

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**PRODUCTOS NATURALES VEGETALES COMO INHIBIDORES DE
MOLÉCULAS SEÑAL DEL “QUORUM SENSING” Y SU EFECTO
SOBRE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Salmonella* spp.**

POR

Q.F.B. TERESA EUGENIA GUIZAR FERREL

**Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

SAN NICOLAS DE LOS GARZA., N.L

MAYO 2014

**PRODUCTOS NATURALES VEGETALES COMO
INHIBIDORES DE MOLÉCULAS SEÑAL DEL “QUÓRUM SENSING”
Y SU EFECTO SOBRE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Salmonella* spp.**

COMITÉ DE TESIS

Director de Tesis: Dr. José Santos García Alvarado

Secretario: Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal 1: Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Vocal 2: Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal 3: Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, junto con la asesoría de la Dra. Licet Villarreal Treviño, Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna y el Dr. Juan Francisco Contreras Cordero.

Dicho trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas y CONACYT. Agradezco la formación, el apoyo económico y la oportunidad de ingresar a la presente Maestría.

A mis catedráticos. Por su excelente forma de enseñar, dedicación, ejemplo de buenos profesionistas.

Al Dr. Santos García. Por la guía, apoyo y comprensión que me brindó, así como la confianza depositada en mi persona.

A la Dra. Norma L. Heredia Rojas y comité interno. Por el aprendizaje y apoyo, además de sus acertados consejos y observaciones en la realización de esta investigación.

A los revisores del comité externo. Por la valiosa colaboración en la culminación del trabajo de tesis.

Al Dr. Eduardo Sánchez García y A la M.C. Sandra Castillo. Por su preciada colaboración, por su incansable paciencia, dedicación y apoyo en todo el proceso de la realización de este trabajo. Por brindarme su amistad, ánimo y empuje en todo momento y ser un ejemplo de excelentes personas y profesionistas.

A mis compañeras, ahora mejores amigas, M.C. Karina Molina, MC. Carmen Cárdenas y M.C Sandra Castillo. Por sus consejos, cariño y amistad, por su apoyo incondicional, quienes hicieron de la estancia en el laboratorio un lugar acogedor y agradable.

A todos mis amigas y amigos por el ánimo, apoyo y también ayuda en la preparación de este documento: Juan Ballesteros, Ana Elizondo, Sonia Corona, Rafael Cruz, Mayra Terrazas, muchos otros que contribuyeron, de verdad muchísimas gracias.

DEDICATORIA

A Dios. Por darme la vida así como la capacidad, oportunidad, entendimiento, iluminación y paciencia.

A mis padres. A quienes amo profundamente, quienes me han dado la oportunidad y la formación tanto académica como espiritual, por su ejemplo incansable de trabajo y determinación. Agradezco infinitamente el amor, el ánimo, la comprensión y los consejos que siempre me brindan. Por ellos soy todo lo que soy, este triunfo lo dedico especialmente a estos seres maravillosos.

A mi familia. Por su cariño, por apoyarme y estar siempre ahí cuando los he necesitado. Por la comprensión y paciencia que tienen.

A mis amigos. Por su valiosa amistad, por sus consejos, animarme y acompañarme en los buenos y los malos momentos, por hacer más ligero el trabajo con su compañía y diversión, así como la comprensión y apoyo incondicional.

A la Ciencia. Para que mi trabajo sea un granito de arena en el maravilloso mundo de la Microbiología, para así ayudar en el mantenimiento de la salud.

INDICE GENERAL

Sección	Página
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCION.....	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.....	3
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	4
3.2 Género <i>Salmonella</i>	5
3.2.1 Clasificación del género <i>Salmonella</i>	5
3.2.2 Características microbiológicas y bioquímicas.....	6
3.2.3 Fisiología microbiana y estructura.....	7
3.2.4 Manifestaciones clínicas.....	7
3.2.5 Epidemiología.....	8
3.2.6 Brotes de <i>Salmonella</i>	9
3.2.7 <i>Salmonella</i> en México.....	10
3.2.8 Mecanismos de patogenicidad.....	11
3.3 Factores de Virulencia bacteriana.....	12
3.3.1 Quorum sensing.....	12
3.3.2 Movilidad tipo swarming.....	15
3.3.3 Formación de biopelículas.....	17

3.4 Extractos de plantas.....	21
3.4.1 Método de extracción.....	22
3.4.2 Extractos de plantas y/o vegetales con acción antimicrobiana.....	25
3.4.3 Mecanismos de acción de antimicrobianos.....	27
3.4.4 Áreas blanco para la actividad anti-QS.....	28
3.4.5 Mecanismos de inhibición del QS.....	29
3.4.6 Extractos de plantas y compuestos inhibidores del QS, swarming y biopelículas.....	30
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	33
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
5. HIPOTESIS.....	34
6. MATERIALES Y METODOS.....	35
6.1 Activación de la cepa bacteriana y condiciones de cultivo.....	35
6.2 Selección del material vegetal.....	36
6.3 Obtención de los extractos.....	38
6.4 Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana (prueba de pozo).....	39
6.5 Determinación de concentración mínima bactericida (CMB).....	39
6.6 Determinación del efecto de las concentraciones subletales de los extractos activos sobre el crecimiento microbiano.....	40
6.7 Efecto de los extractos de plantas sobre la formación de biopelículas.....	41
6.8 Inhibición del swarming.....	41
6.9 Ensayo de la actividad de AI-2.....	42
6.10 Análisis estadístico.....	43

7. RESULTADOS.....	44
7.1 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.....	44
7.2 Determinación de la concentración mínima bactericida.....	50
7.3 Determinación del efecto de las concentraciones subletales de los extractos de plantas sobre el crecimiento microbiano de <i>S. Typhi</i> y <i>S.</i> <i>Typhimurium</i>	51
7.4 Efecto de los extractos de plantas seleccionados sobre la formación de biopelícula de <i>S. Typhi</i> y <i>S. Typhimurium</i>	52
7.5 Efecto de los extractos de plantas seleccionados sobre la movilidad tipo swarming de <i>S. Typhi</i> y <i>S. Typhimurium</i>	56
7.6 Efecto de los extractos de plantas seleccionados sobre la actividad de AI- 2 de <i>S. Typhi</i> y <i>S. Typhimurium</i>	60
8. DISCUSION.....	63
9. CONCLUSIONES.....	75
10. PROSPECTIVAS DE INVESTIGACION.....	76
11. LITERATURA CITADA.....	77
APENDICES.....	101
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	105

INDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Material vegetal, (nombre común y científico) y porción utilizada en este trabajo.	36
2. Halos de inhibición del crecimiento de <i>S. Typhi</i> ATCC 19430 y <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 por efecto de extractos de plantas.....	45
3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) (mg/mL) de los extractos seleccionados.....	50
4. Efecto de diferentes concentraciones de extractos de plantas sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	51

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Etapas del quórum sensing.....	13
2. Circuitos de quórum sensing de <i>C. violaceum</i> y <i>V. harveyi</i>	14
3. Cambios en la morfología de las células según la superficie del agar.....	16
4. Etapas del swarming.....	17
5. Ciclo de vida de la formación de biopelículas.....	19
6. Sitios blanco en la célula bacteriana, en los cuales actúan los compuestos naturales.	28
7. La interrupción del quórum sensing a etapas tempranas inhibe la formación de biopelículas.....	29
8. Antagonistas del QS que funcionan por medio de la estabilización de la conformación del receptor.....	30
9. Maceración y filtración de extractos de plantas.....	38
10. Maceración de extractos en etanol.....	45
11. Halos de inhibición del crecimiento de diferentes extractos contra 2 variedades de <i>Salmonella</i>	49
12. Efecto de diferentes concentraciones de extractos de plantas sobre la formación de biopelículas de a) <i>S. Typhi</i> y b) <i>S. Typhimurium</i>	54

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
13. Ensayo de reducción de <i>S. Typhimurium</i> con extractos a la concentración de 50% y 25% de CMB.....	55
14. Porcentaje de reducción de la movilidad tipo swarming de a) <i>S. Typhi</i> y b) <i>S. Typhimurium</i> por efecto de extractos de plantas.....	57
15. Controles de crecimiento del swarming sin extracto.....	58
16. Ensayo de reducción de la movilidad tipo swarming de <i>S. Typhi</i> con extractos de plantas.....	59
17. Reducción de la actividad de AI-2 en a) <i>S. Typhi</i> y b) <i>S. Typhimurium</i> por efecto de la adición de extractos de plantas.....	61
18. Ensayo de reducción de los AI-2 de <i>S. Typhi</i> y <i>S. Typhimurium</i> con el 50% de la CMB.....	62
19. Bioluminiscencia de <i>V. harveyi</i> BB170.....	62

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

QS	Quorum sensing
Anti-QS	Anti quorum sensing
CMB	Concentración Mínima bactericida
AI	Autoinductor
AI-2	Molécula autoinductora tipo 2
ETAs	Enfermedades transmitidas por los alimentos
CTR	Control
SHU	Síndrome Hemolítico Urémico
FDA	Food and Drug Administration Agencia de alimentos y Medicamentos
HACCP	Análisis y Control de Puntos Críticos
AHLs	acilhomoserin lactonas
ACP	proteína acarreadora de acilos
Log UFC	Logaritmo de Unidades Formadoras de colonias
g	Gramos (s)
mg	Miligramo (s)
ml	Mililitro
l	Litro (s)

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

h	Hora (s)
M	Molaridad
μ	Micra (s)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
v/v	Volume/volumen
±	Más/menos
DE	Desviación estándar
°C	Grados Celcius

RESUMEN

Las infecciones por *Salmonella* spp. son una de las causas más frecuentes de gastroenteritis bacteriana en niños, ancianos y personas inmunosuprimidas, en quienes se hace necesario el tratamiento con agentes antimicrobianos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos agentes ha llevado a una creciente tasa de resistencia a los mismos. Como resultado a esta situación se han venido buscando estrategias y nuevas alternativas terapéuticas que sean accesibles, seguras y eficaces. Debido a que el mecanismo que controla la patogénesis de muchos organismos de importancia clínica involucra un proceso de comunicación intracelular bacteriana llamada “quorum sensing” (QS), en el presente estudio se evaluó la actividad de extractos de plantas y/o vegetales para inhibir este y otros factores de virulencia de *Salmonella* como son la formación de biopelículas y la movilidad tipo swarming.

La metodología que se empleó para estimar la actividad antimicrobiana de los extractos fue una técnica de difusión en agar, posteriormente se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) para cada extracto. Para analizar la capacidad de los extractos de inhibir el QS de *Salmonella* se llevó a cabo el ensayo del autoinductor con bioluminiscencia, además se evaluó la inhibición de la formación de biopelículas mediante la técnica de la tinción en microplaca y la movilidad tipo swarming con la técnica de inoculación en agar.

Nuestros resultados indican que los extractos de acuosos/ etanólicos de cuatro plantas, *Citrus limon*, *Hibiscus sabdariffa*, *Tamarindus indica* y *Lippia graveolens* demostraron la capacidad para reducir la formación de biopelículas, la movilidad tipo swarming, a demás de disminuir considerablemente la actividad de la molécula autoinductora (AI-2) de *Salmonella Typhi* y *Salmonella Typhimurium* a concentraciones subletales.

ABSTRACT

Infections caused by *Salmonella ssp*, are one of the most frequent bacterial gastroenteritis in kids, elderly and immune deficient people, who definitely require anti-microbial agents treatment. Nevertheless, indiscriminated use of these agents, have caused a high resistance rate to themselves. Due this situation, accessible, safe and efficient strategies and new therapeutic alternatives have been under research. Since the control mechanism for the pathogen of many organisms with clinical relevance involves one of the bacterial intracellular communication called “*quorum sensing*” (*QS*), this case study has evaluated the activity of plant and /or vegetable extracts to inhibit *Salmonella*'s *QS* and virulence factors, such as biofilm formation and swarming.

The methodology used to estimate the antimicrobial activity of the extracts was one of the agar dissemination techniques, the minimal bactericidal concentration (MBC) was subsequently determined to each extract. In order to analyze the extract capability to inhibit the *QS* of *Salmonella* an auto-inductor assay was performed (bioluminescence) – in addition the inhibition of biofilm formation was evaluated using microplate dye and swarming mobility with the agar inoculation technique.

Our results indicate that the watery/ethanolic extracts of four plants, *Citrus limon*, *Hibiscus sabdariffa*, *Tamarindus indica* and *Lippia graveolens* demonstrated the capability to reduce biofilm formation, the swarming motility, as well as substantially decrease the autoinducer molecule activity (AI-2) of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium to sublethal concentrations.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es una de las causas más comunes de enfermedades transmitidas por alimentos en Latinoamérica y otras regiones del mundo (Fuzihara *et al.*, 2000). La mayoría de las infecciones por esta bacteria son zoonóticas, *Salmonella* es propagada por la tierra, agua y vegetación, es parte de la microbiota intestinal de muchos animales salvajes y domésticos, incluyendo cerdos, ganado y aves (Wegener *et al.*, 2003).

La salmonelosis es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Es una enfermedad transmitida por los alimentos la cual causa la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2,500 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella* Enteritidis y *S. Typhimurium* (Gutiérrez- Cogco *et al.*, 1994). Esta es una enfermedad aguda de distribución mundial, con variaciones en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con importancia en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados y no cuentan con medidas de salud pública óptimas.

La habilidad de controlar el crecimiento de bacterias indeseadas y patógenas fue uno de los más grandes logros técnicos en el último siglo. Varios compuestos que buscan eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos han sido aplicados en procesos de preservación de alimentos, prevención del desarrollo de biopelículas, la contaminación de superficies y particularmente en el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, en el nuevo milenio ha habido un incremento alarmante de las

bacterias multi-resistentes y como resultado las infecciones que alguna vez fueron tratadas se han vuelto intratables (Rasmussen and Givskov, 2006). Este evento exhorta a desarrollar tratamientos alternativos para la identificación de compuestos naturales y sintéticos que ataquen a moléculas blanco específicas en las bacterias y así inhibir la posibilidad de causar infección. Un planteamiento que llama la atención que se refiere como el principio de drogas anti-patogénicas (Hentzer *et al.*, 2003) es bloquear selectivamente el mecanismo de virulencia y desarrollo de patogenicidad de las bacterias. Haciendo esto, las bacterias infectantes fracasarán en su adaptación en el ambiente del hospedero y como consecuencia, en el establecimiento de la infección.

El mecanismo que ayuda a controlar la patogénesis de muchos organismos de importancia clínica es un proceso de comunicación intracelular bacteriana llamada “quorum sensing” (QS) por medio del cual la bacteria puede activar varias funciones a través de moléculas autoinductoras (AI). Las bacterias usan QS para coordinar actividades tales como conjugación de plásmidos, bioluminiscencia, producción de proteínas y antibióticos, esporulación, inducción de factores de colonización y virulencia durante infecciones en plantas o animales, síntesis de bacteriocinas, diferenciación celular, flujo de nutrientes y biopelículas (“biofilms”) (Williams *et al.*, 2007).

En años recientes, se han publicado algunos reportes de compuestos anti-QS principalmente de hierbas, alimentos y extractos de plantas medicinales (Guo *et al.*, 2004; Sameena 2006; Vathem *et al.*, 2007) además de algas marinas y aceites que tienen la habilidad de atenuar la patogenicidad bacteriana.

En este trabajo se realizó la búsqueda de extractos de plantas y/o vegetales que tuvieran compuestos que alteraran el QS, inhibieran la formación de biopelículas y la movilidad tipo swarming en *Salmonella* spp.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

En México, las bacterias *Escherichia coli* enterotoxigénica, *E.coli* enteropatógena, *Salmonella enterica*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*, ocasionan en conjunto, entre 40 y 50% de las enfermedades transmitidas por alimentos. Se ha reportado que la mortalidad por enfermedades por esta índole es más elevada en niños y en ancianos. Cada año, se registran alrededor de 3000 defunciones en este grupo de personas, casi todas prevenibles, sobre todo en los estados del sur del país (Flores *et al.*, 2005).

La incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en el mundo industrializado y ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países. Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en la práctica del manejo de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos. Estos cambios han tenido como consecuencia nuevos problemas en la higiene de los alimentos al originar una fácil diseminación de *Salmonella* así como de otros gérmenes patógenos en estos productos (Tauxe, 1997). La actividad antimicrobiana de extractos de plantas ha sido ampliamente demostrada. La mayor parte de las investigaciones se centran solo en la inhibición del crecimiento de los microorganismos, y muy poca información en la literatura científica existe sobre su efecto en los factores de virulencia. El estudio del efecto de compuestos de plantas y/o vegetales sobre el QS y factores de virulencia asociados, nos permitirá validar científicamente la actividad antimicrobiana de extractos de plantas sobre *Salmonella* spp.

3. ANTECEDENTES

3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes incluyen diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros síntomas más severos como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera (Rosas and Acosta, 2001).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETAs, de las cuales, la mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETAs se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de *E. coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos; por ejemplo, es posible que una infección con *E. coli* O157:H7 provoque el síndrome hemolítico urémico (SHU) con secuelas de insuficiencia renal crónica (Rosas and Acosta, 2001). Las ETAs constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. 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 (Hyytiä *et al.*, 1999; Milleman *et al.*, 2000), o

por el empleo de materia prima contaminada (Hielm *et al.*, 1998; Fach *et al.*, 2002) pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado.

La carne de aves en general, en especial la del pollo, es un vehículo muy importante de microorganismos patógenos, tales como *Campylobacter* y *Salmonella* a los que se les considera los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial (Arsenault *et al.*, 2007). En ésta cuestión, se ha mostrado gran asociación entre el consumo de carne de pollo con brotes esporádicos de estas enfermedades en humanos (Sheppard *et al.*, 2009).

Salmonella es la principal bacteria causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Chiu, 2002). Con una incidencia reportada en EUA que va de entre 14 y 120 casos por 100 000 personas tan solo en 1997 (FAO, 2002); estimando que cada año ocurran 1.4 millones de casos de salmonelosis en los EUA. (Mead *et al.*, 1999).

3.2 Género *Salmonella*

3.2.1 Clasificación del género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Éste se encuentra integrado por gérmenes de forma bacilar, Gram negativos, anaerobios facultativos y no esporulados (Anderson, 2005).

El género *Salmonella* consta de sólo tres especies, *Salmonella bongori*, *S. subterranean* y *S. enterica*; esta última se divide en seis subespecies: *entericae*, *salamae*,

arizonae, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Los serotipos de la subespecie *entericae* causan 99% de las salmonelosis en humanos y animales superiores. Para fines prácticos de diagnóstico y epidemiología, la nomenclatura se basa en los nombres de los serotipos de la subespecie, por ejemplo *S. enterica*, subespecie Entericae, serotipo Enteritidis, se abrevia como *S. Enteritidis* (Uzzau *et al.*, 2000).

Para la realización de estudios más detallados de taxonomía y patogenia, los serotipos pueden subdividirse mediante el establecimiento de biotipos y fagotipos. El biotipo es la variación bioquímica entre organismos del mismo serotipo, mientras que el fagotipo expresa la diferente susceptibilidad a la lisis por bacteriófagos de organismos del mismo serotipo (Ward *et al.*, 1987).

3.2.2 Características microbiológicas y bioquímicas de *Salmonella*

Las salmonellas crecen entre 5°C y 47°C, y tienen su temperatura óptima a 37°C. Por debajo de los 10°C y por encima de los 42°C, el crecimiento disminuye. Pueden crecer a pH comprendidos entre 4.5 y 9.0, con resultado óptimo entre valores de pH 6.5 y 7.5. Por debajo de pH 4.1 tiene lugar la inactivación y muerte de las *Salmonella*. Resisten la congelación y la desecación (Anderson, 2005).

3.2.3 Fisiología microbiana y estructura

La presencia de cápsula y flagelo en *Salmonella* depende de la especie en cuestión, solamente *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi y *S. enterica* serovar Dublin presentan cápsula y todas las *Salmonellas* se consideran móviles a excepción de *S. enterica* serovar Gallinarum. Estudios recientes muestran que *S. enterica* serovar Pullorum tiene motilidad en agar semisólido o en agar Hektöen incluso en estudios de microscopia electrónica se ha observado un flagelo pequeño y deformado (Humphries *et al.*, 2001). El género *Salmonella* en particular presenta tres tipos de antígenos: somático O, flagelar H y capsular Vi, cuyas propiedades de aglutinación se emplean para diferenciar a más de 2 500 serotipos. Cada año se aumentan nuevos serotipos a la lista de Kauffmann–White (Wise *et al.*, 2009).

3.2.4 Manifestaciones clínicas

La salmonelosis es una enfermedad causada por la ingestión de alimentos contaminados con distintas especies del género *Salmonella*. La salmonelosis más común es la enterocolitis. La ingesta de alimentos conteniendo 10^5 - 10^8 células de *Salmonella* viables deriva en la colonización del intestino delgado y grueso. La aparición de la enfermedad ocurre generalmente 8-48 hrs después de la ingesta. Los síntomas incluyen dolor de cabeza, escalofríos, vómitos y diarrea, seguido de fiebre durante varios días. Esta enfermedad normalmente desaparece sin intervención en 2 o 3 días. Sin embargo, incluso después de la recuperación, los pacientes tienen *Salmonella* en las heces durante varias semanas. Algunos pacientes se recuperan, y se transforman en asintomáticos, pero portan microorganismos durante meses o incluso años, resultando en portadores crónicos (Smith *et al.*, 2004).

3.2.5 Epidemiología

Las enfermedades intestinales causadas por *Salmonella*; son uno de los problemas más comunes en el mundo (Chávez-de la Peña *et al.*, 2001). *Salmonella* normalmente habita en el intestino de los animales y por lo tanto también en las aguas residuales (Smith *et al.*, 2004).

Los diversos serotipos tienen diferentes grados de adaptación y patogenicidad para los humanos y las especies animales; por ejemplo, *S. enterica* serotipo Typhi y *S. enterica* serotipo Paratyphi causan enfermedades severas en humanos, conocidas como síndrome septicémico y fiebre tifoidea, pero estos serotipos no son patógenos para los animales. Asimismo, los serotipos *S. Gallinarum* y *S. Abortus-ovis* son, respectivamente, causantes de la tifoidea aviar y de abortos infecciosos en las ovejas, pero sólo ocasionalmente producen infecciones leves o asintomáticas en humanos. Existen, sin embargo, serotipos como *S. Choleraesuis* que causa enfermedad severa en su principal portador, que es el cerdo, pero también puede causar enfermedad sistémica grave en humanos. Los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* infectan tanto a humanos como a animales, pero en éstos, principalmente en los pollos, producen infecciones asintomáticas (Duchet, 1997; Uzzau *et al.*, 2000).

En la segunda mitad del siglo XX ocurrieron dos cambios importantes en la epidemiología de la salmonelosis en el mundo; en primer lugar, el surgimiento de infecciones en humanos provocadas por el consumo de alimentos contaminados por *S. Enteritidis*, y en segundo, la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de *S. Typhimurium* (Velge *et al.*, 2005). *S. Enteritidis* es ahora el serotipo más común asociado a la salmonelosis, desplazando así a *S. Typhimurium* (Callaway *et al.*, 2008).

