Planch.)	NI	NI	NI	NI	1.6±0.1	2.5±0.2
Mango	<i>Mangifera indica</i> (L.)	0.9±0.01	0.8±0.01	1.0±0.1	1.0±0.1	1.5±0.2	2±0.1
Melón	<i>Cucumis melo</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Mezquite	<i>Prosopis glandulosa</i> (Torr.)	NI	NI	1.4±0.1	1.2±0.1	1.8±0.1	1.3±0.1
Nopal	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.)	NI	NI	1.3±0.1	1.4±0.1	2.4±0.2	2.6±0.1
Palma china	<i>Yucca filifera</i> (Chabaud.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Piña	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	0.8±0.01	0.7±0.01	0.9±0.1	1.1±0.1	1.6±0.1	1.8±0.2
Uva	<i>Vitis labrusca</i> (L.)	0.7±0.01	0.7±0.01	NI	NI	NI	NI
Yerbabuena	<i>Mentha spicata</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Zacate Limón	<i>Cymbopogon citratus</i> (Stapf.)	NI	NI	NI	NI	1.8±0.2	1.7±0.2

\* Desviación estándar.

Por otro lado las cepas de *C. perfringens* fueron sensibles prácticamente a los mismos extractos que las cepas de *V. cholerae* solo que los halos de inhibición de *C. perfringens* fueron un poco mayores, en este caso los extractos acuosos presentaron rangos de 0.8 a 0.9 cm. Los etanólicos de 1.0 a 1.6 cm y los rangos de los extractos metanólicos estuvieron entre 1.0 y 2.7 cm (Tabla 2).

Tabla 2. Halos de inhibición de extractos de plantas acuosos, etanólicos y metanólicos, contra *C. perfringens* FD-1041 y FD-1.

Nombre Común	Nombre Científico	Zona de Inhibición (cm) de diferentes extractos contra <i>C. perfringens</i>					
		Acuoso		Etanólico		Metanólico	
		FD-1041	FD-1	FD-1041	FD-1	FD-1041	FD-1
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> (L.)	NI	NI	1.3±0.1*	1.3±0.1	2.1±0.2	1.8±0.1
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i> (L.)	NI	NI	1.4±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1	1.4±0.1
Anís	<i>Tagetes filifolia</i> (Lag.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Arándano	<i>Vaccinium macrocarpon</i> (Ait.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cacahuete	<i>Arachis hypogaena</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Camote	<i>Ipomoea batatas</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Chicozapote	<i>Manilkara zapota</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.5±0.1	1.5±0.1
Chile Poblano	<i>Capsicum annum</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.8±0.2	1.5±0.06
Ciruela	<i>Prunus salicina</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	2.0±0.2	1.7±0.2
Coco	<i>Cocos nucifera</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Colinabo	<i>Brassica napus</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Durazno	<i>Prunus persica</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.1±0.1	1.0±0.1
Esparrago	<i>Asparagus officinalis</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.3±0.1	1.3±0.1
Estafiate	<i>Artemisia ludovisiana</i> (Nutt.)	NI	NI	1.3±0.1	1.2±0.2	2.1±0.1	2.3±0.3
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	1.2±0.1	1.3±0.1
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	NI	NI	1.6±0.1	1.4±0.1	2.4±0.2	2.6±0.2
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i> (Planch.)	NI	NI	NI	NI	1.6±0.1	2.4±0.08
Mango	<i>Mangifera indica</i> (L.)	0.9±0.01	0.9±0.01	1.1±0.1	1.2±0.1	1.6±0.1	2.0±0.1
Melón	<i>Cucumis melo</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Mezquite	<i>Prosopis glandulosa</i> (Torr.)	NI	NI	1.5±0.1	1.3±0.1	1.8±0.2	1.6±0.1
Nopal	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.)	NI	NI	1.4±0.1	1.4±0.1	2.7±0.2	2.5±0.2
Palma china	<i>Yucca filifera</i> (Chabaud.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Piña	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	0.8±0.01	0.8±0.01	1.0±0.08	1.1±0.1	1.4±0.1	1.5±0.2
Uva	<i>Vitis labrusca</i> (L.)	0.8±0.01	0.8±0.01	NI	NI	NI	NI
Yerbabuena	<i>Mentha spicata</i> (L.)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Zacate Limón	<i>Cymbopogon citratus</i> (Stapf.)	NI	NI	NI	NI	2.1±0.1	1.4±0.2

\*Desviación estándar.

En base a los resultados preliminares antes expuestos, se seleccionaron los mejores extractos metanólicos, debido a que los halos de inhibición fueron cercanos o superiores a los 2 cm, además de que una mayor cantidad de plantas fueron activas contra ambos géneros bacterianos. Las plantas seleccionadas fueron: albahaca, alcachofa, chile poblano, ciruela, estafiate, frambuesa, huizache, kiwi, mango, nopal, zacate limón, a estos extractos se les determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

## 8.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Para esto primeramente determinamos las CMB's parciales y seleccionamos aquellas que estuvieran por debajo de los 5 mg/ml (Tabla 3).

Tabla 3. CMB's parciales de los extractos metanólicos seleccionados contra *C. perfringens* FD-1041 y FD-1 y *V. cholerae* 569-B y 1837.

Planta	Nombre Científico	CMB			
		<i>C. perfringens</i>		<i>V. cholerae</i>	
		FD-1041	FD-1	1837	569-B
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> (L.)	<4	<4	<4	<4
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i> (L.)	>6	>6	>8	>7
Chile Poblano	<i>Capsicum annum</i> (L.)	>10	>10	>10	>10
Ciruela	<i>Prunus salicina</i> (L.)	<7	<6	<8	<8
Estafiate	<i>Artemisia ludovisiana</i> (Nutt.)	<1	<1	<1	<1
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i> (L.)	>10	>10	>10	>10
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i> (L.)	<1	<1	<1	<1
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i> (Planch.)	>10	>10	>10	>10
Mango	<i>Manguifera indica</i> (L.)	>10	>10	>15	>15
Nopal	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.)	<4	<4	<4	<4
Zacate Limón	<i>Cymbopogin citratus</i> (Stapf)	>10	>10	>15	>15

Nota.- Extractos metanólicos seleccionados resaltados en gris.

Las plantas seleccionadas para determinar la CMB fueron dos plantas medicinales (estafiate y huizache) y dos comestibles (albahaca y nopal). De las cuales las primeras dos presentaron las CMB's mas bajas con rangos de 0.5 a 0.6 mg/ml para *C. perfringens* y de 0.5 a 0.9 mg/ml para *V. cholerae*. Las CMB's de las plantas

comestibles fueron de 2.0 mg/ml para *C. perfringens* y de 3.0 mg/ml para *V. cholerae* (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones mínimas bactericidas de los extractos metanólicos seleccionados, contra *C. perfringens* y *V. cholerae*.

Planta	Nombre Científico	CMB (mg/ml)			
		<i>C. perfringens</i>		<i>V. cholerae</i>	
		FD-1041	FD-1	1837	569-B
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> (L.)	2±0.26*	2±0.4	3±0.6	3±0.5
Estafiate	<i>Artemisia ludovisiana</i> (Nutt.)	0.6±0.1	0.5±0.11	0.7±0.05	0.9±0.1
Huizache	<i>Acacia farneciana</i> (L.) Willd.	0.5±0.1	0.5±0.05	0.5±0.1	0.9±0.09
Nopal	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.)	2±0.3	2±0.24	3±0.2	3±0.3

\* Desviación estándar.

### 8.3 Determinación del efecto de concentraciones sub-letales sobre el crecimiento de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

Para el caso de *V. cholerae* 569-B, el análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento de los cultivos, mostró que no existen diferencias significativas en el número de células cuando se utilizaron concentraciones sub-letales (75, 50 y 25% de la CMB) de los extractos metanólicos de albahaca, estafiate, huizache y nopal. Ya que aunque se presentaron ligeras diferencias en los conteos con respecto a los controles, las cuentas se mantuvieron en el mismo logaritmo, de aproximadamente  $10^8$  UFC/ml (Fig. 2). Este mismo efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento fue obtenido para la cepa 1837 (datos no mostrados).

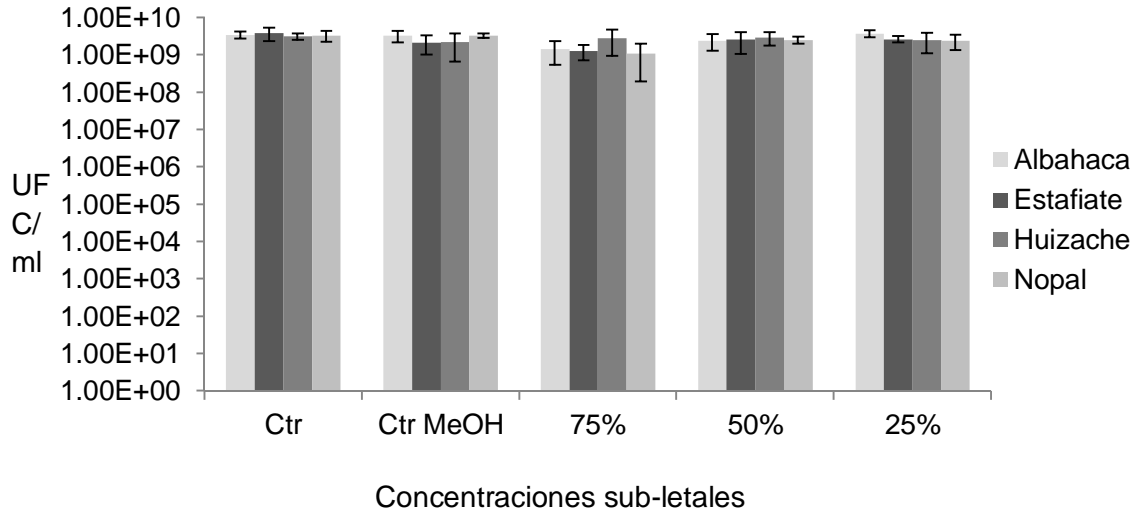


Fig. 2. Efecto de las concentraciones sub-letales, sobre el crecimiento de *V. cholerae* 569-B.

Para el caso de *C. perfringens* FD-1041, las concentraciones sub-letales de los extractos metanólicos de albahaca, estafiate, huizache y nopal, no disminuyeron significativamente el crecimiento de la cepa bacteriana probada, de manera similar a lo ocurrido con *V. cholerae*. (Fig. 3). Este mismo efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento fue obtenido para la cepa FD-1 (datos no mostrados).

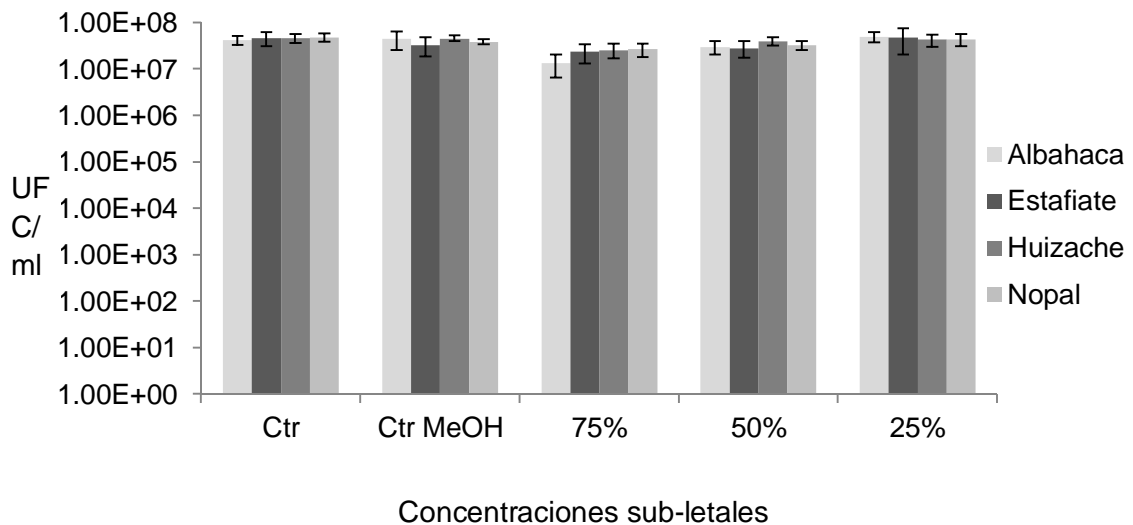


Fig. 3. Efecto de las concentraciones sub-letales, sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1041.

## **8.4 Determinación del sitio blanco de acción antimicrobiana.**

### **8.4.1 Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre la integridad de la membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*.**

Para determinar el efecto de los extractos sobre la viabilidad de la membrana concentraciones de 1, 5, 10 y 20 veces la CMB (1X, 5X, 10X y 20X) y el Kit LIVE/DEAD BacLigth, este sistema es útil ya que contiene dos colorantes el SYTO 9, el cual únicamente puede ingresar al citoplasma celular en organismo con su membrana intacta, tiñéndolos de verde, y el ioduro de propidium que solo tiene acceso a organismos con la membrana celular dañada, tiñéndolos de rojo. Después de 15 min de contacto de los extractos con las cepas de interés, se realizaron conteos en un microscopio de epifluorescencia. Los resultados indican que el 100% de las células tratadas, de *V. cholerae* y *C. perfringens*, con los extractos a una concentración de 10X y 20X la CMB, fueron teñidas por el colorante ioduro de propidium (color rojo), lo cual es un indicativo de que las células tratadas tienen la membrana comprometida o dañada.

Por otro lado al utilizar las concentraciones 1X y 5X de la CMB, el porcentaje de células de *V. cholerae*, con la membrana celular dañada presentó rangos de 1.17 a 41.93% dependiendo del extracto y de la cepa probada. Y en el caso de las cepas de *C. perfringens* los porcentajes de células dañadas fue de entre 2.2 a 57.6% (Tabla 5). En base a estos resultados los ensayos posteriores se desarrollaron utilizando únicamente la concentración de 10X de la CMB.

Tabla 5. Efecto de la CMB aplicada a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de la membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

Cepa/Extracto	Porcentaje de células con la membrana comprometida			
	Concentración de la CMB			
	1X	5X	10X	20X
<i>V. cholerae</i> 569-B				
Albahaca	1.69%	12.47%	100%	100%
Estafiate	3.69%	19.38%	100%	100%
Huizache	1.69%	12.47%	100%	100%
Nopal	1.17%	8.18%	100%	100%
<i>V. cholerae</i> 1837				
Albahaca	9.62%	32.50%	100%	100%
Estafiate	4.95%	41.93%	100%	100%
Huizache	9.62%	32.50%	100%	100%
Nopal	14.26%	19.50%	100%	100%
<i>C. perfringens</i> FD-1041				
Albahaca	4.70%	38.40%	100%	100%
Estafiate	12.42%	51.90%	100%	100%
Huizache	9.65%	44.50%	100%	100%
Nopal	2.20%	25.30%	100%	100%
<i>C. perfringens</i> FD-1				
Albahaca	6.20%	49.30%	100%	100%
Estafiate	15.23%	57.60%	100%	100%
Huizache	18.10%	38.90%	100%	100%
Nopal	6.70%	31.50%	100%	100%

Una vez seleccionada la concentración 10X de la CMB, se procedió a tomar fotografías de las cepas probadas, confirmando los resultados obtenidos durante los conteos, la Figura 4, nos muestra el efecto de los extractos de huizache, estafiate, albahaca y nopal sobre la integridad de la membrana de la cepa 569-B de *V. cholerae*, en donde el efecto dañino se evidencia por la incorporación del colorante ioduro de propidium, el cual tiñe las células de color rojo, cabe mencionar que el control con metanol (MeOH), no tubo un efecto significativo sobre la membrana de *V. cholerae* 569-B (Fig. 4). Este mismo efecto fue observado en la cepa 1837 (datos no mostrados).

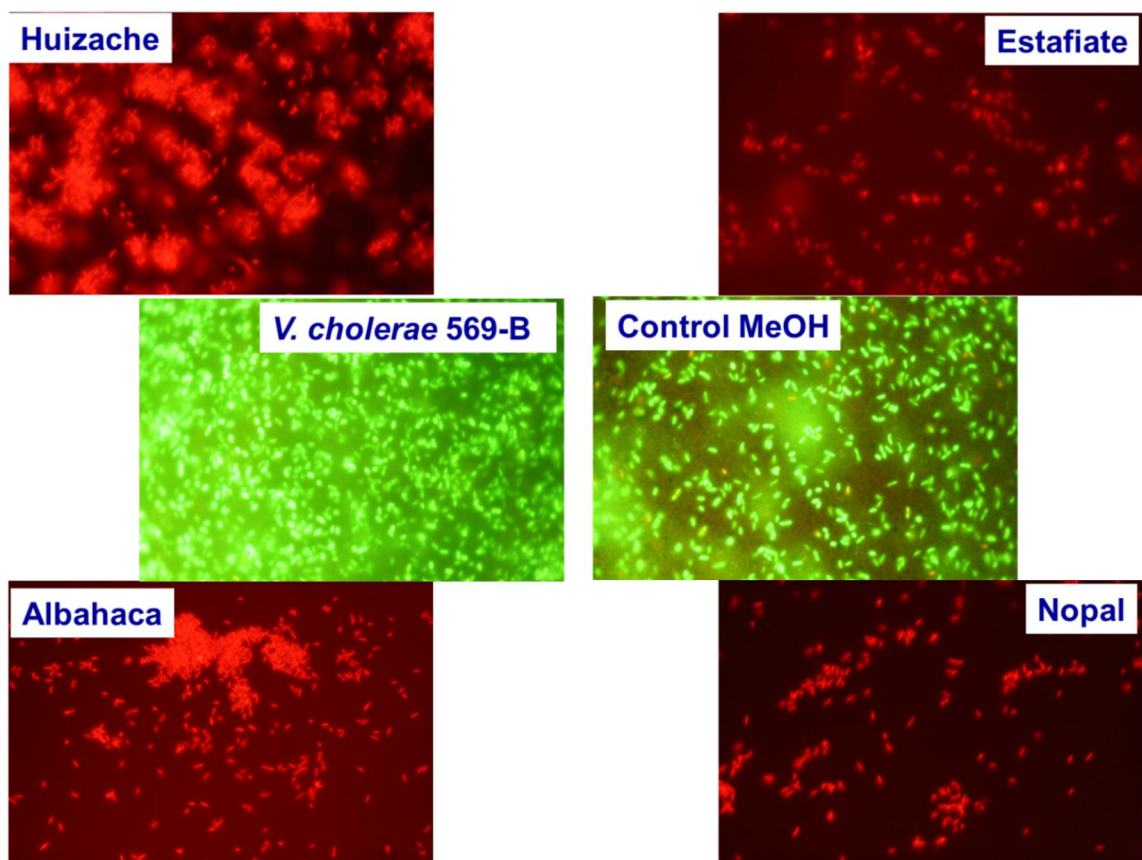


Fig. 4. Efecto de extractos metanólicos sobre la viabilidad de la membrana de *V. cholerae* 569-B.

En el caso de la cepa FD-1041 de *C. perfringens*, los resultados fueron muy similares, es decir el daño en la membrana de este microorganismo, también se evidenció ya que el colorante ioduro de propidium fue incorporado en todo el cultivo celular, en presencia de los extractos a una concentración 10X de la CMB, cabe mencionar que en este caso, en el control del cultivo con MeOH, se observaron, más células teñidas con el colorante ioduro de propidium, sin embargo el efecto del metanol no fue significativo al compararlo con el efecto de los extractos (Fig. 5). Los resultados obtenidos con la cepa FD-1, fueron similares tanto en el efecto del control como en el caso de los extractos (datos no mostrados).



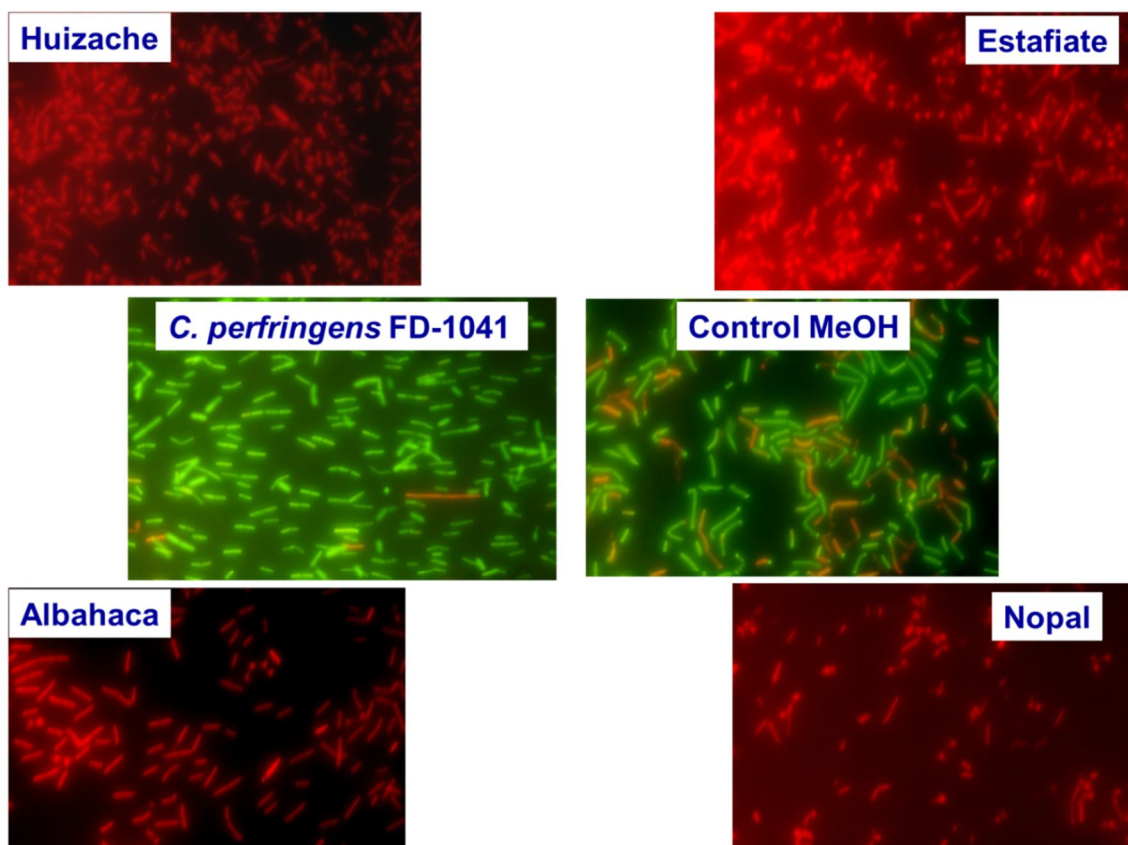


Fig. 5. Efecto de extractos metanólicos sobre la viabilidad de la membrana de *C. perfringens* Fd-1041.

#### 8.4.2 Efecto de los extractos metanólicos sobre el pH citoplásmico (pH<sub>in</sub>) de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

La evaluación del pH<sub>in</sub> se realizó mediante la prueba fluorescente cFDA(SE), la cual se basa en la conjugación intracelular del grupo succimidil (SE) con las aminas alifáticas de las proteínas intracelulares. El efecto de los extractos se determinó en base a la cantidad de fluorescencia emitida por los cultivos expuestos a los extractos metanólicos la cual es expresada como unidades relativas de fluorescencia (URF). Para la cuantificación de los cambios en el pH<sub>in</sub>, se prepararon curvas de calibración exponiendo las cepas probadas a diferentes pH's que fueron de 3, 5, 7, y 9, y de acuerdo a estos datos encontramos que una reducción en las URF corresponde también a una reducción en el pH<sub>in</sub>, tanto en *V. cholerae* como en *C. perfringens* (datos no mostrados)

Una vez habiendo determinado lo anterior procedimos a evaluar el efecto de los extractos sobre el pH<sub>in</sub>, de los microorganismos probados.

