

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PRODUCTOS NATURALES DE PLANTAS COMO INHIBIDORES
DE *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*: ESTUDIO SOBRE
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMO DE ACCIÓN.

Por

Q.B.P. SANDRA LORUHAMA CASTILLO HERNANDEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
acentuación en Microbiología.

Noviembre 2008.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PRODUCTOS NATURALES DE PLANTAS COMO INHIBIDORES
DE *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*: ESTUDIO SOBRE
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMO DE ACCIÓN.

Por

Q.B.P. SANDRA LORUHAMA CASTILLO HERNANDEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
acentuación en Microbiología.

Noviembre 2008.

PRODUCTOS NATURALES DE PLANTAS COMO INHIBIDORES DE
Campylobacter jejuni y *Campylobacter coli*: ESTUDIO SOBRE
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMO DE ACCIÓN.

Comité de Tesis

Director de Tesis: Dr. José Santos García Alvarado.

Secretario: M.C. Luisa Yolanda Solís Soto.

Vocal: Dra. Norma Laura Heredia Rojas.

Suplente: M.C. Eduardo Sánchez García.

El Presente Trabajo se realizó 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 de el Dr. José Santos García Alvarado, la codirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, y la asesoría de M.C. Luisa Yolanda Solís Soto y M.C. Eduardo Sánchez García.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Dios por la vida concedida, la salud, y todos los regalos que me ha dado, entre los más preciados mis hijos y la oportunidad de hacer este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por haberme apoyado con los recursos necesarios para estudiar la Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología.

En especial a La Dra. Norma Laura Heredia Rojas y Dr. José Santos García, por su confianza al darme la oportunidad de estar en este Laboratorio y por el apoyo y comprensión brindados durante el desarrollo del Trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Juan Francisco Contreras y a M.C. Griselda Menchaca Rodríguez por su gran apoyo, paciencia e invaluable enseñanza.

Agradezco a M.C. Eduardo Sánchez García y M.C. Luisa Yolanda Solís Soto, por la asesoría brindada en todo momento.

A mis más sinceros amigos del Laboratorio Rosy, Edu, Ale, Diana, Alma, Luisa, Faby y Aldo. Gracias por su compañía y palabras de apoyo.

A toda la raza del Lab incluyendo a mis alumnos Meris y Juan, que no me dejaron nunca sola con todo el paquete y a mis nuevas compañeras Nere y las dos Mayras que siempre me han regalado una sonrisa.

Por esto y mucho más: GRACIAS

DEDICATORIA.

A Dios, por darme la oportunidad...

A mis hijos, por su amor e incondicional comprensión:

por ustedes vivo, por ustedes lucho...

A Carlos, por su ayuda...

A mi Madre, por ser mi ejemplo y mi apoyo...

A mi Padre, por todo el amor dado...

A mis Hermanos, por su cariño...

A mis sobrinos, que tanto quiero...

A mi espíritu, por mantenerse firme...

Y a ti María Fernanda, por devolverme la Fe...

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCION.....	3
2. HIPOTESIS.....	5
3. OBJETIVO GENERAL.....	6
4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1. Importancia de <i>Campylobacter</i>	7
5.2. Factores de virulencia de <i>Campylobacter</i>	8
5.2.1. Movilidad.....	9
5.2.2. Adherencia e Invasión.....	10
5.2.3. Toxinas.....	12
5.2.3.1. Enterotoxina.....	12
5.2.3.2. Citotoxina.....	14
5.3. COMPUESTOS DE PLANTAS.....	16
5.4. ACTIVIDAD DE PLANTAS SOBRE ENTEROPATOGENOS.....	19
5.5. ACTIVIDAD DE PLANTAS SOBRE PRODUCCION DE TOXINAS.....	23

6. METODOS.....	26
6.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	26
6.2. Línea celular.....	26
6.3. Plantas utilizadas.....	27
6.4. Obtención del extracto.....	29
6.5. Determinación del peso seco.....	29
6.6. Ensayos preeliminares de susceptibilidad antimicrobiana.....	29
6.7. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida.....	30
6.8. Determinación del efecto de las concentraciones subletales	30
sobre el crecimiento microbiano.....	30
6.9. Obtención de sobrenadantes para ensayos de citotoxicidad.....	31
6.10. Ensayo celular para la determinación de citotoxicidad.....	31
6.11. Ensayo para determinar adhesión.....	32
6.12. Determinación colorimétrica de grupos químicos en los	
extractos seleccionados.....	33
6.12.1. Insaturaciones.....	33
6.12.2. Saponinas.....	33
6.12.3. Flavonoides.....	34
6.12.4. Sesquiterpenlactonas.....	34
6.12.5. Carbohidratos.....	34
6.12.6. p-benzoquinonas.....	34
6.12.7. Alcaloides.....	34
6.12.8. Cumarinas.....	35
6.12.9. Aldheidos y cetonas.....	35
6.12.10. Cloruros.....	35
6.12.11. Taninos.....	36
6.13. Análisis estadístico.....	36