La mayoría de los casos de salmonelosis resultan del consumo de alimentos de origen animal (carne de abasto, pollo, marisco, pescado, leche y huevos), subproductos de origen animal (ovoproductos no pasteurizados, productos lácteos no pasteurizados),

alimentos sanos que se contaminan con productos en malas condiciones de salubridad o son mal manipulados (Anderson, 2005). Los factores que influyen en el aumento de los brotes debido a los vegetales, son los cambios en las prácticas de agricultura, los hábitos de consumo y los incrementos de la comercialización de frutas y verduras (Collins, 1997). La contaminación con bacterias entéricas patógenas de los productos hortícolas parece ser la causa principal de infección, y dos rutas de posible contaminación son el uso de fertilizantes de origen animal y la irrigación de los cultivos con aguas residuales (Islam *et al.*, 2004; Natvig *et al.*, 2002).

Dentro de un amplio margen de alimentos que pueden ser una fuente de infección por *Salmonella* en humanos, los productos avícolas han sido identificados como la vía más importante de transmisión. Se ha reportado la transmisión vertical de *Salmonella* en las aves ponedoras a huevos por lo que es importante controlar esta ruta en los programas de erradicación. La transmisión horizontal del ambiente a las aves en las granjas también se ha reportado como otra ruta importante en algunos países (Rasschaert, 2008).

3.2.6 Brotes de *Salmonella*

En años recientes ha aumentado la frecuencia estos brotes de infección que han sido asociados con el consumo de frutas y vegetales crudos o mínimamente procesados (De Roeber, 1998). De todos los brotes infecciosos, 103 (54%) fueron causados por agentes entéricos (virus, protozoarios, nemátodos o bacterias), principalmente por el consumo de lechuga, melón y diversas ensaladas y jugos de frutas y vegetales. De estos 103 brotes, 62 fueron causados por bacterias patógenas, y 30 de estos 62 fueron causados por *Salmonella* (Sivapalasingam *et al.*, 2004). Cada año un estimado de 1.4 millones de personas presentan salmonelosis en los EUA, con aproximadamente 14,800 hospitalizaciones y 415 muertes (Mead *et al.*, 1999).

La demanda de vegetales frescos en diferentes presentaciones listas para consumir ha aumentado mundialmente. En México se han reportado muchas de las causas de enfermedad y brotes asociados con el consumo de este tipo de productos (Quiroz *et al.*, 2009).

En 2005 en un brote causado por jugo de naranja no pasteurizado, contaminado con *Salmonella* Saintpaul, se identificaron 152 casos en 23 estados de los EUA. La Agencia de alimentos y Medicamentos (FDA) encontró que la empresa no obedecía a las regulaciones del sistema de calidad HACCP (Jain *et al.*, 2005).

En Francia (2005) surgió un brote en el cual un total de 141 infantes de menos de 12 meses de edad presentaron diarrea, y fiebre debido a la contaminación de leche en polvo con *Salmonella* Agona (Brouard *et al.*, 2007). En Dinamarca, en Abril de 2008, se reportaron 1,054 casos de salmonelosis por *S. Typhimurium* fagotipo U292 en donde la fuente de contaminación específica no fue encontrada (Ethelberg *et al.*, 2008).

También en Suiza en 2008, *S. Typhimurium* causó 205 casos (2.7 casos/100,000 habitantes), y en todos ellos se atribuyó a que la bacteria se encontró en carne de puerco (Schmid *et al.*, 2008).

3.2.7 *Salmonella* en México

En México, en el periodo de 1994 a 1998, las notificaciones de casos por salmonelosis registraron un incremento de 100 342 casos, en 1994, a 215 155, en 1998, con una mayor incidencia en los grupos de 15 a 24 años, de 25 a 44 años y de 45 a 64 años, siendo el segundo el grupo más afectado. En cuanto a frecuencia con relación a los meses del año ésta se intensificó a partir de los meses de abril y mayo alcanzando un

pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre. Los estados más afectados han sido Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo (Gutiérrez-Cogo *et al.*, 2000).

Se analizaron 24,394 cepas de *Salmonella* aisladas en México durante el período de 1972 a 1999. Según el estudio los serotipos más frecuentes durante este periodo tanto en muestras humanas como no humanas fueron: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. Agona* y *S. Anatum* (Gutiérrez- Cogco *et al.*, 2000). Datos reportados en 2006 mostraron Que se registraron 154,378 casos de esta enfermedad (Secretaría de Salud, 2006). En 2008 en México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó un total de 7,329 casos confirmados por 100,000 habitantes (según Censo 2000) (Secretaría de Salud, 2008).

3.2.8 Mecanismos de patogenicidad

La dosis infectante capaz de desencadenar la salmonelosis humana suele ser de 1×10^5 bacterias, sin embargo puede variar dependiendo de factores como tipo de alimento, cepa involucrada, susceptibilidad del individuo y virulencia de la cepa. Entre las especies altamente virulentas se encuentran algunas cepas de *Salmonella* Dublin y, sobre todo, *Salmonella* Enteritidis (Anderson, 2005).

Los mecanismos de patogenicidad con que *Salmonella* induce diarrea y septicemia no han sido descritos detalladamente, pero parece ser un fenómeno complejo que involucra diversos factores de virulencia. Se ha demostrado la presencia de enterotoxina en *S. Typhimurium* y *S. Typhi* similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT) y toxina termolábil (LT) de *E. coli* (Ochoa and Rodriguez, 2005).

Salmonella Enteritidis inicia la infección adhiriéndose a la superficie de la mucosa intestinal y posteriormente invade las células epiteliales, su adherencia a la superficie del epitelio depende de las fimbrias y flagelos. Las principales fimbrias de *S. Enteritidis* son SEF14, SEF17 y SEF21. El ciego es el sitio primario de colonización en las aves. Se ha investigado que el glucoesfingolípido (GSL) GlcCer (N-1) y el gangliósido GM3 (G-1) de la mucosa intestinal de los pollos, presentes en el intestino delgado, ciego y recto, son los receptores de la fimbria SEF21 (Townsend *et al.*, 2001).

Cuando *Salmonella* Enteritidis atraviesa el epitelio y llega a la lámina propia intestinal, invade a los macrófagos y como es resistente a la acción de éstos, dichas células le sirven de vehículo para invadir otros órganos, principalmente el hígado (Harris *et al.*, 2006).

3.3 Factores de virulencia bacteriana

3.3.1 Quorum Sensing

El QS es un mecanismo regulatorio que permite a las bacterias tomar decisiones colectivas con respecto a la expresión de genes específicos. Este mecanismo contiene un elemento de coordinación y para lograr esto, las bacterias se comunican a través de moléculas señales pequeñas y difusibles. En bacterias Gram negativas el tipo de moléculas señal más común es el grupo de las acilhomoserin lactonas (AHLs por sus siglas en inglés). Éstas son sintetizadas por la familia de proteínas homólogas LuxI. Estas usan la proteína acarreadora de acilos (ACP) como la principal donadora de cadena de acilos y la S-adenosil metionina, la cual provee la fracción de la homoserin lactona (Davies *et al.*, 1998). El paradigma del QS establece que las proteínas del LuxI son expresadas a bajas densidades de células, por consiguiente las AHL se acumulan en

proporción al incremento de la población de bacterias. Cuando las moléculas de AHL alcanzan una concentración umbral, se promueve la unión a receptores moleculares y el complejo activado de LuxR-AHL forma dímeros o multímeros que actúan como reguladores transcripcionales en los genes blanco de los sistemas de QS (Fuqua *et al.*, 1994; Swift *et al.*, 1996; Eberl, 1999). Fig. 1:

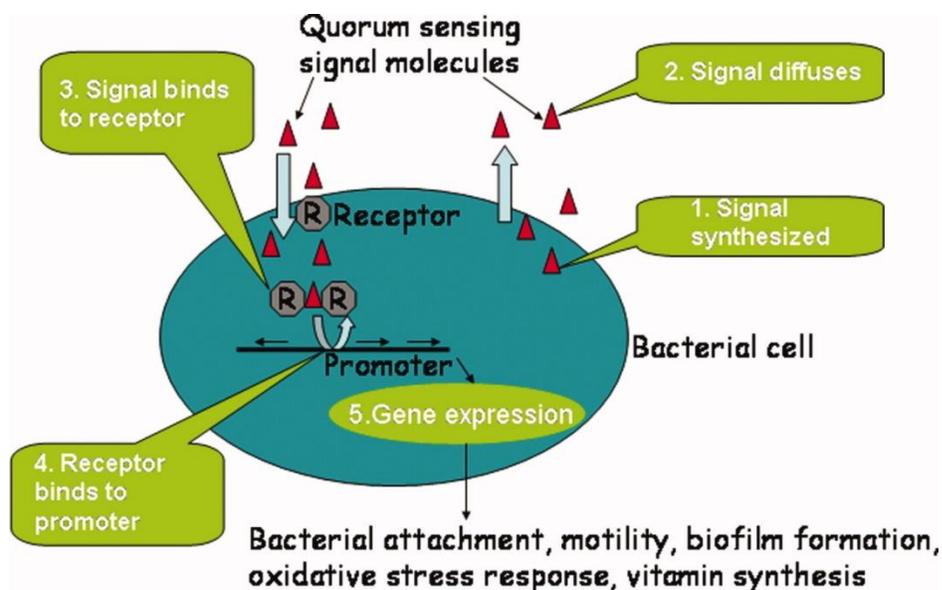


Fig. 1.- Etapas del quórum sensing: 1. La señal (moléculas señal del QS o autoinductores) es sintetizada. 2. La señal se difunde en el medio. 3. La señal se une al receptor. 4. El receptor se une al promotor. 5. Expresión de genes como adhesión, motilidad, formación de biopelículas, respuesta al estrés oxidativo, síntesis de vitaminas. (Kok, 2012).

Se ha reportado un amplio espectro de respuestas multicelulares dependiente de su densidad en distintas bacterias, tales como bioluminiscencia, producción de pigmentos, conjugación, formación de biopelículas y muchas enzimas degradadoras, en patógenos de animales, pescados y plantas. Mc Clean *et al.*, (2004) y Rasmussen *et al.*, (2005), han coincidido que el QS regula la producción de factores de virulencia, antibióticos, interacción entre microorganismos-plantas y movilidad. Varias bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio ssp*, *Burkholderia cepacia* y *Yersinia*

enterocolitica emplean el QS para regular su virulencia y patogenicidad (Fuqua *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2008).

Este proceso de comunicación intercelular, llamado QS, fue descrito por primera vez en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Nealson 1977; Nealson y Hastings 1979). El QS en *V. fischeri* consiste en dos proteínas: LuxI, la cual es responsable de la síntesis del autoinductor acilhomoserin lactona y el LuxR, el cual es activado por este autoinductor y de este modo regula la expresión del operon luciferasa.

Existen 2 cepas biomonitoras para reportar los procesos de QS en las bacterias, *Chromobacterium violaceum* por medio de la producción de violaceína y *Vibrio harveyi* por medio de la producción de bioluminiscencia. Ambas cepas funcionan como reporteras de la alteración de los autoinductores. La fig. 2 explica su funcionamiento.

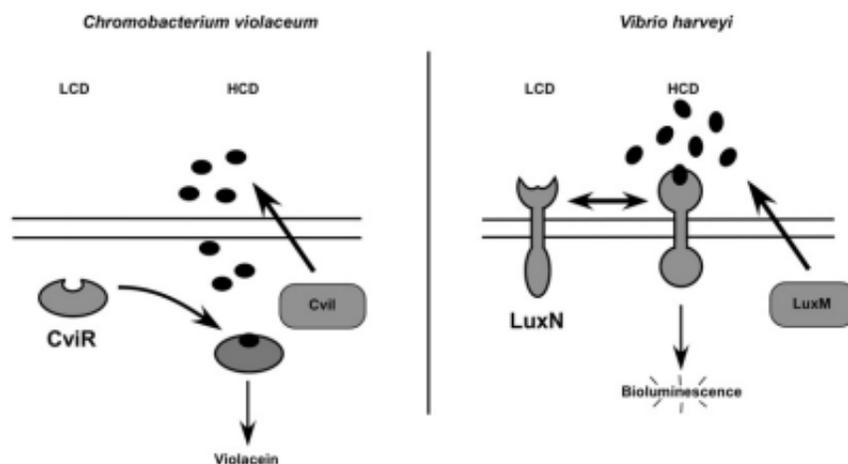


Fig.2. – Circuitos de quórum sensing de *C. violaceum* y *V. harveyi*. (Izquierda) el receptor citoplásmico de QS, CviR, de *C. violaceum* se une al autoinductor AHL (óvalos negros) a alta densidad celular (HCD high cell density). El complejo CviR-AHL se une al DNA y activa la expresión de *vio* genes requeridos para la producción de pigmento violeta, la violaceína. CviI es la C6-HSL sintasa. (Derecha) El receptor de membrana de QS, Lux N, de *V. harveyi* se une al autoinductor AHL (óvalos negros) a alta densidad (HCD), resultando en una cascada de fosforilación que activa la expresión de genes *lux* requeridos para bioluminiscencia. LuxM es el autoinductor 3-OH-C4-HSL sintasa. (Swem *et al.*, 2009)

Aunque existen varios sistemas de QS diferentes (Henke y Bassler 2004), el más usado es el basado en el sistema Lux de *V. fischeri* y *V. harveyi*. Este fenómeno de QS involucra un sistema de 3 componentes, una señal libremente difusible y un regulador que interactúa en conjunto con la señal que regula la expresión de genes.

Ciertas especies de bacterias incluyendo *V. harveyi*, albergan sistemas de QS activados por el autoinductor-2 (AI-2) en el cual las moléculas señal pueden ser usadas como el lenguaje universal para la comunicación con otras bacterias en lugar de ser usado exclusivamente para la comunicación intrabacteriana (Xavier y Bassler, 2003). En *V. harveyi* y *S. Typhimurium*, el gen LuxS codifica para la AI-2 sintasa (ej. la proteína LuxS) que está directamente involucrado en las moléculas del AI-2 de la S-adenilmetionina. (Surette et., al 1999). La proteína LuxS cataliza el paso final en la biosíntesis del AI-2, generando la molécula señal 4,5-dihidroxi-2-3-pentadiona (DPD) (Meijler *et al.*, 2004).

3.3.2 Movilidad tipo swarming

El “swarming” es una forma de movilidad bacteriana que depende de flagelos, este mecanismo facilita la migración de bacterias en substratos viscosos, como superficies de agar semisólido, el cual se ha observado en una variedad de bacterias móviles (Harshey, 2003). Para infectar las células, primeramente se diferencian en un estado especializado caracterizado por un incremento en el número de flagelos y en la elongación de las células, posteriormente se mueven como balsas a través de las superficies. (Fraser y Hughes, 1999; Harshey y Matsuyama, 1994; Harshey, 2003). Esto es en contraste con el nado que representa motilidad individual en ambientes acuosos. Además de los cambios en la morfología, (Fig. 3) se conoce que las células infectantes producen materiales extracelulares como son los surfactantes y exopolisacáridos, para incrementar la humedad de la superficie y así facilitar el movimiento (Harshey, 2003).

En vista de las características del swarming, es muy probable que estén involucradas varias actividades celulares en este tipo de movilidad.

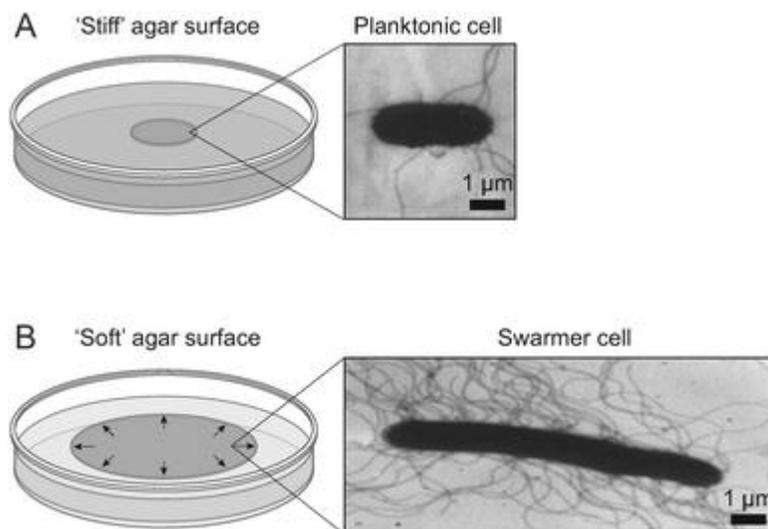


Fig. 3. Cambios en la morfología de las células según la superficie del agar. A. En la superficie de agar sólido se observan células planctónicas. B. En la superficie de agar semisólido, se observan células “swarmer”. (Copeland and Weibel, 2009).

El swarming y la formación de biopelículas están fuertemente relacionadas a la causa de enfermedad (Allison *et al.*, 1992; Elvers y Lapping-Scott, 2000) y se han estudiado los mecanismos de estas dos actividades multicelulares (Allison *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1998; Kolter and Losick 1998).

El swarming existe tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas el cual consiste en tres etapas: i) el reconocimiento de señal ambientales con la formación de células elongadas hiperflageladas, ii) el movimiento coordinado de las células, iv) la consolidación a células vegetativas y la iniciación de una nueva ronda de swarming (Allison *et al.*, 1992) (Fig 4). Este ocurre a viscosidades de superficie y condiciones nutricionales específicas (Allison *et al.*, 1992; Fujikawa 1994). En el laboratorio el

swarming puede llevarse a cabo en cajas Petri con agar semi-sólido con una velocidad tan alta como $16\mu\text{m s}^{-1}$ (Allison *et al.*, 1992).

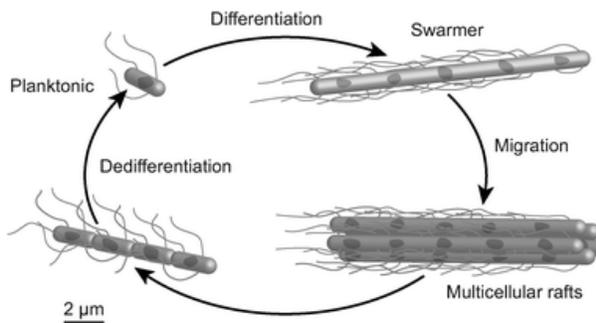


Fig. 4.- Etapas del swarming. Inicia con las células planctónicas flageladas, las cuales sufren diferenciación lo que produce células swarmer que posteriormente migran y forman estructuras multicelulares apiladas, quienes pasan nuevamente por diferenciación para originar nuevas células vegetativas que dan lugar a las siguientes células swarmer. (Copeland and Weibel, 2009).

Se ha encontrado que la comunicación celular, basada en inductores químicos que dependen de la densidad llamada QS, es importante para algunos comportamientos multicelulares de las bacterias tales como el swarming (Eberl *et al.*, 1999) y la formación de biopelículas (Davies *et al.*, 1998).

3.3.3 Formación de biopelículas

Los patógenos humanos forman biopelículas en los alimentos y/o en la superficie en contacto con ellos, de ese modo incrementan su habilidad para sobrevivir en ambientes hostiles, resisten a tratamientos antimicrobianos y persisten en el ambiente de procesamiento de alimentos. Normalmente las bacterias forman comunidades complejas que están cercanamente relacionadas con las superficies bióticas y abióticas. Estas

comunidades conocidas como biopelículas, son adherentes a la superficie, la interfase y ambas. Las biopelículas pueden persistir en los alimentos y causar su contaminación lo cual es preocupante para la seguridad alimentaria (Midelet and Carpentier, 2004).

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton *et al.*, 1995). En esta red, las células actúan como un sistema colectivo viviente, a menudo con canales que liberan agua y nutrientes a las células de la porción interior de la biopelícula. Los organismos que forman biopelículas son significativamente más resistentes al estrés del ambiente o por sustancias microbianas (como antibióticos y biocidas) que las células planctónicas (Donlan, 2002; Stoodley *et al.*, 2002; Sauer, 2003).

La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia sobre la superficie, en bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *E. coli*, *S. enterica*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar (Latasa *et al.*, 2005). En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales (Fig. 5). La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. Typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula; siendo un rasgo muy común en los serotipos de *S. enterica* (Latasa *et al.*, 2005).

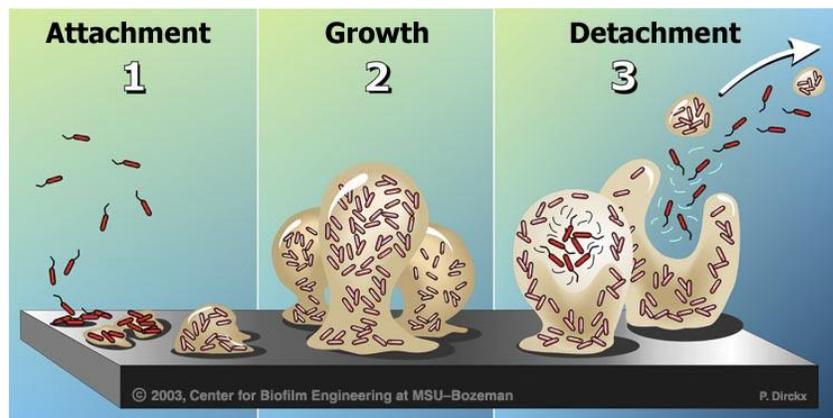


Fig. 5.- Ciclo de vida de la formación de biopelículas. 1. Adhesión. 2. Crecimiento. 3. Desprendimiento de células planctónicas (Dirckx and Davies, 2003).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación de la biopelícula está controlado por una compleja cascada de reguladores. Un trabajo pionero con *P. aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biopelículas está regulado por el proceso de *QS* o autoinducción (Latasa *et al.*, 2005).

En relación con el *QS* se ha identificado una molécula denominada “Furanona” producida por el alga *Delisea pulchra*, con una estructura similar a las acilhomoserin lactonas. Esta molécula se une al mismo receptor, pero en lugar de activarlo, lo bloquea, inhibiendo la consiguiente formación de biopelículas (Wu *et al.*, 2004). En la actualidad se está intentando desarrollar inhibidores de la formación de la biopelícula basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica. De forma similar en *S. aureus* se ha descrito un péptido denominado RIP, que inhibe un sistema de *QS* y el proceso de formación del biopelícula (Gov *et al.*, 2001).

Además del *QS* otros reguladores globales como CsrA en *E. coli*, CytR de *V. cholerae*, se ha demostrado que son determinantes importantes para el desarrollo de biopelículas de estas bacterias. Latasa *et al.*, (2005) en su estudio demostraron que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo de las

biopelículas de *S. aureus*. Su trabajo demostró por primera vez que un regulador de virulencia es a su vez un regulador de la formación de las biopelículas, sirviendo de conexión entre ambos procesos.