Todos los extractos metanólicos probados causaron un cambio significativo ( $p \leq 0.05\%$ ) en el pH citoplásmico, cuando se aplicaron a una concentración de 10X la CMB, comparándolos con los controles, siendo el extracto de estafiate el que causó un decremento mayor en los valores de pH<sub>in</sub> (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre el pH<sub>in</sub> de diferentes cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

	<i>V. cholerae</i>		<i>C. perfringens</i>	
	569-B	1837	FD-1041	FD-1
Control	7.7±0.1*	7.5±0.1	7.3±0.2	7.1±0.2
MeOH	7.2±0.1	7.1±0.3	6.7±0.2	6.9±0.1
Huizache	4.4±0.2	3.6±0.1	3.1±0.2	4.1±0.2
Estafiate	3.5±0.2	3.5±0.3	2.9±0.1	3.1±0.1
Albahaca	4.6±0.2	3.7±0.1	3.2±0.2	3.2±0.2
Nopal	4.6±0.1	3.8±0.2	3.8±0.1	3.4±0.05

± Desviación estándar

La exposición de las cepas de *V. cholerae* a los extractos metanólicos provocó un decremento significativo en el pH<sub>in</sub> ( $p \leq 0.05\%$ ). El extracto que mostró mayor actividad fue el de estafiate presentando una reducción en la cepa 569-B de 7.7 a 3.5, mientras que los extractos de huizache, albahaca y nopal el pH<sub>in</sub>, se redujo a valores de entre 4.4 a 4.6, por otro lado al igual que en la cepa anterior para la cepa 1837, el extracto de estafiate fue el mas efectivo causando una reducción en los valores de pH<sub>in</sub> de 7.5 a 3.5 y la reducción obtenida con los demás extractos llegó a valores de entre 3.6 a 3.8, dependiendo del extracto probado (Fig. 6).

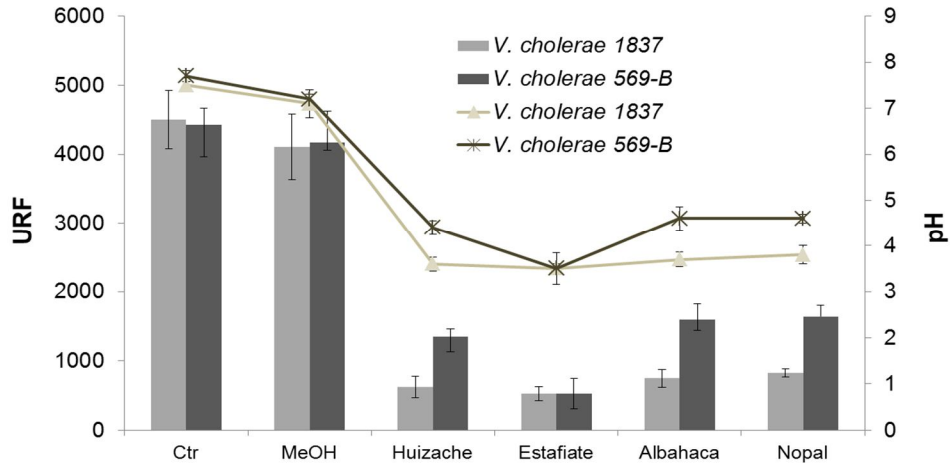


Fig. 6. Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el pH citoplásmico en las cepas 569-B y 1837 de *V. cholerae*.

En el caso de *C. perfringens* el extracto de estafiate también fue el que presentó mayor actividad sobre el  $pH_{in}$  de las cepas FD-1041 y FD-1, el  $pH_{in}$  promedio del cultivo control fue de 7.3 y 7.1 respectivamente, el cual al utilizar el extracto de estafiate fue reducido a 2.9 y 3.1. Los extractos de huizache, albahaca y nopal, también disminuyeron significativamente el  $pH_{in}$  ( $p \leq 0.05\%$ ) a valores de 3.1, 3.2 y 3.8, para la cepa FD-1041 y de 4.1, 3.3 y 3.4 de acuerdo al extracto probado (Fig. 7).

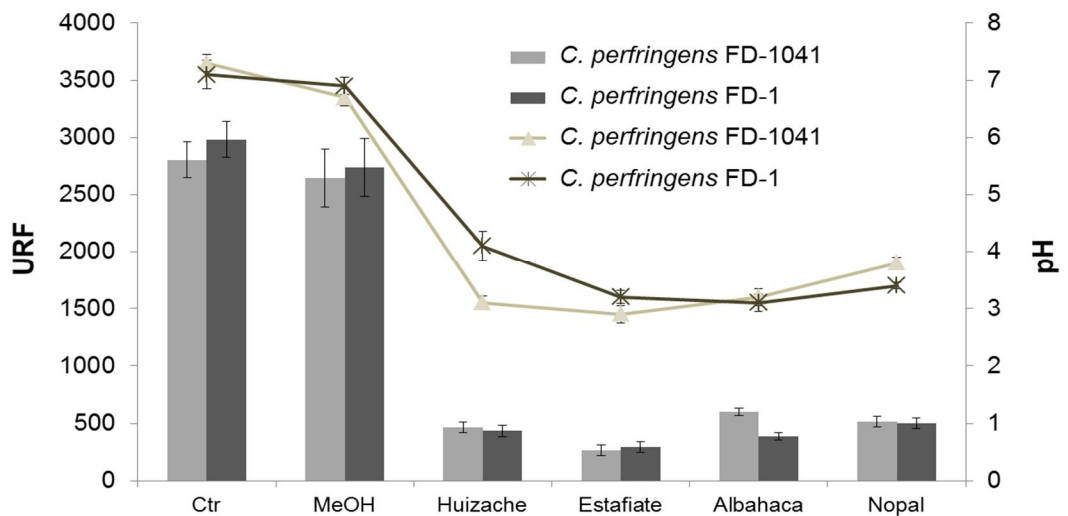


Fig. 7. Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el pH citoplásmico en las cepas FD-1041 y FD-1 de *C. perfringens*.

### 8.4.3 Efecto de los extractos de plantas metanólicas sobre el potencial de membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

Para esto se utilizó el colorante fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3), el cual es comúnmente utilizado para monitorear cambios en el potencial de membrana de una gran variedad de organismos. En este caso se demostró que los cultivos de *V. cholerae*, tratados con los extractos metanólicos de huizache, estafiate y albahaca provocaron un marcado decremento en la fluorescencia (valores negativos) lo cual es un indicativo de que la membrana sufrió un proceso de hiperpolarización, por otro lado el extracto de nopal causó una marcada despolarización de la membrana celular de las cepas probadas, evidenciado por un incremento en la fluorescencia (Fig. 8). La cepa 1837 resultó ser más sensible a los tratamientos con huizache, estafiate y albahaca ya que presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05\%$ ), cuando se comparó con la cepa 569-B, esta diferencia no se presentó entre las cepas tratadas con el extracto de nopal. Por último, el MeOH utilizado como control causó una ligera hiperpolarización de la membrana, sin embargo el efecto causado por los extractos fue significativamente superior al causado por el MeOH.

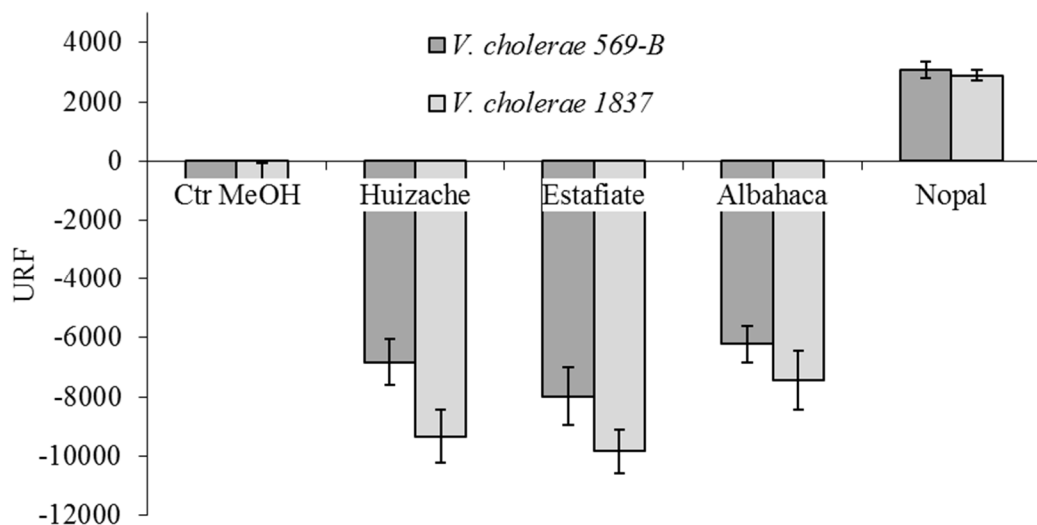


Fig. 8. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre el potencial de membrana de *V. cholerae* 569-B y 1837.

Por su parte, las cepas de *C. perfringens* mostraron resultados similares a las cepas de *V. cholerae*, es decir los extractos de huizache, estafiate y albahaca causaron una hiperpolarización de la membrana y el extracto de nopal una despolarización de la misma, aunque cabe señalar que los cambios en la fluorescencia fueron menores a los mostrados en *V. cholerae* (Fig. 9), además en este caso no se presentaron diferencias significativas en los cambios en el potencial de membrana entre cepas, de hecho existen diferencias mínimas en la hiperpolarización causada por los extractos de huizache, estafiate y albahaca

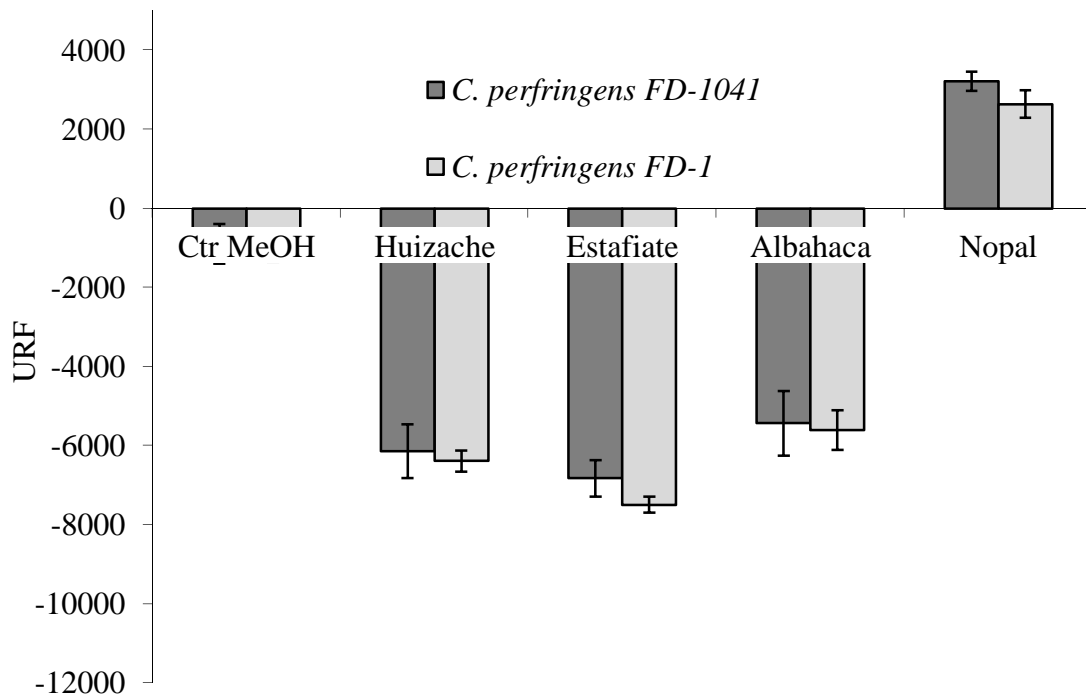


Fig. 9. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre el potencial de membrana de *C. perfringens* FD-1041 y FD-1.

### 8.4.4.3 Efecto de los extractos de plantas metanólicas sobre la síntesis de ATP en *V. cholerae* y *C. perfringens*.

La determinación del ATP celular se realizó únicamente en las cepas de *V. cholerae*, debido a que la reacción de luminiscencia requiere la presencia de oxígeno, por lo que en el caso de *C. perfringens* la reacción no es aplicable.

Nuestros resultados indican que todos los extractos evaluados causaron una reducción significativa ( $p \leq 0.05\%$ ) en la cantidad de ATP detectado, en ambas cepas de *V. cholerae*, siendo los extractos metanólicos del huizache y del estafiate los que presentaron mayor actividad inhibitoria, seguido por el extracto de albahaca y por último por el extracto de nopal (Fig. 10).

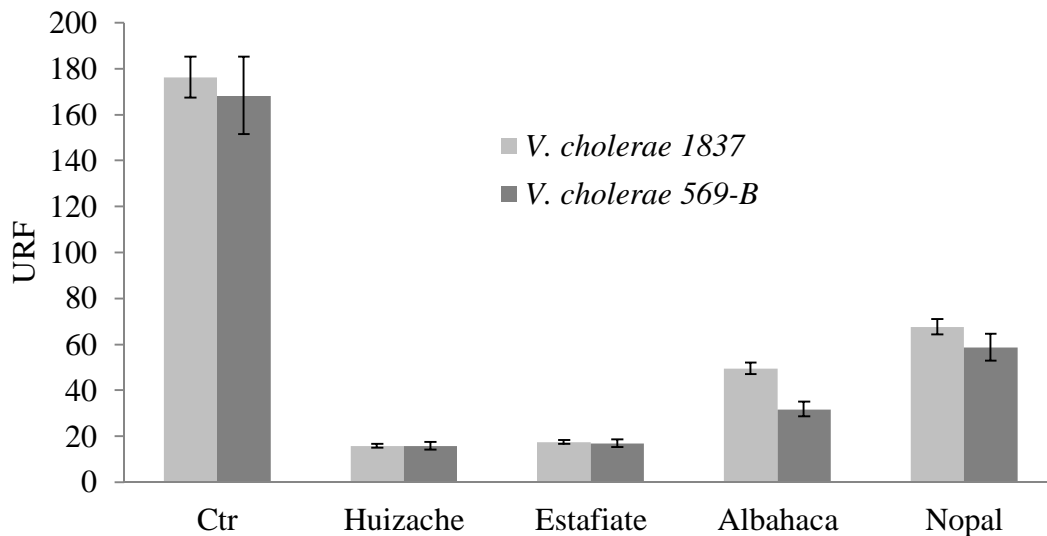


Fig. 10. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre la síntesis de ATP celular en *V. cholerae* 569-B y 1837.

Estos resultados aunque interesantes, no fueron concluyentes en el efecto de los extractos sobre la síntesis de ATP, ya que si es cierto se presentó la reducción del ATP total, no existía la seguridad de que la síntesis del ATP fue inhibida o por otro lado, se produjo una liberación del ATP hacia el sobrenadante, por lo que nos dispusimos a

realizar la comprobación de lo anterior. Para realizar esta determinación la técnica empleada sufrió ligeras modificaciones, en las cuales las células de *V. cholerae* no fueron lisadas después de la aplicación de los extractos sino que fueron centrifugadas para evaluar la cantidad de ATP presente en el sobrenadante.

A este respecto los resultados indican que si bien en todos los tratamientos con los extractos se detectó ATP en los sobrenadantes, se destaca el caso particular del extracto de nopal, ya que después del tratamiento con este extracto, la cantidad de ATP presente en el sobrenadante, sobrepasó al ATP celular, lo que indica que la disminución en la cantidad detectada en los ensayos anteriores de ATP es probablemente debida a la liberación del mismo hacia el sobrenadante, y no a la disminución en su síntesis. Por otro lado en los extractos de huizache, estafiate y albahaca se detectó menor cantidad de ATP en los sobrenadantes, lo que sugiere que en estos casos la síntesis de ATP si fue reducida (Fig. 11).

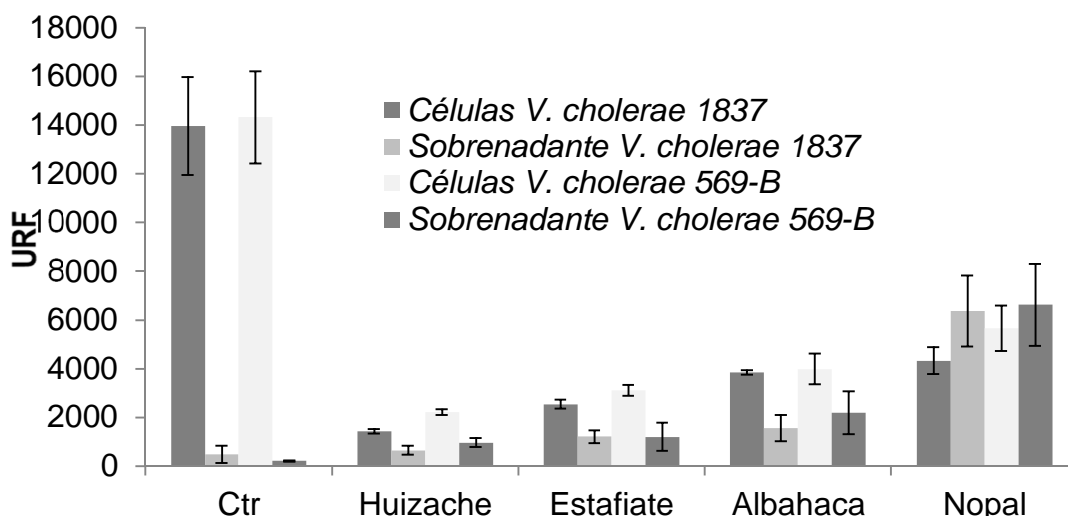


Fig. 11. Efecto de los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, sobre la síntesis de ATP en *V. cholerae* 569-B y 1837.

## 8.5 Purificación de los compuestos bioactivos.

### 8.5.1 *Acacia farnesiana* (Huizache).

### 8.5.1.1 Extracción tipo Soxhlet y actividad antimicrobiana del extracto de huizache.

Para esto se montaron 490 gr de la planta seca y triturada en 2 equipos de extracción en reflujo tipo Soxhlet, el hexano fue el primer solvente que se utilizó obteniendo un rendimiento de 5.8 g de extracto hexánico seco, posteriormente se utilizó cloroformo obteniendo un rendimiento de 5.4 g de extracto seco, después metanol con un rendimiento de 4.7 g y por último agua obteniendo 3.6 g de extracto seco. A todos los extractos obtenidos de esta forma se les evaluaron sus propiedades antimicrobianas resultando que el extracto metanólico fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana, con un halo de inhibición de  $2.7\pm 0.1$  y  $2.4\pm 0.1$  cm de diámetro para las cepas 569-B y 1837 de *V. cholerae* y de  $2.5\pm 0.1$  y  $3.1\pm 0.1$  cm para las cepas FD-1041 y FD-1 de *C. perfringens* respectivamente, por su parte los demás extractos (hexánico, clorofórmico y acuoso) no presentaron actividad antimicrobiana contra ninguna de las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens* evaluadas (Fig. 12).

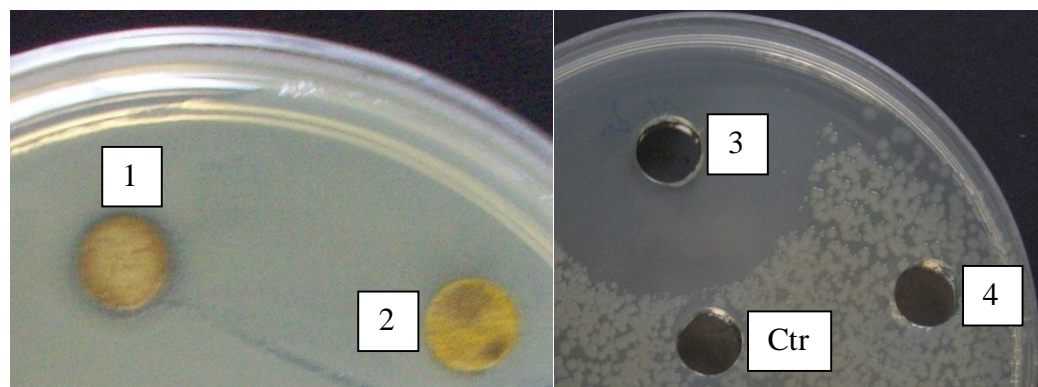


Fig 12. Efecto del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), metanólico (3) y acuoso (4) del huizache, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet contra *V. cholerae* 569-B.

### 8.5.1.2 Cromatografía en columna y TLC del extracto de huizache.

Posteriormente, el extracto metanólico fue fraccionado mediante cromatografía en columna, utilizando como fase móvil diferentes concentraciones de cloroformo y



metanol, como se mencionó en el material y método, obteniendo 48 fracciones de 250 ml, las cuales fueron evaporadas a temperatura ambiente hasta sequedad. Las fracciones fueron resuspendidas en no más de 20 ml de metanol para después evaluar la pureza de las mismas mediante cromatografía en capa fina (TLC), con esta técnica además de evaluar la pureza de las fracciones pudimos determinar la similitud de las mismas por lo que juntamos las fracciones mas parecidas, en este caso se juntaron las fracciones No. 8 a la No. 14 (Fig 13).

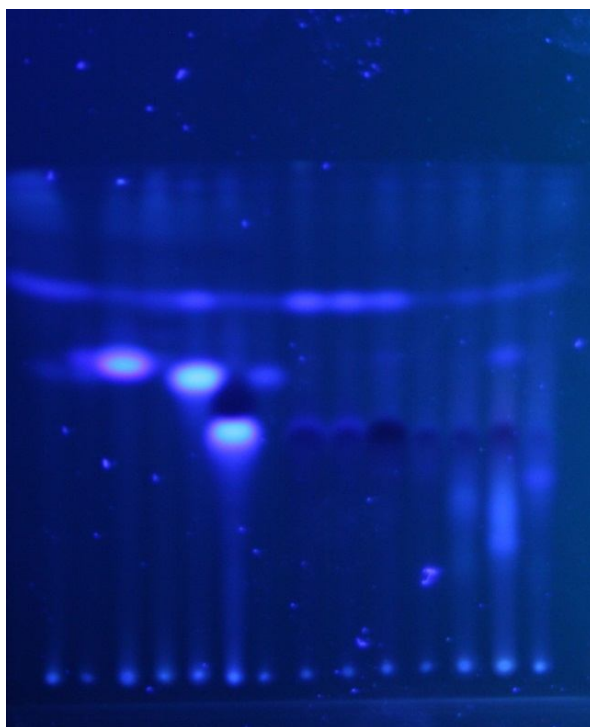


Fig 13. TLC de diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto metanólico de huizache, utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  8:2 y observadas con luz UV.

### **8.5.1.3 Selección de fracciones con actividad antimicrobiana.**

Después de esto se evaluó su actividad antimicrobiana mediante la técnica antes mencionada, con esto fueron seleccionadas las fracciones activas obtenidas de la cromatografía en columna, las fracciones con actividad antimicrobiana fueron obtenidas al utilizar como eluente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  en una proporción de 9.5:0.5 hasta  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$

8:2, las demás fracciones presentaron muy poca o ninguna actividad antimicrobiana (Fig 14).

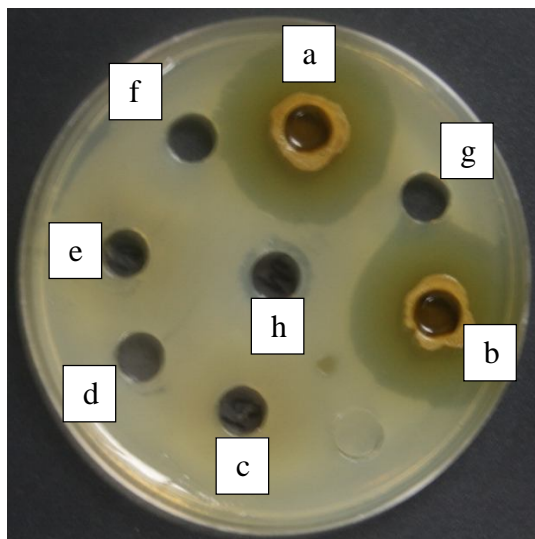


Fig 14. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto de huizache, utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH a) 9:1, b) 8:2, c) 7:3, d) 6:4, e) 1:1, f) MeOH, g)  $\text{H}_2\text{O}$  y h) Ctr contra *V. cholerae* 569-B.

#### 8.5.1.4 HPLC de las fracciones activas del extracto de huizache.

Por último seleccionamos las fracciones correspondientes a la mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH en una proporción de 9:1. Dichas fracciones fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) para estandarizar las condiciones de separación de los compuestos presentes en la fracción activa seleccionada. Para esto se inyectaron 100  $\mu\text{l}$  de la fracción diluida y se utilizaron mezclas de MeOH: $\text{H}_2\text{O}$  como eluente, siendo la combinación MeOH: $\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 1:9 la que mejor separó los compuestos presentes en la fracción activa (Fig 15).