7. RESULTADOS.....	37
7.1. Prueba de pozo.....	37
7.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	40
7.3. Determinación de las concentraciones subletales sobre el crecimiento microbiano.....	41
7.4. Ensayo de citotoxicidad de sobrenadantes.....	43
7.4.1. Evaluación de la citotoxicidad de los sobrenadantes de <i>Campylobacter</i>	43
7.4.2. Evaluación de los efectos de los extractos de plantas sobre la citotoxicidad de <i>Campylobacter</i>	46
7.5. Adhesión a células.....	53
7.6. Caracterización parcial de los compuestos presentes.....	57
8. DISCUSION.....	58
9. CONCLUSIONES.....	66
10. LITERATURA CITADA.....	67
12. RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pag.
1. Nombre común y científico así como partes de las plantas utilizadas en nuestros ensayos.....	27
2. Efecto sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> por extractos metanólicos de diferentes plantas.....	38
3. Concentración mínima bactericida (mg/ml) sobre <i>Campylobacter</i>	40
4. Determinación de grupos químicos presentes en los extractos seleccionados.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pag.
1. Efecto antimicrobiano del extracto de alcachofa, huizache y kiwi sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> 5653.....	37
2. Efecto de las concentraciones subletales de extractos metanólicos sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> 5653.....	41
3. Efecto de las concentraciones subletales de extractos de plantas sobre el crecimiento de <i>C. coli</i> 1.....	42
4. Efecto de las concentraciones subletales de extractos de plantas sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> 180ip.....	42
5. Efecto citotóxico de los sobrenadantes bacterianos sobre células Vero.....	44
6. Disminución gradual del efecto citotóxico de los sobrenadantes de <i>C. coli</i> 1 sobre ceelulas Vero.....	45
7. Efecto citotóxico sobre células Vero de sobrenadantes tratados con extracto de huizache.....	47
8. Efecto citotóxico sobre células Vero de sobrenadantes tratados con extracto de estafiate.....	48

9. Efecto citotóxico sobre células Vero de sobrenadantes tratados con extracto de alcachofa.....	49
10. Disminución de citotoxicidad sobre células Vero al agregar los sobrenadantes tratados con alcachofa.....	50
11. Efecto citotóxico sobre células Vero de sobrenadantes tratados con extracto de nopal.....	51
12. Disminución de la citotoxicidad sobre células Vero al agregar los sobrenadantes de <i>Campylobacter</i> tratados con nopal	52
13. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con huizache al 75% de la CMB.....	53
14. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con estafiate al 75% de la CMB.....	54
15. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con alcachofa al 75% de la CMB.....	55
16. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con nopal al 75% de la CMB.....	56

Carlos Adrián

Nueve años
de tu llegada han pasado
Y como si fuese ayer
recuerdo aquel instante a tu lado.

Desde ese día brilló
más mi vida,
pues llenaste mi ser
de inmensa alegría.

Te noté desesperado,
Mas mi voz calmó tu llanto
Y en el silencio tuyo y mío
Nuestras miradas se cruzaron.

Y nos sentimos ambos amados
Sabiendo que desde entonces
Solos ya no estamos
Porque mi corazón fue tuyo
al tenerte entre mis brazos.

Y desde ese minuto
Le canto alegremente al mundo
La felicidad que tú trajiste
Aquel día que naciste.

Saida Stella

Sus ojos se abren
y me miran por la mañana;
su manita suave,
acaricia despacio mi cara.

Despierto ante tal encanto,
y la veo recostada a mi lado.
Mi alma se siente plena,
por estar hoy junto a ella.

Durante el día la extraño
cuando estoy trabajando;
la impaciencia me ciega
cuando sé que voy a verla.

Y apenas abro la puerta,
ella llega corriendo,
abre sus brazos sonriendo
y abraza con fuerza mi cuerpo.

Es la alegría
de mi vida entera;
es lo que más quiero
vivo sólo por ella.

Hija mía,
tal vez mañana yo muera;
no sin antes decirte
que desde que naciste
iluminaste mi vereda.

María Fernanda

Gracias hermosura
Por darnos tu ternura
Por enseñarnos que en la vida
Se sufre, mas nunca se renuncia...

Gracias corazón
Por esas miradas de amor
Por esos inolvidables momentos
Que nos regalaste en tu dolor...

Gracias bello Ángel,
Guerrera incansable,
Misionera invencible,
De fe ciega y sublime...

Valió la pena tenerte
Aunque sufrimos mucho al perderte,
Porque en estos pocos días
Aprendimos a amarte intensamente...

Hasta pronto mi vida
Te nos adelantaste al cielo
Pero estoy segura,
Que algún día nos encontraremos...

A mi Espíritu

Cuando la vida parezca difícil
Mira hacia el cielo y respira profundo...
Pídele a Dios que te muestre lo bello
Que aún existe en este mundo.

Cuando tus ojos se nieguen a ver
Cuando tus labios no quieran hablar
Tómame un sólo minuto
Y piensa en lo maravilloso de tu andar.