Dado que las bacterias que forman biopelículas pueden ser hasta 1,000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido (Stewart and Costerton, 2001) se han estudiado las bases de la resistencia bacteriana, entre las que se incluyen:

1. La barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos.
2. El crecimiento ralentizado de las bacterias de la biopelícula debido a la limitación de nutrientes.
3. La existencia de microambientes que antagonicen con la acción del antibiótico.
4. La activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico de la biopelícula que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (Mah and O'Toole, 2001).

Entre los métodos que se utilizan para estudiar la resistencia de las biopelículas a los antimicrobianos, destaca el método descrito por Amorena y col.(1999) y el método denominado "*Calgary biofilm system*" (Ceri *et al.*, 1999). En el primero la biopelícula desarrollada sobre pocillos de placas de microtitulación durante distintos períodos de tiempo, se expone a los tratamientos antimicrobianos, el número de bacterias viables que han resistido el tratamiento se cuantifica midiendo la cantidad de ATP por bioluminiscencia. El método "*Calgary Biofilm Device*" utiliza una placa de microtitulación con una tapa especial la cual contiene 96 púas que se introducen y ajustan perfectamente en cada uno de los pocillos de las placas. La biopelícula formada sobre las púas de la tapa se puede llevar a otra placa para su exposición a la acción de las distintas concentraciones de antibióticos. Finalmente, el número de bacterias sobrevivientes se enumeran realizando recuentos en medios de cultivo.

3.4 Extractos de plantas

Actualmente la resistencia de los microbios a las drogas es un problema muy serio, de ahí que las medicinas herbales son consideradas como alternativas seguras en comparación con las drogas sintéticas. (Upadhyay *et al.*, 2010). Por mucho tiempo las plantas han sido una buena fuente de productos naturales para mantener la salud humana, el uso de extractos de plantas y fitoquímicos, ambos con propiedades antimicrobianas conocidas, pueden ser de gran significancia en el tratamiento terapéutico (Parekh and Chanda, 2007). Los aceites esenciales y otros extractos de plantas han provocado interés como fuente de productos naturales. Estos han sido examinados por sus usos potenciales como remedios alternativos para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas (Dorman and Deans, 2000).

Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos obtenidos por destilación a vapor, obtenidos de diferentes partes de las plantas como flores, botones, semillas, hojas, ramillas, cortezas, maderas, frutos y raíces. Estos son una rica fuente de esencias y son usados en la preservación de alimentos y en aromaterapia (Upadhyay *et al.*, 2010). Se ha reportado que algunos poseen propiedades múltiples, por ejemplo antibacterial, (Ozcan *et al.*, 2006) antifúngico (Cafarchia *et al.*, 2002) anticáncer, antiviral y además poseen propiedades antioxidantes (Salehi *et al.*, 2005; Vardar-Unlu *et al.*, 2003) contra virus, bacterias y hongos (Kalemba and Kunicka, 2003).

Muchas plantas se han usado debido a sus efectos antimicrobianos, los cuales se deben a compuestos sintetizados en el segundo metabolismo de la planta. Estos productos son conocidos por sus sustancias activas como los compuestos fenólicos, los cuales son parte de los aceites esenciales, así como los taninos (Tyagi and Malik, 2010).

3.4.1 Métodos de extracción

La extracción es la separación de porciones activas medicinales y porciones de tejido de plantas (y animales) usando solventes selectivos a través de procedimientos estándar. Los productos obtenidos de las plantas son mezclas relativamente complejas de metabolitos en estado líquido o semisólido (después de la remoción del solvente), en forma seca en polvo, los cuales se pretende usar de forma externa u oral. Estas incluyen clases de preparaciones conocidas como decocciones, infusiones, extractos fluidos, tinturas y extractos en polvo (Remington, 2008).

Los métodos de extracción usados de forma farmacéutica buscan la separación de las porciones medicinalmente activas de los tejidos de plantas de las partes inactivas o componentes inertes usando solventes selectivos. Durante la extracción los solventes difunden dentro del material sólido de la planta y solubilizan los compuestos con polaridad similar (Ncube *et al.*, 2008). Los productos resultantes de la extracción contienen una variedad de metabolitos secundarios como alcaloides, glicósidos, terpenoides, flavonoides y ligninas (Handa *et al.*, 2008).

Las técnicas generales de la extracción de plantas medicinales incluyen maceración, infusión, percolación, digestión, decocción, extracción en calor continuo (Soxhlet), extracción acuosa-alcohólica por fermentación, extracción con microondas, extracción ultrasónica (sonicación), extracción de fluidos supercríticos y extracción con hidrofluorocarbonos. Para plantas aromáticas pueden emplearse técnicas de hidrodestilación (destilación en agua, destilación a vapor, maceración hidrolítica seguida de destilación, expresión y extracción fría de grasas -enfleurage-) (Handa *et al.*, 2008).

Los parámetros básicos que influyen la calidad de un extracto incluyen (Ncube *et al.*, 2008): parte de la planta a utilizar como material base, solvente utilizado para la extracción y el procedimiento de extracción.

El efecto de los fitoquímicos de las plantas depende de ciertos factores (Ncube *et al.*, 2008), tales como naturaleza del material vegetal, origen, grado de procesamiento, contenido de humedad, tamaño de partícula.

Las variaciones en los métodos de extracción que afectarán la calidad de la composición de los metabolitos secundarios dependen del tipo y tiempo de extracción, temperatura, naturaleza del solvente, concentración del solvente y polaridad (Ncube *et al.*, 2008).

La determinación exitosa de los compuestos activos de un material vegetal, depende principalmente en el tipo de solvente utilizado en el procedimiento de extracción. Las propiedades en un buen solvente incluyen baja toxicidad, fácil evaporación en calor leve, rápida absorción fisiológica, acción conservada, incapacidad del extracto de formar complejos o de disociarse. Los factores que afectan la elección del solvente son la cantidad de fitoquímicos a extraer, diversidad de compuestos inhibitorios a extraer, el fácil manejo de los extractos, toxicidad del solvente en los bioensayos, y peligro potencial a la salud de los consumidores (Eloff, 1998). La elección del solvente es influenciada por el propósito del uso del extracto. Debido a que el producto final contendrá trazas del solvente residual, el solvente debe ser no tóxico y no interferir con el bioensayo. La selección también dependerá de los compuestos que se necesiten extraer (Ncube *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2010)

A diferencia de la extracción acuosa, la etanólica ofrece mayor actividad y esto se debe a que se obtiene mayor cantidad de polifenoles (Cowan, 1999). Esto significa que estos compuestos poseen mayor actividad en afectar las paredes celulares, quienes tienen carácter no polar y esto causa que los polifenoles sean liberados de las células. Un ejemplo de la diferencia de actividad entre diferentes extractos puede deberse a la enzima polifenol oxidasa, la cual degrada los polifenoles en los extractos acuosos, la cual se inactiva cuando está en contacto con metanol o etanol (Lapornik *et al.*, 2005). Adicionalmente se encontró que el etanol tiene mayor capacidad para penetrar las membranas celulares, y por consiguiente extraer de mejor manera los componentes

intracelulares del material vegetal (Wang, 2010). Debido a que la mayoría de los compuestos activos de plantas identificados como inhibidores de microorganismos son aromáticos u orgánicos saturados, son obtenidos con mayor frecuencia a través de la extracción con etanol o metanol (Cowan, 1999). El metanol es más polar que el etanol, sin embargo, debido a su naturaleza citotóxica es inadecuado en algunos tipos de estudios ya que puede producir resultados tóxicos en células blanco (Tiwari *et al.*, 2011).

Las principales clases de compuestos que se pueden extraer al utilizar diferentes solventes pueden incluir a los compuestos fenólicos (fenoles simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, flavonas, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lecitinas y polipéptidos, así como poliacetilenos (Cowan, 1999).

Se ha determinado que cuando el solvente de la extracción es etanol se pueden obtener taninos, polifenoles, poliacetilenos, flavonoles, esteroides, y alcaloides (Cowan 1999).

Los extractos de plantas en general son mezclas complejas de una amplia diversidad de componentes y su actividad antimicrobiana es por lo tanto relacionada a su composición, configuración, cantidad y su posible interacción. Cuando se encuentran en combinación se pueden producir diferentes efectos: aditivo, antagonista y sinérgico. El efecto aditivo ocurre cuando el efecto combinado de los compuestos es igual a la suma de los efectos individuales. El sinergismo es registrado cuando la actividad combinada de las sustancias es mayor a la suma de las actividades individuales. En contraste, el efecto antagonista se presenta cuando la actividad de los compuestos en combinación es menor que la actividad por separado (Lis-Balchin, 1998).

3.4.2 Extractos de plantas y/o vegetales con acción antimicrobiana

En el año 2009 ante la comprobada resistencia de *Staphylococcus aureus* y otras bacterias a varios antibióticos, se evaluaron *in vitro* los extractos de 27 plantas usadas en la medicina tradicional contra infecciones gastrointestinales, mediante la técnica de dilución en agar. Los resultados mostraron que el 52% (14) de los extractos (presentaron inhibición total frente a *S. aureus*, mientras que 4 de éstos fueron activos contra *S. Typhi* (Bellucia pentámera, Clidemia dentada, Miconia reducens (Pino and Stashenko, 2009).

En el estudio realizado en nuestro laboratorio reportado por Valtierra-Rodriguez *et al.*, 2010 se probaron 54 extractos de plantas de los cuales, tres resultaron ser efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella* y *Campylobacter in vitro*. Encontrando que las cepas de *Campylobacter* mostraron una susceptibilidad mucho mayor que las cepas de *Salmonella* con los extractos de limón, cáscara de naranja agria y ciruela.

En el año 2007 se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cinco cepas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella* spp. El extracto de *A. cepa* (cebolla) mostró una mayor actividad antimicrobiana, en comparación con los otros extractos y fue el extracto con mejor poder inhibitorio sobre *E. coli*, *Salmonella* spp y *B. cereus* (García and Herrera, 2007).

En el año 2004 se realizaron estudios para medir la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas contra enteropatógenos. Se reportó que extractos del orégano tienen una capacidad antioxidante y antimicrobiana contra *Salmonella* Typhimurium, *E.coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, entre otros. (Arcila *et al.*, 2004).

En el año 2003, se reportó que los extractos de tomillo, orégano y canela fueron efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella* Typhi, y *Salmonella* Typhimurium (Kalemba and Kunicka, 2003).

También en otro estudio se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico y acuoso de *Lepechinia meyeri* Walp, el cual demostró actividad inhibitoria contra el crecimiento de microorganismos Gram positivos (*S. aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. faecalis*, estreptococos beta hemolíticos y Gram negativos (*Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*). El tamizaje fitoquímico determinó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, terpenoides y esteroides en dicho extracto (Rossi *et al.*, 2002).

Otros extractos de plantas que también han sido probados contra el crecimiento de *Salmonella*, incluyen a la nuez moscada, orégano, geranio, pimienta negra, clavo, tomillo. Las más activas fueron de nuevo, el orégano y el tomillo (Dorman and Deans, 2000). También se han analizado otros extractos como anís, almendra, canela, nuez moscada, clavo, hierbabuena, menta verde, laurel, albahaca, romero, eucalipto, lima, limón, mandarina, naranja, bergamota, tomillo, ajo, cebolla, mejorana, toronja, jengibre; sobre *S. Enteritidis* y *C. Jejuni*. Se encontró que los más eficaces contra la *S. Enteritidis* fueron canela, clavo, laurel y tomillo; mientras que contra *C. jejuni*, laurel, menta verde, y (Smith-Palmer *et al.*, 1998).

En el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la UANL se han buscado extractos de plantas con propiedades contra los enteropatógenos. *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*. Se han probado diferentes extractos como el limón, cilantro, eucalipto, clavo de olor, hierba de la golondrina, higo, árnica roja, gordolobo, guazima, poleo, salvia blanca, salvia real, linaza, orégano, laurel, manzanilla, hierbabuena, albahaca, aguacate, llantén, durazno, guayaba, romero, pirul, hierba mora, cempasúchil, anís, epazote, epazote de zorrillo, tomillo, jengibre y planta en cruz. De ellos se encontró actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* de extractos de guazima, cempasúchil y jengibre. *S. aureus* fue

inhibida por el árnica, salvia blanca, orégano, hierba del burro, albahaca y gordolobo (Alarcón, 2000).

3.4.3 Mecanismos de acción de antimicrobianos

La investigación sobre las propiedades antimicrobianas de las plantas ha sido ampliamente reportada, sin embargo poca información se encuentra disponible acerca de los mecanismos de acción de los compuestos en la célula bacteriana. Varios mecanismos propuestos incluyen daño en la membrana, cambios en el pH intracelular, cambios en el potencial de membrana y en la síntesis de ATP (Sánchez *et al.*, 2010). El conocimiento de los sitios de ataque de los extractos de plantas y sus componentes en la célula es crucial para entender la sobrevivencia del patógeno en la matriz del alimento, en un tejido vivo o el proceso de la infección del huésped (Dorman and Deans, 2000; Burt 2004; Lambert *et al.*, 2001; Turgis *et al.*, 2009)

Los sitios o estructuras de la célula bacteriana que son considerados blancos de acción por los compuestos de los productos naturales, son ilustrados en la figura 6. Los mecanismos de acción de los compuestos naturales se relacionan a la desintegración de la membrana citoplásmica, desestabilización de la fuerza protón motriz, flujo de electrones, transporte activo y la coagulación del contenido celular. No todos los mecanismos actúan en blancos específicos, y algunos sitios pueden ser afectados por uno o más mecanismos (Burt, 2004).

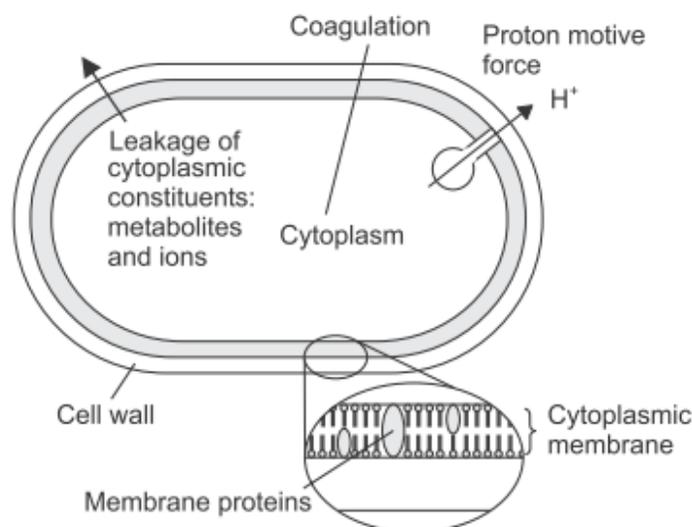


Fig. 6.- Sitios blanco en la célula bacteriana, en los cuales actúan los compuestos naturales. (Adaptación de Burt, 2004).

3.4.4 Áreas blanco para la actividad anti-quorum sensing

La búsqueda de compuestos para atacar los sistemas de QS de las bacterias es generalmente dividida en tres áreas blanco: i) destrucción de la molécula señal, ii) inhibición de la producción de la señal y iii) inhibición del receptor de la señal. Sin embargo dos nuevos enfoques involucran el uso de moléculas que interrumpen algún paso de la ruta natural de señalización de QS. Actualmente algunos ejemplos de inhibidores de QS (IQS) los cuales bloquean la producción de la molécula señal se han reportado en diferentes cepas bacterianas. Estos inhibidores de QS pueden ser similares en estructura a los ligandos naturales o pueden ser completamente diferentes, ya sea que actúen enlazándose directamente al sitio de unión de la señal o en cualquier otro sitio en el receptor, en cualquier caso provocan la eliminación de la señal resultante (Mc Lean *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2005). Los IQS pueden presentarse en una variedad de estructuras y pueden ser derivados de muchas fuentes diferentes. Los agentes antimicrobianos con actividad anti-QS representan un avance prometedor en la batalla

contra los microorganismos patógenos como es el caso de la inhibición de la formación de biopelículas (Fig. 7) y otros factores de virulencia.

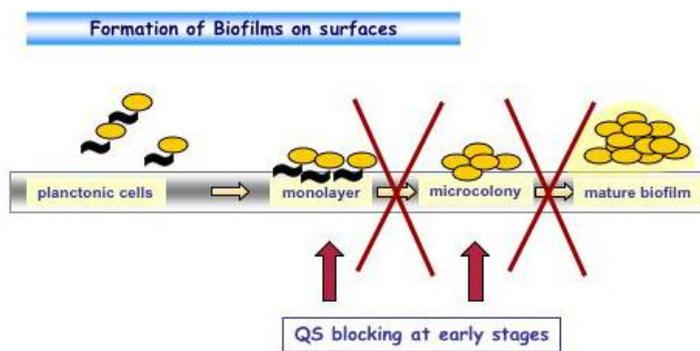


Fig. 7.- La interrupción del quórum sensing a etapas tempranas inhibe la formación de biopelículas (Kok, 2012).

3.4.5 Mecanismos de inhibición del QS

El éxito de la inhibición competitiva en el caso de las furanonas es que son antagonistas basados en la estructura C12-AHL y causan la reducción de la actividad de *LasR*. Además los anticuerpos AHL se han desarrollado para suprimir el QS a través de la unión a la señal (Fig. 8). El bloqueo de S-adenosil metionina (SAM) o los ácidos grasos precursores necesarios para la síntesis de AHLs conduce a una producción disminuida de C12-AHL por *LasI* (Hoang *et al.*, 2004).

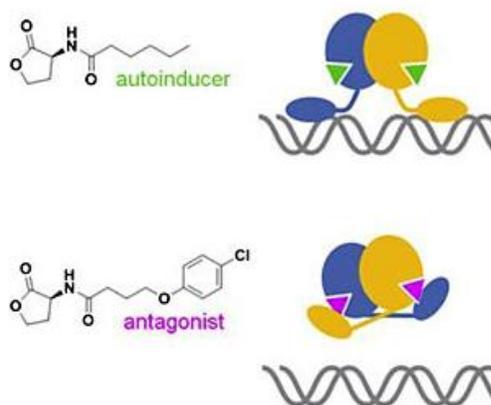


Fig. 8.- Antagonistas del QS que funcionan por medio de la estabilización de la conformación del receptor. (Chen *et al.*, 2011).

3.4.6 Extractos de plantas y compuestos inhibidores del QS, swarming y biopelículas

Una alternativa viable para el desarrollo de nuevas terapias en el tratamiento de infecciones bacterianas es el bloqueo o inhibición del QS (Ni *et al.*, 2008). En años recientes, se han publicado algunos reportes de compuestos anti-QS principalmente a base de hierbas, alimentos y extractos de plantas medicinales (Cumberbatch, 2002; Gao *et al.*, 2003; Sameena 2006; Vattem *et al.*, 2007).

En el 2009 Khan y colaboradores realizaron un estudio acerca de la inhibición del QS con aceites esenciales de plantas en *Chromobacterium violaceum* (CV1247 y CVO26) y *Pseudomona aeruginosa* (PAO1) encontrando que el aceite de clavo, canela y menta mostraron actividad anti-quorum sensing (Khan *et al.*, 2009).

Se realizó un estudio sobre la inhibición de la formación de biopelículas y swarming de *Bacillus subtilis* en donde concluyeron que las furanonas naturales tienen potencial para controlar el comportamiento multicelular de bacterias Gram positivas (Ren y Wood, 2002).

Lo mismo fue reportado al utilizar diversas plantas o hierbas y sus frutos en *Chromobacterium violaceum*, (Vattem *et al.*, 2007). Otras frutas incluyendo frambuesa, arándano azul, zarzamora, arándano y uva, además de hierbas como jengibre, col rizada y cúrcuma, exhibieron moderada inhibición de los procesos controlados por QS. Sin embargo no se obtuvieron datos en modelos animales, ni de compuestos activos purificados de los extractos. Además algunos compuestos que mimetizan la señalización, tales como furanonas y sus derivados sintéticos (ácido elálgico, ácido tánico y epigallocatequin galato) han mostrado inhibición del QS en cepas biomonitoras de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Huber *et al.*, 2004).

Un amplio rango de sustancias naturales, particularmente extractos de plantas y sustancias con valor nutritivo, han sido evaluadas por su habilidad de modular el QS tipo *LuxR* en bacterias Gram negativas tales como el aceite de clavo (Vattem *et al.*, 2007; Mok *et al.*, 2003), y jugo de arándano. Estudios recientes revelan que los microorganismos que producen compuestos anti-QS se protegen a sí mismos de otros microbios. Plantas, bacterias y hongos pueden producir compuestos que pueden interferir con la expresión de genes regulados por el QS en el organismo invasor (Hogan *et al.*, 2004; Persson *et al.*, 2005).

Girenavar *et al.*, 2007 y 2008 en un estudio con jugo de toronja encontraron compuestos con actividad anti-QS. Dos tipos de jugo de toronja (Rio Red y Marsh White) mostraron inhibir los sistemas receptores de AI-1 y AI-2. Dos furocumarinas, (bergamotinas e hidroxibergamotinnas) fueron aisladas del jugo de toronja por separado. Las furocumarinas mostraron ser potentes inhibidores del citocromo p450 y proteínas transportadoras. Las dos bergamotinas mostraron tener fuerte actividad inhibitoria de AI-1 y AI-2 con concentraciones tan bajas como 1µg/ml. Investigaciones posteriores indicaron que ambas inhibieron las biopelículas en *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa* sin la inhibición del crecimiento bacteriano.

Se ha reportado que el extracto de ajo posee propiedades antibacterial, y también muestra efecto sobre las biopelículas en *Candida albicans*, en las fases de adherencia y

maduración (Shuford *et al.*, 2007). Los análisis *in vitro* de las biopelículas de *P. aeruginosa* mostraron considerable reducción de éstas, cuando se expusieron a una combinación de ajo y tobramicina (Rasmussen *et al.*, 2005).

Recientemente se reportó a la solenopsina como el primer ejemplo de alcaloide natural inhibidor de QS extraída de la hormiga roja de fuego (*Solenopsis invicta*). Las investigaciones en *P. aeruginosa* muestran a la solenopsina A como inhibidora de la producción de piocianina, indicación de la supresión de la señalización de QS. Investigaciones posteriores arrojaron la reducción de biopelículas en *P. aeruginosa* en una manera dosis dependiente, indicando un mecanismo anti-QS (Park *et al.*, 2008).

Otras especies de plantas han presentado inhibición del QS bacteriano, Adonizio y colaboradores en 2008, revelaron la inhibición de factores de virulencia controlados por QS en *P. aeruginosa* a causa de extractos la exposición de varias plantas del Sur de Florida. Tres de estos extractos, (*Conocarpus erectus*, *Bucida buceras* and *Callistemon viminalis*), mostraron una inhibición considerable de la proteasa *Las A*, la elastasa *Las B*, la producción de pioverdina y de biopelículas.

Los polifenoles, conocidos como antioxidantes, han revelado poseer efectos sobre las biopelículas. La conexión entre polifenoles y el QS se encuentra levemente establecido (Huber *et al.*, 2003) por algunos compuestos como epigallocatequin (EGCG), ácido elágico y ácido tánico. Los estudios utilizando cepas de *P. putida* (pKR-C12) y *E. coli* MT102, identificaron un efecto antagonista en estos compuestos. El EGCG fue el más efectivo, seguido por el ácido elágico y después el ácido tánico. La inhibición de las biopelículas se produjo sobre *B. cepacia*. Otros distintos polifenoles han manifestado ser prometedores inhibidores del QS.