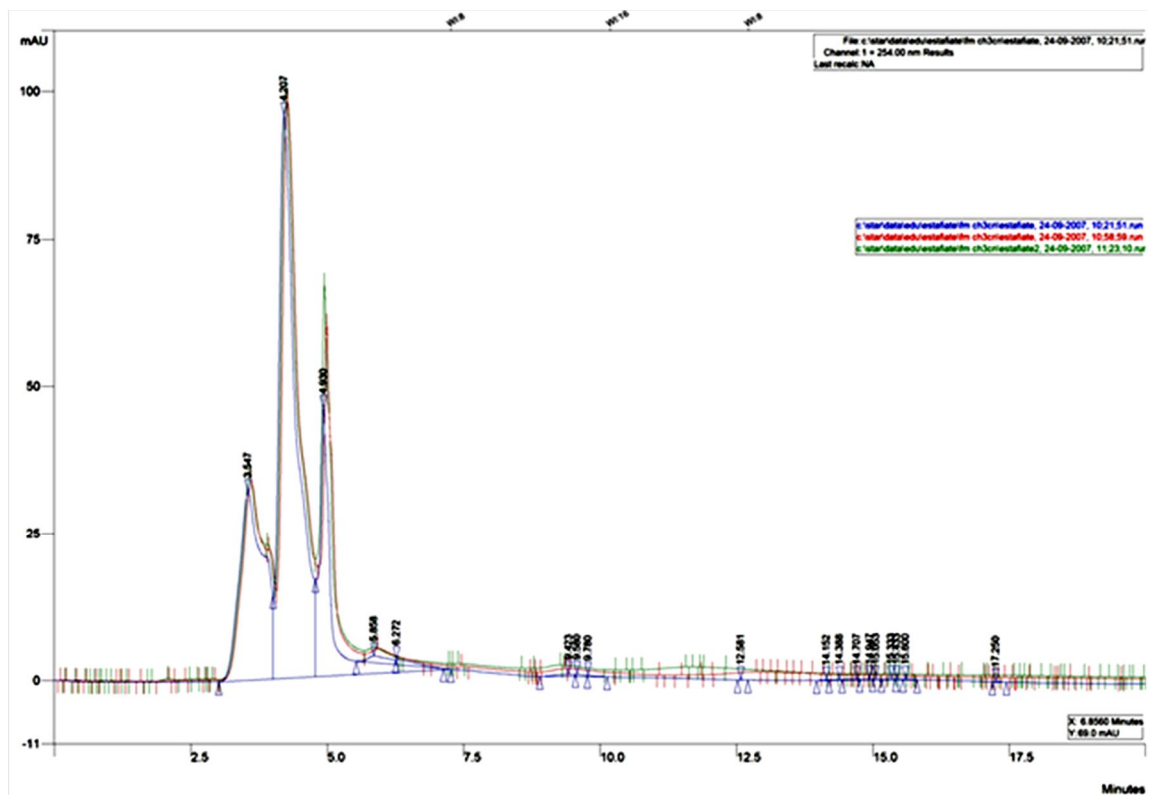


Fig 15. Cromatograma de la separación de los compuestos presentes en la fracción activa, obtenida del extracto metanólico del huizache.

Una vez estandarizadas las condiciones de separación, se utilizó el HPLC en modo semipreparativo, con el cual pudimos obtener los compuestos separados en cantidades suficientes para realizar las pruebas microbiológicas necesarias para determinar cual de los compuestos es el responsable de la actividad antimicrobiana. Para esto se inyectaron 10 ml de la fracción de interés la cual fue separada y colectada mediante un colector de fracciones. Se obtuvieron 3 fracciones diferentes, de las cuales la que fue eluída en un tiempo de retención de 4.207 min, resultó ser la responsable de la actividad antimicrobiana.

#### 8.5.1.5 Re-cristalización del compuesto aislado del huizache.

Por último, para asegurar la pureza del compuesto activo aislado, se realizó un proceso denominado re-cristalización, en el cual se resuspendió el compuesto aislado en 500  $\mu$ l de metanol, se calentó a 45°C durante 3 min, para asegurar la completa solubilidad del compuesto e inmediatamente después se agregaron 5 ml de éter isopropílico, la mezcla se dejó reposar durante 24 horas, una vez pasado este tiempo los cristales obtenidos fueron lavados con  $\text{CHCl}_3$ , con la ayuda de un sistema de filtración al vacío, después de esto los cristales fueron solubilizados en MeOH y colocados en un vial ámbar para su posterior caracterización. Además se corrió una TLC para determinar el grado de pureza final del compuesto, encontrando un grado de pureza mayor al 99% (Fig 16).

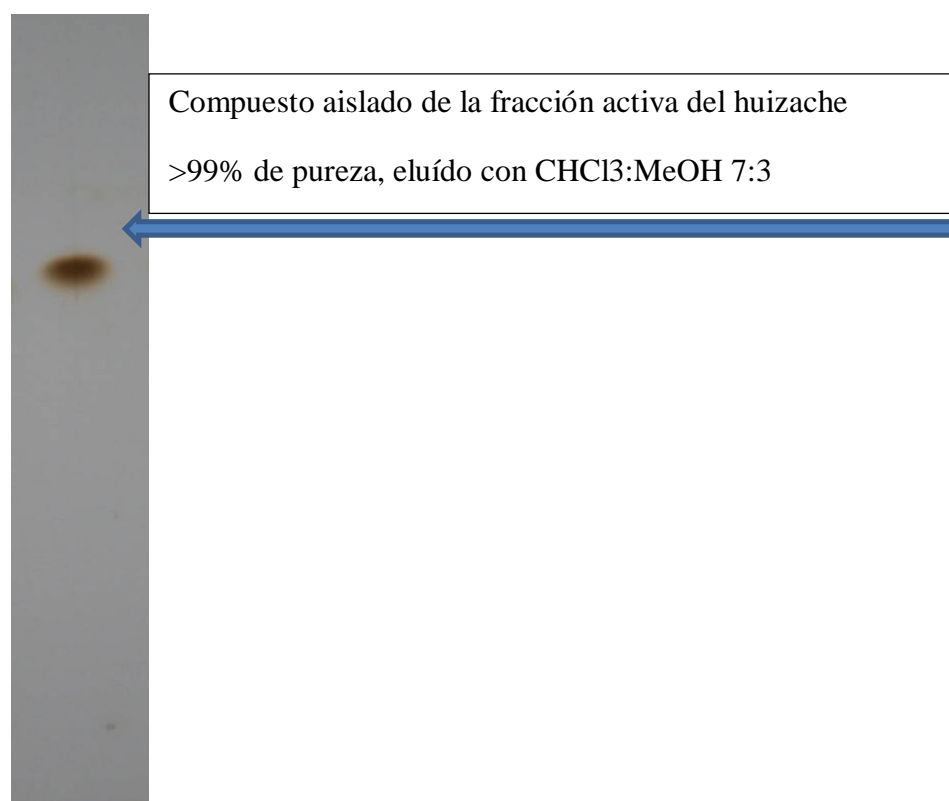


Fig 16. Cromatografía que muestra el grado de pureza del compuesto aislado de la fracción activa del huizache.

### 8.5.1.6 Caracterización del compuesto aislado del huizache.

El compuesto aislado fue enviado para su análisis, al Laboratorio de Servicio Analítico (LASEQA) del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL. Donde se le practicaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN  $^1\text{H}$ ; 400MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) (Fig 17) y de Carbono 13 (RMN $^{13}$ ; 100MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) (Fig 18).

El análisis de los espectros fue realizado por la Dra. María del Rayo Camacho de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. En el reporte realizado por la Dra. Camacho se indica que las señales obtenidas con el análisis de protones (RMN  $^1\text{H}$ ; 400MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) corresponden al DMSO, al agua, a los protones distribuidos en la molécula y por ultimo a un OH. (Fig. 17).

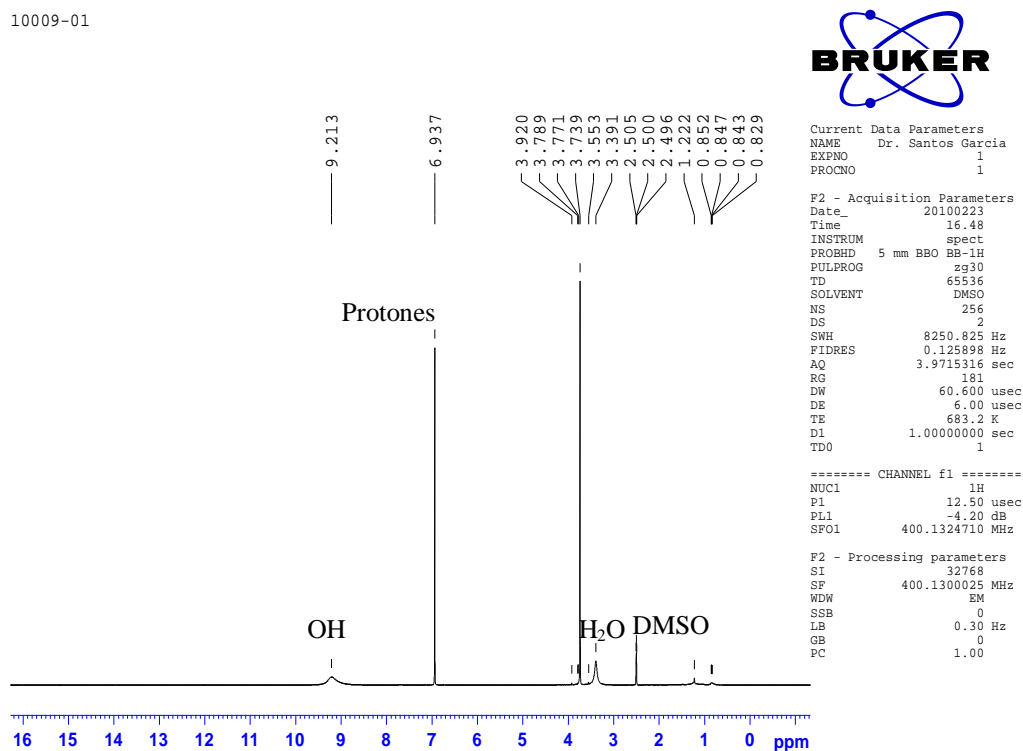


Figura 17. RMN  $^1\text{H}$  del compuesto aislado del extracto metanólico del huizache.

Y por otro lado el análisis de los espectros de Carbono 13 (RMN $^{13}$ ; 100MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ), las señales obtenidas corresponden a la localización de 6 carbonos, los

cuales se encuentran formando un anillo aromático, cabe mencionar que la señal emitida por el carbono No 2 y el No 5, corresponden a dos carbonos y en los demás casos a un solo carbono (Fig 18).

10009-01

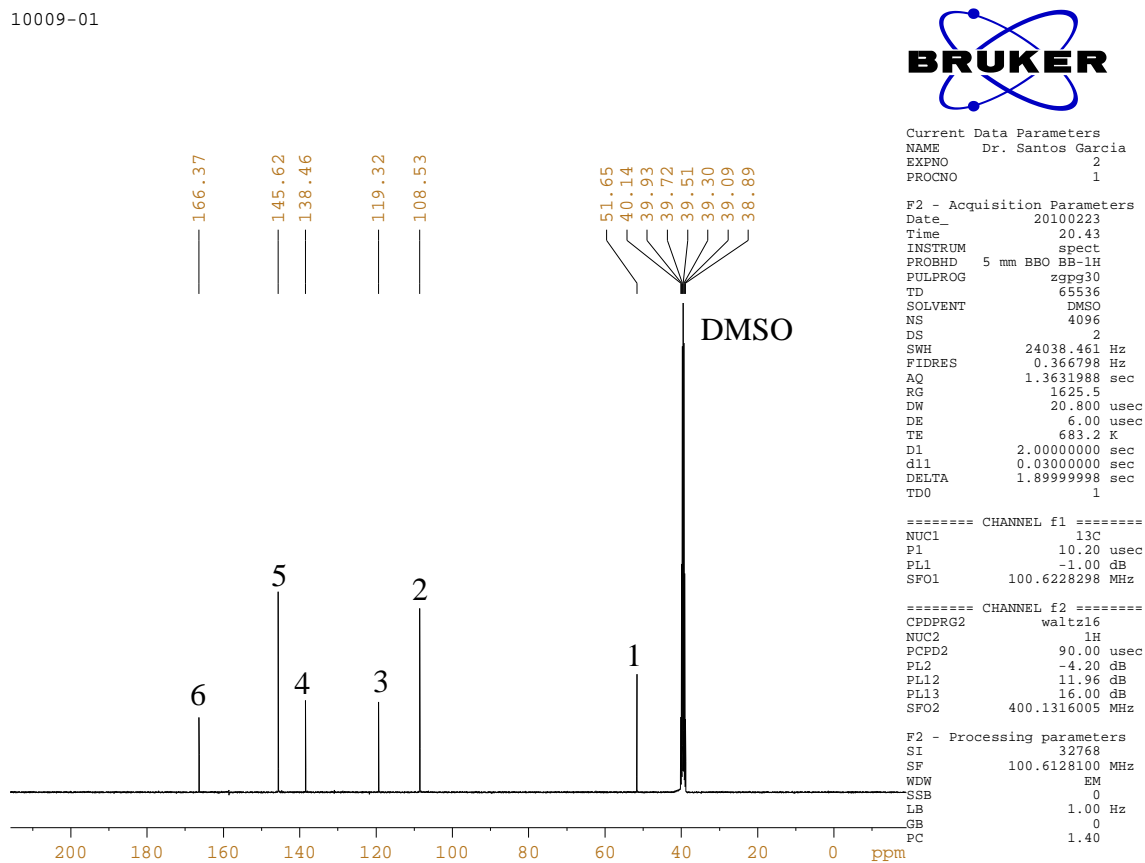


Fig. 18. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN<sup>13</sup>; 100MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del compuesto aislado del huizache.

El análisis final de los espectros dieron como resultado que el compuesto aislado responsable de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico del huizache es un compuesto fenólico denominado metil galato (Fig 19)

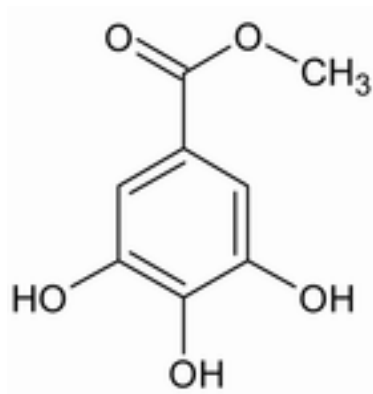


Fig 19. Estructura química del Metil Galato

### 8.5.2 *Opuntia ficus-indica* var Villanueva (Nopal).

#### 8.5.2.1 Extracción tipo Soxhlet del extracto de nopal.

La purificación de los compuestos presentes en el nopal, se realizó mediante la misma metodología utilizada para el huizache, con algunas modificaciones. Para esto se montaron 480 gr de la planta seca y triturada en 2 equipos de extracción en reflujo tipo Soxhlet, como en el caso anterior el hexano fue el primer solvente que se utilizó obteniendo un rendimiento de 4.7 g de extracto hexánico seco, posteriormente se utilizó cloroformo obteniendo un rendimiento de 4.2 g de extracto seco, después metanol con un rendimiento de 3.8 g y por último el agua obteniendo 3.1 g de extracto seco. A todos los extractos obtenidos de esta forma se les evaluaron sus propiedades antimicrobianas, sin embargo en este caso aproximadamente 4 g del extracto hexánico y clorofórmico secos, fueron reflujaados con 100 ml de MeOH durante 30 min, el MeOH fue evaporado a 50°C hasta obtener 10 ml de extracto metanólico, todo lo anterior fue evaluado mediante la técnica del pozo en agar, resultando que como en el caso anterior, el extracto metanólico fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana, con un halo de inhibición de  $2.4 \pm 0.1$  cm de diámetro, por su parte los extractos hexánico y clorofórmico reflujaados con MeOH, presentaron mínima actividad antimicrobiana y el acuoso no presentó actividad (Fig 20)

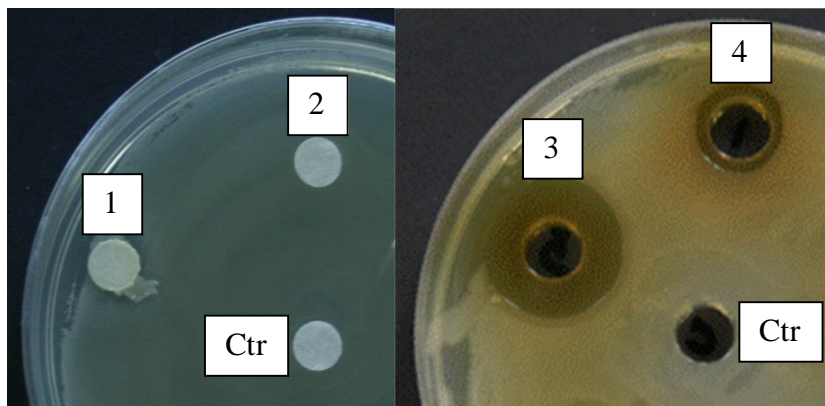


Fig 20. Efecto del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), metanólico (3) y acuoso (4) del Nopal, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet.

#### 8.5.2.2 Cromatografía en columna y TLC del extracto de nopal.

Posteriormente, el extracto metanólico fue fraccionado mediante cromatografía en columna, en este caso también se obtuvieron 48 fracciones de 250 ml, utilizando como fase móvil diferentes concentraciones de cloroformo y metanol, dichas fracciones fueron evaporadas a temperatura ambiente y resuspendidas en no más de 20 ml de metanol, estas fracciones fueron sometidas a TLC, mediante la cual se evaluó tanto la pureza como la similitud de las fracciones trabajadas (Fig 21).

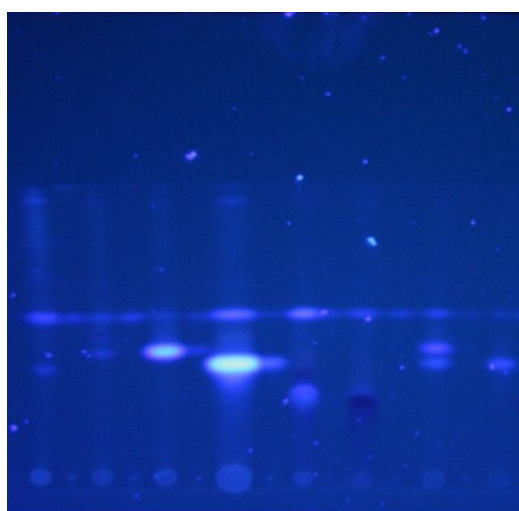




Fig 21. TLC de diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto metanólico de nopal, utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  7:3 y observadas con luz UV.

### 8.5.2.3 Selección de fracciones con actividad antimicrobiana.

Después de esto se evaluó su actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión del pozo en agar, encontrando que las fracciones activas correspondían a las obtenidas entre  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  en una proporción de 9.5:0.5 hasta  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  7:3, las demás fracciones presentaron muy poca o ninguna actividad antimicrobiana (Fig 22). Las fracciones activas fueron corridas en TLC y en base a estos resultados se seleccionaron las fracciones obtenidas con la combinación de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  9:1 y 8.5:1.5, las cuales presentaron mayor porcentaje de pureza (Fig 23) y de actividad antimicrobiana.

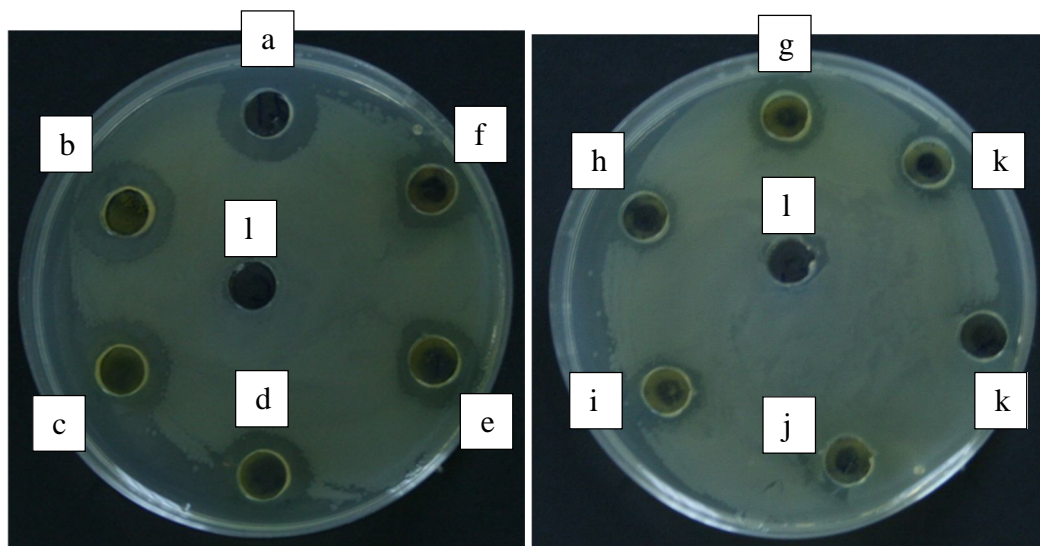


Fig 22. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto de huizache, utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  a) 9.5:0.5, b) 9:1, c) 8.5:1.5, d) 8:2, e) 7.5:2.5, f) 7:3, g) 6.5:3.5 h) 6:4, i) 5.5:4.5 j) 1:1 k)  $\text{MeOH}$  y l) Ctr.

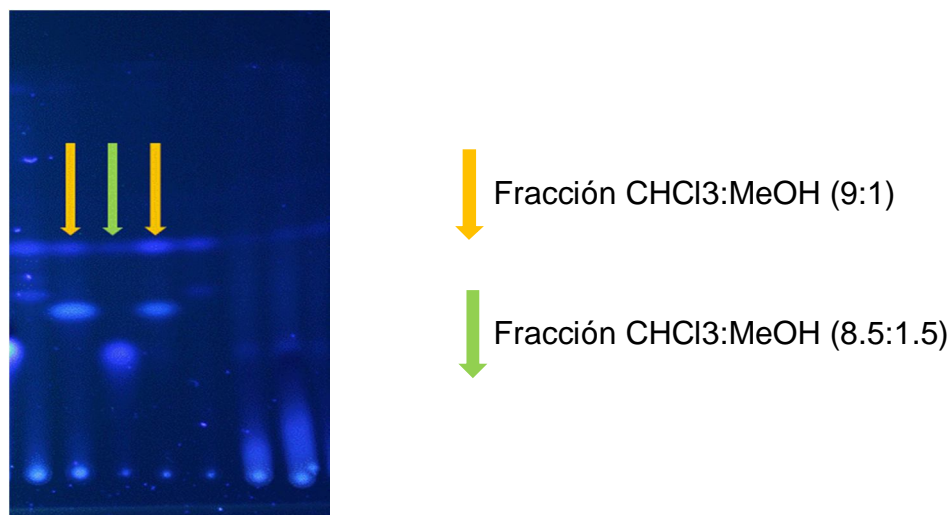


Fig 23. TLC de diferentes fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto metanólico de nopal, utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 8:2 y observadas con luz UV.

#### 8.5.2.4 Autobiografía de extracto de nopal.

Una vez seleccionadas las fracciones se procedió a la purificación del compuesto activo y para esto se utilizó la cromatografía en capa preparativa (PLC) y una técnica auxiliar denominada autobiografía, mediante la cual podemos detectar cual de las bandas obtenidas en la PLC es la responsable de la actividad antimicrobiana. Primero se prepararon placas para la PLC de 5X20, la fracción de interés se colocó aproximadamente a 1 cm de la base de la placa para posteriormente eluirse con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH en una proporción de 7:3 (Fig 24). Posteriormente se colocó una capa de agar fundido sobre la cromatografía, después de solidificar se sembró la cepa bacteriana por extensión, y se incubó en cámara húmeda durante 24 h, los resultados indican que la banda azul observada bajo luz UV, es la responsable de la actividad antimicrobiana (Fig 25).