No te desgastes odiando
No te consumas pensando en lo malo,
Sonríe, olvida y perdona
A todo aquel que te ha hecho daño...

...Y si acaso las heridas fuesen tantas,
que todo aquello todavía las desangra,
Ten fortaleza, rompe con todo,
Rescata tu vida y sácala del lodo.

Entonces sentirás paz y alegría
Entonces vivirás en armonía...
Y descubrirás que en esta vida
Se puede ser feliz sin medida...

Y tal vez llores y sufras de nuevo,
Mas no importa cuantas veces te tropieces
Levántate con inmensa fe del suelo
Y no descanses hasta conseguir lo que quieres.

RESUMEN

Campylobacter jejuni es el microorganismo más común asociado a diarreas en niños, sobretodo en países en vías de desarrollo, además de considerarse la causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos en países industrializados.

Debido al uso indiscriminado de antibióticos, los microorganismos han desarrollado resistencia a los mismos, por lo que actualmente se buscan alternativas medicinales para su control. Es por esto que la utilización de la medicina natural desde tiempos muy antiguos ha resultado en una estrategia actual.

En el presente estudio, se determinó la acción antimicrobiana de diversos extractos de plantas sobre el crecimiento, la actividad citotóxica (producción de toxinas) y la capacidad de adhesión a células VERO de *C. jejuni* y *C. coli*.

Se encontró que 27 de los 35 extractos metanólicos analizados tuvieron actividad inhibitoria contra ambos microorganismos. Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos que mostraron mejor actividad los cuales fueron: *Artemisia ludoviciana* (Estafiate), *Acacia farneciana* (Huizache), *Opuntia ficusindica* (Nopal) y *Synara scolymus* (Alcachofa) siendo 0.3, 0.5, 0.4 y 2.0mg/mL respectivamente.

Se probaron concentraciones subletales (25, 50 75% del CMB) de Nopal, Alcachofa, Huizache y Estafiate que no inhibieron el crecimiento bacteriano; pero sí disminuyeron la capacidad de adhesión (nopal y alcachofa) de *C. jejuni/coli* a líneas celulares Vero, así como la producción de toxinas de *C. jejuni/coli* (huizache y estafiate).

ABSTRACT

Campylobacter spp. is recognized in developed countries as the most common cause of food-borne bacterial gastroenteritis in humans. The illness associated with this microorganism is Campylobacteriosis. Epidemiological studies have revealed that consumption of poultry products is an important risk factor of this disease. Asymptomatic infections, watery diarrhea and dysentery-type illnesses of human have been reported as caused by this microorganism. Adherence to and invasion of host mucosal surfaces were proposed as essential steps in pathogenesis. In addition many cytotoxic activities have been reported but the significance in human disease are unclear.

Due to the improper use of antibiotics there are new bacterial strains which are multi-resistant. Therefore actions must be taken to reduce this problem. Actually the investigations are searching for new alternatives to controlling this microorganisms and the use of natural products of plants has been suggested.

In this study, we tested the effect of plants extracts of *Acacia farnesiana*, *Artemisia ludoviciana*, *Opuntia ficusindica* and *Synara scolymus* against the grow, adherence and cytotoxicity of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. The MBC founded were 0.3, 0.5, 0.4 and 2.0 mg/mL respectively. We tested the effect of subinhibitory concentrations (25, 50, 75% of MBC) of the four plants extracts mentioned above and they did not affect the grow of any strain tested . We found that *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit the supernatant cytotoxicity of *Campylobacter jejuni* against Vero cells. And *Synara scolymus* reduced in two fold dilutions the cytotoxicity. The adherence of *Campylobacter* was significativly affected by *Opuntia ficusindica* and *Synara scolymus*.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del género *Campylobacter*, existen 14 especies de las cuales *C. jejuni*, *C. coli*, y *C. fetus*, son las más frecuentemente aisladas en humanos. Estas bacterias, son bacilos Gram-negativos, con forma espiral y móviles por contar con un flagelo polar ó en ocasiones bipolar. Crecen óptimamente en atmósfera microaerofílica, en temperaturas de entre 37 y 42 °C (Konkel *et al.*, 2001).

Campylobacter jejuni/coli se considera responsable de una enfermedad conocida como campylobacteriosis cuyos síntomas incluyen: fiebre, náusea, dolor abdominal e incluso diarrea severa la cual pudiera ser sanguinolenta. La dosis infectiva para contraer campylobacteriosis se ha reportado de 500 a 800 células, en tanto que el período de incubación es de 2 a 7 días y comúnmente la enfermedad cede espontáneamente (Black *et al.*, 1988).

Como complicación a una campylobacteriosis en aproximadamente el 1% de los pacientes, se desarrolla del síndrome de Guillan Barré, el cual se presenta como una polineuropatía desmielinizante, que causa, una parálisis flácida, que puede derivar en la muerte (Nachamkin *et al.*, 1998).