Recientemente se reportaron efectos antagonistas de análogos del pirogalol de los sistemas de QS en *V. harveyi* (Ni *et al.*, 2008). Zeng y colaboradores en 2008 reportaron un ensayo para la selección de compuestos con actividad inhibidora de QS y que son capaces de inhibir también la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar las propiedades de extractos de plantas (o de los compuestos bioactivos) para inhibir las moléculas señal del QS y la habilidad para afectar la expresión fenotípica de factores de virulencia regulados por QS en *Salmonella* spp.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Obtener extractos de plantas comestibles y probar su capacidad para inhibir el crecimiento de *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Typhimurium.
- 2) Determinar el efecto de los extractos vegetales sobre algunos factores de virulencia de *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Typhimurium, tales como movilidad tipo swarming y formación de biopelículas.
- 3) Establecer la capacidad de extractos vegetales para afectar la actividad de la molécula autoinductora AI-2.

5. HIPÓTESIS

Algunos extractos de plantas comestibles son capaces de inhibir la actividad de la molécula autoinductora (AI-2) en *S. Typhi* y *S. Typhimurium* y afectar la producción de factores de virulencia, formación de biopelícula y swarming.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Activación de la cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron *Salmonella* Typhi ATCC 19430 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Estas cepas fueron conservadas a 4 °C en tubos de tapón de rosca con agar inclinado de Infusión Cerebro Corazón (ICC) (Difco BD. Sparks M.D USA), realizando resiembras cada tres meses. Para la activación de las cepas, se tomó una asada de cultivos de reserva en tubos con 4 ml de caldo Mueller Hilton, caldo soya tripticasa (TSB) y Luria-Bertani (LB) (según el ensayo a realizar) y se incubaron en condiciones aerobias a 37° C por 18 h. Al día siguiente se ajustó el inóculo bacteriano sembrándola cepa en medio nuevo y dejándola crecer por aproximadamente 2 h hasta alcanzar la fase media exponencial ($0.2_{600 \text{ nm}}$, espectrofotómetro Sequoia Turner modelo 340), la cual equivalió a 1.5×10^8 UFC/ml.

Para los ensayos del Autoinductor AI2 se utilizaron las cepas de *Vibrio harveyi* BB170, BB120, BB152. Estas cepas fueron conservadas a 4 °C en tubos de tapón de rosca con agar LB. Para la activación de estas cepas, se tomó una asada de cultivos de reserva en tubos conteniendo 4 ml de caldo LB. Estas se cultivaron en medio AB (0.3 M de NaCl, 50mM MgSO₄, 0.2% p/V de casa aminoácidos, 10mM de amortiguador de fosfatos (pH 7), 1mM de L-arginina, 2% p/v de glicerol, 1mg/L de tiamina y 10 µg/L de riboflavina) a 30°C en agitación (Shaker Maxi Ø mini 4450 Labline) a 175 rpm por 18 h. para posteriormente para obtener el cultivo libre de células.

6.2 Selección del material vegetal

Se recolectaron 35 frutas, vegetales o plantas para probar su actividad antimicrobiana contra *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Estos se obtuvieron de centros comerciales de Monterrey y el área metropolitana de Nuevo León. El material vegetal se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Material vegetal, (nombre común y científico) y porción utilizada en este trabajo.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	PARTE UTILIZADA
<i>Árnica montana</i>	Árnica	Hojas
<i>Sesamum indicum</i>	Ajonjolí	Semilla
<i>Pimpinella anisum</i>	Anís	Semilla
<i>Ipomoea batatas.</i>	Camote	Fruto
<i>Cinnamomun zeylanicum</i>	Canela	Corteza
<i>Prunus domestica</i>	Ciruela	Fruto
<i>Caryophyllus</i>	Clavo	Corteza
<i>Cuminum cyminum</i>	Comino	Hoja
<i>Allium cepa</i>	Cebolla	Fruto
<i>Amphipterygium Adstringens</i>	Cuachalalate	Tallo
<i>Punica granatum</i>	Granada	Cáscara y semilla
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Jamaica	Flor
<i>Pachyrhizus erosus</i>	Jícama	Fruto
<i>Citrus aurantifolia swingle</i>	Lima	cáscara
<i>Citrus limón</i>	Limón	Cáscara y bagazo

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	PARTE UTILIZADA
<i>Citrus reticulata.</i>	Mandarina	cáscara
<i>Origanum majorana</i>	Mejorana	Hojas
<i>Mentha Piperita</i>	Menta	Hoja
<i>Citrus sinensis.</i>	Naranja	Cáscara y bagazo
<i>Juglans regia</i>	Nogal	Corteza
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	Hojas
<i>Haematoxylum brasiletto</i>	Palo de Brasil	Tallo
<i>Haematoxylum campechianum</i>	Palo de Campeche	Tallo
<i>Piper nigrum.</i>	Pimienta negra	Semilla
<i>Pimienta dioica.</i>	Pimienta gorda	Semilla
<i>Anana comosus</i>	Piña	Cáscara y pulpa
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Hoja y rama
<i>Citrus limetta Risso.</i>	Cidra	Cáscara y bagazo
<i>Tamarindus indica</i>	Tamarindo	Pulpa
<i>Theae nigraefolium.</i>	Té negro	Hoja
<i>Camelia sinesis</i>	Té verde	Hoja
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Tepezcohuite	Tallo
<i>Thymus vulgaris.</i>	Tomillo	Hoja y rama
<i>Citrus paradasi.</i>	Toronja	Cáscara y bagazo
<i>Cymbopogon citratus.</i>	Zacate limón	Hoja

6.3 Obtención de los extractos

El material vegetal fue secado en una estufa a 45°C durante toda la noche (Guo *et al.*, 2004). Se pesaron 20 g y se colocaron en un vaso de licuadora agregando 100 ml de etanol al 96% y se trituraron. La mezcla se dejó macerar 24 h a temperatura ambiente. (Fig. 9). El extracto obtenido se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se colocó en platos de vidrio y se mantuvo a temperatura ambiente, hasta que se evaporó por completo el solvente. Una vez seco, el extracto se resuspendió a temperatura ambiente en agua destilada para los acuosos/etanólicos y en etanol para los extractos etanólicos/etanólicos. Los extractos se esterilizaron por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (poro de 0.45 μm), y posteriormente se colocaron en viales estériles color ámbar, y se mantuvieron a 4° C hasta su uso. Para determinar la concentración del extracto obtenido, se tomó 1 ml del mismo y se colocó en un vial, el cual se ajustó previamente a peso seco constante y se determinó el peso seco del extracto. La diferencia entre ambos pesos correspondió al peso seco del extracto (García *et al.*, 2005).



Fig. 9 .- Maceración y filtración de extractos de plantas.

6.4 Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana (prueba de pozo)

Para determinar el efecto sobre el crecimiento de las cepas de *Salmonella* utilizadas se utilizó el método de difusión en pozo en agar (García *et al.*, 2005). Éste consistió en sembrar por extensión 100 µl de la cepa ajustada a 1.5×10^8 UFC/ml en agar Mueller- Hinton. Posteriormente se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo Durham invertido (5 mm de diámetro). En dichos pozos se agregaron aproximadamente 100 µl de los extractos a probar; las placas se incubaron a 37° C por 24 h en aerobiosis.

Pasado el tiempo de incubación, se observó el efecto del extracto sobre el crecimiento microbiano mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo. Se midió el halo de inhibición. Como blanco se agregó a uno de los pozos el solvente (agua o etanol) con el que fueron resuspendidos los extractos.

6.5 Determinación de concentración mínima bactericida (CMB)

La determinación de la CMB se realizó a aquellos extractos que presentaron el mayor halo de inhibición (mayor a 1.5 cm de diámetro). Los ensayos para determinar la CMB se realizaron por el método de microdilución (Heredia *et al.*, 2005).

Los pozos fueron llenados con caldo Muller-Hinton y extracto a una determinada cantidad de acuerdo a los cálculos con el peso seco de cada extracto. El volumen se complementó con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 300 µl. Cada pozo se inoculó con 1% v/v (3µl) de la cepa ajustada a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml excepto el pozo del control negativo (caldo Mueller - Hinton + agua destilada de acuerdo a los cálculos), se adicionó a otro pozo únicamente solvente en vez de extracto. La placa fue incubada a 37 °C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se

realizó tomó una alícuota (20µl) de cada pozo y se inoculó sobre una placa de agar Mueller-Hilton por el método de Miles y Mishra (1932) posteriormente se incubaron a 37 °C por 24 h.

Una vez ubicado el rango de concentraciones en las que se produjo la inhibición, se colocaron concentraciones puntuales en los pozos de una microplaca y se prosiguió a la inoculación, incubación y siembra como se mencionó anteriormente (lo mismo se realizó con un control antimicrobiano comercial llamado Citrol K-Ultra, (Corpocitrik, S.A. de C.V.). Se estableció como Concentración Mínima Bactericida (CMB), la mínima concentración de extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano.

6.6 Determinación del efecto de las concentraciones subletales de los extractos activos sobre el crecimiento microbiano

Para poder determinar si diferentes concentraciones de los extractos afectaban la producción de los factores de virulencia mencionados anteriormente, se requirió determinar el efecto de concentraciones subletales sobre la viabilidad de *Salmonella*.

Para determinar esto, se inoculó una microplaca de 96 pozos con la cepa ajustada a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml y se añadieron diferentes concentraciones de extractos que correspondían al 25% y 50% de la CMB previamente determinada. Esto también se determinó con el control comercial Citrol K-Ultra.

Las placas fueron incubadas por 24hr a 37°C. Se realizó un recuento de células viables, empleando el método de Miles y Mishra en placas con agar Mueller Hinton. Éstas se incubaron a 37°C por 24h.

6.7 Efecto de extractos de plantas sobre la formación de biopelículas

La cuantificación de las biopelículas se realizó como describió Møretre *et al.*, 2003 con algunas modificaciones. La cepas de *Salmonella* fueron activadas en caldo soya triplicase (TSB) por 18 hrs aproximadamente. Posteriormente se transfirió una alícuota (1%) a un matraz con caldo TSB fresco, éstos nuevos cultivos se dejaron crecer hasta la fase media exponencial ($DO_{610nm}=0.2$, 1.5×10^8 UFC/ml). Posteriormente se colocaron 300 μ l a pozos de una microplaca, a los que también se agregaron diferentes concentraciones de los extractos correspondientes al 25 o 50% de la CMB, así como del control comercial. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48h sin agitación, al cabo de lo cual los cultivos fueron removidos y los pozos con las biopelículas formadas fueron lavados dos veces con agua destilada. Las biopelículas se tiñeron con 125 μ l de safranina al 1% durante 30 min. El exceso de colorante se removió lavando cada placa tres veces con agua. El colorante unido a la biopelícula se disolvió con 100 μ l de etanol al 96%, por último se determinó la densidad óptica a 450nm en un lector de ELISA (modelo 550 Bio-Rad Laboratories). Se realizaron 3 ensayos por duplicado independientes.

6.8 Inhibición del swarming

Para determinar si los extractos eran capaces de afectar el swarming de las cepas de *Salmonella*, se llevó a cabo el procedimiento descrito por Kim y Surette (2003) con algunas modificaciones. Se prepararon placas de Petri de 8.5cm de diámetro con 25 ml de agar Luria Bertani adicionado con glucosa (Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, Glucosa 0.5%, Agar nutritivo 0.6% [p/v]) y con los extractos a probar ajustados a una concentración correspondiente al 25 y 50% de CMB. Las placas se dejaron secar y posteriormente se colocaron en la incubadora de 37°C para su uso el día siguiente.

Las cepas de *Salmonella* se activaron por 18h en caldo Luria Bertani después se realizó una dilución 1: 100 en caldo LB fresco y se incubó 2h hasta alcanzar la fase media-exponencial ($DO_{610nm}=0.2$). Se inocularon 5 μ l de esta cepa en el centro de las placas Petri previamente preparadas y se dejaron incubar sin invertir a 37°C por 48h. Se midió la distancia de migración en centímetros, comparando con los controles de solvente y crecimiento.

6.9 Efecto de extractos de plantas sobre la actividad de AI-2

En este ensayo se empleó el método de Surette y Bassler, (1998).

- **Preparación de los cultivos libres de células**

Las cepas de *Salmonella* se activaron en caldo LB conteniendo 0.5% de glucosa y se incubó a 30°C por la noche. Pasado el tiempo se preparó una dilución 1:100 con la que se inoculó medio LB con glucosa fresco más los extractos correspondientes al 25 y 50% de CMB previamente determinada. Los cultivos fueron incubados 30°C por 4h. El cultivo libre de células se preparó removiendo las células del medio por centrifugación a 15,000 rpm durante 5 minutos en una micro centrifuga. Se recolectó el sobrenadante y filtró con membranas (0.2 μ m) y se almacenaron -20°C hasta su uso. Se utilizaron como control las cepas de *V. harveyi* BB120 (AI-1⁺ y AI-2⁺) y *V. harveyi* BB152 (AI-1⁻ y AI-2⁺). Ambas cepas se incubaron por la noche a 30°C con aireación en medio AB (autoinducer bioassay) preparado en el laboratorio. Los sobrenadantes libres de células de las cepas de *V. harveyi* se prepararon como se describió para *Salmonella*.

- **Ensayo para la producción de moléculas señal (AI-2)**

Los sobrenadantes del cultivo de *Salmonella* se analizaron para detectar la presencia en ellos de moléculas de autoinductores que puedan inducir bioluminiscencia en *V. harveyi* BB170 (capaz de detectar AI-2 pero no AI-1). Para este bioensayo, la cepa de *V. harveyi* BB170 se incubó a 30°C durante 16 h con aireación en medio AB, posteriormente se realizó una dilución 1:5,000 en el mismo medio fresco. Se agregaron 180µl de las células diluidas de *V. harveyi* BB170 a una microplaca de 96 pozos a la cual se le añadió 20 µl del sobrenadante de *Salmonella* tratada con extracto. Se utilizaron las cepas BB120 y BB152 de *V. harveyi* como controles positivos y medio AB estéril como control negativo. Las microplacas se incubaron a 30°C por aproximadamente 8 h. Por último se midió la bioluminiscencia usando un luminómetro (VICTOR X2 multilabel reader luminometer, Perkin Elmer). Las unidades relativas de luz se expresaron como el total de luminiscencia por cada 10^6 células de *V. harveyi* BB170 por pozo. Para comprobar que ésta última (cepa reportera) estuviera activa y corroborar que no fue afectada por los extractos, se sembraron alícuotas en agar Luria-marine (Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 2%, agar nutritivo 2%).

6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS ver 17.0. Se utilizó estadística descriptiva: media, desviación estándar y ANOVA. Se realizó una prueba de comparación de las medias de Tukey para evaluar las diferencias entre los valores promedio obtenidos del porcentaje de la inhibición de la formación de biopelícula, swarming y QS.

7. RESULTADOS

7.1 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

En la presente investigación se estudiaron un total de 35 plantas, utilizando diferentes partes de éstas, con las cuales se prepararon un total de 60 extractos (metanólicos, etanólicos y acuosos) (Fig. 10). Dichos extractos se analizaron contra *S. Typhi* ATCC 19430 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 para determinar la susceptibilidad antimicrobiana, encontrando 16 de ellos con actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

Los halos de inhibición de los extractos que mostraron actividad antimicrobiana presentaron entre 1.1 a 3.3 cm de diámetro, que correspondieron a extractos metanólicos y etanólicos, siendo los metanólicos los de mayor actividad y los acuosos los de menor actividad (Tabla 2).

Los criterios de selección que se emplearon para la determinación de los extractos a utilizar en los siguientes ensayos fueron: extractos que resultaron con un halo de inhibición mayor a 1.5 cm de diámetro, cuya extracción fuera de naturaleza no tóxica para el consumo humano (acuoso o etanólico) y que se pudiera obtener una cantidad significativa de compuestos activos en el solvente; este fue el caso de la extracción etanólica, con solvente acuoso y/o etanólico.

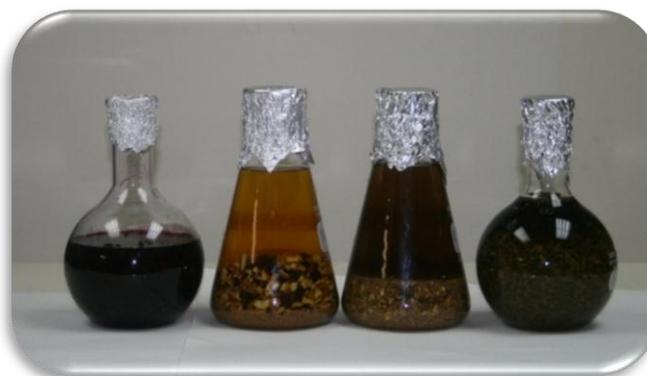


Fig. 10.- Maceración de extractos en etanol.

Tabla 2. Halos de inhibición del crecimiento de *S. Typhi* ATCC 19430 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 por efecto de extractos de plantas.

PLANTA	Porción utilizada	SOLVENTE	RESUSP.	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
Árnica	Hojas	Etanol	Etanol	NI	NI
Ajonjolí	Semilla	Metanol	Agua	NI	NI
Anís	Semilla	Metanol	Agua	NI	NI
Camote	Fruto	Metanol	Agua	NI	NI
Canela	Corteza	Metanol	Agua	NI	NI
		Etanol	Etanol	NI	NI
Cebolla	Fruto	Etanol	Etanol	NI	NI
		Etanol	Agua	Reducc	Reducc
Ciruela	Fruto	Metanol	Agua	NI	NI
		Etanol	Etanol	NI	NI
Clavo	Corteza	Metanol	Agua	NI	NI
Comino	Hoja	Etanol	Etanol	NI	NI
Cuachalalate	Tallo	Metanol	Agua	NI	NI

PLANTA	Porción utilizada	SOLVENTE	RESUSP.	S. Typhi ATCC 19430	S. Typhimurium ATCC 14028
Granada	Cáscara	Metanol	Agua	1.5± 0.1	1.5± 0.2
Granada	Semilla	Metanol	Agua	Reducc	Reducc
		Etanol	Etanol	NI	NI
Jamaica	Flor	Metanol	Agua	2.9± 0.22	2.9± 0.18
		Etanol	Etanol	2.5± 0.15	2.8± 0.2
		Etanol	Agua	2.3± 0.25	2.4± 0.3
Jícama	Fruto	Metanol	Agua	NI	NI
Lima	cáscara	Etanol	Etanol	NI	NI
Limón	Cáscara y bagazo	Metanol	Agua	1.9± 0.09	1.9± 0.1
		Etanol	Etanol	1.9± 0.12	1.5± 0.09
		Etanol	Agua	1.85± 0.2	2.0± 0.23
Mandarina	cáscara	Etanol	Etanol	NI	NI
Mejorana	hojas	Etanol	Etanol	1.3± 0.1	1.1± 0.1
		Etanol	Agua	1.3± 0.08	NI
Menta	Hoja	Etanol	Etanol	NI	NI
Naranja	Cáscara y bagazo	Metanol	Agua	2.9± 0.25	3.3± 0.2
		Etanol	Etanol	1.9± 0.15	1.4± 0.23
		Etanol	Agua	Reducc	Reducc
Nogal	Corteza	Metanol	Agua	1.9± 0.09	1.9± 0.1
Nuez	Cáscara	Etanol	Etanol	NI	NI
Orégano	Hojas	Etanol	Etanol	1.9± 0.1	1.7± 0.06
		Etanol	Agua	NI	NI
Palo de Brasil	Tallo	Metanol	Agua	Reducc	Reducc
Palo de Campeche	Tallo	Metanol	Agua	NI	NI
Pimienta negra	Semilla	Metanol	Agua	NI	NI

PLANTA	Porción utilizada	SOLVENTE	RESUSP.	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
Pimienta gorda	Semilla	Etanol	Etanol	NI	NI
Piña	Fruto	Etanol Etanol	Etanol Agua	Reducc Reducc	Reducc Reducc
Piña	Cáscara	Etanol Etanol	Etanol Agua	NI Reducc	NI Reducc
Romero	Hoja y rama	Metanol Etanol Etanol	Agua Etanol Agua	NI 1.5± 0.1 NI	NI 1.5± 0.1 NI
Sidra	Pulpa	Metanol	Agua	1.3± 0.22	1.3± 0.2
Sidra	Cáscara y bagazo	Etanol	Etanol	1.3	1.1
Tamarindo	Pulpa	Metanol Etanol Etanol	Agua Etanol Agua	Reducc 2.2± 0.2 2.0± 0.16	Reducc 2.0± 0.21 1.8± 0.2
Té negro	Hoja	Metanol	Agua	NI	NI
Té verde	Hoja	Etanol Etanol	Etanol Agua	NI NI	NI NI
Tepezcohuite	Tallo	Metanol	Agua	NI	NI
Tomillo	Hoja y rama	Metanol Etanol Etanol	Agua Etanol Agua	NI Reducc 1.3± 0.2	NI Reducc NI

PLANTA	Porción utilizada	SOLVENTE	RESUSP.	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
Toronja	Cáscara y bagazo	Metanol	Agua	Reducc	Reducc
Zacate limón	Hoja	Etanol	Etanol	NI	NI

NI: no inhibición

Reducc: reducción del crecimiento.

Resultados \pm Desviación estándar

La desviación estándar fue obtenida del promedio de 3 repeticiones.

Los extractos que se eligieron para continuar con los ensayos posteriores correspondieron a *Citrus limon* (cáscara de limón), *Hibiscus sabdariffa* (flor de Jamaica), *Tamarindus indica* (pulpa de tamarindo) y *Lippia graveolens* (orégano) (Tabla 4, figura 11).

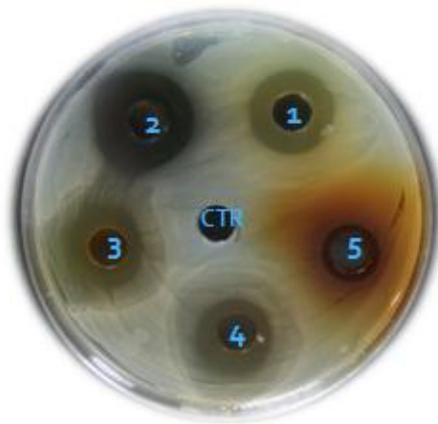
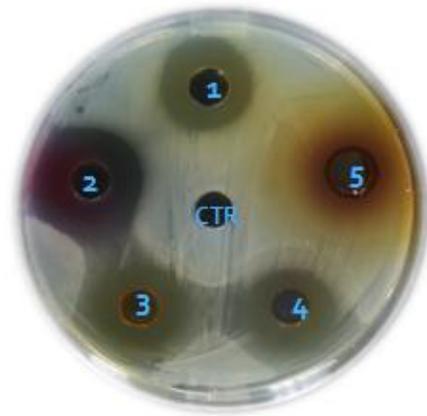
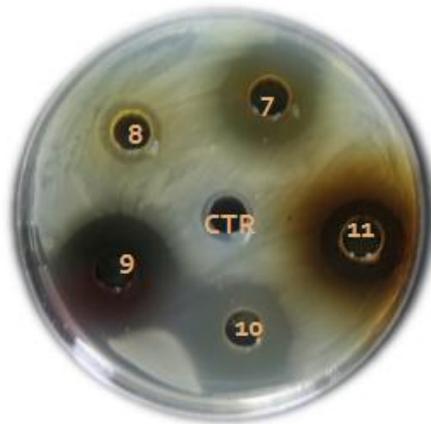
*S. Typhi**S. Typhimurium**S. Typhi**S. Typhimurium*

Fig. 11. Halos de inhibición del crecimiento de diferentes extractos contra dos variedades de *Salmonella*. Extractos acuosos: 1. Limón, 2. Jamaica, 3. y 4. tamarindo, 5. orégano. Extractos etanólicos: 7.limón, 8.naranja, 9.jamaica, 10. tamarindo, 11. orégano.