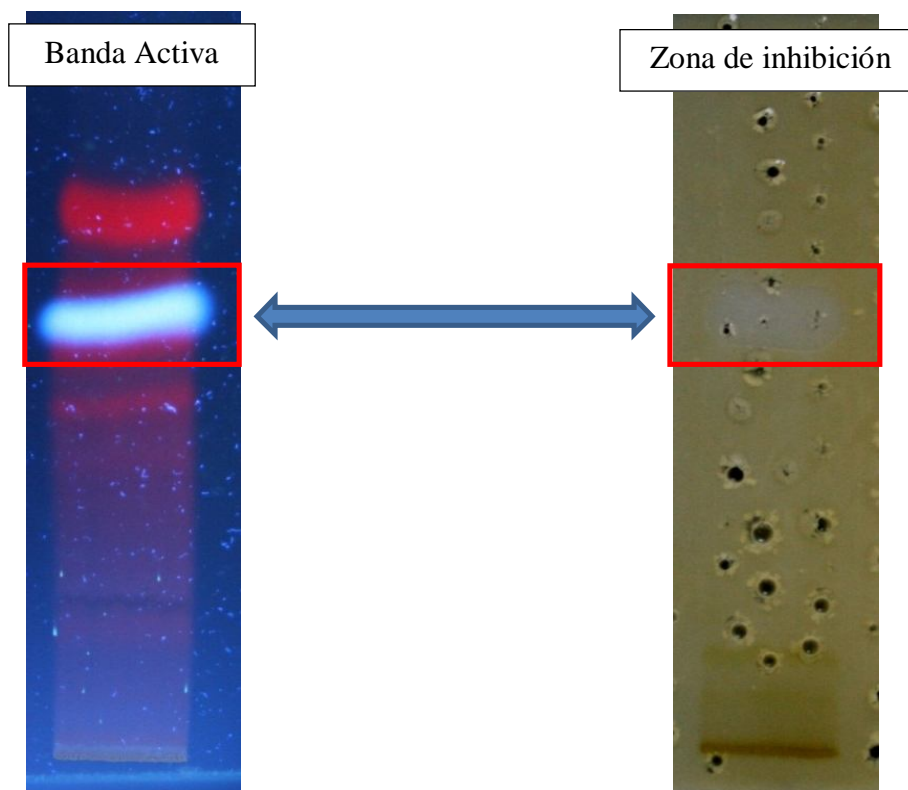


Fig 24. PLC de la fracción activa del nopal eluída con  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (7:3) y observada bajo luz UV.

Fig 25. Autobiografía de la fracción activa del nopal eluída con  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (7:3).

#### 8.5.2.5 Obtención del compuesto puro.

Una vez determinada la banda responsable de la inhibición, se procedió a preparar placas de PLC de 20X20, y eluirlas con  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (7:3), como previamente se mencionó, las placas fueron observadas bajo luz UV para detectar la banda de interés (Fig 26).

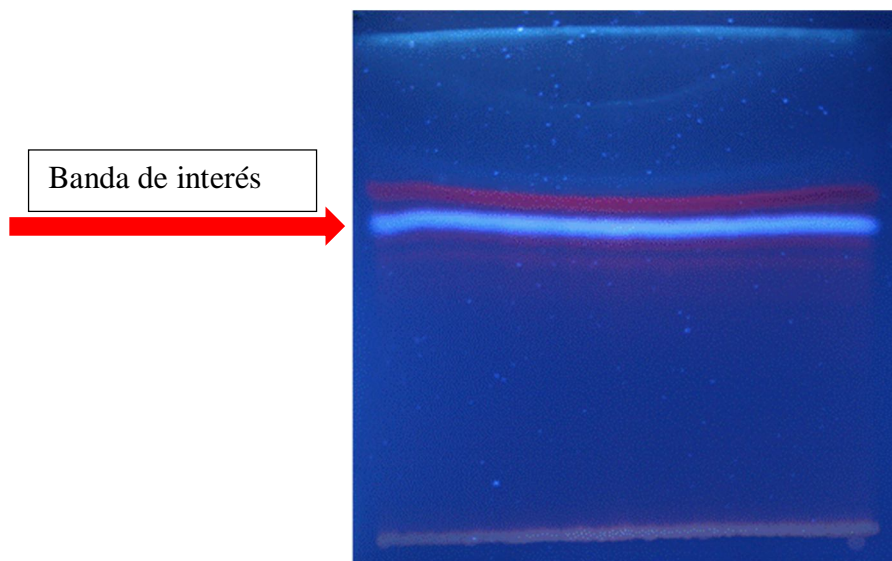


Figura 26. Placas de PLC de 20X20 eluída con  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (7:3), donde se muestra la banda activa que fue purificada.

Posteriormente la banda de interés fue raspada y retirada de la placa de vidrio, y por último la silica obtenida fue lavada con MeOH para recuperar el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana, y para evaluar la pureza del compuesto utilizamos el HPLC en modo analítico (Fig 27), sin embargo como no se consiguió purificar al 100% el compuesto, esta técnica se repitió varias veces hasta obtener una cantidad considerable de compuesto y realizar las pruebas microbiológicas pertinentes, esto debido a problemas técnicos con el modo preparativo del HPLC. La pureza y la actividad del compuesto aislado al cual se le asignó el nombre de Pro-OFi, fue determinada con las técnicas antes mencionadas (Fig 28).

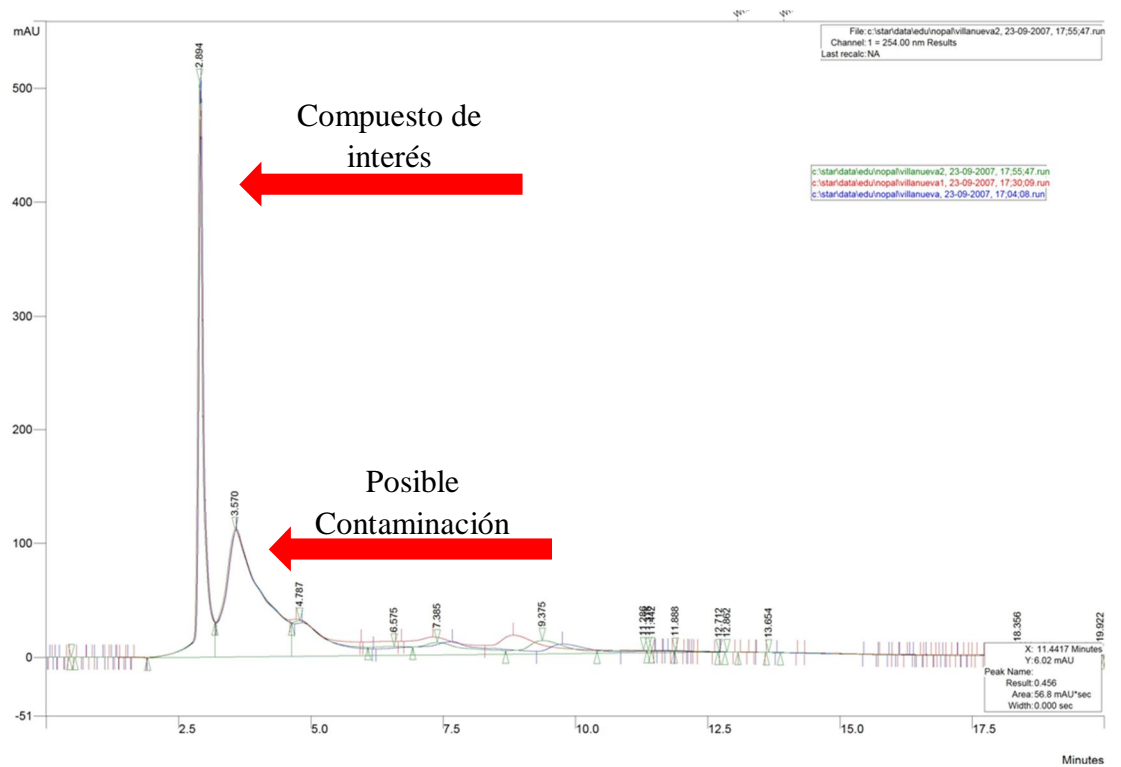


Fig 27. Cromatograma del compuesto aislado del nopal, mediante PLC.

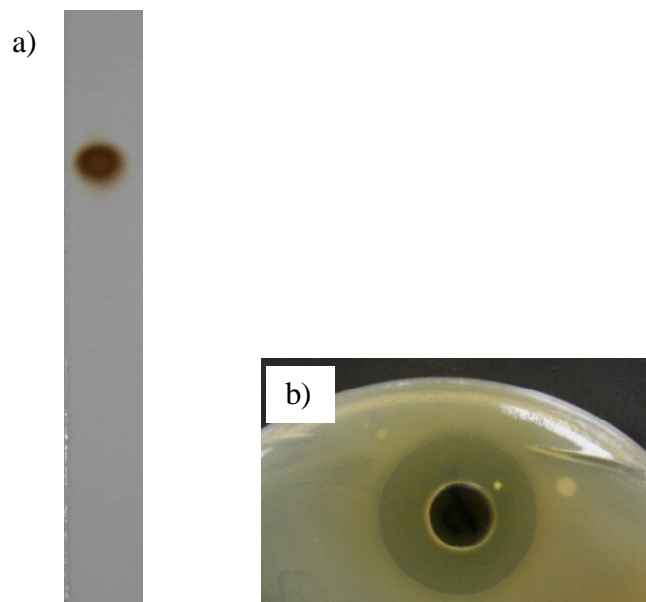


Fig 28. a) TLC del compuesto aislado del nopal y b) Actividad antimicrobiana del compuesto aislado al cual se le denominó Pro-OFi.

### 8.5.3 *Artemisia ludoviciana* (Estafiate) y *Ocimum basilicum* (Albahaca)

#### 8.5.3.1 Extracción tipo soxhlet de los extractos de estafiate y albahaca

La purificación de los compuestos presentes en el estafiate y en la albahaca, se realizó de forma similar a lo antes expuesto. En este caso esto se montaron 490 gr de estafiate y 475 g de albahaca, en 2 equipos de extracción en reflujo tipo soxhlet, el hexano fue el primer solvente que se utilizó obteniendo un rendimiento de 3.9 g y 4.1 g de extracto respectivamente, con el cloroformo se obtuvieron 3.5 g y 4.0 g de extracto seco, el metanol arrojó un rendimiento de 3.5 y 3.2 g y el agua extrajo 2.6 g y 3.0 g de extracto seco.

#### 8.5.3.2 Evaluación antimicrobiana de los extractos de estafiate y albahaca.

La actividad antimicrobiana de los extractos, fue evaluada mediante la técnica del pozo en agar y de difusión del papel filtro, encontrando que el extracto metanólico fue el único que presentó actividad antimicrobiana, con un halo de inhibición de  $3.4 \pm 0.1$  cm de diámetro en el caso del estafiate y de 2.5 cm de diámetro en el caso del albahaca, por otro lado los el extractos hexánicos, clorofórmicos y acuosos de ambas plantas, no presentaron actividad antimicrobiana (Fig 29 y Fig 30).

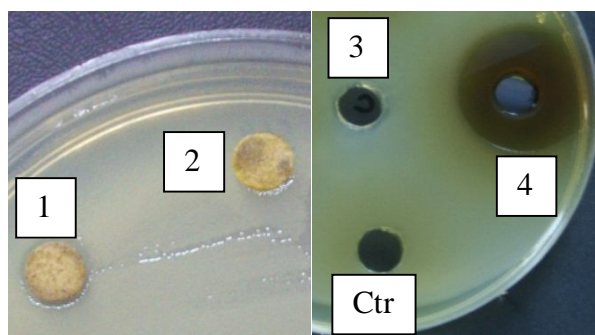


Fig 29. Efecto del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), acuoso (3) y metanólico (4) del Estafiate, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet.

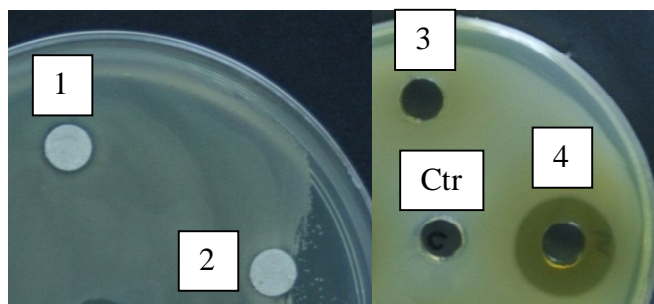


Fig 30. Efecto antimicrobiano del extracto hexánico (1), clorofórmico (2), acuoso (3) y metanólico (4), de la Albahaca, obtenidos mediante extracción tipo Soxhlet.

### 8.5.3.3 Cromatografía en columna de los extractos de huizache y albahaca.

Ambos extractos metanólicos fueron montados en columna para su separación (Fig 31) utilizando como fase móvil diferentes concentraciones de cloroformo y metanol, las fracciones obtenidas fueron evaluadas mediante TLC, para determinar su pureza y juntar las fracciones similares (Fig 32).

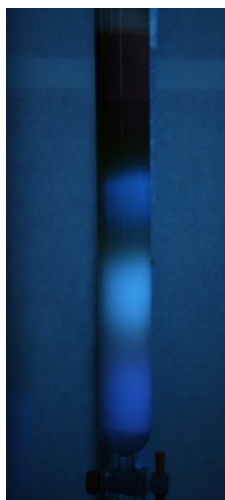


Fig 31. Cromatografía en columna del extracto metanólico del estafiate obtenido mediante extracción en reflujo tipo Soxhlet y observada bajo luz UV.

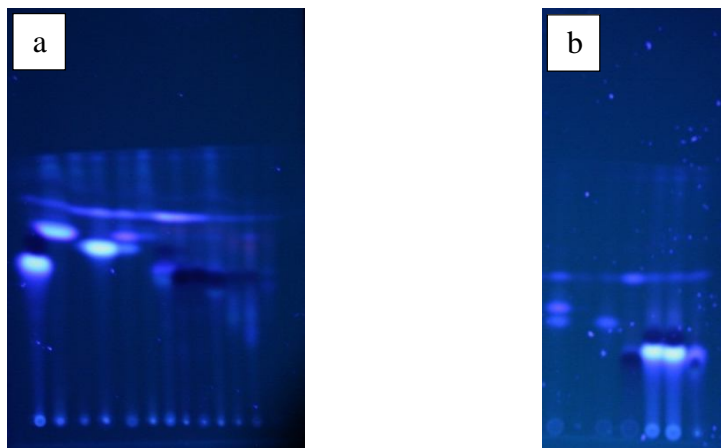


Fig 32. TLC de las fracciones del extracto metanólico del estafiate (a) y de las fracciones del extracto metanólico de la albahaca (b) obtenidos mediante cromatografía en columna y observadas bajo luz UV.

A las fracciones anteriores se les evaluó su actividad antimicrobiana, encontrando que en ambos casos las fracciones activas correspondieron a las obtenidas con  $\text{CHCl}_3$  (resuspendida en MeOH) y con la mezcla  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 9:1 hasta 8:2 (Fig 33).

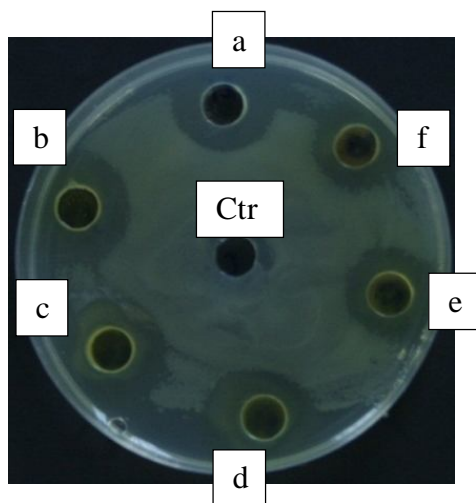


Fig 33. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto de estafiate utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3$  (resuspendido en MeOH) (a),  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (b) 9:1 y 8:2 (c) y del extracto de la albahaca utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3$  (resuspendido en MeOH) (d),  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (e) 9:1 y (f) 8:2.



### 8.5.3.4 HPLC y PLC de los extractos de estafiate y albahaca.

La pureza de la fracción del extracto de estafiate obtenida con la mezcla CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9:1, fue evaluada con la ayuda del HPLC en modo analítico (Fig 34), esta fracción fue seleccionada debido a su actividad antimicrobiana y a la cantidad obtenida que fue de aproximadamente 365 mg. En este caso se puede observar un pico principal con un tiempo de retención de 9.609 min, el cual consideramos pudiera ser el responsable de la actividad antimicrobiana, sin embargo la fracción presentó cierto grado de contaminación, por lo que se procedió a utilizar la PLC para aumentar el grado de pureza del compuesto. Sin embargo a pesar de repetir la técnica varias veces, no fue posible purificar al 100% el compuesto de interés, posiblemente porque la contaminación estaba prácticamente unida al compuesto de interés. En la Fig 34 se muestra la posible contaminación que no fue posible eliminar con la tecnica PLC, por lo que se decidió continuar con la purificación de la fracción activa de la albahaca.

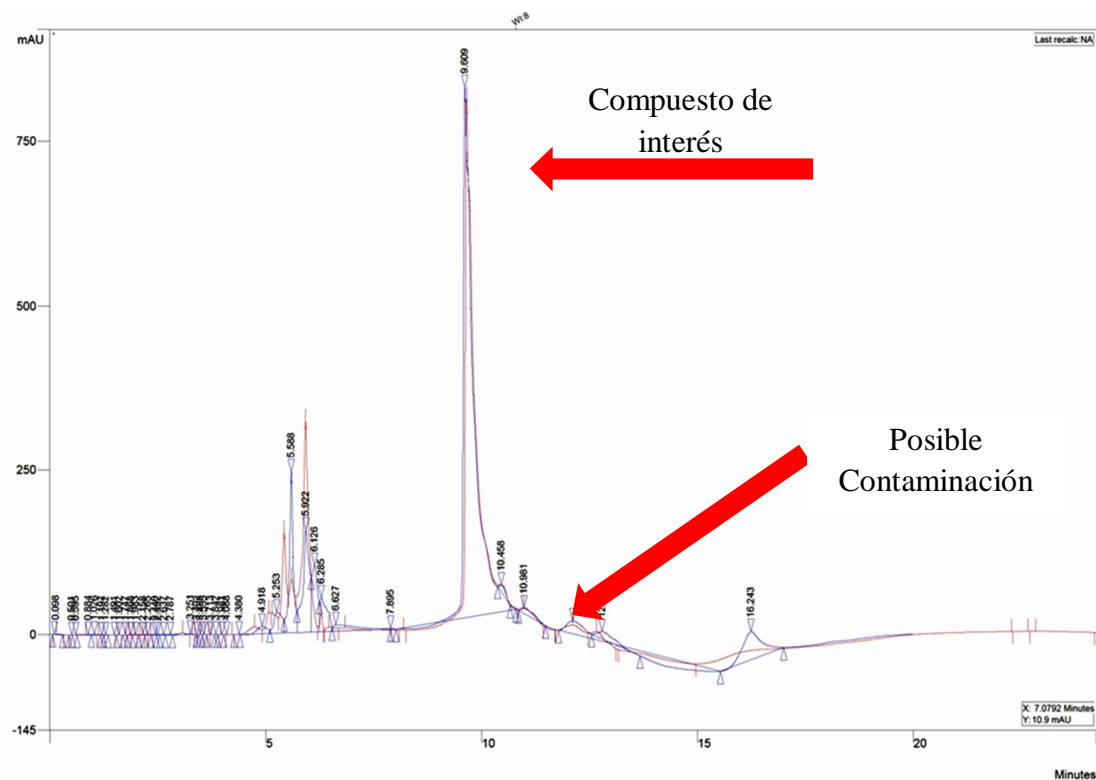


Fig 34. Cromatograma del compuesto de interés semipurificado del extracto de estafiate mediante PLC.

Por último con el extracto de albahaca se presentaron problemas similares, y a pesar de aplicar las técnicas antes mencionadas no se logró purificar el compuesto de interés, de hecho se logró estimar que la pureza del extracto solo alcanzó aproximadamente el 80%, además conforme se realizaban las cromatografías (PLC), se fue perdiendo la actividad antimicrobiana, hasta que la fracción prácticamente quedó sin actividad (Fig 35), esto posiblemente es debido a que la mezcla compleja de los compuestos presentes en la fracción activa quedaban adheridos a la sílica y no fue posible recuperarlos con los lavados o a que el efecto antimicrobiano se debe a la acción conjunta de varios compuestos y al separarlos la actividad se fue perdiendo paulatinamente. Debido a lo anterior se procedió a determinar el modo de acción de los compuestos puros aislados del huizache y del nopal.

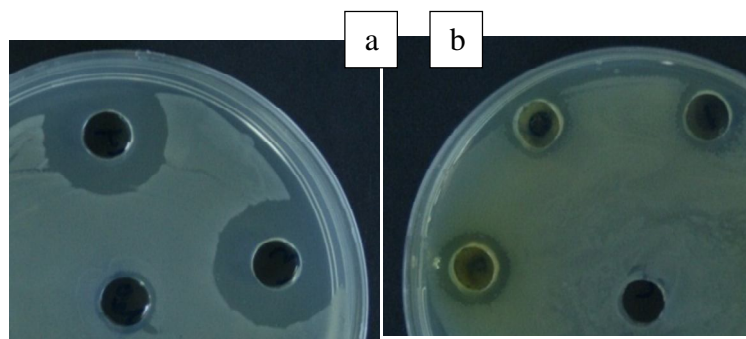


Fig 35. En la figura “a” se muestra la actividad original de la fracción antes del proceso de purificación, los halos de inhibición fueron de aproximadamente 2.0 cm. En la figura “b” se puede observar la reducción en la actividad antimicrobiana después del proceso de purificación.

## **8.6 Mecanismo de acción de los compuestos aislados del huizache (metil galato) y del nopal (Pro-OFi).**

### **8.6.1 Determinación de la CMB del metil galato y del Pro-OFi**

Antes de determinar el mecanismo de acción de los compuestos aislados del huizache y del nopal, se determinó la CMB utilizando un método de microdilución y la

técnica de Miles y Mishra previamente descrita. En este caso los resultados indican que la CMB fue considerablemente más baja que la encontrada en los extractos crudos, antes de la purificación, ya que para el extracto metanólico de huizache la CMB fue de 0.5 a 0.9 mg/ml y para el compuesto aislado (metil galato) fue de 0.03 a 0.05 mg/ml, de acuerdo a la cepa probada. Lo mismo sucedió para el extracto metanólico del nopal cuya CMB fue de 3 mg/ml, la cual se redujo a niveles que fueron de 0.7 a 0.9 mg/ml también dependiendo de la cepa evaluada (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de la CMB obtenida de los extractos metanólicos del huizache y nopal con sus compuestos aislados metil galato y Pro OFi.

	<i>V. cholerae</i> (mg/ml)		<i>C. perfringens</i> (mg/ml)	
	569-B	1837	FD-1041	FD-1
Huizache	0.9±0.09	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.05
Metil Galato	0.05±0.001	0.03±0.001	0.045±0.001	0.05±0.002
Nopal	3±0.3	3±0.2	2±0.3	2±0.2
Pro OFi	0.7±0.01	0.9±0.04	0.5±0.01	0.7±0.03

### 8.6.2 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre la integridad de la membrana de *Vibrio cholerae* y *C. perfringens*.

Una vez determinada la CMB procedimos a evaluar el efecto de los compuestos aislados sobre la viabilidad de la membrana de las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*, y cuando se compararon los resultados se observaron diferencias significativas en la cantidad de células afectadas por las diferentes concentraciones de los compuestos, ya que en el caso de los extractos el porcentaje de células con la membrana comprometida no sobrepasó el 20% cuando se evaluó la CMB al 1X, sin embargo con los compuestos aislados el porcentaje de células con la membrana comprometida cuando se probó la CMB al 1X superó el 50% y cuando se utilizó la CMB al 5X el porcentaje se incrementó alrededor del 90% siendo que con los extractos crudos fue de aproximadamente 40%, y

de igual forma que en el caso de los extractos crudos la membrana celular del 100% de las de las cepas tratadas con las concentraciones 10 y 20X de la CMB fueron afectadas por los tratamientos con los compuestos aislados del huizache y del nopal (Fig 36).