Una infección por *Campylobacter jejuni/coli* se adquiere frecuentemente por manejo insalubre o consumo de pollo mal cocinado, aunque también por consumo de leche no pasteurizada y agua contaminada (Friedman *et al.*, 2000).

Actualmente se han desarrollado métodos más innovadores para evitar la contaminación microbiana en la industria alimentaria así como para combatir las infecciones por microorganismos (Forsythe, 2000).

Debido a la capacidad de adaptación a condiciones adversas, como los conservadores en alimentos, y del incremento a la resistencia a antibióticos que ciertas bacterias han desarrollado, se están buscando nuevas alternativas para combatirlos (Nachamkin *et al.*, 1998).

El uso de extractos de plantas como agentes antimicrobianos naturales y como aditivos en alimentos, recientemente ha tenido un gran impacto debido al interés de la población por un consumo "todo natural"; es por ello que los esfuerzos se han enfocado a la búsqueda de alternativas para el control de microorganismos tanto en la industria alimentaria como farmacéutica (Gustafson *et al.*, 1998).

Sin embargo, actualmente no solamente basta con saber que algunos compuestos naturales son efectivos sino que resulta de suma importancia, conocer el mecanismo de acción de extractos de plantas sobre la viabilidad de *C. jejuni/ coli* lo que permitirá sugerir alternativas viables para el control de estos microorganismos (Fields and Swerdlow, 1999).

Sabemos que México cuenta con una flora amplia y que desde mucho tiempo atrás se ha utilizado como "remedios" para enfermedades; sin embargo no hay una validación científica para ello. Debido a lo anterior, en este trabajo, se pretende encontrar uno o varios extractos de plantas, con capacidad para inhibir el crecimiento, la adhesión, la producción de toxinas de *C. jejuni* y *C. coli*, así como evaluar su posible mecanismo de acción.

2. HIPÓTESIS

Los extractos de plantas probados, poseen actividad biológica contra el crecimiento, la actividad citotóxica y la adhesión a células Vero de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento, la actividad citotóxica y la capacidad de adhesión a células de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar en forma preeliminar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra *C. jejuni* y *C. coli*.
- 2) Establecer la concentración mínima bactericida de los extractos de plantas que presentaron en los estudios preeliminares actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* y *C. coli*.
- 3) Determinar el efecto de las concentraciones subletales de los extractos biológicamente activos sobre el crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli*.
- 4) Evaluar el efecto de los extractos de plantas sobre la actividad citotóxica de *C. jejuni* y *C. coli* así como en su capacidad de adhesión a células Vero.
- 5) Caracterizar parcialmente los compuestos responsables de la actividad biológica.

5. ANTECEDENTES

5.1. *Importancia de Campylobacter.*

Las campylobacterias fueron descubiertas en 1886 por Theodor Escherich, debido al gran número de muertes infantiles que hubo en aquel tiempo y que llamó "cólera infantil"; Sin embargo, no fue sino hasta 1972 cuando Dekyser y Butzler aislaron a *Campylobacter* a partir de sangre y heces de una paciente joven con proceso febril y enteritis hemorrágica (Skirrow and Butzler, 2000).

La enfermedad asociada con *Campylobacter*, conocida como campilobacteriosis, incluye síntomas que van desde diarrea leve hasta severa, además puede incluir síntomas como fiebre, náusea y dolor abdominal (Black *et al.*, 1988).

La infección se adquiere en forma general, por mal manejo y consumo de pollo contaminado, aunque también por consumo de leche no pasteurizada y por agua contaminada (Friedman *et al.*, 2000). Aunque cerca del 90% de los casos son esporádicos y se presentan durante el verano, *Campylobacter* es el responsable de la mayoría de las infecciones intestinales alrededor del mundo afectando anualmente al 1.1% y 1% de la población de Reino Unido y Estados Unidos respectivamente (Hong *et al.*, 2004).

La incidencia real de casos, debido a los no reportados, se estima al menos 10 veces mayor a los casos documentados (Allos *et al.*, 2001). Debido a esto, *Campylobacter jejuni*, es considerada como la principal causa de diarreas a nivel mundial y aunque *C. coli* también es patógena para el humano, su incidencia es menor (Wassenar *et al.*, 2000).

La variabilidad en la expresión y severidad clínica de *Campylobacter* ha sido observada por muchos años. En un estudio realizado en niños, los datos clínicos

variaron desde infecciones asintomáticas hasta diarrea secretora y en unos cuantos casos, diarrea inflamatoria (Carvahlo *et al.*, 2001).

Otras presentaciones clínicas de la infección por *Campylobacter* incluyen, meningitis, bacteremia, infecciones extraintestinales localizadas, así como complicaciones inmuno-reactivas como es el caso de artritis reumatoide y del síndrome de Guillain Barré (Konkel *et al.*, 1998), éste último se presenta aproximadamente en el 1% de los pacientes después de la infección gastrointestinal, provocando una parálisis flácida, que puede derivar en la muerte (Nachamkin *et al.*, 1998).