7.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) sobre el crecimiento de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*.

Se determinó la CMB de los extractos de limón (acuoso), jamaica (acuoso) tamarindo (etanólico) y orégano (etanólico) de acuerdo al criterio de selección antes mencionado. Los resultados se encuentran en la Tabla 3, en donde se observó que la CMB varió entre 0.3 y 7.4 mg/ml en ambas cepas. Se realizó también la CMB del producto (Citrol-K Ultra), utilizado como control positivo de actividad antimicrobiana (0.02 ± 0.1 mg/ml).

Tabla 3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) (mg/ml) de los extractos seleccionados. El ensayo se realizó a 24 h de incubación a 37°C.

PLANTA	EXTRAC- CION	RESUSPEN- CION	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
Cáscara de Limón	Etanol	Agua	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Flor de Jamaica	Etanol	Agua	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2
Pulpa de Tamarindo	Etanol	Etanol	7.4 ± 0.2	7.2 ± 0.3
Orégano	Etanol	Etanol	0.3 ± 0.07	0.3 ± 0.08
Citrol K ultra			0.02 ± 0.4	0.03 ± 0.3

± : Desviación estándar.

7.3 Determinación del efecto de concentraciones subletales de los extractos de plantas sobre el crecimiento de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*.

Se analizó el efecto de las concentraciones subinhibitorias, partiendo de la CMB de los 4 extractos y el Citrol K Ultra, sobre la viabilidad de las dos cepas de *Salmonella* (*S. Typhi* ATCC 19430 y *S. Typhimurium* ATCC 14028), encontrando que no se presentó diferencia significativa sobre el crecimiento bacteriano ($P \leq 0.01$) al agregar los extractos a concentraciones equivalentes al 50 y 25% de la CMB previamente encontrada (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de extractos de plantas sobre el crecimiento de *Salmonella*. El ensayo se realizó a 24 h. de incubación a 37°C.

Extracto	Concentraciones subinhibitorias de extractos en mg/ml (equivalentes a % de la CMB encontrada)					
	100%	50%	25%	100%	50%	25%
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430			<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028		
<i>Citrus limon</i>	3.9 ± 0.1*	1.95	0.98	3.9 ± 0.1*	1.95	0.98
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	2.3 ± 0.2*	1.15	0.58	2.3 ± 0.2*	1.15	0.58
<i>Tamarindus indica</i>	7.4 ± 0.2*	3.7	1.85	7.2 ± 0.3*	3.60	1.80
<i>Lippia graveolens</i>	0.3 ± 0.07*	0.15	0.075	0.3 ± 0.08*	1.15	0.58
Citrol K ultra	0.02 ± 0.4*	0.01	0.005	0.03 ± 0.3*	0.015	0.008

*± : Desviación estándar

Para realizar las determinaciones de formación de biopelículas, swarming e inhibición de la actividad de AI-2) los extractos se agregaron en la fase media exponencial (densidad óptica de 0.2 a 610 nm), que correspondía a una concentración bacteriana de 1.5×10^8 UFC/ml.

7.4 Efecto de los extractos de plantas seleccionados sobre la formación de biopelícula de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*.

Se analizó el efecto de concentraciones menores a la CMB encontradas (subletales, correspondientes al 25 y 50% de la CMB) de los extractos de *C. limon*, *H. sabdariffa*, *T. indica* y *L. graveolens*, sobre la formación de biopelícula de las dos cepas de *Salmonella* medida a 48 h de incubación. Como se esperaba, no se observó formación de biopelícula al utilizar el 100% de la CMB de los extractos, debido a la ausencia de células viables, mientras que en los controles de solvente (cepa más solvente pero sin extracto) la formación de biopelícula no se afectó, por lo que se determinó que entre ambos había diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

La formación de biopelículas de las cepas analizadas fue afectada significativamente ($P \leq 0.05$) al agregar los cuatro extractos analizados a una concentración equivalente al 50% de CMB, observándose más del 50% de inhibición, excepto el extracto de *C. limon* para *S. Typhimurium* cuya inhibición fue menor, (25.57%). Cuando la concentración de extracto agregado equivalió al 25% de la CMB, se observó una inhibición de la formación de biopelículas de alrededor de 20%.

El extracto (agregado al equivalente del 50% de la CMB) más efectivo para la inhibición de biopelícula de *S. Typhi* fue *H. sabdariffa* (59.20%), seguido de *C. limon* (49.51%), *T. indica* (49.26%) y *L. graveolens* (46.53%). La inhibición de biopelícula observada para la cepa de *S. Typhimurium* fue muy parecida a obtenida en *S. Typhi*. Al agregar el equivalente al 50% de la CMB, el extracto de *H. sabdariffa* mostró la mayor

inhibición (52.92%) seguido de *T. indica* (52.38%), posteriormente *L. graveolens* (49.60%) y en último lugar *C. limon* (25.57%). El Citrol K-Ultra (antimicrobiano comercial) fue significativamente efectivo ($P \leq 0.05$) en la inhibición de la formación de biopelícula en las dos cepas, mostrando incluso mayor inhibición que los extractos naturales (Fig. 18).

El efecto de los extractos en la formación de biopelículas sobre ambas cepas de *Salmonella* se resume en la figura 18 a y b se muestra la imagen de los ensayos en la figura 13.

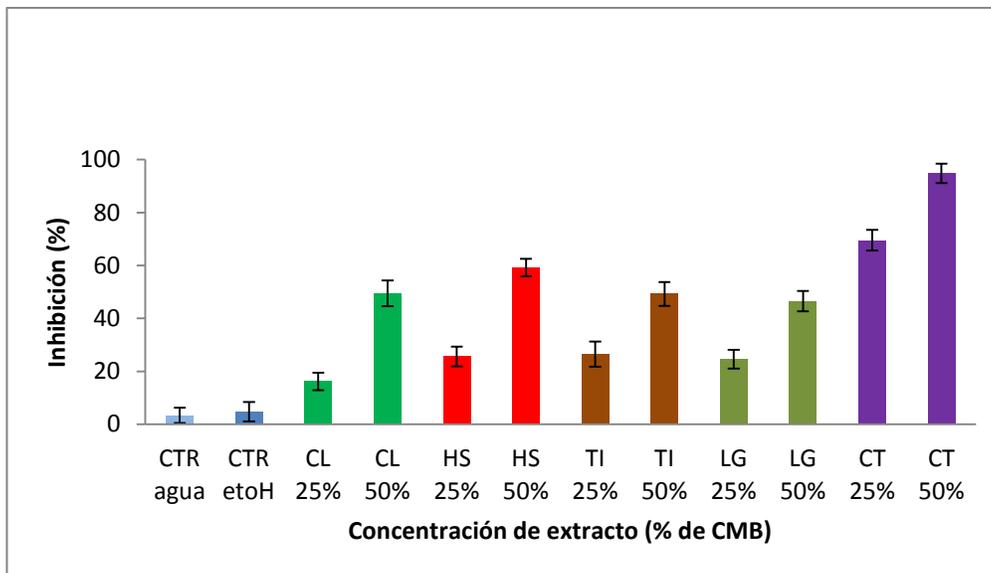
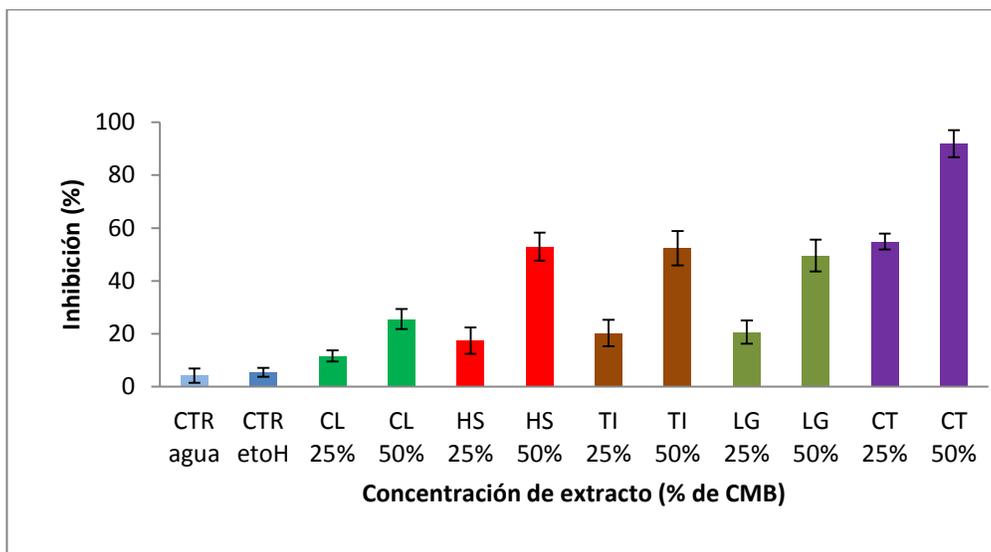
a) *S. Typhi*b) *S. Typhimurium*

Fig. 12.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de plantas sobre la formación de biopelículas de a) *S. Typhi* y b) *S. Typhimurium*. CTR agua, (bacteria más agua destilada), CTR etoH (bacteria y etanol), CL (*Citrus limon*), HS (*Hibiscus sabdariffa*), TI (*Tamarindus indica*), LG (*Lippia graveolens*), CT (*Citrol K-Ultra*). Los datos se presentan con \pm desviación estándar.

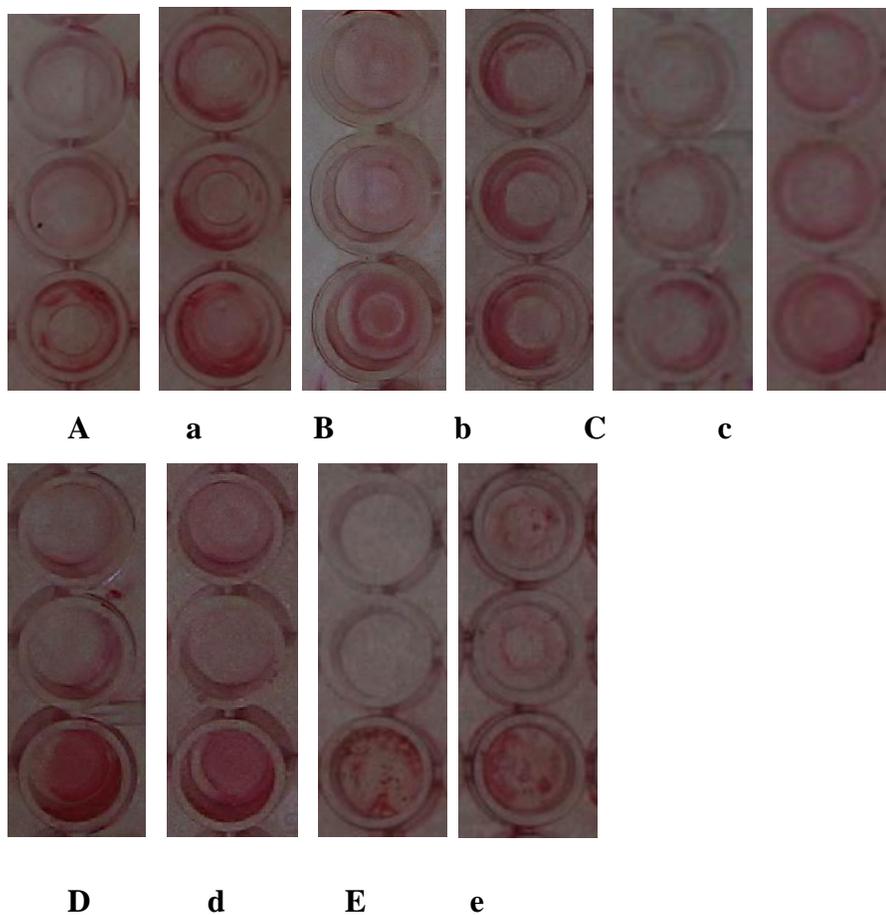


Fig. 13.- Ensayo de reducción de *S. Typhimurium* con extractos a la concentración de 50% y 25% de CMB. Los dos primeros pocillos en la columna corresponden al tratamiento y el tercer pocillo al control de bacteria sin solvente. **A:** limón 50%; **a.** limón 25% ; **B.** jamaica 50% ; **b.** jamaica 25% ; **C.** tamarindo 50%, **c.** tamarindo 25% ; **D.** orégano 50% ; **d.** orégano 25% ; **E.** citrol K Ultra 50% ; **e.** citrol K Ultra 25%.

7.5 Efecto de los extractos de plantas seleccionados sobre la movilidad tipo swarming de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*.

Para evaluar el efecto de los extractos de plantas sobre el movimiento tipo swarming de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, cada bacteria fue inoculada, en el centro de placas de agar LBG adicionado con extractos de plantas a concentraciones correspondientes al 25 y 50% de CMB, así como el Citrol K-Ultra.

Se presentó una reducción de la movilidad tipo swarming que fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos con extractos y sus respectivos controles bacteria con solvente, sin extracto y bacteria sin solvente, sin extracto). Los cuatro extractos inhibieron significativamente la migración del swarming (a 24h de incubación) de las dos cepas de *Salmonella* de manera dosis dependiente, siendo mayor la inhibición con los extractos que se agregaron a una concentración equivalente al 50% de CMB, la cual se observó entre 81% y 95%. El Citrol K Ultra mostró una reducción del swarming muy semejante a la observada con los extractos, siendo estadística e igualmente significativa.

Cuando los extractos se agregaron a una concentración equivalente al 50% de la CMB y se inoculó con *S. Typhi*, el porcentaje de reducción de este tipo de movilidad fue del 94.31% para *C. limon*, seguido de *L. graveolens* (93.60%), *H. sabdariffa* (93.46%) y *T. indica* (89.81%). En comparación, la reducción observada para *S. Typhimurium* fue mayor para *C. limon* (94.66 %), seguido por *H. sabdariffa* (94.06%), *L. graveolens* (93.18%) y *T. indica* (81.03 %) al agregar el equivalente al 50% de la CMB. El control comercial (Citrol K-Ultra) para *S. Typhi* y *S. Typhimurium* mostró una reducción de 94.78% y 90.30% respectivamente (Fig. 14 a y b) las imágenes de los ensayos se muestran en las figuras 15 y 16.

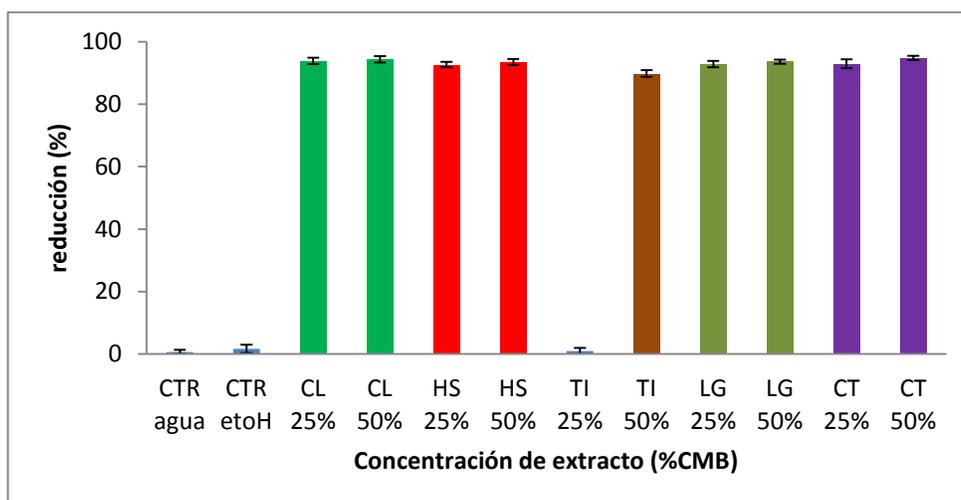
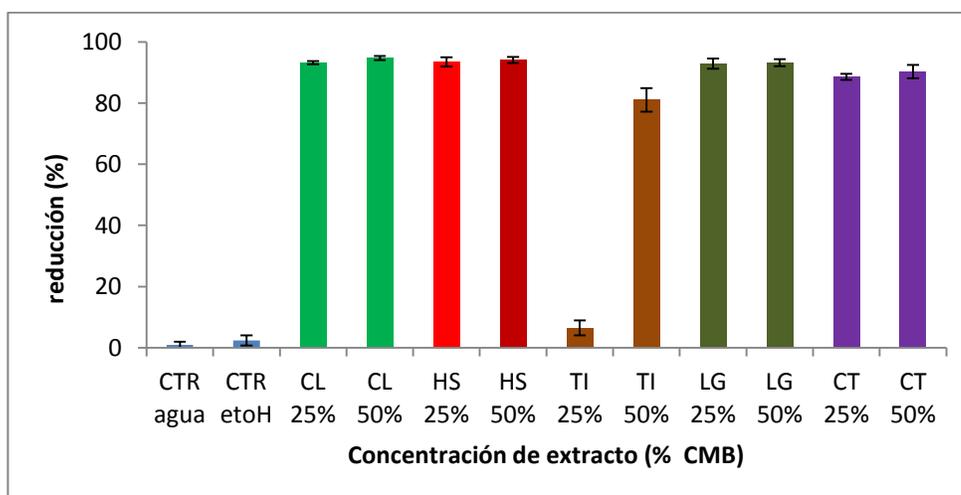
a) *S. Typhi*b) *S. Typhimurium*

Figura 14. Porcentaje de reducción de la movilidad tipo swarming de a) *S. Typhi* y b) *S. Typhimurium* por efecto de extractos de plantas. CTR agua (bacteria más agua destilada), CTR etoH (bacteria más etanol), CL (*Citrus limon*), HS (*Hibiscus sabdariffa*), TI (*Tamarindus indica*), LG (*Lippia graveolens*), CT (*Citrol K-Ultra*). Los datos se presentan con \pm desviación estándar.

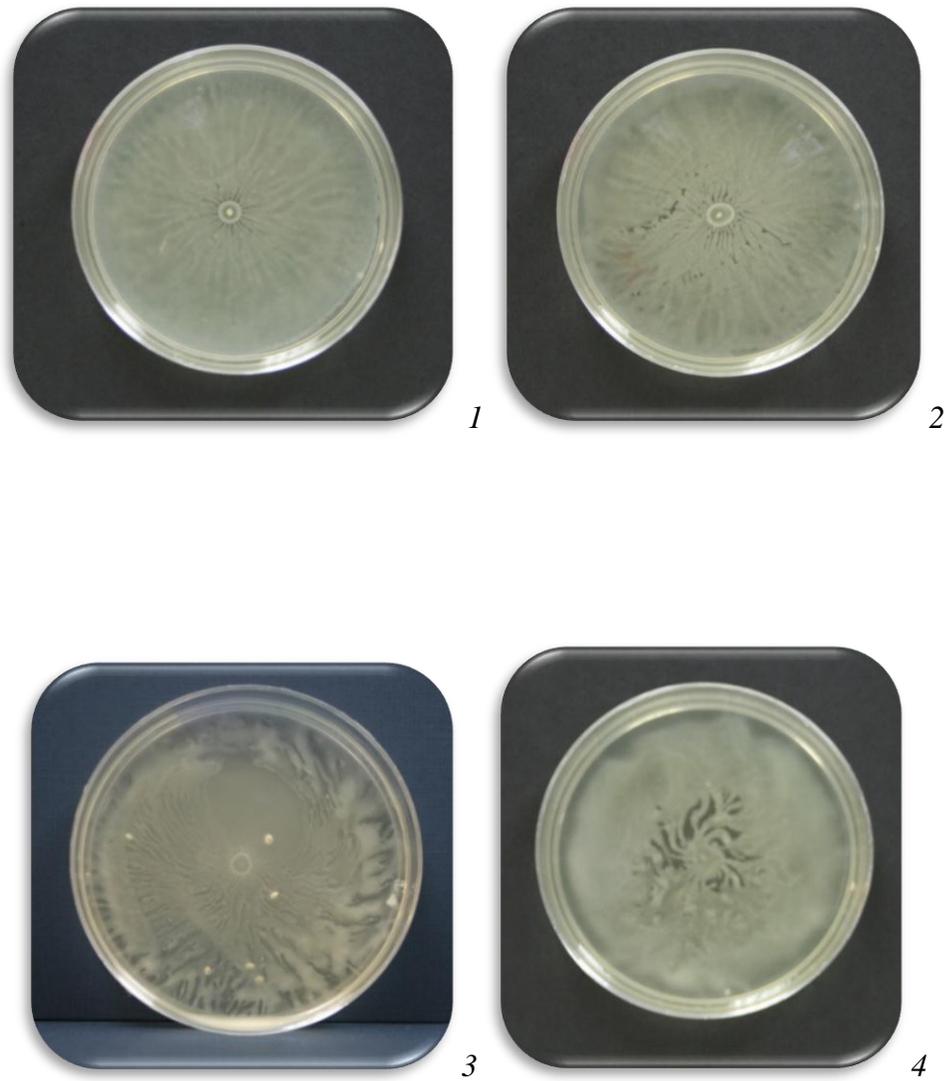


Fig. 15.- Controles de crecimiento del swarming sin extracto 1. Control *S. Typhi* sin extracto y sin solvente. 2. Control *S. Typhi* con etanol sin extracto. 3. Control *S. Typhimurium* sin extracto y sin solvente. 4. Control *S. Typhimurium* con etanol sin extracto.