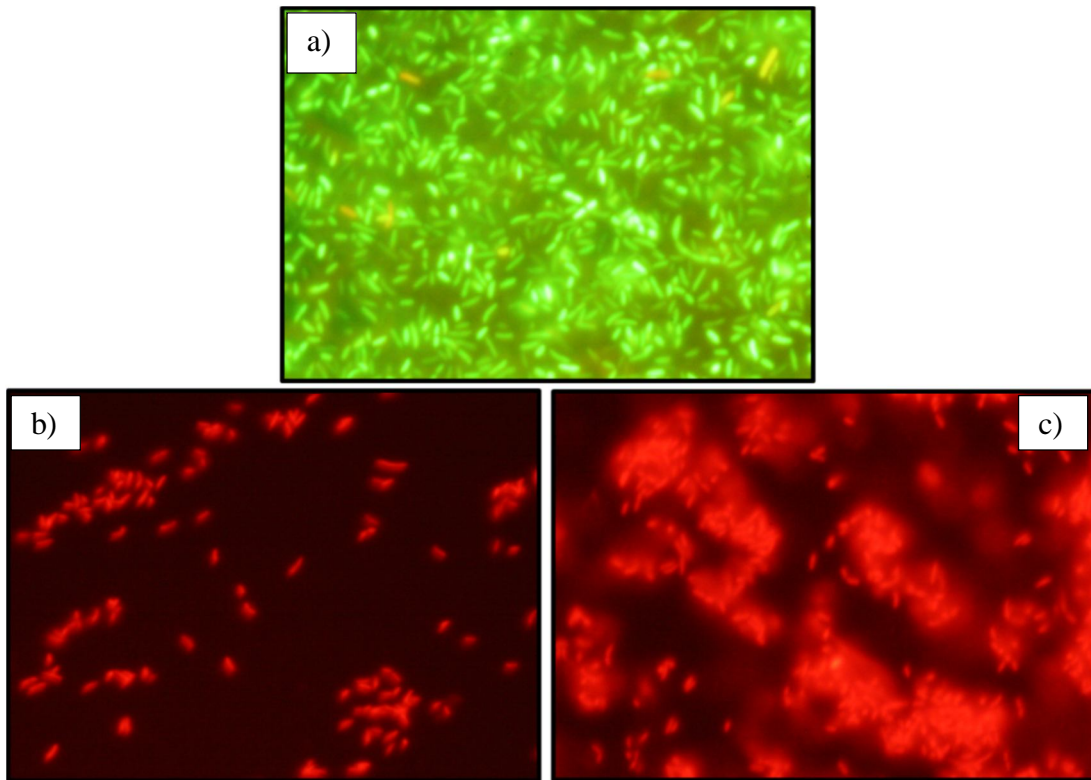


Fig. 36. Efecto de los compuestos aislados sobre la viabilidad de la membrana de *V. cholerae* 569-B. a) control; b) metil galato; c) Pro-OFi.

### 8.6.3 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre el sobre el pH citoplásmico ( $pH_{in}$ ) de *V. cholerae* y *C. perfringens*

La exposición de las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens* a los compuestos aislados del huizache y del nopal provocó un decremento significativo en el  $pH_{in}$  ( $p \leq 0.05\%$ ). El compuesto que mostró mayor actividad fue el metil galato aislado del huizache, presentando reducciones en el  $pH_{in}$  de hasta 2.1 en el caso de la cepa 1837, por su parte la reducción en el pH de la cepa 569-B de *V. cholerae* llegó a valores de pH

de 2.5. Las cepas de *C. perfringens* FD-1041 y FD-1 arrojaron valores de pH de 2.4 y 2.3 respectivamente. Además fue evidente que el metil galato fue más eficiente al reducir el pHin al compararlo con el extracto metanólico del huizache (Fig. 37).

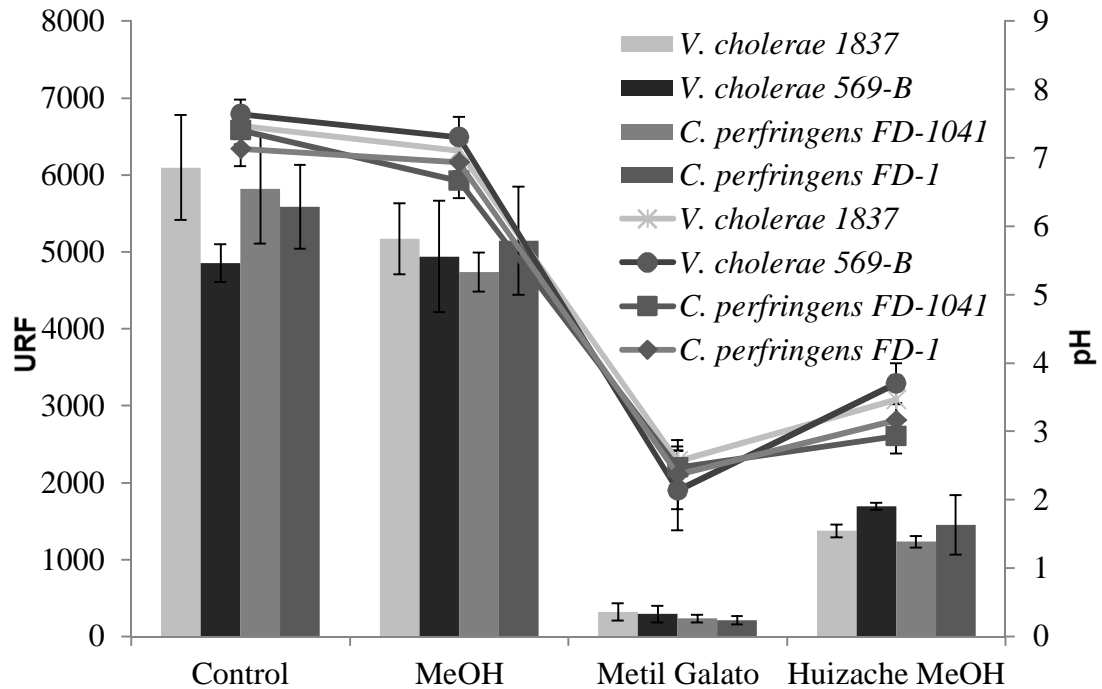


Fig. 37. Efecto del Metil Galato y del extracto metanólico de huizache sobre el pHin de las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

Por su parte, el compuesto aislado del nopal denominado Pro-OFi, redujo el pHin de las cepas de *C. perfringens* FD-1041 y FD-1 a valores de 2.6 y 2.5 respectivamente además la reducción obtenida con las cepas de *V. cholerae* 569-B y 1837 fue de 3.1 y 2.9 respectivamente. Además de igual forma que en el caso del metil galato, el compuesto Pro-OFi fue mas efectivo cuando se comparó con el extracto metanólico del nopal (Fig. 38)

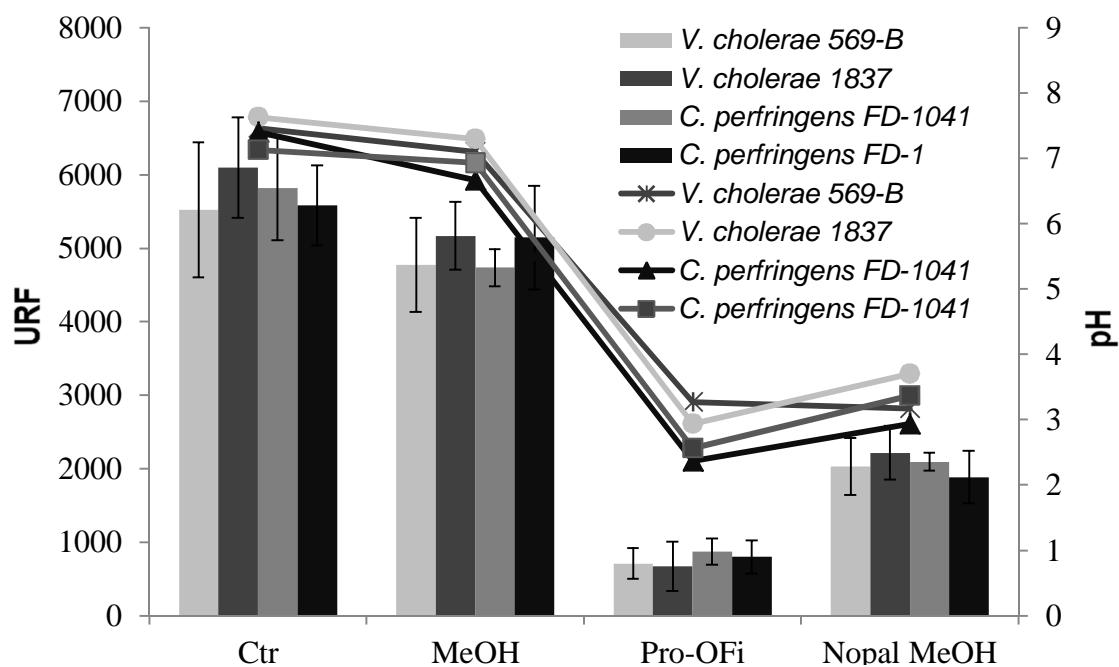


Fig. 38. Efecto del Pro-OFi y del extracto metanólico del nopal sobre el pH<sub>in</sub> de las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

En la tabla 8 se muestra un resumen de los pH's obtenidos por los compuestos aislados, metil galato y Pro-OFi, así como por los extractos metanólicos del huizache y del nopal, con las cepas 569-B y 1837 de *V. cholerae* y FD-1041 y FD-1 de *C. perfringens* (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto sobre el pH<sub>in</sub> de diferentes cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

	<i>V. cholerae</i>		<i>C. perfringens</i>	
	569-B	1837	FD-1041	FD-1
Control	7.4±0.3*	7.6±0.2	7.4±0.1	7.1±0.2
MeOH	7.1±0.3	7.3±0.3	6.6±0.2	6.9±0.1

Huizache	3.4±0.2	3.7±0.5	2.9±0.3	3.1±0.5
Metil Galato	2.5±0.2	2.1±0.3	2.4±0.2	2.3±0.3
Nopal	3.2±0.2	3.7±0.1	2.9±0.2	3.3±0.4
Pro-OFi	3.1±0.3	2.9±0.2	2.6±0.5	2.5±0.2

\* Desviación estándar

#### **8.6.4 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre el potencial de membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*.**

El potencial de membrana de todas las cepas probadas fue afectado significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con los controles. El compuesto que presentó mayor actividad contra todas las cepas probadas, fue el metil galato el cual ocasionó una marcada hiperpolarización de la membrana, de hecho al compararlo con el efecto del extracto metanólico del huizache, el efecto del compuesto aislado fue mucho mayor. Por su parte los resultados obtenidos con el Pro-OFi presentaron la misma tendencia en lo que respecta a la mayor actividad observada por el compuesto aislado al compararlo con el extracto metanólico del nopal. En este caso la fluorescencia obtenida indica que el efecto en la membrana es dado por un marcado proceso de despolarización (Fig. 39).

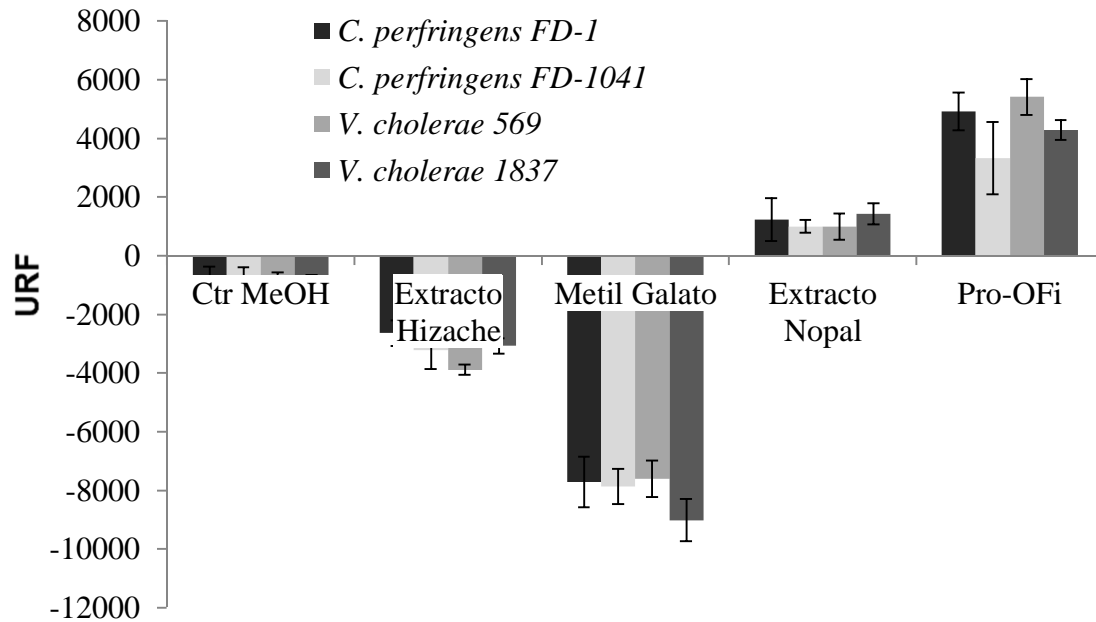


Fig. 39. Efecto de los compuestos aislados del huizache y del nopal sobre el potencial de membrana de las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

### 8.6.5 Efecto del metil galato y del Pro-OFi sobre el la síntesis de ATP celular de *V. cholerae*.

Los resultados obtenidos indican que los tratamientos con el metil galato y con el extracto metanólico del huizache afectaron significativamente la síntesis de ATP, siendo mas efectivo el metil galato, esto es evidente ya que cantidad de ATP detectada en los sobrenadantes es mínima, lo que indica que el ATP dejó de ser producido por las cepas tratadas. Por otro lado el efecto del Pro-OFi y del extracto metanólico del nopal fue diferente al antes mencionado, ya que en esta caso se detectaron altas cantidades de ATP en el sobrenadante de los cultivos tratados, esto sugiere que el ATP no deja de sintetizarse, sin embargo es liberado al medio después del tratamiento con el compuesto y con el extracto del nopal (Fig. 40).



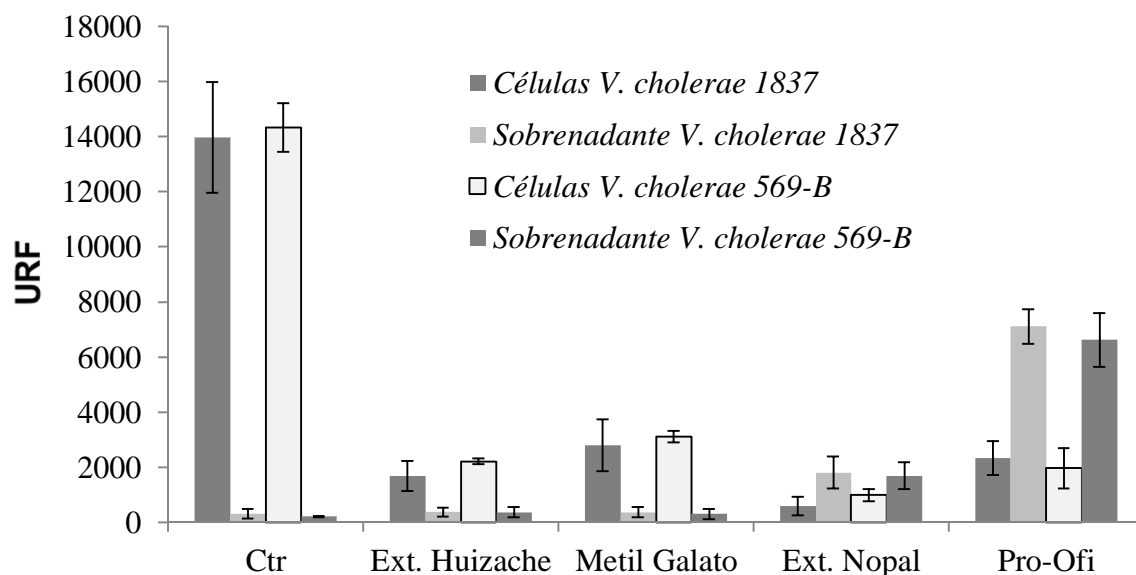


Fig. 40. Efecto de los compuestos aislados del huizache y del nopal sobre el potencial de membrana de las cepas de *V. cholerae* y *C. perfringens*.

#### 8.6.6 Efecto de los extractos metanólicos del huizache, estafiate, albahaca y nopal sobre la expresión del gen de la enterotoxina (*ctx*) de *V. cholerae*.

Por último procedimos a evaluar el efecto tanto de los extractos metanólicos probados así como de los compuestos activos aislados durante el transcurso de este trabajo sobre la expresión del gen *ctx* de *V. cholerae*, mediante PCR en Tiempo Real (qRT-PCR). Las condiciones ideales para el qRT-PCR fueron establecidas realizando gradiente de temperatura y gradiente de concentración de MgCl, y se determinó que la mejor Tm fue de 60°C y la concentración de MgCl fue estandarizada en 3.0 mM.

Después de esto procedimos a realizar el qRT-PCR, donde encontramos que ninguno de los extractos inhibió de manera significativa la expresión del gen *ctx* de *V. cholerae*, lo cual fue evidenciado debido a que la gráfica de amplificación no presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el valor del Ct, el cual fue de aproximadamente 28 (Fig. 41).

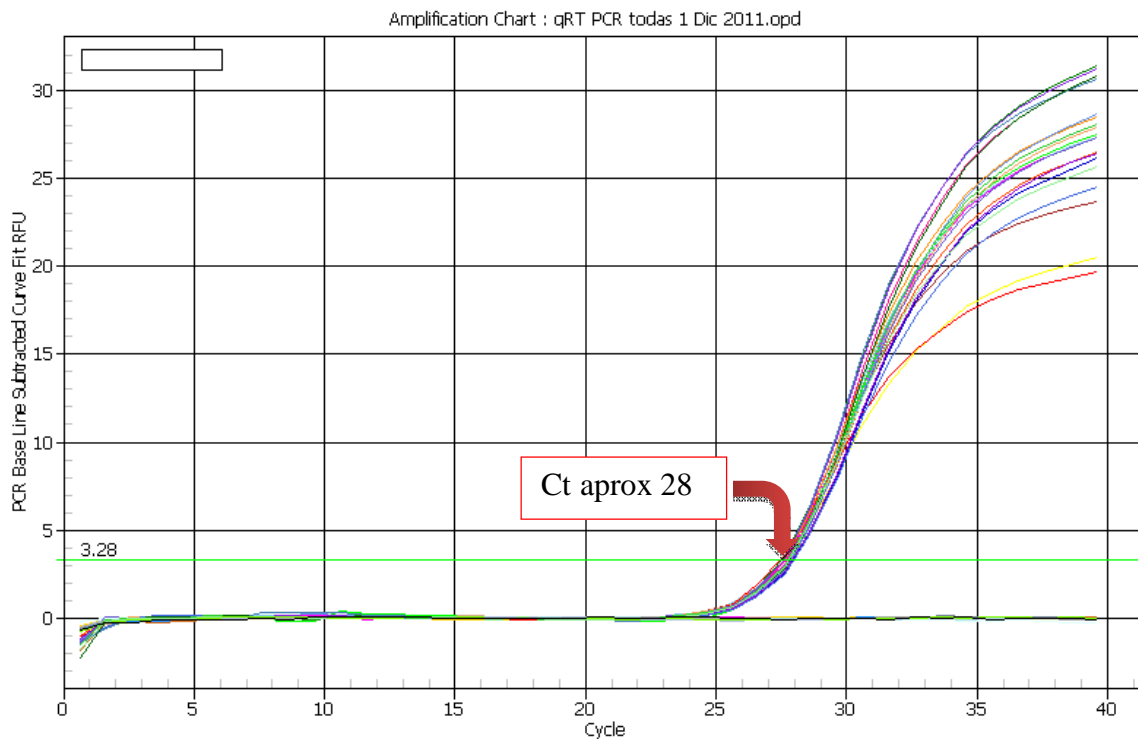


Fig. 41. Efecto de los extractos metanólicos del huizache, estafiate, albahaca y nopal sobre la expresión del gen *ctx* de *V. cholerae*.

#### 8.6.7 Efecto del metil galato y del Pro-OFl sobre la expresión del gen de la enterotoxina (*ctx*) de *V. cholerae*.

A pesar de que no obtuvimos resultados positivos en el ensayo anterior, decidimos probar el efecto de los compuestos aislados sobre la expresión del gen de la enterotoxina, los resultados obtenidos fueron los esperados ya que los compuestos aislados tampoco afectaron de forma significativa la expresión del gen *ctx* (Fig. 42).

## PCR Amp/Cycle Chart

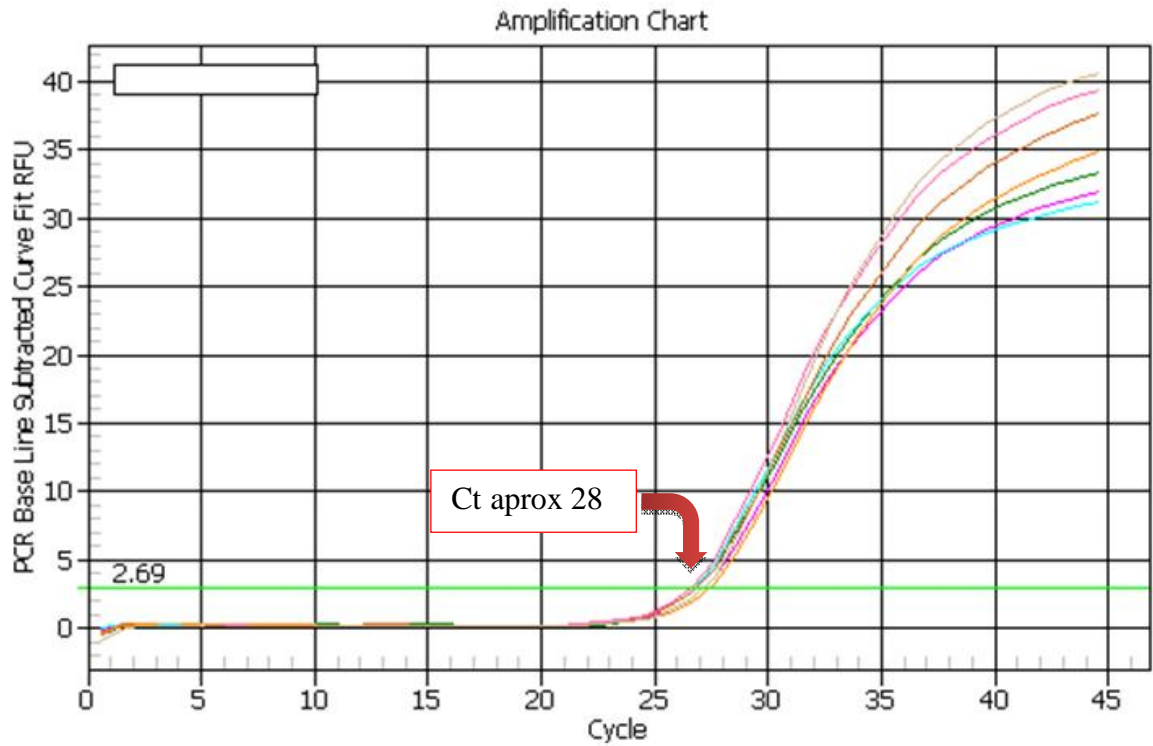


Fig. 42. Efecto de los compuestos aislados del huizache y del nopal sobre la expresión del gen *ctx* de *V. cholerae*.

## DISCUSION

Las propiedades antimicrobianas de las plantas han sido reconocidas desde hace tiempo y han sido utilizadas como conservantes de alimentos así como en la medicina tradicional, para tratar diversas enfermedades (Adiguzel *et al.*, 2009) sin embargo en muchos casos, el mecanismo de acción mediante el cual ejercen su efecto inhibitorio ha sido pobremente estudiado (Garcia-Alvarado *et al.*, 2001). En este trabajo, fueron evaluadas las propiedades antimicrobianas de extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de plantas medicinales y comestibles. Inicialmente se utilizó la técnica de difusión en pozo (Rasooli, 2007), la cual has sido ampliamente utilizada para determinar en forma preliminar la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas (Ergene *et al.*, 2006). De los 81 extractos analizados, los extractos metanólicos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, presentaron la mayor actividad antimicrobiana.