Este amplio rango de manifestaciones clínicas, depende de la respuesta del hospedero y de las características del patógeno. Normalmente la infección no requiere hospitalización, únicamente se ingieren electrolitos para mantener al paciente hidratado (Peterson, 1994; Allos, 2001), en situaciones especiales como pacientes con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA) o mujeres embarazadas, se utilizan antibióticos.

Factores como el abuso de antibióticos en las dietas de aves de engorda, así como la automedicación, han contribuido a la emergencia de cepas de *Campylobacter* resistentes a antimicrobianos (Nachamkin, 2002). El incremento en el número de infecciones humanas, por este tipo de cepas de *Campylobacter*, hace muy importante a la campilobacteriosis (Fields and Swerdlow, 1999).

5.2. Factores de virulencia de *C. jejuni* y *C. coli*

La identificación y caracterización de factores de virulencia resulta de gran importancia en la investigación microbiológica; el conocimiento de la naturaleza, la regulación y mecanismo de acción de factores de virulencia es indispensable para la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Wassenaar, 1997).

Campylobacter posee un lipopolisacárido que le confiere cierta resistencia, endotoxicidad y adhesión (van Vliet and Ketley, 2001). Varios estudios han demostrado que el LPS de *Campylobacter* es similar al de *Haemophilus* y *Neisseria* spp (Logan and Trust, 1984; Konkel *et al* 2001).

Se ha establecido que dentro de la célula, *Campylobacter jejuni/ coli*, se transloca dentro de vacuolas hacia la superficie basolateral de la misma, donde la exocitosis puede ocurrir y entonces el microorganismo puede entrar en un estado viable no cultivable, que resulta de gran importancia para la virulencia del mismo (Forsythe, 2000; Kopecko *et al.*, 2001).

Para esta bacteria se han reconocido al menos cuatro principales factores de virulencia: movilidad, adherencia, invasión y producción de toxina (Walker *et al.*, 1986).

5.2.1. Movilidad.

El rol de la movilidad en la patogénesis está bien definido (Morooka *et al.*, 1985). La motilidad está ligada a dos proteínas FlaA y FlaB, pero específicamente a la síntesis de FlaA ya que los niveles de producción de FlaB son muy bajos. Se ha establecido que *Campylobacter* penetra la capa mucosa utilizando su flagelo polar, que es el responsable del movimiento de sacacorcho del mismo (Szymanski *et al.*, 1995).

Mutantes carentes de *flaA*, el principal gen para la síntesis de la proteína FlaA del flagelo, son incapaces de colonizar pollos de tres días de nacidos así como células intestinales de humano *in vitro* (Fields and Swerdlow, 1999). Es por ello que se considera a la adhesión e invasión, como procesos dependientes de movilidad y expresión flagelar de este microorganismo (van Vliet and Ketley, 2001).

5.2.2. Adherencia e invasión.

La adherencia de *Campylobacter jejuni/ coli* al tejido, es probablemente determinante para el desarrollo de la infección y podría incrementar la concentración de productos secretados por la bacteria (De Melo and Pechere, 1990). Según Ruiz-Palacios *et al.*, (1992), la habilidad de esta bacteria para adherirse e invadir células epiteliales se considera esencial para el desarrollo de la enfermedad.

La adhesión y la invasión de *C. jejuni/ coli* a líneas celulares, han sido ampliamente estudiadas (Konkel *et al.*, 1992). La adhesión de la bacteria a mucosas es necesaria para la colonización y subsecuentemente la patogénesis (Mc Swegan and Walker, 1986). Se ha demostrado que *C. jejuni* es capaz de adherirse a células humanas (INT407, Hep-2, HeLa, y 293), así como a células de origen animal (VERO, CHO-K1 y MDCK) con la misma eficiencia (Konkel *et al.*, 2001).

Sin embargo, esta habilidad de *C. jejuni* para invadir cultivos celulares, parece variar en cada cepa; Everest *et al.*, (1992), observaron diferencias significativas en el nivel de invasión entre *C. jejuni* aislado de individuos con colitis y de individuos con diarrea no inflamatoria ya que se determinó que aquellas cepas que provenían de individuos con colitis, tenían una mayor capacidad de adhesión (hasta en un 30%), que aquellas de individuos con diarrea no inflamatoria.

Mc Swegan y Walker (1986), trataron de inhibir la adhesión de *Campylobacter* a células epiteliales utilizando 14 azúcares que se añadieron al medio de cultivo, de los cuales, la fucosa y manosa, fueron los más inhibitorios, reduciendo la capacidad de adhesión hasta en un 47%.

Se ha comprobado que la quimiotaxis o atracción por agentes químicos, juega un papel muy importante en la adhesión de *C. jejuni/coli* al tejido, ya que se encontró en ratones que fueron inoculados con 110 UFC de *C. jejuni* nativa, una invasión activa,

no así cuando se inocularon con una cepa mutante para quimiotaxis. Las mutantes utilizadas, tenían el mismo tipo de flagelo que la cepa nativa (Takata *et al.*, 1992; van Vliet and Ketley, 2001).