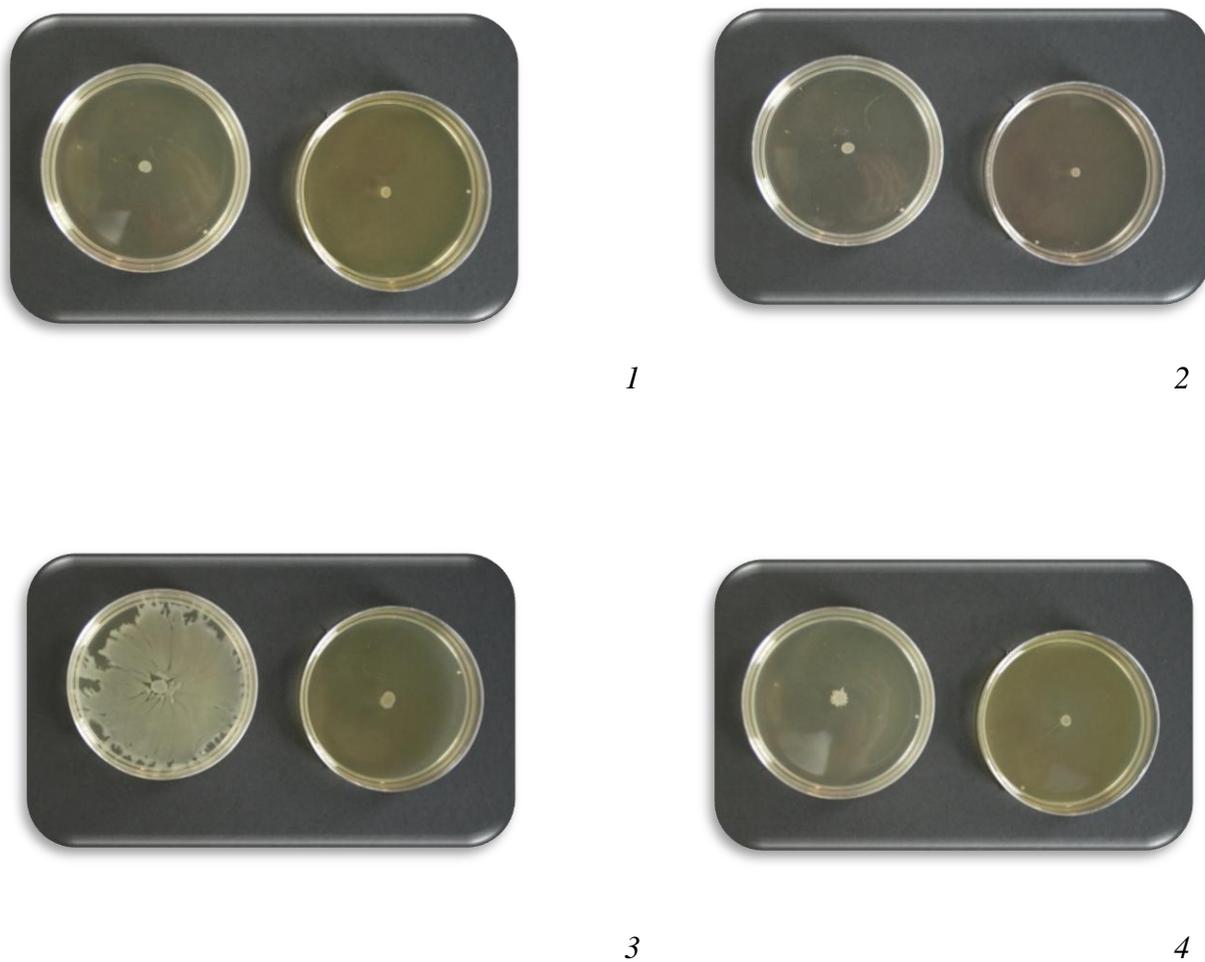
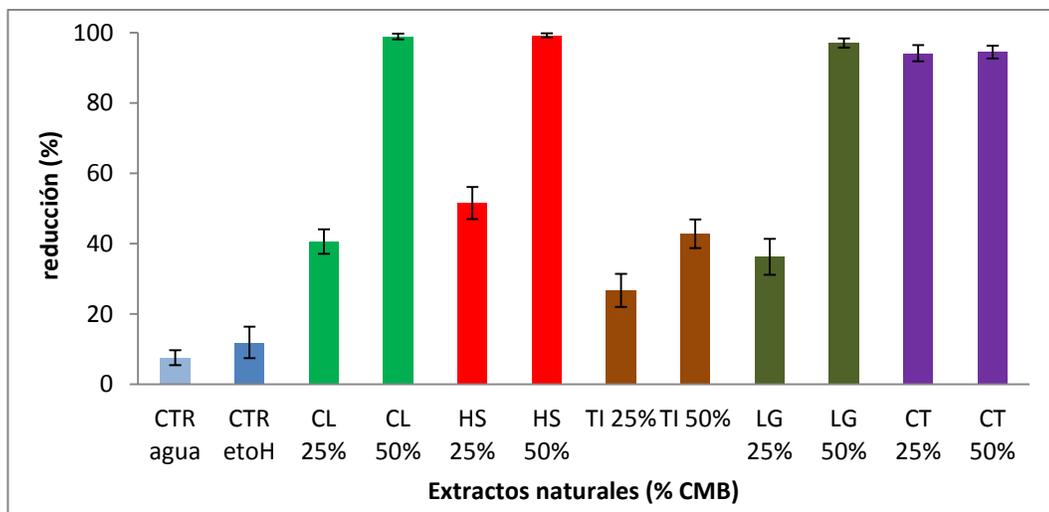


Fig. 16.- Ensayo de reducción de la movilidad tipo swarming de *S. Typhi* con extractos de plantas. (1) 25 y 50% de CMB de extracto de limón, (2) 25 y 50% de CMB de extracto de Jamaica, (3) 25 y 50% de CMB de extracto de tamarindo, (4) 25 y 50% de CMB de extracto de orégano.

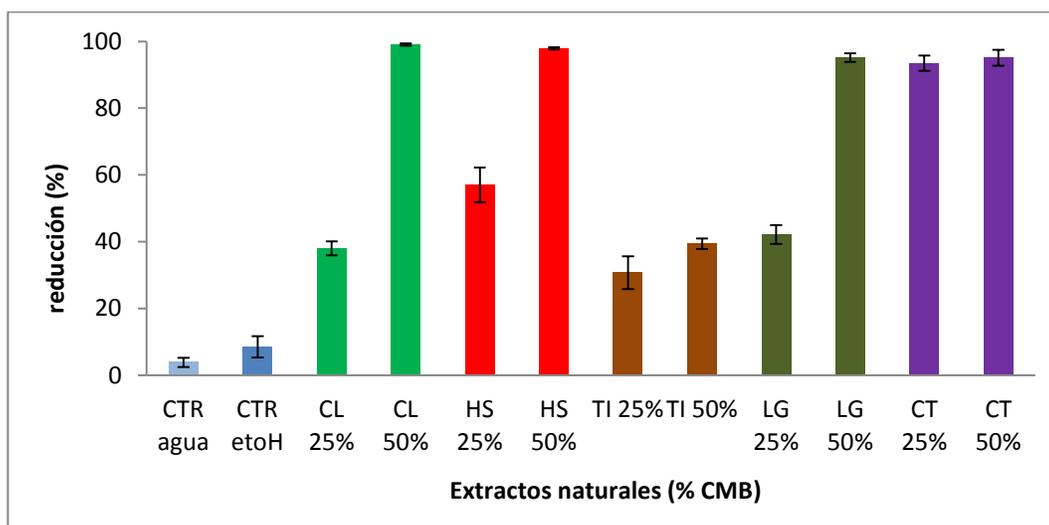
7.6 Efecto de los extractos de plantas sobre la actividad de AI-2 de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*.

Diferentes concentraciones de los extractos de plantas (equivalentes al 25 y 50% de la CMB) fueron examinados para evaluar su efecto en la actividad de las moléculas autoinducidas AI-2 de las dos cepas de *Salmonella* utilizando a *V. harveyi* BB170 como cepa reportera y las cepas de *V. harveyi* BB120 y BB152 como controles positivos (productores del AI-2) (fig. 19). Se presentó inhibición estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos con extractos y sus respectivos controles (bacteria con solvente, sin extracto). Los controles no presentaron diferencia significativa entre sí ($p > 0.05$).

Los extractos de plantas mostraron una reducción del autoinductor dependiente de la concentración de extracto agregado, siendo del 26.73 al 51.56% para *S. Typhi* y del 30.78 a 57.05% de *S. Typhimurium* al agregar el equivalente al 25% de la CMB. Cuando el extracto agregado equivalía al 50% de CMB, la reducción mostrada fue del 39% al 99% en ambas cepas (Fig. 17). Los extractos de *C. limon*, *H. sabdariffa* y *L. graveolens* fueron los más efectivos para *S. Typhi* y *S. Typhimurium* inhibiendo casi por completo la actividad de los AI-2 con porcentajes mayores del 95% de reducción. Éstos últimos tuvieron mejores resultados que el Citrol K-Ultra.



a) *S. Typhi*



b) *S. Typhimurium*

Fig. 17.- Reducción de la actividad de AI-2 en a) *S. Typhi* y b) *S. Typhimurium* por efecto de la adición de extractos de plantas. CTR agua (bacteria más agua destilada), CTR etoH (bacteria más etanol), CL (*Citrus limon*), HS (*Hibiscus sabdariffa*), TI (*Tamarindus indica*), LG (*Lippia graveolens*), CT (*Citrol K-Ultra*). Los datos se presentan con \pm desviación estándar.

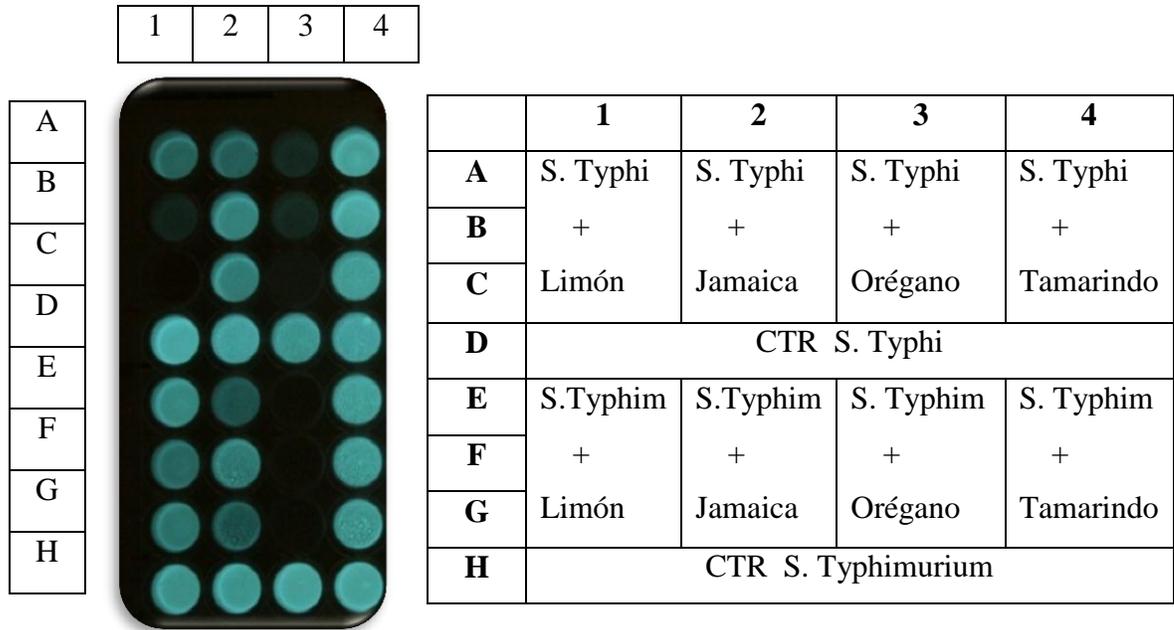


Fig. 18.- Ensayo de reducción de los AI-2 de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* con el 50% de la CMB de cada extracto y sus respectivos controles de cultivos libres de células (autoinductores de *Salmonella* sin extracto + cepa reportera).

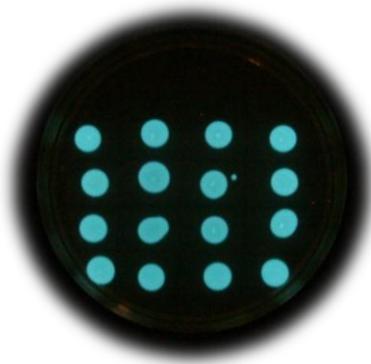


Fig. 19.- Bioluminiscencia de *V. harveyi* BB170. Ensayo para verificar la viabilidad de dicha cepa reportera con los extractos, primera columna limón, segunda jamaica, tercera orégano, cuarta tamarindo.

8. DISCUSIÓN

En nuestros días los patógenos resistentes a antibióticos representan una gran amenaza para la salud humana, por lo tanto se han buscado alternativas naturales, para inhibir las infecciones microbianas. Por esta razón se ha encontrado que en muchas ocasiones la producción de factores de virulencia, depende de un fenómeno llamado Quorum Sensing (QS), estableciéndose como un blanco o punto de ataque muy importante para combatir eficazmente la virulencia bacteriana. Debido a dicho hallazgo se han reportado que algunos extractos de plantas son capaces de inhibir o antagonizar las moléculas involucradas en el QS, eliminando o reduciendo como consecuencia, la patogénesis bacteriana.

En el presente estudio, se examinaron cuatro extractos de plantas, *C. limon*, *H. sabdariffa*, *T. indica* y *L. graveolens* para determinar si poseen actividad contra QS de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Se ha establecido claramente que la virulencia de *Salmonella* se debe en primera instancia a su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y posteriormente otros procesos toman parte tal como la invasión a las células del huésped, segregación de toxinas y factores de virulencia como la formación de biopelículas. Debido a esto, en este trabajo también investigamos la capacidad de estos extractos de plantas para interferir con otros factores de virulencia, tales como movilidad tipo swarming, y la formación de biopelículas. Además investigamos la capacidad de los extractos para inhibir la expresión de los autoinductores AI-2 de *Salmonella*.

Nuestro trabajo evidenció la susceptibilidad de *S. Typhi* ATCC 19430 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 a los extractos de plantas (acuosos y etanólicos).

Se analizaron 35 plantas entre ellas hierbas, frutas y vegetales, para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de cepas de *Salmonella*. De ellas, se seleccionaron cuatro que mostraron la mayor capacidad inhibitoria y cuyo solvente de extracción fuera

etanol ya que el metanol, aunque es un muy buen solvente de extracción, es muy tóxico y al utilizar estos extractos pudieran quedar trazas del solvente. Estudios previos han demostrado que la extracción etanólica ofrece un buen sistema de obtención de compuestos polifenólicos. Además, también se ha reportado que este solvente (etanol) es fácil de penetrar en las membranas celulares para extraer los ingredientes extracelulares del material vegetal (Wang, 2010) y por consiguiente los compuestos aromáticos u orgánicos saturados (como taninos, polifenoles, poliacetilenos, flavonoles, esteroles y alcaloides) (Cowan, 1999). Nuestros resultados mostraron que los extractos de *C. limon*, *H. sabdariffa*, *T. indica*, *L. graveolens* y el antimicrobiano comercial Citrol K Ultra fueron capaces de inhibir el crecimiento de las ambas cepas de *Salmonella*.

Citrus limon es una planta nativa de Asia, una importante planta medicinal de la familia Rutanaceae, es rica en ácido cítrico que le da un pH de 2 a 3 (Verma *et al.*, 2012). Es cultivada principalmente por sus alcaloides, quienes tienen actividad anticáncer y potencial antibacteriano, en extractos crudos de diferentes partes (hojas, tallos y flores). Se ha reportado al limón efectivo contra bacterias de significado clínico (Kawaii *et al.*, 2000).

En un estudio se expuso la actividad antibacterial del extracto etanólico de las hojas de *C. limon* contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*. Mediante el método de difusión en agar se encontró que *E. coli* fue la más susceptible a una concentración de 200 mg/ml mientras que *S. Typhimurium* fue la bacteria más resistente entre los microorganismos probados (Pandey *et al.*, 2011).

Los resultados de nuestros estudios concuerdan con los reportados sobre la efectividad antibacterial de extractos acuosos, etanólicos y aceites esenciales de *C. limon* y cítricos contra especies de *Salmonella* (Javed *et al.*, 2011; Dhanavade *et al.*, 2011). En la presente investigación el extracto acuoso de *C. limon* (limón) obtuvo una CMB de 3.9 mg/ml, lo cual concuerda con lo reportado por Escobar *et al.*, (2010) quienes reportaron una CMB de 3 mg/ml con extracto etanólico contra *E. coli* O157:H7. Sin embargo, en este trabajo encontramos concentraciones menores a aquellas reportadas

por Valtierra-Rodriguez *et al* (2010) quienes encontraron una CMB de 8 mg/ml para *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Estas variaciones pudieran ser debidas a diferencias en la composición química de los extractos, que dependen de varios parámetros como condiciones ambientales, periodo de recolección, procedimiento de deshidratación, almacenamiento y métodos de aislamiento. De acuerdo con lo reportado en los últimos años, la actividad antibacteriana de *C. limon* se le puede atribuir a la presencia de flavonoides (Burt, 2004; Ortuno *et al.*, 2006; Duthie and Crozier, 2000).

La cáscara de frutas cítricas es una fuente rica en glucósidos flavonoides, cumarinas, β y γ -sitosterol y aceites volátiles según Pandey *et al.*, (2010). Los flavonoides de cítricos tienen un gran espectro de actividad biológica incluyendo antibacterial, antifúngica, anticáncer y antiviral (Burt, 2004; Ortuno *et al.*, 2006). Duthie y Crozier en 2000, reportaron que la búsqueda preliminar de los fitoquímicos del extracto de *C. limon*, reveló la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides y glucósidos. La presencia de flavonoides, taninos y alcaloides pudieran ser los responsables de la actividad contra las bacterias patógenas analizadas en este trabajo. Los flavonoides pueden funcionar directamente como antioxidantes y eliminadores de radicales libres, además tienen la capacidad de modular actividades enzimáticas e inhibir la proliferación celular. Los taninos presentes en el extracto pudieran poseer actividad de unión a proteínas y por lo tanto pudieran interferir con muchas sustancias (Duthie and Crozier, 2000).

H. sabdariffa comúnmente llamada Jamaica, se conoce por sus propiedades gastronómicas y por sus propiedades medicinales. Las hojas y tallos ya sean crudos o cocidos son utilizados en ensaladas, como hierbas sazonadoras en salsas tipo “curries” ya que esta planta tiene un sabor ácido. El cáliz fresco es consumido crudo en ensaladas, es cocinado y utilizado como saborizante en pasteles etc., y empleado además en la elaboración de gelatinas, sopas, salsas y en encurtidos, pudines etc. Es también utilizada para agregar color a tés herbales (Mungole *et al.*, 2011).

Los extractos de *H. sabdariffa* han sido investigados como agentes antimicrobianos por lo menos por 40 años. Las primeras investigaciones fueron realizadas por Sharaf *et al.* (1966), quienes encontraron que los extractos acuosos de Jamaica evitaron el crecimiento de *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Streptococcus*. Hace algunos años se estudió el efecto de extractos acuosos contra el crecimiento de *P. aeruginosa*, *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., y *Corynebacterium* sp., (Oboh *et al.*, 2004). Se ha encontrado que los extractos acuosos-metanólicos de los cálices de jamaica tienen actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marscences*, *Clostridium sporogenes*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas fluorescense* (Olaleye, 2007).

Los resultados de nuestra investigación demostraron concordancia con reportados anteriormente (Sharaf *et al.*, 1966, Oboh *et al.*, 2004; Olaleye, 2007; Mungole *et al.*, 2011; Nwaiwy *et al.*, 2012 y Zhang *et al.*, 2011).

Mungole *et al.*, (2011) demostraron la actividad antimicrobiana de las hojas, tallos y raíces de Jamaica encontrando que la mayor zona de inhibición fue con los extractos acetónicos de las hojas contra *Proteus vulgaris* (18.1mm), seguido del extracto acuoso de las raíces contra *S. aureus* (18mm) y *E.coli* (17.1mm). Los extractos (realizados en éter de petróleo, cloroformo, acetona, etanol y acuoso) de las hojas, tallos y raíces no mostraron actividad contra *Pseudomonas*, *Salmonella* sp, *Rhodococci* y *Bacillus* sp. Nuestros resultados difieren con dicha investigación, ya que en el presente estudio encontramos que si inhibía el crecimiento contra *S. Typhi* (2.27 mm) y *S. Typhimurium* (2.37 mm). Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los reportados en el estudio de Nwaiwy *et al* (2012), en donde el extracto acuoso de dicha planta mostró efectividad contra *Salmonella*, *Shigella* y *Enterobacter* a 0.2 mg/ml con halos de inhibición de 10 mm para *Salmonella* con el método de difusión en agar.

En otro estudio el extracto etanólico de las hojas de jamaica exhibió a concentración de 40 mg/ml eliminó completamente a *E. coli*, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* después de 24 horas (Zhang *et al.*, 2011). En nuestro trabajo,

encontramos como CMB a 2.3 mg/ml para ambas cepas de *Salmonella*, concentración menor que las previamente reportadas.

Se han aislado 3 polisacáridos solubles en agua de las flores de jamaica polisacáridos neutrales compuestos de arabinanos y arabinogalactanos. Los cálices son ricos en ácido cítrico y pectina (Muller y Franz, 1992). Zhang *et al* (2011) reportaron alto contenido en flavonoides y ácidos fenólicos presentes en el extracto de dicha planta, también mencionaron que la actividad antibacteriana pudiera ser atribuida a la presencia de dichos compuestos sin embargo deberá tomarse en cuenta los demás compuestos presentes en la planta, ya que pudieran exhibir efectos sinérgicos, además del pH.

Cowan (1999) mencionó que la actividad antimicrobiana debida a flavonoides pudiera ser causada por su estructura, ya que estos tienen la habilidad de formar complejos con las paredes bacterianas. El mecanismo de acción puede ser por medio de la inhibición de varios procesos celulares, seguido del incremento de la permeabilidad y finalmente la pérdida de iones de las células bacterianas. Estos procesos incluyen la inhibición del transporte de electrones, translocación de proteínas, fosforilación, y otras reacciones enzimáticas. Este autor ha sugerido que la acción antimicrobiana pudiera ser atribuida a propiedades intrínsecas relacionadas con la permeabilidad de la superficie celular.

El tamarindo (*T. indica L*) se ha utilizado por cientos de años como planta medicinal, sus frutos son la parte más valiosa, los cuales han sido repetidamente reportados como curativos en gran cantidad de farmacopeas. Las plantas producen una buena cantidad de metabolitos secundarios, los cuales han beneficiado a la humanidad en varias formas, incluyendo el tratamiento de enfermedades (Souza-Fagundes *et al.*, 2002). El tamarindo pertenece las dicotiledonias, familia Leguminosae y subfamilia Caesalpiniaceae (Khanzada *et al.*, 2008). En la presente investigación se demostró la efectividad del extracto etanólico de la pulpa del fruto contra *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Nuestros resultados concuerdan con los estudios de Daniyan y Muhammad (2008), y Gumgumjee *et al* (2012), al demostrar que los extractos etanólicos producen fuerte actividad antibacterial. Esto pudiera deberse a que la mayoría de los

compuestos activos identificados son aromáticos u orgánicos saturados y estos son obtenidos con mayor frecuencia a través de la extracción con etanol o metanol (Cowan, 1999).