Cabe señalar que en todos los ensayos, los extractos metanólicos fueron más activos que los etanólicos o acuosos. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la literatura, ya que diversos estudios mencionan el mayor efecto inhibitorio de los extractos realizados con metanol. A este respecto Mothana en 2008, mencionó que los extractos metanólicos en general presentan mayor actividad antimicrobiana, así como El Astal *et al.*, 2005, quienes mencionaron que los extractos metanólicos presentaron mejor efecto inhibitorio al compararlos con los extractos metanólicos. Por otro lado Parekh *et al.*, 2005, encontraron que los resultados obtenidos con extractos de plantas realizados con metanol son mejores y más consistentes que los obtenidos con extractos acuosos. Estas observaciones son explicadas debido a la polaridad de los compuestos que son extraídos por cada uno de los solventes empleados para realizar los extractos, de hecho existen reportes que aseguran que los compuestos principales responsables de la actividad antimicrobiana de las plantas, son extraídos en mayor cantidad y en mayor número de compuestos diferentes con metanol como solvente de extracción (Cowan, 1999; Nickavar *et al.*, 2002).

De los cuatro extractos que presentaron mayor actividad, el nopal y la albahaca son utilizados como plantas comestibles mientras que el estafiate y el huizache han sido utilizados como plantas medicinales. Los usos de la albahaca se han reportado

principalmente como un ingrediente culinario para aderezar salsas y sopas. Sus hojas frescas se han utilizado en ocasiones como parte de ensaladas aunque también se utilizan secas para hacer té (Makinen and Paakkonen, 1999). Además se han reportado algunos usos medicinales incluyendo el tratamiento de enfermedades estomacales, gastroenteritis, así como en tratamiento de resfriados (Prabuseenivasan *et al.*, 2006).

Por su parte el nopal es una planta abundante en México que juega un papel ecológico muy importante en la conservación del suelo así como en la producción de frutas comestibles. Este vegetal es consumido fresco en ensaladas y cocido o guisado en diferentes formas (nopalitos), además los frutos (tunas) y los cladodios son utilizados para preparar productos de como dulces, licores, lociones corporales, cremas, champús entre otros. El nopal también se le atribuye algunos usos medicinales, como el tratamiento de heridas colocando los cladodios “tatemados” directamente sobre la herida y para tratar desordenes gástricos como la gastritis, además de usos industriales, como la producción de harina y otros productos como los denominados alimentos saludables. (Singh and Felker, 1998; Valdez *et al.*, 2008). En México la pulpa y el jugo del nopal ha sido utilizado para tratar diversas enfermedades como parásitos intestinales, inflamaciones del aparato digestivo y del tracto urinario (Fрати-Munari *et al.*, 1983).

El estafiate es una planta medicinal utilizada para tratar problemas estomacales, tos, resfriados y dolores de cabeza. (Zavala-Sanchez, 2002). También se ha demostrado que alivia los síntomas de la diarrea. El té hecho de esta planta, es utilizado en la medicina tradicional mexicana para aliviar problemas intestinales (Ruiz-Cancino *et al.*, 1993). Por otra parte, el huizache tiene muchos usos tradicionales: El té hecho con los tallos o ramas es utilizado contra el prolapso rectal, las raíces para el tratamiento de la tuberculosis, las flores son utilizadas como remedios para el dolor de cabeza y como tratamiento de la indigestión. El fruto es utilizado para tratar disentería e infecciones de la piel (Standley and Parrotta, 2001).

Las CMB's obtenidas con el estafiate y huizache fueron relativamente bajas en rangos de 0.5 a 0.9 mg/ml, para el caso de las cepas de *V. cholerae* y de entre 0.5 a 0.6 mg/ml, en el caso de las cepas de *C. perfringens*. Para el caso de *V. cholerae*, estos resultados difieren a los encontrados en la literatura ya que en el 2006, Garcia *et al.*,

reportaron que los extractos etanólicos de *Acacia farnesiana* (huizache) y *Artemisia ludoviciana* (estafiate) presentaron CMB's en rangos de 4 a 7 mg/ml contra tres cepas de *V. cholerae*. Esta diferencia es probablemente debida a factores tales como a) el lugar de colecta de la planta, b) la época de colecta, c) factores climato-geográficos o el estado fenológico de la planta colectada (Rodríguez, 1998), d) así como ya se mencionó, de manera más relevante el solvente utilizado que en este caso es el metanol (Cowan, 1999) y e) el tipo de extracción utilizado para la obtención del extracto. Esto último se apoya en que se tienen reportes de que el sistema en reflujo tipo soxhlet es más eficiente para la extracción casi completa de los compuestos naturales de interés, debido a que el sistema en equilibrio aporta solvente fresco a la matriz sólida (planta seca), además de mantener una temperatura relativamente elevada lo que hace mas eficiente el sistema de extracción (Tandon and Rane, 2008). Por su parte las CMB's de la albahaca, fueron de 2 mg/ml para las cepas de *C. perfringens* y de 3 mg/ml para las cepas de *V. cholerae*, estos resultados corroboran reportes anteriores sobre la actividad antimicrobiana de esta planta ya que existen reportes de la actividad antimicrobiana de la albahaca contra *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras cepas bacterianas (Durga *et al.*, 2010; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010; Daneshian *et al.*, 2011). En lo que respecta al extracto de nopal este presentó CMB's similares a las de la albahaca, 2 mg/ml para *C. perfringens* y 3 mg/ml para *V. cholerae*. A este respecto, lo destacable es que existen pocos reportes en la literatura sobre la actividad antimicrobiana de esta especie, y la mayoría de los reportes se basan en las propiedades medicinales como anti-úlceras, anti-inflamatorio, diurético y cardiotónico (Galati *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Butera *et al.*, 2002; Gurrieri *et al.*, 2000; El Kossori *et al.*, 1998), además de utilizarse como control de la diabetes (Wolfram *et al.*, 2002; Bwititi *et al.*, 2001; Satta and Sisini, 1964).

Cabe señalar que la tetraciclina que fue el antibiótico utilizado como control positivo en los ensayos de CMB, presentó una actividad muy superior a los extractos, la cual fue de entre 2 a  $5 \times 10^{-5}$  mg/ml, esto concuerda con la literatura ya que se menciona que para incrementar la actividad de los extractos, los compuestos bioactivos deben de

probarse purificados lo que traería como consecuencia que las CMB's de dichos compuestos sean más bajas que la de los extractos crudos (Omojola and Awe, 2004)

Las investigaciones realizadas sobre el mecanismo de acción de compuestos antimicrobianos, incluyendo los compuestos naturales, se han enfocado principalmente en la determinación de ciertos parámetros de importancia para la homeostasis celular como la determinación de la viabilidad de la membrana (Lambert *et al.*, 2001; Skandamis *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002), la determinación de la alteración y disipación de los componentes de la fuerza protón motriz, el pH citoplásmico ( $pH_{in}$ ) y el potencial eléctrico (Sikkema *et al.*, 1995). Y para esto se ha utilizado el marcado directo de células con colorantes fluorescentes (Lahtinen *et al.*, 2005).

Para detectar el daño en las membranas celulares se utilizó el kit LIVE/DEAD BacLight. Este método contiene 2 fluorocromos SYTO 9 el cual tiene la capacidad de penetrar todas las células en un población microbiana sin importar la condición de sus membranas y el Ioduro de Propidio que solamente penetra en células con la membrana dañada lo que reduce la fluorescencia del colorante SYTO 9. Cuando los dos colorantes están presentes en proporciones apropiadas, las bacterias con la membrana celular intacta fluorescerán color verde, mientras que las células con la membrana dañada fluorescerán color rojo (Braga *et al.*, 2003; Leuko *et al.*, 2004). En algunos casos pueden ser observados colores ambiguos como amarillo o naranja, y cuando esto se presenta la mayoría de las veces se considera que la membrana es afectada en cierto grado pero no en su totalidad (Boulos *et al.*, 2004) Con este método se determinó que los cuatro extractos metanólicos probados, afectaron la membrana celular de ambas cepas bacterianas, causando un aumento en su permeabilización, la cual fue detectada por la incorporación del colorante yoduro de propidio. Este sistema resultó ser sumamente efectivo y presentó ventajas al compararlo con el método tradicional utilizado para determinar viabilidad bacteriana, la cuenta viable en placa (CVP), debido a su rapidez, ya que el efecto de las diferentes concentraciones de los extractos sobre la membrana, se obtenía en tan solo 30 min. Además la literatura menciona que el método CVP, presenta inconvenientes ya que se puede subestimar la porción viable real de una población microbiana (Barer and Harwood, 1999). Esto es debido a que se han reportado diferentes grados de viabilidad celular, uno de ellos es el estado viable no cultivable, el cual ha

sido ampliamente estudiado en *V. cholerae* y que puede ser inducido debido a condiciones subletales de estrés o daño celular (Kell *et al.*, 1998; Edwards, 2000). Por otro lado, este método ha sido utilizado satisfactoriamente con varias especies de bacterias en bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *Salmonella oranienburg*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Y todas ellas mostraron buena correlación entre los resultados obtenidos con el kit LIVE/DEAD *BacLight* y los obtenidos con los métodos estándar de plaqueo. Además se han realizado evaluaciones en diferentes medioambientes y en productos alimenticios (Berney *et al.*, 2007; Leuko *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008).

El pH citoplásmico ( $\text{pH}_{\text{in}}$ ) ha sido reconocido como un aspecto importante en la fisiología de la célula bacteriana, sobre el cual la célula tiene estrechos procesos de regulación (Booth, 1985). En resumen la regulación del  $\text{pH}_{\text{in}}$ , implica el control de los sistemas de transporte de iones lo cual facilita la entrada de protones, lo cual está estrechamente relacionado con la permeabilidad de la membrana celular (Nakamura *et al.*, 1982). El pH intracelular fue determinado con la prueba fluorescente 5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDA-SE) (Breeuwer *et al.*, 1996), la cual cuando penetra la membrana celular bacteriana, es hidrolizada por esterasas intracelulares específicas eliminando el grupo succinimidyl ester (SE) el cual es altamente fluorescente y dependiente del pH (Holyoak *et al.*, 1996). En el caso particular de este trabajo, *V. cholera* y *C. perfringens* son considerados microorganismos neutrófilos que presentan un  $\text{pH}_{\text{in}}$  de entre 7.5 y 8.0 y cabe señalar que todos los extractos probados indujeron cambios en el  $\text{pH}_{\text{in}}$ , obteniendo reducciones en los valores de pH de entre 2 y 3, lo que podemos relacionar con el daño en la membrana previamente mencionado. En general una bacteria energéticamente activa puede regular el  $\text{pH}_{\text{in}}$  con cambios de 0.1 unidades cuando el pH del medio ( $\text{pH}_{\text{ex}}$ ) cambia en valores de 1 unidad (Hackstadt, 1983), sin embargo, la ruptura del gradiente de pH conduciría a una acidificación del citoplasma la cual puede ser determinada por una reducción en la fluorescencia (Breeuwer *et al.*, 1996), lo que explicaría los resultados obtenidos en esta investigación.



El método ha sido reportado como efectivo tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas. Sin embargo algunas interferencias pueden ocurrir con las Gram-negativas por la inhabilidad del cFDA-SE de cruzar la membrana externa de estos microorganismos. La pre-incubación de la bacteria con EDTA, ha sido sugerida para contrarrestar este problema (Breeuwer *et al.*, 1996).

En este trabajo todos los extractos indujeron cambios en el  $\text{pH}_{\text{in}}$ , indicando que hubo daño en la membrana. La reducción en el pH interno de otros microorganismos como *Staphylococcus aureus* ha sido observada como resultado del tratamiento con orégano, timol y carvacrol.

El DiBAC<sub>4</sub> (Berney *et al.*, 2007) es un colorante fluorescente utilizado para determinar el potencial de membrana ya que sirve como indicador de cambios en la polaridad de membrana. La fluorescencia emitida por este reactivo, se ve aumentada cuando este atraviesa la membrana celular, como resultado de una despolarización de membrana (carga menos negativa dentro de la célula) (Whiteaker *et al.*, 2001). Tres de los extractos metanólicos analizados (albahaca, huizache, estafiate), causaron hiperpolarización de la membrana (carga más negativa dentro de la célula). Aunque el efecto de despolarización era esperado, la hiperpolarización ha sido reportada también como un importante tipo de daño a membrana (Yuroff *et al.*, 2003). Estudios recientes de este fenómeno, concluyeron que la hiperpolarización ocurre principalmente debido al cambio de pH (de ácido a neutro) o por aumento en el movimiento de iones, específicamente K<sup>+</sup>, que se difunde fuera de la membrana celular a través de los canales de K<sup>+</sup> afectando la homeostasis de la célula (Bot and Prodan, 2009).

Los extractos de nopal, incrementaron la fluorescencia en las células tratadas, debido a una despolarización de la membrana (menos negativo dentro de la célula), como resultado del cambio significativo en el potencial de membrana (Jepras *et al.*, 1997).

Cuando se determinó el ATP celular, se encontró que en presencia de los extractos metanólicos, los cuatro extractos causaron un decremento en la concentración del ATP citoplásmico en ambas cepas probadas. La determinación del ATP intra y

extracelular de los cultivos tratados con los extractos metanólicos de huizache, estafiate y albahaca, revelaron que los niveles de ATP dentro de la célula decrecieron sin existir un incremento proporcional fuera de la célula, esto indica que la tasa de síntesis de ATP se vio disminuida o que la tasa de hidrólisis de ATP se vio incrementada (Chandler and Segel, 1978). Sin embargo, un efecto directo de los extractos en la actividad de ATPasa, no pudo ser comprobado. Se ha demostrado que productos naturales presentes en extractos de plantas, afectan la permeabilidad de la membrana de *Listeria monocytogenes* llevando a una subsecuente pérdida del ATP citoplásmico como consecuencia de daño a la membrana (Oussalah *et al.*, 2006). González *et al.*, 1996, reportaron que la disminución de ATP puede estar dada por la liberación de ATP citoplasmático, y la hidrólisis de la bomba de ATPasa, que resulta en una disminución rápida del ATP basal. Dos mecanismos han sido propuestos para explicar la hidrólisis de ATP: (i) un intercambio en el equilibrio de la hidrólisis del ATP como consecuencia de la pérdida de fosfato orgánico a través de la membrana, (ii) terminación del ATP basal intracelular y disipación de la fuerza motriz de protones (Whiteaker *et al.*, 2001).

Algunos autores han reportado que los antimicrobianos naturales incluyendo aceites esenciales, fenoles, y bacteriocinas, pueden promover la pérdida de componentes celulares como iones, ATP, ácidos nucleicos, aminoácidos etc. (Cox *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 1999).

La membrana celular es una estructura activa que actúa como una barrera entre el citoplasma y el medio extracelular. Es esencial para mantener la condición interna óptima para el metabolismo y la transducción. Los extractos de plantas estudiados aquí, fueron capaces de comprometer la membrana celular, resultando un incremento en la permeabilización, cambios en el pH, en el potencial de membrana y decremento en el ATP celular, que en conjunto resultaron en actividad antimicrobiana. Los efectos secundarios que pueden estar involucrados y posteriormente afectar la viabilidad incluye la inhibición de algunas enzimas causada por el anclaje de iones esenciales, pérdida de turgencia, presión y alteración en la síntesis macromolecular y otros procesos en la célula bacteriana.

Los productos naturales tales como los extractos de plantas así como los compuestos purificados, son fuente de oportunidades ilimitadas para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos, debido a la amplia diversidad química que presentan las plantas (Cos *et al.*, 2006). El primer paso para aislar el o los compuestos biológicamente activos de los extractos naturales, es el proceso de extracción, el cual se considera crítico, debido a que la técnica debe extraer el/los compuestos de interés para su posterior purificación (Fabricant and Farnsworth, 2001). Fue por esto que el metanol se seleccionó como solvente para la elaboración de los extractos crudos al principio de esta investigación, ya que una gran gama de compuestos con posible actividad antimicrobiana son extraídos con este solvente (Cowan, 1999). Las técnicas reportadas en la literatura con más frecuencia para el aislamiento de compuestos naturales son la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía preparativa (PLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Hostettmann and Wolfender, 2004; Sasidharan *et al.*, 2011), técnicas que fueron empleadas durante el desarrollo de esta investigación, para aislar el/los compuestos mayoritarios responsables de la actividad antimicrobiana.

En el caso del huizache (*Acacia farnesiana*) después de aplicar las técnicas antes mencionadas (cromatografía en columna y HPLC), se logró el aislamiento de un compuesto antimicrobiano de naturaleza fenólica que fue caracterizado como metil galato. Este compuesto ya ha sido reportado en plantas del género *Acacia* como *A. nilotica* y *A. leucophloea* (Chaubal *et al.*, 2005), además de plantas como *Rhus javanica*, *Toona surei*, *Acer ginnala*, *Diospyros kaki*, (Abou-Zaid *et al.*, 2009; Ekaprasada, 2009; Kaur *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2009; Ahna *et al.*, 2005). Por otro lado, las propiedades antimicrobianas de este compuesto han sido ampliamente reportadas en la literatura en microorganismos como *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *B. cereus*, *Shigella epidermidis*, y *Escherichia coli* (Choi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005), *Salmonella*, *Enterobacter* (Choi *et al.*, 2008).

En el caso del nopal (*Opuntia ficus-indica* var. Villanueva), al no poder hacer uso del HPLC, decidimos utilizar una técnica alternativa para la purificación del principal compuesto antimicrobiano presente en el extracto metanólico, y para esto utilizamos la técnica denominada “bioautografía”, la cual es una técnica muy conveniente para evaluar las propiedades antimicrobianas de extractos de plantas y es útil para bio-dirigir

el aislamiento de sus compuestos activos (Shahverdi, 2007). Aunque se han reportado tres variantes de la bioautografía la más utilizada es la denominada “TLC- agar overlay”, la cual ha sido aplicada con éxito en levaduras como *Candida albicans* y en bacterias como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, entre otras, esta técnica produce zonas bien definidas de inhibición y es poco sensible a contaminación (Mehrotra *et al.*, 2010). En esta técnica los compuestos activos que fueron separados por cromatografía, son transferidos de la fase estacionaria (silica gel) a la capa de agar, la cual contiene al microorganismo, por un proceso de difusión. La placa se incuba en cámara húmeda, y después de este periodo la zona de inhibición observada corresponde a la localización del compuesto activo responsable de la actividad antimicrobiana (Cos *et al.*, 2006; Sasidharan *et al.*, 2011). Al aplicar esta técnica, se logró la purificación de un compuesto al que denominamos Pro-OFi, el cual al parecer es de naturaleza fenólica, ya que se corrieron pruebas colorimétricas preliminares dando positivo la reacción para OH-fenólicos, es importante señalar que aunque no se pudo realizar la purificación completa del compuesto de interés mediante HPLC en modo preparativo, recientemente pudimos inyectar fracciones del nopal con actividad antimicrobiana, en el HPLC en modo analítico. Los cromatogramas obtenidos fueron analizados de dos formas, la primera mediante la biblioteca de compuestos que viene con el equipo y la segunda mediante la comparación de diferentes estándares que fueron previamente inyectados, el resultado del estudio de los cromatogramas arroja que posiblemente, el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana que presenta en extracto metanólico de nopal sea debido ácido  $\rho$ -coumérico, el cual es un compuesto fenólico, del cual ya se ha reportado su presencia en diferentes variedades de nopal (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010). También existen reportes en la literatura de las propiedades antimicrobianas de este compuesto, ya que se ha probado contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* causando la inhibición de todos los microorganismos probados. (Mokbel and Sukanuma, 2006). Además Lou *et al.*, en 2012, reportaron que el ácido  $\rho$ -coumerico, afecta la permeabilidad de la membrana celular de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. dysenteriae* y *S. Typhimurium*, y el efecto sobre la membrana observado en ese estudio fue similar al reportado en nuestros resultados.

Es importante recalcar, que se requieren estudios de mayor profundidad para tener la certeza de que el ácido  $\rho$ -coumérico es el principal responsable de la actividad antimicrobiana, debido a que se ha reportado la presencia de otros compuestos fenólicos como el ácido vainillínico, felúrico,  $\rho$ -hidroxibenzoico, y cafeico en diferentes variedades del nopal (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010), todos ellos con actividad antimicrobiana contra diferentes especies de bacterias patógenas, como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, entre otras (Merkl *et al.*, 2010). Por otro lado, no podemos descartar la presencia de flavonoides en el nopal como la iso-quercitina y la rutina, compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza con propiedades antimicrobianas (Pepeljnjak *et al.*, 2005; Vaquero *et al.*, 2007). Estos compuestos también han sido reportados en cladodios frescos de nopal (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó, no se lograron aislar el/los compuestos antimicrobianos del estafiate (*Artemisia ludovisiana*) y de la albahaca (*Ocimum basilicum*), esto sin lugar a dudas es debido a la complejidad de los extractos ya que la literatura señala que uno de los principales retos en el aislamiento de compuestos naturales es precisamente la inmensa cantidad de metabolitos que pueden estar presentes en un extracto realizado con solventes orgánicos (Sasidharan *et al.*, 2011) y en casos particulares como estos se deben emplear técnicas diferentes para el aislamiento y caracterización de los compuestos de interés como la cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS). (Hostettmann and Wolfender, 2004). Además existen diversos reportes en la literatura reciente, que mencionan que las plantas pertenecientes a los géneros *Artemisia* y *Ocimum* presentan gran cantidad de compuestos aromáticos lo que sustenta la idea de la utilización de GC/MS (Verma *et al.*, 2011; Abad *et al.*, 2012).

De cualquier forma la literatura menciona que los principales compuestos que pudieran ser responsables de la actividad antimicrobiana del estafiate son, sesquiterpenos oxigenados como la davanona, la cual ha sido identificada como uno de los compuestos presentes en mayor cantidad en esta especie, y se le atribuyen propiedades antimicrobianas contra bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, levaduras como *Candida albicans* y

*Cryptococcus neoformans*), y dermatofitos como *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum* (Lopes-Lutz *et al.*, 2008). Otras investigaciones reportan compuestos como camphor, 1,8-cineole, davanone, los cuales presentan actividad antimicrobiana reportada contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Abad *et al.*, 2012).

La albahaca también ha sido muy estudiada mediante GC/MS, y se han reportado compuestos como linalool (69%), eugenol (10%), (E)- $\alpha$ -bergamotene (3%) y timol (2%) (Keita *et al.*, 2000). Por otro lado Özcan y Chalchat, en 2002 reportaron la presencia de linalool (45.7%), eugenol (13.4%), methyl eugenol (9.57%), ambos reportes mencionaron que el linalool fue el compuesto más abundante encontrado en esta especie. También se ha reportado la presencia de *epi*- $\alpha$ -cadinol (8.6–11.4%),  $\alpha$ -bergamotene (7.4–9.2%) y  $\gamma$ -cadinene (3.2–5.4%). Y como grupos principales se reportan monoterpenos oxigenados e hidrocarburos sesquiterpénicos (Hussain *et al.*, 2008)

La utilización de compuestos naturales como agentes inhibidores de factores de virulencia es una aplicación novedosa, que desde el punto de vista médico ayudaría a contrarrestar el incremento en la resistencia de microorganismos patógenos hacia los antibióticos (Chatterjee *et al.*, 2010). Los principales factores de virulencia de *V. cholerae* son la toxina del cólera (CT) y un pili co-regulado a la toxina (TCP), los cuales son codificados por los genes *ctxAB* y *tcpA*, respectivamente (Nair *et al.*, 2006). En este trabajo se decidió evaluar el efecto de las concentraciones subinhibitorias de los extractos de huizache, estafiate, albahaca y nopal, así como del metil galato aislado del huizache y del compuesto aislado del nopal al que denominamos PRO-OFi, sobre la expresión del gen de la enterotoxina de *V. cholerae* (*ctxAB*), mediante la técnica PCR en tiempo real (qRT-PCR), sin embargo, ninguno de los extractos metanólicos de las plantas evaluadas y ninguno de los compuestos aislados del huizache y del nopal afectaron significativamente la expresión de la enterotoxina, lo que sin lugar a duda indica que la actividad inhibitoria de los extractos y de los compuestos naturales aislados se debe principalmente al efecto que tienen sobre la membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*, ya que es importante destacar que aún existen diversos procesos fisiológicos y factores de virulencia que pueden ser blancos potenciales para controlar a estos microorganismos patógenos.

## CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de huizache (*Acacia farnesiana*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), albahaca (*Ocimum basilicum*) y nopal (*Opuntia ficus-indica*) presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra las cepas de *V. cholerae* 569-B y 1837 y contra las cepas de *C. perfringens* FD-1041 y FD-1, siendo el extracto de huizache el más activo con una CMB de 0.5 a 0.9 mg/ml.

Ninguna de las concentraciones subletales (25, 50 y 75% de la CMB) redujeron significativamente el número de microorganismos presentes en los bioensayos.

Los extractos antes mencionados causaron daño en la membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*, resultando un incremento en la permeabilidad de la misma, además provocaron cambios significativos en el pH citoplásmico, en el potencial de membrana y causaron un decremento en la síntesis del ATP celular, estos cambios fisiológicos con seguridad conducen a la muerte bacteriana.

Mediante la técnica conocida como ensayos bio-dirigidos, se logró la purificación de un compuesto aislado del extracto de huizache el cual fue caracterizado como metil galato, de igual forma se purificó un compuesto de naturaleza fenólica del extracto de nopal, el cual se encuentra en proceso de caracterización.

Los compuestos aislados del extracto de huizache y nopal tuvieron un efecto similar al de los extractos metanólicos ya que causaron deterioro en la membrana de *V. cholerae* y *C. perfringens*, provocaron una reducción significativa en el pH

citoplásmico, además de afectar significativamente el potencial de membrana y disminuir la síntesis de ATP celular.

Al evaluar el efecto tanto de los extractos como de los compuestos aislados sobre la síntesis de la enterotoxina de las cepas de *V. cholerae* se determinó que en ninguno de los ensayos fue inhibida de manera significativa la expresión del gen *ctx* de *V. cholerae*.



## PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos durante esta investigación confirman que al menos los extractos metanólicos del huizache, estafiate, albahaca y nopal, son una fuente de compuestos bioactivos los cuales pueden considerarse como alternativas para el tratamiento de *V. cholerae* y *C. perfringens*, o por otro lado como alternativas en la prevención de la contaminación de alimentos causada por estos microorganismos patógenos. Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para proveer información acerca de otros sitios o aspectos fisiológicos de relevancia que pudieran verse afectados, sobre todo en lo que respecta a la búsqueda de la inhibición de factores de virulencia diferentes al de la enterotoxina de *V. cholerae*. Dentro de estos blancos puede ser el pili-corregulado a la toxina, el cual es necesario para la unión de la bacteria a las células de intestino y por otro lado, en lo que respecta a *C. perfringens*, falta evaluar el efecto de los extractos y/o los compuesto aislados sobre factores de virulencia como la enterotoxina, causante de enfermedades gastrointestinales e incluso de la alfa toxina causante de la gangrena gaseosa entre otras cosas. También sería de mucho interés la determinación del efecto de los extractos y de los compuestos aislados sobre el “Quorum Sensing”, el cual ha sido ampliamente ligado a la expresión de diversos factores de virulencia de una gran cantidad de microorganismos patógenos.

Además a pesar de que se tiene la idea de que los compuestos naturales provenientes de plantas tienen como ventajas la relativamente baja toxicidad que pueden presentar, se necesitan futuros ensayos de citotoxicidad para asegurar la inocuidad de los compuestos de interés.

## LITERATURA CITADA

1. Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. 2012. The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules* 17:2542-2566.
2. Abou-Zaid MM, Lombardo DA, Nozzolillo C. 2009. Methyl gallate is a natural constituent of maple (Genus *Acer*) leaves. *Natural Products Research* 23(15):1373.1377.
3. Acharyya S, Patra A, Bag PK. 2009. Evaluation of the antimicrobial activity of some medicinal plants against enteric bacteria with particular reference to multidrug resistant *Vibrio cholerae*. *Tropic Journal of Pharmaceutical Research* 8(3):231-237.
4. Adiguzel, A., H. Ozer, M. Sokmen, M. Gulluce, A. Sokmen, H. Kilic, F. Sahin, and O. Baris. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. *Pol. J. Microbiol.* 58: 69–76.
5. Ahn J, Grun IU, Mustapha A. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts *in vitro* and in ground beef. *Journal of Food Protection* 67(1):148-155.
6. Ahna Y-J, Leeb H-S, Oha H-S, Kimc H-T, Leea Y-H. 2005. Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 8:105–112.
7. Alam M, Sulatana M, Nair GB, Siddique AK, Hasan NA, Sack RB, Sack DA, Ahmed KU, Sadique A, Watanabe H, Grim CJ, Colwell RR. 2007. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proceedings of the National Academy of Science* 104(45):17801-17806.
8. Ali-Shtayeh MS, Yaghmour RMR, Faidi YR, Salem K, Al-Nuri MA. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian. *Journal of Ethnopharmacology.* 60:265–271.

9. Angelichio MJ, Spector J, Waldor MK, Camilli A. 1999. *Vibrio cholerae* intestinal population dynamics in the suckling mouse model of infection. *Infection and immunity*. 67(8):3733-3739.
10. Aqeel A, Khursheed AK, Viqaruddin A, Sabiha Q. 1989. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. *Arzneimittelforschung*. 39:652-655.
11. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Jöberg A-M, Aarnisalo K, Björkroth J, Mattila-Sandholm T, Korkeala H. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology* 65:150-155.
12. Avila-Sosa R, Gastélum-Franco MG, Camacho-Dávila A, Torres-Muñoz JV, Nevárez-Moorillón GV. 2008. Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 3(3):434-440.
13. Bakker, E., and W. E. Mangerich. 1981. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* 147:820–826.
14. Barer MR, Harwood CR. 1999. Bacterial viability and culturability. *Advance in Microbial Physiology* 41:93–137.
15. Baris O, Gulluce M, Sahin F, Ozer H, Kilic H, Ozkan H, Sokmen M, Ozbek T. 2006. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea Biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turkish Journal of Biol.* 30: 65-73.
16. Berney, M., F. Hammes, F. Bosshard, H.-U. Weilenmann, and T. Egil. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/ DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3283–3290.
17. Biswas SK, Chowdhury A, Das J, Zahir S, Shill MC, Karmakar UK. 2011. Investigation of antibacterial activities of ethanol extracts of *Musa paradisiaca* Lam. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(06):133-135.

18. Blake PA, Allegra DT, Snyder JD, Barrett TJ, McFarland L, Caraway CT, Feeley JC, Craig JP, Lee JV, Pühr ND, Feldman RA. 1980. Cholera – a possible epidemic focus in the United States. *The New England Journal of Medicine* 302:305-309.
19. Booth IR. 1985. Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiological Reviews* 49(4):359-378.
20. Bot, C., and C. Prodan. 2009. Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 38:1049–1059.
21. Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37:77–86
22. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD<sup>®</sup>BacLight<sup>™</sup>: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37:77–86
23. Braga PC, Bovio C, Culici M, Sasso MD. 2003. Flow Cytometric assessment of susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* to erythromycin and rokitamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(1):408-412.
24. Brandi G, Amagliani G, Schiavano GF, De Santi M, Sisti M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 69(9):2274-2279.
25. Breeuwer, P., J. L. Drocourt, F. M. Rombouts, and T. Abee. 1996. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:178–183..
26. Breeuwer, P., J. L. Drocourt, F. M. Rombouts, and T. Abee. 1996. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the

- internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:178–183.
27. Brijesh S, Daswani PG, Tetali P, Rojatkari SR, Antia NH, Birdi TJ. 2006. Studies on *Pongamia pinnata* (L.) Pierre leaves: understanding the mechanism(s) of action in infectious diarrhea. *J Zhejiang Univ Sci B.* 7(8):665-674.
28. Brynestad S, Sarker MR, McClane BA, Granum PE, Rood JI. 2001. Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infection and Immunity.* 69:3483–7.
29. Brynestad, S., and P. E. Granum. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology.* 74:195-202
30. Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi AM, Kohen R, Livrea MA. 2002. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50 (23):6895–6901.
31. Bwititi P, Musabayane CT, Nhachi CVF. 2000. Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 69(3):247-252.
32. Caillet, S., and M. Lacroix. 2006. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69:2961–2969.
33. Canard, B., B. Saintjoanis, and S.T. Cole. 1992. Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* 6: 1421-1429.
34. CDC. 2010. Centers for the Disease Control and Prevention. Trends of foodborne illness 1996-2010. Disponible en el sitio de red: [http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET\\_B\\_TRENDS.PDF](http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_B_TRENDS.PDF). Consultado el día: 3 de Enero de 2012.
35. CDC. 2011. Centers for the Disease Control and Prevention. Estimate of food borne illness. Disponible en el sitio de red:

<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>.

Consultado el día: 2 de Enero de 2012.

36. CDC. 2011b. Centers for the Disease Control and Prevention. *Clostridium perfringens*. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/clostridium-perfringens.html#howcommon>. Consultado el 4 de Enero de 2012.
37. Chakrabarti G, McClane BA. 2005. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell Microbiology*. 7:129-146.
38. Chakraborty S, Mukhopadhyay AK, Bhadra RK, Ghosh AN, Mitra R, Shimada T, Yamasaki S, Faruque SM, Takeda Y, Colwell RR, Nair GB. 2000. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9):4022-4028.
39. Chandler CJ and Segel IH. 1978. Mechanism of the antimicrobial action of pyriithione: effects on membrane transport, ATP levels and protein synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 14(1):60-68.
40. Chatterjee S, Asakura M, Chowdhury N, Neogi SB, Sugimoto N, Haldar S, Awasthi SP, Hinenoya A, Aoki S, Yamasaki S. 2010. Capsaicin, a potential inhibitor of cholera toxin production in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters* 306(1):54-60.
41. Chaubal R, Deshpande VH, Deshpande NR. 2005. Methyl gallate, the medicinally important compound: A review. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 4(4):956-962.
42. Chitemerere TA, Mukanganyama S. 2011. *In vitro* antibacterial activity of selected medicinal plants from Zimbabwe. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology* 5(1):1-7.

43. Choi J-G, Kang O-H, Lee Y-S, Oh Y-C, Chae H-S, Jang H-J, Shin D-W, Kwon D-Y. 2009. Antibacterial activity of methyl gallate isolated from *Galla Rhois* or Carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria. *Molecules* 14:1773-1780.
44. Choi J-G, Kang O-H, Lee Y-S, Oh Y-C, Chae H-S, Jang H-J. 2008. *In vitro* activity of methyl gallate isolated from *Galla Rhois* alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of *Salmonella*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(11):1848–1852.
45. Chomvarin C, Namwat W, Wongwajana S, Alam M, Thaew-Nonngiew K, Sinchaturus A, Engchanil C. 2007. Application of duplex PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology* 53:229-237.
46. Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Nychas GJ, Haroutounian SA. 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(26):8261-8267.
47. Colwell RR, Huq A. 1994. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholerae. *Annals of the New York Academy of Sciences* 740:44-45.
48. Conner DE, Beuchat LR. 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science* 49(2):429-434.
49. Cos P, Hermans N, De Bruyne T, Apers S, Sindambiwe JB, Vanden Berghe D, Pieters L, Viletinck AJ. 2002. Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. *Journal Ethnopharmacology*. 79(2):155-163.
50. Cos P, Viletinck AJ, Berghe DV, Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 290–302.

51. Cos P, Vlietinck AJ, Vanden BD, Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of concept'. *Journal of Ethnopharmacology*. 106:290-302.
52. Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris C, Casu M, Pompei R, Bosignore L. 2001. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine* 8(4):302-305.
53. Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564–582.
54. Cox, S. D., J. E. Gustafson, C. M. Mann, J. L. Markham, Y. C. Liew, R. P. Hartland, H. C. Bell, J. R. Warmington, and S. G. Wyllie. 1998. Tea tree oil causes K<sub>+</sub> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:355–358.
55. Cragg GM, Newman DJ. 2001. Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharmaceutical Biology* 39:8–17.
56. Cutter CN. 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection* 63(5):601-607.
57. Dadalioglu I, Evrendilek GA. 2004. Chemical composition and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. 52(26):8255-8260.
58. Dalaquis P, Stanich K, Toivonen P. 2005. Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection* 68(7):1472-6.
59. Daneshian AM, Shayegh J, Mikaili P, Sharaf JD. 2011. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5(15):3453-3456.



60. Das, A., Y. Mazumder, B.K. Dutta, B.R. Shome, K.M. Bujarbaruah, and A. Kumar. 2008. *Clostridium perfringens* Type A from broiler chicken with necrotic enteritis. *Int J Poultry Sci.* 7(6):601-609.
61. Daube G, Simon P, Limbourg B, Manteca C, Mainil J, Kaeckenbeeck A. 1996. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ,  $\mu$  and enterotoxin) and for sialidase. *Am. J. Vet. Res.* 57:496–501.
62. De Leo M, Braca A, De Tommasi N, Norscia I, Morelli I, Battinelli L, Mazzanti G. 2004. Phenolic compounds from *Baseonema acuminatum* leaves: isolation and antimicrobial activity. *Planta Medica* 70(9):841-846.
63. De Leon L, Beltran B, Moujir L. 2005. Antimicrobial activity of 6-oxophenolic triterpenoids. Mode of action against *Bacillus subtilis*. *Planta Medica* 71(4):313-319.
64. Denyer SP, Hugo WB. 1991. Biocide Induced Damage to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. In: Mechanism of Action of Chemical Biocides; their study and exploitation the society of for applied bacteriology, Technical series No. 27, Denyer SP and Hugo WB (eds). Oxford Blackwell Scientific Publications, pp. 171-188.
65. Desta B. 1993. Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 39(2):129-139.
66. Dickens JA, Berrang ME, Cox NA. 2000. Efficacy of an herbal extract on the microbiological quality of broiler carcasses during a simulated chill. *Poultry Science.* 79:1200-1203.
67. Dranghon FA. 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. *Food Technology* 58:20-28.
68. Dranghon, SINAVE. 2010. Información epidemiológica de morbilidad. Disponible en el sitio de red:

- [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/INF\\_EPID\\_MORBI\\_2009\\_VER\\_EJEC.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/INF_EPID_MORBI_2009_VER_EJEC.pdf). Revisado el día 13 de Junio de 2011.
69. Duncan CL. 1973. Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Bacteriology*. 113: 932-936.
  70. Durga KR, Karthikumar S, Jegatheesan. 2010. Isolation of potential antibacterial and antioxidant compounds from *Alcalypha indica* and *Ocimum basilicum*. *African Journal of Plant Science*. 4(5):163-166.
  71. Edwards C. 2000. Problems posed by natural environments for monitoring microorganisms. *Molecular Biotechnology* 15:211–223.
  72. Ekaprasada MT, Nurdin H, Ibrahim S, Dachriyanus. 2009. Antioxidant activity of methyl gallate isolated from the leaves of *Toona surei*. *Indonesian Journal of Chemistry* 9(3):457-470.
  73. El Astal ZY, Ashour AERA, Kerit AAM. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts in Palestine. *Pakistan Journal of Medical Science* 21(2):187-193.
  74. El Kossori RL, Villaume C, Boustani EE, Sauvaire Y, Méjean L. 2002. Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Chemistry and Materials Science*. 52(3):263-270.
  75. Elavazhagan T, Arunachalam KD. 2010. Phytochemical and antibacterial studies of seed extracts of *Memecylon edule*. *International Journal of Engineering Science and Technology* 2(4):498-503.
  76. Ergene A, Guler P, Tan S, Mirici S, Hamzaoglu E, Duran (2006). Antimicrobial and antifungal activity of *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*. *Afr. J. Biotechnol.* 5(11): 1087-1089.
  77. Fabricant DS, Farnsworth NR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspective* 109:69–75.
  78. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, Gourreau JM, Carlin F, Popoff MR, Broussolle V. 2002. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental

samples from a coastal area in northern France. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5870-5876.

79. Fasano A. 2000. Bacterial Infections. In. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. Walker AW, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins J (eds). BC Decker Inc, Ontario, pp. 97-102.
80. Fett WF, Cooke PH. 2003. Reduction of *Escherichia coli* 157:H7 and *Salmonella* on laboratory-inoculated alfalfa seed commercial citrus-related products. *Journal of Food Protection* 66(7):1158-1165.
81. Fisher K, Phillips CA. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 101(6):1232-1240.
82. Fitzgerald DJ, Stratford M, Narbad A. 2005. Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5):1769-1775
83. Frati-Munari, A.C.; Fernandez-Harp, J.A.; de la Riva, H.; Ariza-Andraca, R. & del Carmen Torres, M. (1983): Effects of nopal (*Opuntia* sp.) on serum lipids, glycemia and body weight. *Archivos de investigacion medica* 14(2): 117–125.
84. Friedman M, Henika PR, Manddrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65(10):1545-1560.
85. Galati EM, Monforte MT, Tripodo MM, d'Aquino A, Mondello MR. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *Journal of Ethnopharmacology*. 76(1):1-9.
86. Gamboe RW, Chavez P, Baker WP. 2008. Antimicrobial activity of natural plant extracts against five bacterial species. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 40(2):165-167.

87. Garate-Lizarraga I, Bustillos-Guzmán JJ, Lopez-Cortez DJ, Hernandez-Sandoval F, Erler K, Luckas B. 2006. Paralytic selfish toxin profiles in netphytoplankton samples from bahía Concepcion, gulf of California, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 52:800-806.
88. García S, Alarcón G, Gómez M, Heredia N. 2005. *Haematoxylon brasiletto* extracts inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. *Food Biotechnology*. 19:15-26.
89. García S, Alarcon G, Rodriguez C, Heredia N. 2006. Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:669-674.
90. Garcia S, Araiza M, Gomez M, Heredia N. 2002. Inhibition of growth, enterotoxin production, and spore formation of *Clostridium perfringens* by extracts of medicinal plants. *Journal of Food Protection*. 65 (10):1667-1669
91. Garcia, S., G. Alarcon, C. Rodriguez, and N. Heredia. 2006. Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:669–674.
92. Garcia-Alvarado J, Labbe R, Rodriguez M. 1992. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43 degrees C. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 1411-1414.
93. Garcia-Alvarado, J. S., M. J. Verde-Star, and N. L. Heredia. 2001. Traditional uses and scientific knowledge of medicinal plants from Mexico and Central America. A review. *J. Herbs Spices Med. Plants* 8:37–89.
94. Geetha RV, Roy A, Lakshmi T. 2011. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of heart wood extract of *Acacia catechu* on enteric pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research* 9(2):147-149.

95. Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 25(73):83-92.
96. Gill AO, Holley RA. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology* 108(1):1-9.
97. González T, Rojas RA. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México* 47(5):388-390.
98. González-Lamothe R, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bouarab K. 2009. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *International Journal of Molecular Science* 10:3400-3419.
99. Goun E, Cunningham G, Chu D, Nguyen C, Miles D. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia* 74(6):592-596.
100. Guevara-Figueroa T, Jiménez-Islas H, Reyes-Escogido ML, Mortensen AG, Laursen BB, Lin LW, De León-Rodríguez A, Fomsgaard IS, Barba de la Rosa AP. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis* 23:525-532.
101. Guidolin A, Manning PA. 1987. Genetics of *Vibrio cholerae* and its bacteriophages. *Microbiological Review* 51:285-298.
102. Gupta M, Mazumder UK, Chaudhuri I, Chaudhuri RK, Bose P, Bhattacharya S, Manikandan L, Petra S. 2002. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. *Fitoterapia* 73(2):168-170.
103. Gurrieri S, Miceli L, Lanza CM, Tomaselli F, Bonomo RP, Rizzarelli E. 2000. Chemical Characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) and Perspectives for the Storage of Its Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(11):5424-5431

104. Hackstadt T. 1983. Estimation of the cytoplasmic pH of *Coxiella burnetii* and effect of substrate oxidation on proton motive force. *Journal of Bacteriology*. 154(2):591-597.
105. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86(6): 985.
106. Hannan A, Saleem S, Chaudhary S, Barkaat M, Arshad MU. 2008. Antibacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 20(3):72-74.
107. Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 48(1):125-129.
108. Hatheway CL. 1990. Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*. 3(1):66-98.
109. Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG. 2006. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(17):6314-6321.
110. Helms M, Vastupo P, Gerner-Smidt P, Molbak K. 2003. Short and long term mortality associated to foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *British Medical Journal* 326:357-360
111. Hendriksen RS, Price LB, Schupp JM, Gillece JD, Kaas RF, Engelthaler DM, Bortolaia V, Pearson T, Waters AE, Upadhyay BP, Shrestha SD, Adhikari S, Shakaya G, Keim PS, and Aarestrup FM. 2011. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. *mBio* 2(4):e00157-11.
112. Hernández T, Canales M, Teran B, Avila O, Duran A, Garcia AM, Hernandez H, Angeles-Lopez O, Fernandez-Araiza M, Avila G. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 111(1):137-141.

113. Heymann DL. 2004. Cholerae and other Vibrios. In: Control of Communicable Diseases Manual, 18 Edition. Washington DC: American Public Health Association, pp 103-117.
114. Hielm S, Björkroth J, Hyytiä E, Korkeala H. 1998. Prevalence of *Clostridium botulinum* in Finnish trout farms: Pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. Applied and Environmental Microbiology, 64:4161-4167.
115. Holyoak, C. D., M. Stratford, Z. McMullin, M. B. Cole, K. Crimmins, A. J. P. Brown, and P. J. Coote. 1996. Activity of the plasma membrane H<sub>2</sub>O-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. Appl. Environ. Microbiol. 62:3158–3164.
116. Hostettmann K, Wolfender JL. 2004. Applications of Liquid Chromatography/UV/MS and Liquid Chromatography/ NMR for the On-line Identification of Plant Metabolites. In: Bioactive Compounds from Natural Sources. Tringali C (ed). Taylor and Francis London, pp 31-68.
117. Hugo WB. 1978. Membrane-active antimicrobial compounds a reappraisal of their mode of action in the light of the chemi-osmotic theory. International Journal of Pharma. 1:127-131.
118. Hunter PR. 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. Journal of Applied Microbiology. 94:37-46.
119. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry. 108(3):986-995.
120. Hussain, A. I., F. Anwar, S. T. H. Sherazi, and R. Przybylski. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chem. 108:986–995.

121. Hyttiä E, Hielm S, Björkroth J, Korkeala H. Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E strains isolated from fish and fishery products. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2057-2064.
122. ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1996. *Vibrio cholerae*. In: *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. London: Blackie Academic & Professional, pp 414-425.
123. ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1998. Fish and fish products. In: *Microorganisms in Foods 6. Microbial ecology of food commodities*. London: Blackie Academic & Professional, pp 130-189.
124. INFOSAN. 2007. Red internacional en materia de inocuidad de los alimentos. Disponible en el sitio de red: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/infosan\\_1007\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_1007_sp.pdf). Revisado el día 13 de Junio de 2011.
125. INFOSAN. 2009. INFOSAN e INFOSAN emergency, 177 estados miembros. Disponible en el sitio de red: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/countries\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/countries_sp.pdf). Consultado el día 14 de Junio de 2011.
126. Irobi ON, Moo-Young M, Anderson WA, Daramola SO. 1994. Antimicrobial activity of bark extracts of *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 43(3):185-190.
127. Jepras, R. I., F. E. Paul, S. C. Pearson, and M. J. Wilkinson. 1997. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2001-2005.
128. Juneja VK, Dwivedi HP, Yan X. 2012. Novel natural food antimicrobials. *Annual Reviews of Food Science*. 3:381-403.
129. Juneja VK, Novak JS, Labbe RG. 2010. *Clostridium perfringens*. In: *Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions*. Juneja VK, Sofos JN (eds). pp 53-70.



130. Juneja, V. K., H. Thippareddi, and M. Friedman. 2006. Control of *Clostridium perfringens* in cooked ground beef by carvacrol, cinnamaldehyde, thymol or oregano oil during chilling. *Journal of Food Protection*. 69:1546-1551.
131. Kadohama N, McCarter JA. 1971. Inhibition of DNA polymerase of *E. coli* by proflavine. *Can. J. Biochem.* 50: 901-908.
132. Kaisner CA. 2000. *Vibrio* species. In: Lund BM, Braid-Parker TC and Gould GW (eds). *The microbiological safety and quality of food*. Maryland: Aspen Publishers, Inc, pp 1336-1362.
133. Kaur R, Singh B, Arora S. 2011. Amelioration of oxidative damage by Methyl gallate in different *in vitro* models. *Phytopharmacology* 1(4) 82-94.
134. Keita SM, Vincent C, Schmit JP, Belanger A. 2000. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. *Flavour and Fragrance Journal* 15:339–341.
135. Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-187.
136. Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. 2001. Anti-microbial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis*. *Fitoterapia* 72(6):662-665.
137. Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. 2001. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. *Fitoterapia* 72(7):825-828.
138. Khan MR, Omoloso AD, Kihara M. 2003. Antimicrobial activity of *Securinega leucopyrus*. *Fitoterapia* 74(7):736-740.
139. Khan MR, Omoloso AD. 2003. Antibacterial activity of *Pterocarpus indicus*. *Fitoterapia* 74(6):603-605.