De Melo y Pechére (1990), identificaron cuatro proteínas de membrana con una masa molecular aparente de 28, 32, 36, y 42 kDa, que podrían participar en la adhesión de *C. jejuni* a las células del hospedero. Otras moléculas propuestas como adhesinas son: el LPS, flagelo, así como la membrana externa (Konkel *et al.*, 2001).

Konkel y Cieplak (1992) encontraron que diferentes concentraciones en tratamientos con cloranfenicol (inhibidor específico de la síntesis de proteínas) no afectaron la capacidad de adhesión de *C. jejuni* a células epiteliales. Sin embargo, redujeron significativamente la internalización de las mismas. Por su parte, Ruiz-Palacios *et al* en el 2002, encontraron que la adhesión de *Campylobacter* a células HEp-2, fue inhibida por leche humana, así como por oligosacáridos de la misma leche.

Lee *et al* (2004) determinaron la capacidad de adhesión e invasión de 42 aislados de *C. jejuni* de animales domésticos (perros, gatos, cabras y ovejas), encontrando que el 50% fueron capaces de adherirse a células epiteliales, y de éstas el 28.6% invadieron estas mismas células. De la misma manera encontraron que la capacidad de invasión de *C. jejuni* se vio disminuida después de varios pasos de éste *in vitro*.

Lengsfeld *et al* (2007), investigaron la influencia de extractos acuosos obtenidos de la fruta de la Okra, enriquecidos con polisacáridos, sobre la adhesión de *C. jejuni* en pollo, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ellos encontraron que *in vitro* el extracto completo no tenía un efecto significativo en la inhibición de la adhesión, en tanto que los polisacáridos sí. Sin embargo cuando se realizaron los experimentos *in vivo* no se encontraron efectos significativos entre ambos.

5.2.3. Toxinas

5.2.3.1. Enterotoxina.

El mecanismo exacto por el cual *C. jejuni/coli* produce la enfermedad en humanos aún se desconoce. Un gran número de cepas de *Campylobacter*, incluyendo *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*, *C. fetus* y *C. upsaliensis* producen varias toxinas, entre las más importantes se encuentran la enterotoxina y una toxina citoletal distensora (CDT) (Mooney *et al.*, 2001);

Según Spangler (1992), las enterotoxinas se definen como secreciones proteicas con la capacidad de unirse a un receptor, entrar a la célula y elevar los niveles de AMP cíclico intracelular. Los prototipos más comunes de enterotoxina son: toxina de *Vibrio cholerae* (CT) y la toxina termolábil de *E. coli* (LT) (Tamplin *et al.*, 1988).

La actividad de la enterotoxina de *C. jejuni / coli* fue documentada por primera vez en 1983, encontrándose evidencias de que las enterotoxinas y citotoxinas pudieran estar involucradas en la patogénesis de la enteritis producida por *Campylobacter* (Ruiz-Palacios *et al.*, 1983). Se encontró que los sobrenadantes de cultivos de *C. jejuni* causaban una secreción intraluminal en los modelos RILT (Rat Ileal Loop Test), además de causar elongación y muerte (efecto citotóxico) en las células de ovario de hámster (CHO) así como aumento intracelular del AMP cíclico *in vitro*.

Posteriormente se determinó que la enterotoxina de *C. jejuni* podía neutralizarse con anticuerpos contra la toxina de *V. cholerae* (CT) así como la toxina termolábil de *E. coli* (LT), lo que sugirió una similaridad inmunológica con estas dos toxinas (Klipstein *et al.*, 1986; Ruiz- Palacios *et al.*, 1983; Goossens *et al.*, 1985).

Debido a esto, es posible aplicar un método alternativo independiente de cultivo celular para la identificación de la enterotoxina, basado en la propiedad de la misma para adherirse al receptor celular gangliósido GM1 (Klipstein *et al.*, 1986).

Este método llamado ELISA GM1, puede realizarse con anticuerpos antiCT o antiLT utilizando el gangliósido GM1 como fase sólida.

Johnson y Lior (1984) observaron el efecto de la enterotoxina en células CHO y en Y-1 donde determinaron que las condiciones del cultivo afectaron la producción de enterotoxina. Por ejemplo suplementos como el IsoVitale X, incrementó la producción de la misma, debido posiblemente al hierro que contiene. Esto concuerda con Mc Cardell *et al.*, (1986) quienes comprobaron que cuando se variaba la cantidad de hierro en el medio, también variaba la cantidad de enterotoxina producida.

Klipstein y Engert (1985), demostraron que la enterotoxina, podía ser concentrada por precipitación con sulfato de amonio y ser parcialmente purificada en columna de galactosa-agarosa o por cromatografía de afinidad con gangliósidos o utilizando anticuerpos anti CT. Con ello obtuvieron una fracción que al ser separada en gel de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS- PAGE), se evidenció una banda de 70 kDa. Cuando estos ensayos fueron repetidos por Daikoku *et al.*, (1989), se obtuvieron tres bandas (68, 54 y 43kDa) por lo que a la enterotoxina se le atribuyó un peso de entre 68-70 kDa.