Gumgumjee *et al* (2012), investigaron la actividad antimicrobiana de las hojas de tamarindo usando solventes acuosos y orgánicos. El efecto más pronunciado se mostró con el extracto etanólico seguido de los extractos metanólicos y extractos con etil acetato. La CMB y CMI menor fue observada contra *K. pneumoniae* y *M. luteus*, en tanto que los más resistentes fueron *P. aeruginosa* y *S. aureus* metilcilin resistente (MRSA). Resultados similares han sido reportados por Daniyan y Muhammad (2008) quienes demostraron que los extractos etanólicos producen una fuerte actividad contra el crecimiento de *E.coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella Paratyphi* y *P. aeruginosa*. Los extractos acuosos mostraron la menor actividad comparada con otros solventes. Sin embargo, también se ha reportado que los extractos acetónicos mostraron la mayor actividad contra los organismos examinados, seguido del extracto etanólico y acuoso (Doughari, 2006).

Nuestra investigación mostró que la pulpa de tamarindo inhibió el crecimiento de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Esto concuerda con lo reportado por Dipali *et al* (2010) quienes obtuvieron una CMB de 7.2 mg/ml para ambas cepas de *Salmonella* al exponerlos a extracto etanólico. Resultados similares fueron reportados por Doughari (2006) quien reportó una CMB de 10 mg/ml y 8mg/ml para *S. Typhi* y *S. Paratyphi* respectivamente. Nuestro extracto mostró halos de alrededor de 2 cm de inhibición de crecimiento para las cepas analizadas, las cuales fueron mucho menores a los reportados por Ara e Islam (2009) (13.5 mm a 13 mm).

Se ha reportado en la literatura la presencia de agentes bioactivos en los extractos etanólicos de las semillas de tamarindo tales como alcaloides, glicósidos, glicósidos cardiacos, flavonoides, saponinas (Ara e Islam, 2009), glicósidos flavonoidales, orientin y vitexin (Gumgumjee *et al.*, 2012). De manera similar Prajapati *et al.*, (2006) encontraron que la fruta y raíces de *T. indica* son ricas en ácido tartárico, ácido cítrico,

ácido málico, potasio, bitartarato, ácido oxálico, vitexin, orientin, homorientin y horedin. Se han encontrado metabolitos como flavonoides y otros polifenoles en las hojas del tamarindo, y se tienen antecedentes de estos compuestos como agentes antimicrobianos en muchas otras plantas (Shankar *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de estos fitoquímicos podría ser vía lisis celular, compuestos que actúan incrementando la permeabilidad de la pared celular y membrana, la inhibición de la síntesis de proteínas y DNA y/o inhibiendo el transporte de nutrientes a través de la pared celular o membrana (Stewart y Beswick, 1979; Sánchez, 2010), perturbación de la homeostasis celular e inhibición de enzimas (Lambert, 2008). Además la actividad biológica mostrada, puede deberse no solo a un constituyente activo, sino a la acción conjunta de diferentes compuestos presentes en la planta (Bai, 1990) y al pH ácido, debido a que la actividad de extractos es ligeramente incrementada a este pH. El aumento de la actividad de los fitoconstituyentes en presencia de medio ácido ha sido reportado anteriormente (Molan, 1992).

Lippia graveolens (orégano mexicano) es una planta de la familia *Verbenaceae*. Es ampliamente utilizada en México como condimento en alimentos y como remedio popular (Hernández *et al.*, 2003; Pascual, 2001). Se ha utilizado popularmente al orégano para combatir diarrea vómito, indigestión y disentería (Monroy and Castillo 2000, Argueta *et al.*, 1994)

Numerosos estudios se han llevado a cabo con extractos naturales y aceites esenciales de orégano, los cuales han revelado la actividad bacteriostática o actividad bactericida (tanto en modelos en medios de cultivo líquido, como en matrices de alimentos) en patógenos como *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, *S. flexneri*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. thermospacta*, *P. fluorescens*, *S. liquefaciens*, *S. pyogenes*, entre otros, y hongos como *R. leguminosarum*, *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium spp* y *Candida albicans* (Lambert *et al.*, 2001; Cáceres 1999).

El orégano mexicano fue estudiado por Pozzattii *et al* (2008) a fin de analizar su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. El tamizaje fitoquímico de hojas de *L. graveolens* contiene: aceite esencial, glicósidos saponínicos, taninos y triterpenos, celulosa y pigmentos y elementos minerales; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavonas y lapachenol (Cáceres, 1999).

En la presente investigación el extracto etanólico de orégano mostró una CMB de 0.3 mg/ml para ambas cepas. Salinas (2009) utilizó el mismo extracto y reportó una CMI de 1mg/ml contra *S. aureus* y *C. albicans* y de 4 mg/ml contra *S. faecalis*. Como se me mencionó anteriormente el mecanismo de acción del orégano es muy probablemente provocado por el daño estructural y funcional sobre las membranas celulares debido a la acción principalmente de los aceites esenciales timol y carvacrol.

La diferencia en la actividad antibacteriana y actividad anti-Quorum sensing entre las especies de plantas, se deben a muchos factores que pueden influenciarla calidad y cantidad del producto extraído, en particular la composición del suelo, órgano de la planta, fase del ciclo vegetativo y clima (Miguel *et al.*, 2005; Angioni *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008). Se ha reportado que los parámetros básicos que influyen la calidad de un extracto incluyen parte de la planta a utilizar, tamaño de partícula, solvente utilizado para la extracción y procedimiento de extracción. (Ncube *et al.*, 2008).

Otro factor importante que puede influenciar los resultados obtenidos con los ya reportados incluyen a la cepa del microorganismo analizado, concentración del inóculo y diferencias de susceptibilidad de las cepas (Davidson y Naidui, 2000; Hao *et al.*, 1998).

Debido a que las características fenotípicas tales como producción de biopelículas, motilidad y producción de pigmentos en muchas bacterias patogénicas son regulados por (AHL) acilhomoserin lactonas mediadas por el sistema de QS, la búsqueda de compuestos naturales que inhiban dichos compuestos, se ha vuelto imperativa para combatir la proliferación y patogénesis de microorganismos.

Aunque se han estudiado muchas propiedades antibacterianas, y antifúngicas, anti diarreicas de los extractos acuosos o etanólicos de *C. limon*, *H. sabdariffa*, *T. indica*, *L. graveolens*, su capacidad de afectar el QS no ha sido reportado hasta hoy. Por esta razón la presente investigación pretendió demostrar la eficacia de dichos extractos naturales de afectar el sistema de QS de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* así como factores de virulencia (formación de biopelículas y motilidad swarming) relacionados con el QS. Dicho estudio se llevó a cabo con el sistema de bioluminiscencia, empleando la cepa biosensora *Vibrio harveyi*. Se ha reportado que cualquier compuesto capaz de inhibir las moléculas autoinductoras sin la inhibición del crecimiento bacteriano puede ser considerado un inhibidor de QS prometedor.

Las furanonas halogenadas producidas por el alga *Delisea pulchra*, así como furanonas sintéticas y otros compuestos como el ácido elágico, ácido tánico y galato de epigallocatequin han mostrado inhibición del QS en cepas biomonitoras de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Huber *et al.*, 2004).se han reportado como fuertes inhibidores de los autoinductores AI-1 y AI-2 mediados por el sistema QS. Así también, extractos naturales de plantas de frutas incluyendo frambuesa, arándano azul, zarzamora, arándano y uva, además de hierbas como jengibre, col rizada y cúrcuma, exhibieron moderada inhibición de los procesos controlados por QS (Vattem *et al.*, 2007).

En el presente estudio, los extractos crudos de *C. limon*, *H. sabdariffa*, *T. indica*, *L. graveolens* afectaron la actividad QS demostrado por la disminución de la molécula AI-2 cuando se agregaron concentraciones menores a las CMBs. Estos resultados concuerdan con los reportados por Girenavar *et al* (2008) quienes utilizaron jugo de toronja y encontraron compuestos con actividad anti-QS. Dos furocumarinas, las bergamotinas e hidroxibergamotinas fueron aisladas del jugo de toronja por separado en donde ambas mostraron tener fuerte actividad inhibitoria de AI-1 y AI-2 con alrededor de 95% de de reducción.

Así también Adonizio *et al* (2008), encontraron una reducción de factores de virulencia mediados por QS en *P. aeruginosa* al exponerse a extractos de varias plantas del Sur de Florida. Las plantas de este estudio demostraron 35 a 46% de reducción de la producción de moléculas AHL.

Rasmussen y Givskov (2006) han propuesto que el proceso para lograr la reducción o inhibición de los sistemas de QS es por medio de diferentes mecanismos: 1) impedir la producción del compuesto señal, 2) inactivar el compuesto señal por medio de interacción directa ó 3) unión competitiva (o interferir con) los receptores de QS en la bacteria. Adicionalmente, Adonizio (2008) estableció que además, está el mecanismo de mimetismo de la señal, como en el caso de las furanonas. Otros mecanismos reportados incluyen la degradación por medio de proteínas como lactonasas y acilasas, unión de señales, la inhibición de sistemas de regulación genética, o la interrupción de genes de virulencia.

En nuestro trabajó no se realizó el análisis de compuestos presentes en las plantas, por lo que es recomendable el análisis fitoquímico completo, sin embargo los resultados encontrados de alguna forma nos sugieren que los extractos pudieran estar causando el efecto de reducción/inhibición debido a distintos mecanismos, logrando de alguna forma interferir con los autoinductores AI-2 que produce *Salmonella*.

Existe evidencia que los AHL mediados por QS son moléculas cruciales en la maduración de las biopelículas (Hammer and Bassler, 2003), se ha reportado que este proceso de comunicación, dependiente de AHL juega el papel principal en la formación de éstas. Por lo tanto la reducción del QS puede prevenir potencialmente la maduración de dichas biopelículas. Se ha demostrado que los aceites esenciales de una gran cantidad de plantas pueden afectar su formación y su estructura. Rasmussen *et al.*, (2005) reportó que la exposición de *P. aeruginosa* a extractos de ajo y tobramicina produjo una disminución de la producción de las mismas.

En nuestros ensayos también encontramos una reducción de la formación de biopelículas al agregar los extractos de plantas, siendo dicha reducción dosis dependiente. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Girenavar *et al* (2008) quienes indicaron que tanto el jugo completo de toronja Rio Red, así como dos bergamotinas aisladas, mostraron una inhibición considerable de las biopelículas en *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa*. De manera similar se reportó niveles de reducción del 41 al 89% de la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* al exponer con las plantas del sur de Florida (Adonizio *et al.*, 2008).

Sibiya *et al.*, (2011) han sugerido que tratamientos con extractos naturales podrían causar la formación de biopelículas débiles debido a la reducción de la adhesión y formación de microcolonias. Esto se ha basado en estudios previos en donde se ha observado que extractos de hierbas culinarias y de otras plantas han sido capaces de inhibir la adhesión celular (Sandassi *et al.*, 2009).

El swarming es el movimiento mediado por flagelos por el cual las bacterias pueden esparcirse como biopelículas sobre una superficie. Este fenómeno es considerado como factor de virulencia debido a que está involucrado en la formación de biopelículas a través de translocación de células, por la expresión de biosurfactantes. La expresión de estas moléculas es mediadas por las AHL dependientes del sistema de QS (Daniels *et al.*, 2004). Sin embargo, cualquier compuesto que inhiba la producción de biosurfactantes y la motilidad swarming se espera que como consecuencia interfiera con el QS y la regulación de la formación de biopelículas (Sibiya *et al.*, 2011).

En el presente estudio los extractos de *C. limon*, *H. sabdariffa*, *T. indica*, *L. graveolens* Disminuyeron la movilidad tipo swarming de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* de manera dosis dependiente.

Reportes previos han indicado una reducción de la formación de biopelículas y movilidad tipo swarming en *Bacillus subtilis* cuando se encontraba en presencia de furanonas, concluyéndose que estas moléculas tienen potencial para controlar el comportamiento multicelular de bacterias Gram positivas (Ren y Wood, 2002). Esto

también fue observado con otros extractos de diversas plantas o hierbas y sus frutos (Vattem *et al.*, 2007).

La mayoría de los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con los mostrados por Khan *et al.*, (2009) en donde se reportó una reducción de la movilidad tipo swarming del 78% en presencia del aceite de clavo en *P. aeruginosa* PAO1. Igualmente, Sibiyá *et al.*, (2011) reportaron que la adición del extracto de *Caparis spinosa* (alcaparra) produjo una disminución dosis dependiente en *E. coli*, *S. marcescens* y *P. mirabilis*. Este mismo efecto fue observado por extractos de brócoli en *E. coli* O157:H7 (Lee *et al.*, 2011).

Nuestros resultados sugieren que los efectos inhibitorios de los extractos en la formación de biopelículas y motilidad tipo swarming están asociados a la reducida producción de AI-2, tal y como lo reportan Kang-Mu Lee *et al.*, (2009). La incapacidad de las cepas para moverse por la movilidad tipo swarming podría ser el resultado de una reducida producción de biosurfactantes (Daniels *et al.*, 2004) o a la inhibición de la síntesis de proteínas (Li *et al.*, 1993).

En síntesis, la hipótesis planteada se acepta debido a que los compuestos naturales analizados fueron capaces de reducir el QS y algunos factores de virulencia como son formación de biopelículas y movilidad tipo swarming.

9. CONCLUSIONES

Los extractos acuosos de *C. limon* e *H. sabdariffa*, y los extractos etanólicos de *T. indica* y *L. graveolens* poseen un efecto contra el crecimiento de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, siendo el extracto de *L. graveolens* el más efectivo para ambas cepas.

Concentraciones más bajas que las CMB encontrados (25 o 50%) de los extractos no afectaron significativamente el crecimiento de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*.

La formación de biopelícula por las cepas de *Salmonella* fue reducida con los extractos de plantas utilizados de manera dosis dependiente.

La movilidad tipo swarming de las cepas de *Salmonella* fue reducida con los extractos de plantas utilizados de manera dosis dependiente.

Los extractos de *C. limon*, *H. sabdariffa*, *T. indica* y *L. graveolens* demostraron la capacidad de reducir la actividad de la molécula autoinductora (AI-2) de ambas cepas de *Salmonella* de manera dosis dependiente.

10. PROSPECTIVAS DE INVESTIGACION

- Purificar e investigar los compuestos activos de los cuatro extractos probados y su estructura química.
- Estudiar el efecto de los extractos en la producción de exopolisacáridos (EPS).
- Estudiar los genes de *Salmonella* que intervienen en el QS y factores de virulencia (formación de biopelículas y swarming).
- Estudiar la reducción de la expresión de los genes de QS, la reducción de las moléculas señal y el efecto final en la producción de factores de virulencia.
- Investigar y comparar el efecto de los autoinductores de *Salmonella* frente a las furanonas con el efecto de nuestros extractos.
- Investigar los mecanismos de inhibición del QS de cada extracto.
- Investigar el efecto antimicrobiano y anti-QS de los extractos utilizados con otras bacterias patógenas.
- Realizar ensayos clínicos *in vivo* con organismos huésped (*Caenorhabditis elegans*), investigando la toxicidad, para determinar la inhibición del QS e infectividad.
- Demostrar la efectividad de los extractos purificados o la mezcla de éstos en el ámbito industrial, ambiental y clínico, como conservadores o terapéuticos, para combatir la patogénesis bacteriana.

11.LITERATURA CITADA

Adonizio, A., Kong, K. F., & Mathee, K. (2008). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(1), 198-203.

Ahmad, I., Aqil, F., Ahmad, F., Zahin, M., & Musarrat, J. (2008). Quorum sensing in bacteria: potential in plant health protection. *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*, 354–360.

Alarcón G. 2000. Análisis de la actividad antimicrobiana de 48 plantas medicinales comestibles contra bacterias de importancia en alimentos. Tesis (licenciatura) FBC, UANL.

Allison, C., & Hughes, C. (1990). Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behaviour. *Science progress*, 75(298 Pt 3-4), 403-422.

Allison, C., Coleman, N., Jones, P.L. and Hughes, C. 1992. Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infection and Immunity* 60, 4740–4746.

Anderson P, M.R.. 2005. Enfermedades de Origen Alimentario: su prevención. 1ª edición. Editorial Díaz de Santos pp. 24-26.

Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*

essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 4364–4370.

Ara, N., & Islam, M. M. (2009). Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of *Tamarindus indica* seeds Ethanolic Extract. *Pakistan Journal Of Pharmacology*, 26(1), 19-23.

Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M., 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista (1-3): 86-88, 999-1000,1073-1074, 1086-1087.

Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Uribe, S., & Mejía, E. G. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.

Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Morin, J. P., & Boulianne, M. (2007). Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in turkeys slaughtered in Quebec, Canada. *Journal of Food Protection*®, 70(6), 1350-1359.

Bai D (1990). Traditional Chinese material: A respect and prospect. *Planta Med.* 56:502.
Boeru V, Derevici A (1978). Some chemical and physical data on Romania propolis. Apimondia "propolis" Bucharest. pp. 19-26.

Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., & Heffron, F. (1996). Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 412, 149-158.

Brouard, Cécile MPH; Espié, Emmanuelle DVM, MPH; Weill, Francois-Xavier MD; Kérouanton, Annaëlle PhD; Brisabois, Anne PhD; Forgue, Anna-Maria RN; Vaillant, Véronique MD, MPH; de Valk, Henriette MD, MPH. 2007. Two Consecutive Large Outbreaks of *Salmonella enterica* Serotype Agona Infections in Infants Linked to the

Consumption of Powdered Infant Formula. *The Pediatric Infectious Disease Journal*: 26: 148-152.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Journal of Food Microbiology*. 94, 223-253

Cáceres, A., Álvarez, A.V., Ovando, A.E., Samayoa, B.E., 1991. “Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria”. *Journal of Ethnopharmacology*, 31: 193-208.

Cafarchia, C., N. De-Laurentis, M.A. Milillo, V. Losacco and V. Puccini, 2002. Antifungal activity of essential oils from leaves and flower of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parasitologia*, 44: 153-156.

Callaway, T. R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Byrd, J. A., & Nisbet, D. J. (2008). Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *Journal of Animal Science*, 86 (14 suppl), E163-E172.

Casos de *Salmonella* en México en 2008 Semana 53 del año 2008. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Disponible en <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1771-1776.

Chávez-de la Peña, M., Higuera-Iglesias, A. L., Huertas-Jiménez, M. A., Báez-Martínez, R., Morales-de León, J., Arteaga-Cabello, F., & Ponce de León-Rosales, S. (2001). Brote por *Salmonella* enteritidis en trabajadores de un hospital. *Salud pública de México*, 43(3), 211-216.

Chen, G., Swem, L. R., Swem, D. L., Stauff, D. L., O'Loughlin, C. T., Jeffrey, P. D., ...

& Hughson, F. M. (2011). A strategy for antagonizing quorum sensing. *Molecular cell*, 42(2), 199-209.

Chiu, C. H., Wu, T. L., Su, L. H., Chu, C., Chia, J. H., Kuo, A. J., & Lin, T. Y. (2002). The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *New England Journal of Medicine*, 346(6), 413-419.

Collins, J. E. (1997). Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/reemergence of foodborne pathogens. *Emerging infectious diseases*, 3(4), 471.

Copeland, M. F., & Weibel, D. B. (2009). Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter*, 5(6), 1174-1187.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

Cumberbatch, A. (2002). Characterization of the Anti-Quorum Sensing Activity Exhibited by Marine Macro algae of South Florida.

Daniels, R., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 28(3), 261-289.

Daniyan SY, Muhammad HB (2008). Evaluation of the antimicrobial activities and phytochemical properties of extracts of *Tamaridus indica* against some diseases causing bacteria. *Afr. J. Biotechnol.* 7(14):2451-2453.

Davidson, P. M., & Naidu, A. S. (2000). Phyto-phenols. *Natural food antimicrobial systems*, 265-294.

Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.

De Roever, C. 1998. Microbiology safety evaluation and recommendations on fresh produce. *Food Control* 9:321–347.

Dhanavade, M. J., Jalkute, C. B., Ghosh, J. S., & Sonawane, K. D. (2011). Study antimicrobial activity of Lemon (Citrus lemon L.) peel extract. *Br J Pharmacol Toxicol*, 2, 119-122

Dirckx and Davies, 2003. The biofilm cycle. Center for Biofilm Engineering MSU Bozeman. Disponible en sitio red:
<http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v004/r003/contents/chapters/chapter001/section002/green/page001.html>

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.

Dorman HJD and S.G. Deans. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.

Doughari JH (2006). Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. Trop. J. Pharm. Res. 5(2):597-603. Dykstra MJ (1993). A Manual of Applied Techniques for biological Electron Microscopy plenum press. p. 257.

Duchet-Suchaux, M., F. Mompert, F. Berthelot, C. Beaumont, P. Le´chopier, and P. Pardon. (1997). Differences in frequency, level and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis*. Avian Dis. 41:559–567.

Duthie, G., & Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology*, 11(1), 43-47.

Eberl, L., Molin, S., & Givskov, M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology*, 181(6), 1703-1712.

Eloff JN. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 1-8

Elvers, K.T. and Lappin-Scott, H.M. (2000). Encyclopedia of Microbiology. ed. Lederberg, J. San Diego, California: Academic Press.

Escobar, 2010. Extractos de plantas como inhibidores de la formacion de biopelicula de *Escherichia coli* O157:H7. Tesis de maestria. Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Ethelberg, S., Wingstrand, A., Jensen, T., Sørensen, G., Müller, L., Lisby, M., ...& Mølbak, K. (2008). Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium infection in Denmark in 2008. *Eurosurveillance (Online Edition)*, 13(44).

Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Dargaignaratz, C., Botella, L., ... & 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(12), 5870-5876.

Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Salgueiro L, Miguel MG, Faleiro ML. (2008). Portuguese Thymbra and Thymus Species Volatiles: Chemical Composition and Biological Activities. *Current Pharmaceutical Design*. 14: 3120-3140.

Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5), 388-390.

Fraser, G. M., & Hughes, C. (1999). Swarming motility. *Current opinion in microbiology*, 2(6), 630-635.

Fujikawa, H. (1994) Diversity of the growth patterns of *Bacillus subtilis* colonies on agar plates. *FEMS Microbiology Ecology* 13, 159–168.

Fuqua, C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 727-751.

Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology*, 176(2), 269.

Fuzihara, T. O., Fernandes, S. A., & Franco, B. D. (2000). Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection*®, 63(12), 1749-1753.

Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J. B., & Bauer, W. D. (2003). Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(9), 827-834.

García Rico R O, Herrera Arias F C. (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. BISTUA Vol 5 No.2 pp 68-79.

García S; Alarcón G; Gómez M; Heredia N. 2005. *Haematoxylon brasiletto* extracts inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio Cholerae*. Food Biotech. 19 (1):15-26.

Girenavar, B., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2007). Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. *Journal of food science*, 72(8), C417-C421.

Girenavar, B., Cepeda, M. L., Soni, K. A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2008). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibit autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International journal of food microbiology*, 125(2), 204-208.

Gov Y, Bitler A, Dell'Acqua G, Torres JV, Balaban N (2001) RNAIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. *Peptides* 22: 1609-1620.