140. Kim JH, Dong-Hwan S, Dong-Won S, Hyun P, Dong-Yeul K. 2005. Biological activity of bioactive components from *Acer ginnala* Max. Bulletin of the Korean Chemical Society 26(9):1450-1452.
141. Kim JW, Kim YS, Kyung KH. 2004. Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. Journal of Food Protection 67(3): 499-504
142. Kim S, Fung DY. 2004. Antibacterial effect of water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on foodborne pathogens in ground beef and mushroom soup. Journal of Food Protection 67(9):1953-1956.
143. Kim S, Ruengwilysup C, Fung DY. 2004. Antibacterial effect of water-soluble tea extracts on foodborne pathogens in laboratory medium and in a food model. Journal of Food Protection 67(11):2608-2612.
144. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. 2002. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 82(1):51-3
145. Korhonen H. 1980. A new method for preserving raw milk: The lactoperoxidase antibacterial system. World Animal Review 35:23–29.
146. Kuete V, Metuno R, Ngameni B, Tsafack AM, Ngandeu F, Fotso GW, Bezabih M, Etoa FX, Ngadjui BT, Abegaz BM, Beng VP. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae). Journal of Ethnopharmacology. 112(3):531-536.
147. Kuete V, Ngameni B, Simo CC, Tankeu RK, Ngadjui BT, Meyer JJ, Lall N, Kuate JR. 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). Journal of Ethnopharmacology. 120(1):17-24.
148. Kuete V, Nguemeving JR, Beng VP, Azebaze AG, Etoa FX, Meyer M, Bodo B, Nkengfack AE. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). Journal of Ethnopharmacology. 109(3):372-379.

149. Kuete V, Tangmouo JG, Penlap Beng V, Ngounou FN, Lonsi D. 2006. Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 104(1-2):5-11.
150. Labee RG, Juneja VK. 2006. *Clostridium perfringens* gastroenteritis. *Foodborne Infections and Intoxications*. 137-164.
151. Labee, RG, Heredia N. 2001. *Clostridium perfringens*. IN *Guide to Foodborne Pathogens*. Labee RG, García S. Ed. New York, John Wiley & Sons. Pp 133-141.
152. Lahtinen, S. J., M. Gueimonde, A. C. Ouwehand, J. P. Reinikainen, and S. J. Salminen. 2005. Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1662–1663.
153. Lambert PA, Hammond SM. 1973. Potassium fluxes. First indications of membrane damage in micro/organisms. *Biochemistry and Biophysics Research Comm.* 54: 796-799.
154. Lambert RJ, Nychas JE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453-462.
155. Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. Coote, and G. J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453–462.
156. Lee J-Ch, Kim HR, Kim J, Jang YS. 2002. Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(22):6490-6496.
157. Lee, E., H. Kim, Y. Song, C. Jin, K. Lee, J. Cho, and Y. Lee. 2003. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Arch. Pharmacol. Res.* 26:1018–1023.
158. Leuko S, Legat A, Fendrihan S, Stan-Lotter H. 2004. Evaluation of the LIVE/DEAD *BacLight* Kit for Detection of Extremophilic Archaea and Visualization of Microorganisms in Environmental Hypersaline Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 70(11):6884-6886.

159. Leuko, S., A. Legat, S. Fendrihan, and H. Stan-Lotter. 2004. Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic *Archae* and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6884–6886.
160. Li J, Chen J, Vidal JE, McClane BA. 2011. The Agr-Like Quorum-Sensing System Regulates Sporulation and Production of Enterotoxin and Beta2 Toxin by *Clostridium perfringens* Type A Non-Food-Borne Human Gastrointestinal Disease Strain F5603. *Infection and Immunity.* 79(6): 2451–2459.
161. Lin YT, Kwon YI, Labbe RG, Shetty K. 2005. Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):8558-8564.
162. Longanga OA, Vercruyse A, Foriers A. 2000. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal Ethnopharmacology.* 71(3):411-423.
163. Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69(8):1732-1738.
164. Lou Z, Wang H, Rao S, Sun J, Ma C, Li J. 2012. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 25:550-554.
165. Maatta-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Torronen AR. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52(20):6178-6187.
166. Maheshwari M, Nelapati K, Kiranmayi B. 2011. *Vibrio cholerae* – A Review. *Veterinary World* 4(9):423-428.

167. Makinen, S. M., and K. K. Paakkonen. 1999. Processing and use of basil in foodstuffs, beverages and in food preparation, p. 137–152. In R. Hiltunen and Y. Holm (ed.), *Basil: the genus *Ocimum**. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands.
168. Martinez-Vazquez M, González-Esquinca AR, Cazares L, Moreno MN, García-Argáez AN. 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *Journal of Ethnopharmacology* 66(1):79-82.
169. McClane BA, Lyerly DM, Wilkins TD. 2006. Enterotoxigenic clostridia: *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium difficile*. IN *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti VA, Novick R P, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ (Eds). Pp 703-714.
170. McClane BA. 2007. *Clostridium perfringens*. In: Doyle MP, Beuchat LR, eds. *Food Microbiology*. 3rd ed. Washington D.C.: ASM press. pp 423–444.
171. McClung LS. 1945. Human food poisoning due to growth of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in freshly cooked chicken: preliminary note. *Journal of Bacteriology*. 50:229-231.
172. Mehrotra S, Srivastava AK, Nandi SP. 2010. Comparative antimicrobial activities of Neem, Amla, Aloe, Assam Tea and Clove extracts against *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants and Research* 4(18):2437-2478.
173. Merkl R, Hrádková I, Filip V, Smidrkal J. 2010. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech Journal of Food Science* 28(4):275-279.
174. Miall SH, Walker IO. 1967. Structural studies on ribosomes. The binding of proflavine to *Escherichia coli* ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta*. 145: 82-95.
175. Millemann Y, Gaubert S, Remy D, Colmin C. 2000. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella* Enterica subsp. Enterica serotype Typhimurium bovine isolates from farm meat. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2204-2209.

- 176.Miyata ST, Kitaoka M, Brooks TM, McAuley SB, Pukatzki S. 2011. *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum*. *Infection and Immunity* 79(7):2941-49.
- 177.Mokbel, MS, Suganuma T. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of themethanol extracts from pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) fruit albedo tissues. *European Food Research and Technology* 224:39-47.
- 178.Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, Waksman N. 2007. Evaluation of the flora of Northern México for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology* 109(3):435-441.
- 179.Moreno Salazar SF, Enriquez A, Cuamea C, Bolado E, Medrano T, Robles-Zepeda RE. 2008. Activity of medicinal plants, used by native populations from Sonora México, against enteropathogenic bacteria. *Pharmaceutical Biology* 46(10-11):732-737.
- 180.Morris, JG. 2011. Cholera-modern pandemic disease of ancient lineage. *Emerging Infectious Diseases Journal* (internet). Disponible en el sitio de red: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/pdfs/11-1109-ahead\\_of\\_print.pdf](http://wwwnc.cdc.gov/eid/pdfs/11-1109-ahead_of_print.pdf). (Revisado el 28 de octubre de 2011).
- 181.Mothana RAA, Abdo SAA, Hasson S, Althawab FMN, Alaghbari SAZ, Lindequist U. 2008. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *eCAM* 7(3)323–330.
- 182.Murillo-Alvarez JI, Encarnacion DR, Franzblau SG. 2001. Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (México). *Pharmaceutical Biology* 39(6):445-449.
- 183.Nair GB, Qadri F, Holmgren J, Svennerholm A-M, Safa A, Bhuiyan NA, Ahmad QS, Faruque SM, Faruque ASG, Takeda Y, Sack DA. 2006. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology* 44(11):4211–4213.

184. Nakamura T, Tokuda H, Unemoto T. 1982. Effects of pH and monovalent cations on the potassium ion exit from the marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* and the manipulation of cellular cation content. *Biochimica et Biophysica Acta* 692:389-396.
185. Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 53(3):143-147.
186. Neidhardt FG, Shaechter M. 1990. *Physiology of the bacterial cell. A molecular Approach*. New York: Sinauer Assoc. Inc. Publishers.
187. Nickavar, B., G. Amin, and P. Ghavamian. 2002. Antimicrobial activity of *Pulicaria dysenterica* L. *Iran. J. Pharm. Res.* 1:31–32.
188. Nohynek LJ, Alakomi HL, Kahkonen MP, Heinonen M, Helander IM, Oksman-Caldentey KM, Puupponen-Pimia RH. 2006. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer.* 54(1):18-32.
189. O'Brien DK, Melville SB. 2000. The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions. *Cell Microbiology.* 39:505-519.
190. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K, Vuorela P. 2000. Antimicrobial activity of some coumarin herbal plants growing in Finland. *Journal Ethnopharmacology* . 73(1-2):299-305.
191. Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GH, Goel K, Arnason JT. 2000. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation of traditional medicine. *Journal Ethnopharmacology.* 73(1-2):161-170.
192. Omojasola, P.F., and S. Awe. 2004. The antibacterial activity of the leaf extracts of *Anacardium occidentale* and *Gossypium hirsutum* against some microorganisms. *Biosci Res Comm.* 16(1):25-28

- 193.Ooi LS, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EY, Ooi VE. 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia*. *American Journal of Chinese Medicine* 34(3):511-522.
- 194.Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* 157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 69(5):1046-1055.
- 195.Owais M, Sharad KS, Shehbaz A, Saleemuddin M. 2005. Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental murine salmonellosis. *Phytomedicine* 12(3):229-235.
- 196.Özcan M, Chalchat J-C. 2002. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. *Czech Journal of Food Science* 20(6):223-228.
- 197.Pag, U., M. Oedenkoven, N. Papo, Z. Oren, Y. Shai, and H.-G. Sahl. 2004. *In vitro* activity and mode of action of diastereomeric antimicrobial peptides against bacterial clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 230–239.
- 198.Parekh J, Jadeja S, Chanda S. 2005. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turkish Journal of Biology* 29:203-210.
- 199.Parrotta, J.A. 2001 *Healing plants of peninsular India*. CAB International. New York. 944 pags.
- 200.Parsons JA, Bannam TL, Devenish RJ, Rood JI. 2007. TcpA, an FtsK/SpoIIIE homolog, is essential for transfer of the conjugative plasmid pCW3 in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*; 189: 7782-90.
- 201.Paulo A, Duarte A, Gomes ET. 1994. *In vitro* antibacterial screening of *Cryptolepis sanguinolenta* alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*. 44(2):127-130.



202. Pepeljnjak S, Kalodera Z, Zovko M. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.) L'Hérit. *Acta Pharmaceutica* 55:431-435.
203. Pereira AP, Ferreira CFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*. 12:1153-1162.
204. Pérez C. 2003. Análisis epidemiológico de los principales microorganismos aislados, de heces en el Hospital Nacional de Niños, Dr. Carlos Sáenz Herrera Enero de 1 995 - abril de 2003. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*. 38(1-2):
205. Piarroux R, Barraï R, Faucher B, Haus R, Piarroux M, Gaudart J. 2011. Understanding the cholera epidemic, Haiti. *Emerging Infectious Disease*. 17:1161–1168.
206. Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar, and S. Ignacimuthu. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 6:39.
207. Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Alakomi H-L, Oksman-Caldentey K-M. 2005. The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *BioFactors*. 23:243-251.
208. Rahim N, Gomes DJ, Watanabe H, Rahman SR, Chomvarin C, Endtz HP, Alam M. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 63:271-274.
209. Ramesh N, Viswanathan MB, Sarawathy A, Balakrishna K, Brindha P, Lakshmanaperumalsamy P. 2001. Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*. *Fitoterapia* 72(8):934-936.
210. Rasooli I. 2007. Food preservation-A biopreservative approach. *Food* 1(2):111-136.

- 211.Rasooli, I. 2007. Food preservation: a biopreservative approach. *Food* 1:111–136.
- 212.Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. 2009. Antimicrobial activity of elephant garlic oil against *Vibrio cholerae in vitro* and in a food model. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73(7):1623-1627.
- 213.Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56(1):3-12.
- 214.Ravishankar S, Zhu L, Law B, Joens L, Friedman M. 2008. Plant-derived compounds inactivate antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Food Protection*. 71(6):1145-1149.
- 215.Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Martin-Belloso O. 2006. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *Journal of Food Protection* 69(7):1579-1586.
- 216.Rodríguez, M. 1998. Intriduccuón a la fitoterapia y a la medicina tradicional. Ed. Herbal. Mx p:48-66.
- 217.Rosas GA, Acosta VM. 2001. Manual de manejo higiénico de los alimentos. Mexico, D.F. Secretaría de Salud.
- 218.Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. 2004. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 67(6):1252-1256.
- 219.Ruiz-Cancino, A., A. E. Cano, and G. Delgado. 1993. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*. *Phytochemistry* 33:1113–1115.
- 220.Rusell AD. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*. 43: S57-S68

221. Salud-Perez G, Zavala MA, Arias L, Pérez C, Pérez RM. 2007. Antimicrobial study of bark from five tree species. *Phytotherapy Research* 15(4):356-359.
222. Sánchez E, Heredia N, García S. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20):6888-6894.
223. Sánchez J, Taylor D. 1997. Cholerae. *The Lancet* 349(9068):1825-1830.
224. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. 2005. Natural Products Isolation: An Overview. In *Methods in Biotechnology: Natural Products Isolation*. Sarker, S.D., Z. Latif, and A.I. Gray (eds). Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp. 1-25.
225. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8(1):1-10.
226. Satcher D. 2000. Food safety: a growing global health problem. *Journal of the American Medical Association* 283:1817-21.
227. Satdive RK, Abhilash P, Fuzele DP. 2003. Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* leaf extract. *Fitoterapia* 74(7):699-701.
228. Satish S, Raveesha KA, Janardhana GR. 1999. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. *Letters in Applied Microbiology*. 28, 145-147.
229. Satta MA, Sisini A. 1964. Glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-diphosphatase activity in *Opuntia ficus indica*. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 40(18):1109-10.
230. Savikin K, Menković N, Zdunić G, Stević T, Radanović D, Janković T. 2009. Antimicrobial activity of *Gentiana lutea* L. extracts. *Z Naturforsch C.* 64(5-6):339-342.
231. Seigler, D. S. 2003. Phytochemistry of *Acacia-sensu lato*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31:845-873.

232. Senderovich Y, Izhaki I, Hampton M. 2010. Fish as reservoirs and vectors of *Vibrio cholerae*. PLoS ONE 5(1):e8607.
233. Shahverdi AR, Abdolpour F, Monsef-Esfahani HR, Farsam HA. (2007). TLC bioautographic assay for the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound. Journal of Chromatography B 850:528–530.
234. Sharma A, Patel VK, Ramteke P. 2009. Identification of vibrocidal compounds from medicinal plants using chromatographic fingerprinting. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25:19-25.
235. Shina SN, Saha GC, Biswas M. 2010. Screening of various solvent extracts of *Gymnema sylvestre* R. Br. leaf for antibacterial activity. Advances in Bioresearch 1(2):25-28.
236. Sikkema, J., J. A. M. De Bont, and B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59:201–222.
237. Silva S, Teixeira P, Oliveira RR, Azeredo A. 2008. Adhesion to and Viability of *Listeria monocytogenes* on Food Contact Surfaces. Journal of Food Protection 71(7):179-1385
238. Silva, S., P. Teixeira, R. Oliveira, and J. Azeredo. 2008. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. J. Food Prot. 71:1379–1385.
239. SINAVE. 2011. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, plataforma única. Disponible en el sitio de red: <http://www.sinave.gob.mx/>. Revisado el día 29 de Junio de 2011.
240. Singh, G. B., and P. Felker. 1998. Cacti: a new world food. Indian Hortic. 43:26–29.
241. Skandamis, P., K. Koutsoumanis, K. Fasseas, and G.-J. E. Nychas. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. Ital. J. Food Sci. 13:65–75.

242. Skocibusic M, Bezic N. 2004. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*. 18(12):967-970.
243. Smedley JG, McClane BA. 2004. Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infection and Immunity*. 72: 6914-6923.
244. Smedley JG, Uzal FA, McClane BA. 2007. Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infection and Immunity*. 75(5):2381-2390.
245. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 2008. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters and Applied Microbiology*. 26(2):118-122.
246. Somchit MN, Reezal I, Nur IE, Mutalib AR. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 84(1):1-4.
247. Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. 2001. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 883-888.
248. Standley, P. C. 1967. Contributions from the National Herbarium, vol. 23. Trees and shrubs of Mexico. Smithsonian Institution, Washington, DC.
249. Steffen R, Acar J, Walker E, Zukerman J. 2003. Cholera: assessing the risk to travelers and identifying methods of protection. *Travel Medicine and Infectious Disease* 1:80-88.
250. Sudhakar M, Rao CV, Rao PM, Raju DB. 2006. Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. *Fitoterapia* 77(1):47-49.
251. Tam VC, Susuki M, Coughlin M, Saslowsky D, Biswas K, Lencer WI, Faruque SM, Mekalanos JJ. 2010. Functional analysis of VopF activity required for colonization in *Vibrio cholerae* mBio 1(5):e00289-10.

252. Tamil SA, Dinesh MG, Satyan RS, Chandrasekaran B, Rose C. 2011. Leaf and seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(9):116-120.
253. Tandon, S., and S. Rane. 2008. Decoction and hot continuous extraction techniques. IN *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Ed. Swami, H.S., S.P. Singh, G. Longo, and D.D. Rakesh. International centre for science and high technology. pp. 93-106.
254. Tassou CC, Drosinos EH, Nychas GJE. 2008. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. *Journal of Applied Microbiology*. 78(6):593-600.
255. Taxue RV, Blake PA. 1992. Epidemic cholera in Latin America. *Journal of the American Medical Association* 267:1388-1390.
256. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Science*. 84:2833-2837.
257. Thangadurai, D., Viswanathan, M.B., and Ramesh, N. 2002. Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longiracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity. *Pharmazie* 57:714-719.
258. Thiem B, Goslinska O. 2004. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia* 75(1):93-95.
259. Thompson FL, Tetsuya I, Swings J. 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:403-431.
260. Tobin-D'Angelo M, Smith AR, Bulens SN, Thomas S, Holden M, Izumiya H, Arakawa E, Morita M, Watanabe H, Marin C, Parsons MB, Cooper K, Haydel D, Bopp C, Yu P, Mintz E. 2008. Severe diarrhea caused by cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* serogroup O75 infections acquired in the Southeastern United States. *Clinical Infectious Diseases* 47(8):1035.

261. Todar, K. 2009. Online text book of bacteriology. Disponible en el sitio de red: <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> (Revisado el 6 de febrero de 2012).
262. Tona L, Kambu K, Mesia K, Cimanga K, Apers S, De Bruyne T, Pieters L, Totté J, Vlietinck AJ. 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine*. 6(1):59-66.
263. Torrado-Truiti MC, Sarragiotto MH, Abreu BA, Vataru-Nakamura C, Dias-Filho DP. 2003. In vitro antibacterial activity of a 7-O-D-glucopyranosilnutanocoumarin from *Chaptalianutans* (Asteraceae). *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 98:283-286.
264. Trombetta D, Saija A, Bisignano G, Arena S, Caruso S, Mazzanti G, Uccella N, Castelli F. 2002. Letter in *Applied Microbiology* 35(4):285-290.
265. Ultee, A., E. P. W. Kets, and E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4606–4610.
266. Ultee, A., M. H. J. Bennink, and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561–1568.
267. Valarmathy K, Gokulakrishnan M, Salma Kausar M, Paul K. 2010. A study of antimicrobial activity of ethanolic extracts of various plant leaves against selected microbial species. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 1(8):293-295.
268. Valdez, R.D., Blanco, M., Vázquez R.E., Magallanes, R. 2008. VI Simposium taller producción y aprovechamiento del nopal en el noreste de México. *Revista Salud Pública y Nutrición*.
269. Valero M, Frances E. 2006. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinamaldehyde or tymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *Food Microbiology* 23:68-73.

270. Vaquero MJR, Alberto MR, de Nadra MCM. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18:93–101.
271. Verma RS, Pandey V, Padalia RC, Saikia D, Krishna B. 2011. Chemical composition and antimicrobial potential of aqueous distillate volatiles of Indian peppermint (*Mentha piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 17(3):258-267.
272. Veshntakova A, Protze J, Rossa J, Blasin IE, Krause G, Pinotek J. 2010. On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudinas. *Toxins*. 2:1336-1356.
273. Weinke T, Liebold I, Burchard GD, Frühwein N, Grobush MP, Hatz C, Kollaritsch H, Nothdurft HD, Reisinger E, Rieke B, Schönfeld Ch, Steffen R, Stich A. Prophylactic immunisation against traveller's diarrhoea caused by enterotoxin-forming strains of *Escherichia coli* and against cholera: Does it make sense and for whom?. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 6(6):362-367.
274. Whiteaker, K. L., S. M. Gopalakrishnan, D. Groebe, C.-C. Shieh, U. Warrior, D. J. Burns, M. J. Coghlan, V. E. Scott, and M. Gopalakrishnan. 2001. Validation of FLIPR membrane potential dye for high throughput screening of potassium channel modulators. *J. Biomol. Screen*. 6:305–312.
275. WHO. 2010, Cholera: prevention and control. (internet). Disponible en el sitio de internet: <http://www.who.int/cholera/technical/prevention/control/en/index.html>. Revisado el 9 de Diciembre de 2011.
276. Wiart C, Mogana S, Khalifah S, Mahan M, Ismail S, Buckle M, Narayana AK, Sulaiman M. 2004. *Fitoterapia* 75(1):68-73.
277. Willardsen, R. R., F. F. Busta, and C. E. Allen. 1979. *Growth of Clostridium perfringens* in three different beef media and fluid thioglycollate medium at static and constantly rising temperatures.]. *Food Protection*. 42:144-148.
278. Witkowska BE, Bylka W, Matlawska I, Goslinska O, Muszynski Z. 2005. Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. *Fitoterapia* 76(5):458-461.



279. Wolfram RM, Kritz H, Efthimiou Y, Stomatopoulos J, Sinzinger H. 2002. Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia--a pilot study. *Wien Klin Wochenschr.* 114(19-20):840-846.
280. Yuroff, A. S., G. Sbat, and W. J. Hickey. 2003. Transporter-mediated uptake of 2-chloro and 2-hydroxybenzoate by *Pseudomonas huttiensis* strain D1. *Applied and Environmental Microbiology.* 69:7401–7408.
281. Yuroff, A. S., G. Sbat, and W. J. Hickey. 2003. Transporter-mediated uptake of 2-chloro and 2-hydroxybenzoate by *Pseudomonas huttiensis* strain D1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7401–7408.
282. Zavala-Sanchez, Miguel A.; Perez-Gutierrez, Salud; Perez-Gonzalez, Cuauhtemoc; Sanchez-Saldivar, David; Arias-Garcia, Lucina. 2002. Antidiarrhoeal activity on nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology.* 40(4): 263-268.
283. Zuckerman JN, Rombo L, Fisch A. 2007. The true burden and risk of cholera: implications for prevention and control. *The lancet infectious diseases.* 7(8):521-530.

## **RESUMEN BIBLIOGRÁFICO**

El M.C. Eduardo Sánchez García, nació en la ciudad de Monterrey N.L., el día 23 de Octubre del año 1974, realizando sus estudios de educación básica y media también en la ciudad de Monterrey. Sus estudios profesionales los realizó en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, estudiando la Carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, de la obtiene su título Profesional en el año de 1998. Sus estudios de Posgrado los comienza en 1999 obteniendo el grado de Maestro en ciencias con Especialidad en Microbiología en el 2002. También 1999 acepta un trabajo como Personal Profesional No Docente, en la Facultad de Ciencias Biológicas y en el Año 2001 se le otorga la base como PPND y de Maestro Asignatura A. En el 2006 comienza sus estudios de Doctorado en Ciencias con Acentuación en Microbiología en la misma Institución, los cuales concluyen con la presentación de este trabajo.