Kawaguchi *et al.*, (1989) encontraron que el efecto citotóxico de los sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de *C. jejuni* sobre células CHO o modelos RILT, aumentó cuando éste se sometió a un tratamiento con polimixina B, sin embargo si el tratamiento se prolongaba, la actividad disminuía. Este último efecto se observó cuando se sonicaba a la célula, debido probablemente a la liberación de proteasas.

5.2.3.2. Citotoxinas.

Las citotoxinas son definidas como proteínas que matan blancos celulares; éstas pueden actuar intracelularmente o desde los poros en la célula. Tienen actividad intracelular, generalmente se adhieren a la célula blanco y son procesadas antes de que lleguen al citoplasma. Existen diferentes mecanismos de toxicidad entre los cuales predominan la inhibición de la síntesis de proteínas y la inhibición de la formación de filamentos de actina. Ejemplos de las citotoxinas mas comunes son: Toxina de *Shigella dysenteriae* (Shiga-toxin o Stx) y *E. coli* Shiga-Like toxin, también conocida como verotoxina (Obrig, 1994).

A pesar de las investigaciones realizadas en este campo, la literatura sobre la detección de la actividad citotóxica en *Campylobacter* es muy confusa. En cada estudio, varía la línea celular utilizada, así como las condiciones de cultivos y los tipos de cepas. En base a la comparación de pesos moleculares, se propone la existencia de seis citotoxinas: (i) citotoxina de 70 kDa activa en líneas celulares como HeLa (células humanas de cáncer cervico-uterino), CHO (células de ovario de hámster) y otras, e inactiva en Vero (células de riñón de mono verde); (ii) Citotoxina activa en Vero y HeLa; (iii) Citotoxina Citoletal Distensora (CDT); (iv) citotoxina neutralizable con antitoxina –Stx; (v) una citotoxina con actividad hemolítica; (vi) y una hepatotoxina (Wassenaar, 1997).

La toxina citoletal distensora (CDT) producida por *Campylobacter* spp. fue descrita por primera vez en 1988. Las líneas celulares CHO, Vero, He-La y HEp-2 son sensibles a ésta, mientras que las células Y-1 no lo son (Wassenaar, 1997).

La actividad de CDT en cultivos celulares se hace evidente por la distensión celular caracterizada por elongación e hinchazón de casi cinco veces su tamaño normal, lo cual refiere un efecto citotónico (Johnson and Lior 1988; Konkel, 2001).

Esta citotoxina, causa una distensión celular progresiva debida al arresto irreversible en la transición de las fases G2/M del ciclo celular y por consiguiente inducir la muerte celular del hospedero (Kopecko *et al.*, 2001; Newel, 2001).

En el año de 1996, Pickett *et al.*, clonaron y secuenciaron los genes productores de CDT; encontrando que los genes responsables de la producción de esta toxina, eran *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*. Determinaron que estas toxinas estaban relacionadas con las de *E. coli* y que además *C. jejuni* producía más concentración de toxina que *C. coli*.

Dang *et al.*, (2001), relacionaron la presencia del gen *cdt* y la capacidad de *Campylobacter* para producir CDT. Ellos evaluaron la producción de la misma en células Vero y determinaron la presencia del gen por una técnica de biología molecular, encontrando que el gen estaba presente tanto en *C. jejuni* como en *C. coli*, y ambas presentaban efectos citotóxicos sobre la línea celular antes mencionada. Sin embargo, *C. coli* produjo una menor cantidad de toxina y en dos casos niveles no detectables de la misma.

Durante las primeras 24h de incubación, los efectos de la enterotoxina y la CDT son indistinguibles, ya que se ha observado que ambas incrementan el AMPc intracelular (Manal-AbuOun *et al.*, 2005); sin embargo, las diferencias entre ambas después de la inoculación en cultivos celulares, son evidentes desde las 72h (Johnson and Lior, 1988).

Jonson y Lior (1986) encontraron que una cepa de *Campylobacter* puede tener tanto efecto citotónico (CYTON, inflamación celular) así como citotóxico (CYTOX, destrucción celular). Ellos probaron los sobrenadantes de *C. jejuni* sobre varias líneas celulares (Y-1, Vero, CHO). De acuerdo a los cambios morfológicos de estas, determinaron que las células más sensibles a los efectos citotóxicos fueron las VERO y las células CHO lo fueron a los efectos citotónicos.

En el 2003, Nadeau *et al.*, compararon las propiedades de virulencia *in vitro* de *Campylobacter* spp. aisladas de pollos y humanos, encontrando que todas las cepas tenían capacidad de adhesión, así como efecto citotóxico en células INT-407 y CHO; mientras que las células VERO presentaron una sensibilidad variable. Además se encontró que aquellas cepas aisladas de humanos presentaron mayor invasividad y toxicidad sobre estas células que las aisladas a partir de pollo.