Gumgumjee, N. M., Khedr, A., & Hajar, A. S. (2012). Antimicrobial activities and chemical properties of *Tamarindus indica* L. leaves extract. *African Journal of Microbiology Research*, 6(32), 6172-6181.

Guo F., Williams B., Kwakkel P., Li H., Li P., Luo Y., Li W., Verstegen M. (2004). Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on the cecal microbial ecosystem in broiler chickens. *Poultrysci.* 83:175–182

Gutiérrez-Cogco L, González-Bonilla C, Giono-Cerezo S, Beltrán LG. (1994) Principales serotipos de *Salmonella* identificados en 10 703 cepas en México entre 1982 y 1993. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 36: 221-226.

Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., & González-Andrade, M. C. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud pública de méxico*, 42(6), 490-495.

Hammer, B. K., & Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*, 50(1), 101-104.

Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. *International centre for science and high technology, Trieste* 21-25.

Harris, J. B., Baresch-Bernal, A., Rollins, S. M., Alam, A., LaRocque, R. C., Bikowski, M., ...& Ryan, E. T. (2006). Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infection and immunity*, 74(9), 5161-5168.

Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 249-273.

Harshey, R. M., & Matsuyama, T. (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8631-8635.

Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Duran, A., Caballero, J., Vivar, A., & Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2), 181-188.

Henke, J. M., & Bassler, B. L. (2004). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology*, *186*(20), 6902-6914.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., ... & Givskov, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*, *22*(15), 3803-3815.

Heredia, N., M. Escobar, C. Rodríguez, and S. García. 2005. Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 to HeLa cells. *Journal of Food Protection*. *68*:1346–1351.

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*(11), 4161-4167.

Hoang, T Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., Polster, J., 2004. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Biosciences*. *58*, 879-884..

Hoang, T. T., Sullivan, S. A., Cusick, J. K., & Schweizer, H. P. (2002). β -Ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. *Microbiology*, *148*(12), 3849-3856.

Hogan, D. A., Vik, Å., & Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, *54*(5), 1212-1223.

Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., Polster, J., 2004. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift für Naturforschung Section C, Biosciences*. 58, 879-884.

Humphries, A. D., Townsend, S. M., Kingsley, R. A., Nicholson, T. L., Tsois, R. M., & Bäumlér, A. J. (2001). Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS microbiology letters*, 201(2), 121-125.

Hyttiä, E., Hielm, S., Björkroth, J., & Korkeala, H. (1999). Biodiversity of *Clostridium botulinum* Type E Strains Isolated from Fish and Fishery Products. *Applied and environmental microbiology*, 65(5), 2057-2064.

Issac Abraham, S. V. P., Palani, A., Ramaswamy, B. R., Shunmugiah, K. P., & Arumugam, V. R. (2011). Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*. *Archives of Medical Research*, 42(8), 658-668.

Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens & Disease*, 1(1), 27-35.

Jain, S., Bidol, S. A., Austin, J. L., Berl, E., Elson, F., Williams, M. L., ... & Lynch, M. F. (2009). Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice—United States, 2005. *Clinical infectious diseases*, 48(8), 1065-1071.

Javed, S., Javaid, A., Mahmood, Z., Javaid, A., & Nasim, F. (2011). Biocidal activity of citrus peel essential oils against some food spoilage bacteria. *Journal Of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3697-3701.

Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.

Kawai, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., ...& Furukawa, H. (2000). Quantitative study of flavonoids in leaves of Citrus plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 3865-3871.

Khan, M. S. A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2009). Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in applied microbiology*, 49(3), 354-360.

Khanzada, S. K., Shaikh, W., Sofia, S., Kazi, T. G., Usmanhani, K., Kabir, A., & Sheerazi, T. H. (2008). Chemical constituents of Tamarindus indica L. medicinal plant in Sindh. *Pak. J. Bot*, 40(6), 2553-2559.

Kim, W., & Surette, M. G. (2003). Swarming populations of Salmonella represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biological procedures online*, 5(1), 189-196.

Kok, L, 2012. IB Microbes and Biotechnology (internet). TCIS University of Korea. Disponible en el sitio red: <http://www.biologyandibchemistry.html> .(Revisado el 10 de diciembre de 2012).

Kolter, R. and Losick, R. (1998) One for all and all for one. *Science* 280, 226–227.

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. 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.

Lambert PA (2008). Mechanisms of action of biocides. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, Blackwell publishing Ltd. pp.139-153.

Lapornik B, Prosek M, Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*; 71: 214–222.

Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penades, J. R. & Lasa, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology* 58, 1322–1339.

Lee, K. M., Kim, W. S., Lim, J., Nam, S., Youn, M., Nam, S. W., & Park, S. (2009). Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechingallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Protection*®, 72(2), 325-331.

Lee, K. M., Lim, J., Nam, S., Yoon, M. Y., Kwon, Y. K., Jung, B. Y., ... & Yoon, S. S. (2011). Inhibitory effects of broccoli extract on *Escherichia coli* O157: H7 quorum sensing and in vivo virulence. *FEMS microbiology letters*, 321(1), 67-74.

Lis-Balchin M, Deans SG, Eaglesham E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 13:98-104.

Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.

McLean, R. J., Pierson III, L. S., & Fuqua, C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of microbiological methods*, 58(3), 351-360.

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607–625.

Meijler, M. M., Hom, L. G., Kaufmann, G. F., McKenzie, K. M., Sun, C., Moss, J. A., ... & Janda, K. D. (2004). Synthesis and biological validation of a ubiquitous quorum-sensing molecule. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(16), 2106-2108.

Midelet, G., & Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food*. *Journal of applied microbiology*, 97(2), 262-270.

Miguel MG, Duarte J, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2005. Thymus carnosus Boiss.: effect of harvesting period, collection site and type of plant material on essential oil composition. *Journal of Essential Oil Research*. 17:422-426.

Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1932). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(06), 732-749.

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 to meat. *Journal of clinical microbiology*, 38(6), 2204-2209.

Mok, K. C., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2003). *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *The EMBO journal*, 22(4), 870-881.

Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(1), 5-28.

Monroy, C., Castillo, P., 2000. *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*, Centro de Investigaciones Biológicas. UAEM, p. 89, 90, 95, 136, 150, 203, 216, 228, 239, 258, 291, 298.

Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A. L., Sidhu, M. S., Rudi, K., & Langsrud, S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5648-5655.

Muller B.M. and Franz G (1992) Chemical structure and biological activity polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa*, *Planta Med.* 58(1): 60-67.

Mungole, A., & Chaturvedi, A. Determination of antibacterial activity of two medicinally important Indian Taxa. *Der Pharma Chemica*, 2011, 3(1): 83-89.

Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R., & Roper, T. R. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2737-2744.

Nwaiwu, N., Mshelia, F., & Raufu, I. 2012 Antimicrobial activities of crude extracts of *Moringa oleifera*, *Hibiscus sabdariffa* and *Hibiscus esculentus* seeds against some enterobacteria. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*, 1(1), 11-16.

Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7 (12): 1797-1806.

Nealson, K. H. (1977). Autoinduction of bacterial luciferase. *Archives of microbiology*, 112(1), 73-79.

Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, 43(4), 496.

Ni, N., Choudhary, G., Li, M., & Wang, B. (2008). Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(5), 1567-1572.

Oboh, G., & Elusiyan, C. A. (2004). Nutrient composition and antimicrobial activity of sorrel drinks (soborodo). *Journal of medicinal food*, 7(3), 340-342.

Ochoa, I. M. F., & Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 25-42.

Olaleye, M. T. (2007). Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1), 9-13.

Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, A., & Río, J. D. (2006). Citrus paradise and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food chemistry*, 98(2), 351-358.

Özcan, M. M., Sagdıç, O., & Özkan, G. (2006). Inhibitory effects of spice essential oils on the growth of *Bacillus* species. *Journal of medicinal food*, 9(3), 418-421.

Pandey, R. R., Dubey, R. C., & Saini, S. (2010). Phytochemical and antimicrobial studies on essential oils of some aromatic plants. *African Journal of Biotechnology*, 9(28), 4364-4368.

Pandey, A., Kaushik, A., & Tiwari, S. K. (2011). Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of Citrus limon. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)*, 13(13)..

Parekh, J., & Chanda, S. (2007). Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. *African Journal of Biomedical Research*, 10(2).

Park, J., Kaufmann, G. F., Bowen, J. P., Arbiser, J. L., & Janda, K. D. (2008). Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 198(8), 1198-1201.

Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A., 2001. “*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review”. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3): 201-214.

Persson, T., Hansen, T. H., Rasmussen, T. B., Skindersø, M. E., Givskov, M., & Nielsen, J. (2005). Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(2), 253-262.

Pino-Benitez N., Stashenko E. 2009. Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. 2009 Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (2), 145 – 150.

Pozzatti, P., Scheid, L. A., Spader, T. B., Atayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2008). In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian journal of microbiology*, 54(11), 950-956.

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39.

Prajapati ND, Purohit SS, Sharma AK, Kumar T (2006). A Hand book of Medicinal Plants., 3 Edition. Agrobios Hindustan Printing Press, Jodhpur. fungal pathogens. *J. Med. Plants Res.* 5(16):3606-3618.

Quiroz C., Rodas O, Vázquez C, Fernández F, Quiñones E, And Vázquez-Salinas C. 2009. Prevalence of *Salmonella* in Vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection* 72: 1279–1282

Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Köte, M., ... & Givskov, M. (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of bacteriology*, 187(5), 1799-1814.

Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2), 149-161.

Rasschaert, G., Houf, K., Godard, C., Wildemauwe, C., Pastuszczak-Frak, M., & De Zutter, L. (2008). Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. *Journal of Food Protection*®, 71(1), 146-152.

Ray, B. (2004). *Fundamental food microbiology*. CRC press.

Remington JP. 2008. Remington: The science and practice of pharmacy, 21 st edition, Lippincott Williams & Wilkins, 773-774.

Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2002). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2 (5H)-furanone. *Letters in applied microbiology*, 34(4), 293-299.

Rosas GA, Acosta VM. Manual de manejo higiénico de los alimentos. México, D.F.: Secretaría de Salud, 2001.

Rossi C, Arias G. y Lozano RN. 2002. Evaluación Antimicrobiana y Fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp "Salvia". Ciencia e Investigación Vol. 5 N° 1. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/ciencia/v05_n1/evaluaci%C3%B3n_antimicrobiana.htm

Sameena, H. (2006) Quorum sensing inhibition and antimicrobial properties of certain medicinal plants and natural products. M.Sc. Thesis, Aligarh, India: Aligarh Muslim University.

Sánchez, E., García, S., & Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and environmental microbiology*, 76(20), 6888-6894.

Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology*, 50(1), 30-35.

Schmid, H., Hachler, H., Stephan, R., Baumgartner, A., & Boubaker, K. (2008). Outbreak of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Switzerland, May-June 2008, implications for production and control of meat preparations. *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, 13(44), pii-19020.

Secretaría de Salud. Salud: México 2008. Información para la rendición de cuentas: disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem50/index.htm>

Secretaría de Salud: México 2006. Información para la rendición de cuentas. Disponible en: <http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos>

Sharaf, A., Geneidi, A., & Negm, S. (1966). Further Study on the Antibacterial Effect of *H. sabdariffa*. *Pathobiology*, 29(1), 120-125.

Sheppard, S. K., Dallas, J. F., Strachan, N. J., MacRae, M., McCarthy, N. D., Wilson, D. J., & Forbes, K. J. (2009). Campylobacter genotyping to determine the source of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, 48(8), 1072-1078.

Shuford, J. A., Piper, K. E., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2007). In vitro biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 57(3), 277-281.

Sivapalasingam, S., C. R. Friedman, L. Cohen, and R. V. Tauxe. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*. 67: 2342–2353

Smith, B. P., House, J. K., Magdesian, K. G., Jang, S. S., Cabral Jr, R. L., Madigan, J. E., & Herthel, W. F. (2004). Principles of an infectious disease control program for preventing nosocomial gastrointestinal and respiratory tract diseases in large animal veterinary hospitals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(8), 1186-1195.

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26: 118-122.

Souza-Fagundes, E. M., Queiroz, A. B., Martins Filho, O. A., Gazzinelli, G., Corrêa-Oliveira, R., Alves, T., & Zani, C. L. (2002). Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(8), 1207-1212.

Stewart FS, Beswick TS (1979). *Bacteriology, Virology and Immunity*. 10th Edu, the English Language Book Society and Ballierie Tindall, London. pp. 35-37.

Stewart, P. S., & William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135-138.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.

Surette, M. G., & Bassler, B. L. (1998). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 7046-7050.

Surette, M. G., Miller, M. B., & Bassler, B. L. (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1639-1644.

Swem, L. R., Swem, D. L., O'Loughlin, C. T., Gatmaitan, R., Zhao, B., Ulrich, S. M., & Bassler, B. L. (2009). A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Molecular cell*, 35(2), 143-153.

Swift, S., Throup, J. P., Williams, P., Salmond, G. P., & Stewart, G. S. (1996). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in biochemical sciences*, 21(6), 214-219.

Tauxe, R. V. (1997). Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging infectious diseases*, 3(4), 425.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106.

Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., & Bäuml, A. J. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infection and immunity*, 69(5), 2894-2901.

Turgis M, Han J, Caillet S, Lacroix M. 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhi. *Food Control*. 20:1073-1079.

Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 65.

Upadhyay RK, Dwivedi P, Ahmad S (2010). Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. *Asian J. Med. Sci.*, 2: 152-158.

Valtierra-Rodriguez, D., Heredia, N. L., Garcia, S., & Sanchez, E. (2010). Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry skin by fruit extracts. *Journal of Food Protection*, 73(3), 477-482.

Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., ... & Tepe, B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 63-67.

Vattem, D. A., Mihalik, K., Crixell, S. H., McLean, R. J. C., 2007. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*. 78, 302-310.

Verma, V., Singh, R., Tiwari, R. K., Srivastava, N., & Verma, A. (2012). Antibacterial activity of extracts of Citrus, Allium & Punica against food borne spoilage. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(4), 503-509.

Velge, P., Cloeckert, A., Barrow, P. (2005). Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary research*, 36(3), 267-288.

Wang GX. 2010. In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleayamicrocarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Veterinary Parasitology*; 171: 305–313.

Ward, L.R., De Sa, J.D.H. & Rowe, B. 1987 A phage- typing scheme for Salmonella enteritidis. *Epidemiology and Infection* 99, 291-294.

Wegener, H. C., Hald, T., Wong, L. F., Madsen, M., Korsgaard, H., Bager, F., ... & Mølbak, K. (2003). Salmonella control programs in Denmark. *Emerging infectious diseases*, 9(7), 774.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., & Camara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1119-1134.

Willix, D. J., Molan, P. C., & Harfoot, C. G. (1992). A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *Journal of Applied Microbiology*, 73(5), 388-394.

Wise, M. G., Siragusa, G. R., Plumblee, J., Healy, M., Cray, P. J., & Seal, B. S. (2009). Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR. *Journal of microbiological methods*, 76(1), 18-24.

Wu, M. K., Dummer, P. M. H., & Wesselink, P. R. (2006). Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *International endodontic journal*, 39(5), 343-356.

Xavier, K. B., & Bassler, B. L. (2003). LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current opinion in microbiology*, 6(2), 191-197.

Zhang, M., Hettiarachchy, N. S., Horax, R., Kannan, A., Praisoody, A., Muhundan, A., & Mallangi, C. R. (2011). Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera* and *Murray akoenigii* leaves. *Journal Of Medicinal Plants Research*, 5(30), 6672-6680.

Zeng, Z., Qian, L., Cao, L., Tan, H., Huang, Y., Xue, X., ... & Zhou, S. (2008). Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(1), 119-126.

APÉNDICE 1

Resultados de viabilidad microbiana de las dos cepas de *Salmonella* empleando las concentraciones subletales o subinhibitorias de cada extracto y el control comercial.

TRATAMIENTO	S. Typhi UFC/ml ±DE	S. Typhimurium UFC/ml ±DE
Control bacteria	$2.38 \times 10^9 \pm 5.77 \times 10^8$	$2.38 \times 10^9 \pm 4.79 \times 10^8$
CTR agua	$2.50 \times 10^9 \pm 2.04 \times 10^8$	$1.60 \times 10^9 \pm 6.52 \times 10^8$
CTR etanol	$1.26 \times 10^9 \pm 8.64 \times 10^8$	$2.67 \times 10^9 \pm 2.08 \times 10^8$
<i>Citrus limon</i> 25%	$2.79 \times 10^9 \pm 1.78 \times 10^9$	$2.19 \times 10^9 \pm 1.13 \times 10^9$
<i>Citrus limon</i> 50%	$2.50 \times 10^8 \pm 2.04 \times 10^8$	$5.00 \times 10^7 \pm 2.18 \times 10^7$
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 25%	$2.94 \times 10^9 \pm 1.99 \times 10^9$	$3.90 \times 10^9 \pm 1.52 \times 10^9$
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 50%	$1.0 \times 10^9 \pm 3.78 \times 10^8$	$2.31 \times 10^8 \pm 1.93 \times 10^8$
<i>Tamaridus indica</i> 25%	$7.50 \times 10^8 \pm 3.78 \times 10^8$	$2.06 \times 10^8 \pm 1.12 \times 10^8$
<i>Tamaridus indica</i> 50%	$1.79 \times 10^8 \pm 1.29 \times 10^8$	$8.14 \times 10^9 \pm 4.73 \times 10^7$
<i>Lippia graveolens</i> 25%	$1.00 \times 10^9 \pm 7.75 \times 10^8$	$6.29 \times 10^8 \pm 2.56 \times 10^8$
<i>Lippia graveolens</i> 50%	$2.93 \times 10^8 \pm 1.79 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8 \pm 7.07 \times 10^7$
CITROL K-Ultra 25%	$1.43 \times 10^9 \pm 4.21 \times 10^8$	$5.06 \times 10^8 \pm 2.11 \times 10^8$
CITROL K-Ultra 50%	$4.15 \times 10^8 \pm 2.04 \times 10^8$	$3.06 \times 10^8 \pm 1.98 \times 10^8$

CTR: control

±DE: desviación estándar

APÉNDICE 2

Resultados de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas de las cepas de *Salmonella*, empleando las concentraciones subletales de los extractos naturales y el control comercial.

TRATAMIENTO	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Typhimurium</i>
	% Inhibición ± DE de biopelículas	% Inhibición ± DE de biopelículas
CTR agua	3.33 ± 2.89	4.18 ± 2.70
CTR etanol	4.71 ± 3.64	5.42 ± 1.7
<i>Citrus limon</i> 25%	16.18 ± 3.34	11.60 ± 2.10
<i>Citrus limon</i> 50%	49.51 ± 4.89	25.57 ± 3.80
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 25%	25.60 ± 3.70	17.37 ± 5.00
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 50%	59.20 ± 3.33	52.92 ± 5.30
<i>Tamaridus indica</i> 25%	26.53 ± 4.76	20.28 ± 5.00
<i>Tamaridus indica</i> 50%	49.26 ± 4.49	52.38 ± 6.50
<i>Lippia graveolens</i> 25%	24.61 ± 3.53	20.64 ± 4.40
<i>Lippia graveolens</i> 50%	46.53 ± 3.82	49.60 ± 6.00
Citrol K-Ultra 25%	69.54 ± 3.90	54.87 ± 3.00
Citrol K-Ultra 50%	94.79 ± 3.69	91.94 ± 5.10

CTR: control

±DE: desviación estándar

APÉNDICE 3

Resultados de porcentaje de inhibición del swarming de las cepas de *Salmonella*, empleando las concentraciones subletales de los extractos naturales y el control comercial.

TRATAMIENTO	S. Typhi	S. Typhimurium
	% Inhibición ± DE del swarming	% Inhibición ± DE del swarming
CTR agua	0.71 ± 0.65	0.59 ± 0.69
CTR etanol	1.65 ± 1.34	2.36 ± 0.02
<i>Citrus limon</i> 25%	93.84 ± 1.01	93.18 ± 0.53
<i>Citrus limon</i> 50%	94.31 ± 1.02	94.66 ± 0.67
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 25%	92.66 ± 0.87	93.47 ± 1.53
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 50%	93.46 ± 0.96	94.06 ± 1.00
<i>Tamaridus indica</i> 25%	0.95 ± 0.99	6.50 ± 2.46
<i>Tamaridus indica</i> 50%	89.81 ± 1.10	81.03 ± 3.85
<i>Lippia graveolens</i> 25%	92.84±1.00	92.88 ± 1.68
<i>Lippia graveolens</i> 50%	93.60 ± 0.64	93.18 ± 1.13
Citrol K-Ultra 25%	92.89 ± 1.43	88.52 ± 0.98
Citrol K-Ultra 50%	94.78 ± 0.68	90.30 ± 2.20

CTR: control

±DE: desviación estándar

APÉNDICE 4

Resultados de porcentaje de inhibición de la actividad de las moléculas AI-2 de las cepas de *Salmonella*, empleando las concentraciones subletales de los extractos naturales y el control comercial.

TRATAMIENTO	S. Typhi	S. Typhimurium
	% Inhibición ± DE actividad de AI-2	% Inhibición ± DE actividad de AI-2
CTR agua	7.60 ± 2.1	3.90 ± 1.4
CTR etanol	11.91 ± 4.5	8.60 ± 3.2
<i>Citrus limon</i> 25%	40.59 ± 3.5	38.06 ± 2.1
<i>Citrus limon</i> 50%	98.92 ± 0.8	99.08 ± 0.3
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 25%	51.56 ± 4.6	57.05 ± 5.2
<i>Hibiscus sabdariffa</i> 50%	99.22 ± 0.6	97.91 ± 0.3
<i>Tamaridus indica</i> 25%	26.73 ± 4.7	30.78 ± 4.9
<i>Tamaridus indica</i> 50%	42.81 ± 4.1	39.42 ± 1.6
<i>Lippia graveolens</i> 25%	36.27 ± 5.1	42.17 ± 2.8
<i>Lippia graveolens</i> 50%	97.09 ± 1.3	95.13 ± 1.3
Citrol K-Ultra 25%	94.13 ± 2.3	93.51 ± 2.3
Citrol K-Ultra 50%	94.50 ± 1.8	95.07 ± 2.4

CTR: control

±DE: desviación estándar

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Teresa Eugenia Guízar Ferrel

Candidata para el grado de:

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: PRODUCTOS NATURALES VEGETALES COMO INHIBIDORES DE MOLÉCULAS SEÑAL DEL “QUÓRUM SENSING” Y SU EFECTO SOBRE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Salmonella* spp.

Campo de estudio: Productos naturales e inocuidad alimentaria.

Datos personales: Nacida en Cd. Victoria, Tamps. el 16 de abril de 1984, hija del Ing. Salvador Guízar Marín y la Profra. Teresa Eugenia Ferrel Boijseauneau.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2007.

Experiencia Profesional: Químico Analista en el Centro de Mezclas OCA en 2007, Laboratorio de Análisis clínicos RUBILAB 2007-2008, Laboratorio de Análisis clínicos Clínica María Luisa 2008-2009, Químico Analista en el laboratorio de OCA Hospital 2012-a la fecha.