Engberg *et al.*, (2005), evaluaron la producción de CDT en cepas de *Campylobacter* aisladas a partir de pacientes con diarrea y asintomáticos. De estas cepas aisladas, se obtuvieron sobrenadantes para observar los efectos citotóxicos de las mismas sobre la línea celular Vero, encontrando que el 90% de las cepas aisladas de ambos tipos de pacientes producían efectos citotóxicos hasta en títulos altos (1:64).

5.3. Compuestos de plantas

Las plantas superiores han servido desde los inicios de la humanidad, como fuente de compuestos fitoquímicos con actividad biológica (Kinghorn y Balandin, 1993). Sabemos que muchas plantas que contienen compuestos biológicamente activos, aún no han sido estudiadas biológica ni fitoquímicamente, y de las que sí se han estudiado, sólo pocos compuestos han sido caracterizados de una forma adecuada (Duke, *et al.*, 2000).

A lo largo del siglo XIX y en la primera mitad del siglo XX, se descubrieron muchos compuestos bioactivos al analizar los ingredientes de las plantas (Duke, *et al.*, 2000). Con ello se evidenció que las plantas son una fuente invaluable de un amplio rango de metabolitos secundarios los cuales son usados como farmacéuticos, agroquímicos, saborizantes, fragancias, colores, biopesticidas y como aditivos en los alimentos (Rao *et al.*, 2002; Ravishankar *et al.*, 2008). Esta estrategia hasta la fecha se mantiene, a pesar de que hace algunas décadas el interés en este tipo de compuestos

se vio disminuido, debido al desarrollo de la industria química, farmacéutica y agrícola; por lo que los nuevos productos disponibles se basaron únicamente en desarrollos sintéticos (Duke, *et al.*, 1992).

Desde hace algunos años se ha resurgido el interés en las plantas debido, por una parte, a la tendencia actual de consumo de lo más natural; y por el otro a que las plantas continúan siendo una excelente fuente de productos nuevos, como antimicrobianos y otros compuestos bioactivos (Duke, *et al.*, 1985; Rao and Ravishankar, 2002).

Dentro de los principales grupos de compuestos que pueden encontrarse en las plantas que han mostrado actividad biológica, se encuentran los compuestos fenólicos y polifenólicos, donde se incluye un grupo muy amplio de familias químicas como lo son las quinonas, las flavonas, los flavonoides, los flavonoles y las cumarinas (Mendoza, *et al.*, 1997). De la misma manera se encuentran compuestos terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas, polipéptidos y también otros compuestos menos estudiados como poliaminas, isotiocianatos, tiosulfatos y glucósidos (Cowan, 1999).

Recientes estudios epidemiológicos, indican que las dietas ricas en frutas y vegetales, están asociadas con baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes. Estos efectos protectivos, están ligados a la presencia de antioxidantes, vitaminas y fitoquímicos fenólicos que, se ha reportado, tienen dicha actividad (Dixon, *et al.*, 1983; Vatterm *et al.*, 2005). Por ejemplo el ajo (*Allium sativum*), es uno de los productos naturales con efectos protectivos. Esta planta se utiliza tradicionalmente en dietas alimenticias y ahora se conoce su aplicación como agente anti-infectivo. Además se ha comprobado la actividad antimicrobiana del extracto fresco del mismo (Ross *et al.*, 2001). Por otro lado las fitoalexinas extraídas

comúnmente de la zanahoria, presentan actividad fungicida en contra de hongos fitopatógenos (Hoult *et al.*, 1996). Y aunque se ha visto la actividad antimicrobiana de este grupo de compuestos, el modo de acción de ellos no se ha esclarecido por completo. Otros fitoquímicos como la proflavina pueden actuar sobre ribosomas afectando el proceso de traducción del RNA mensajero (Miall *et al.*, 1967) o inhibiendo la síntesis de polinucleótidos en *E. coli* (Kadohama *et al.*, 1971).

Los grupos trifenilmetano y las acridinas se han considerado potencialmente antimicrobianos ya que se ha establecido que las segundas compiten con protones por sitios aniónicos en la superficie de la célula y se combinan con muchos sitios dentro de la célula bacteriana, entre ellos, el DNA (Porkorny *et al.*, 1983; Haslam, 1996).

Otros fitoquímicos son fenoles, alcoholes y bisbiguanidas los cuales son pequeñas moléculas y se ha visto que pueden penetrar a la célula con facilidad, donde las bacterias Gram-positivas son generalmente muy sensibles a esta clase de agentes antimicrobianos (Russell, *et al.*, 1999; Walsh and Bartolo, 2003). En forma particular los compuestos fenólicos son hidrofóbicos por naturaleza y activos contra membranas (Geissman, 1963; Hugo, 1978).

Se ha demostrado que los aceites esenciales de plantas como el orégano, tomillo y árbol del té (Cox, 2000) o bien, sus constituyentes fenólicos (carvacrol, eugenol y timol) actúan contra patógenos bacterianos y levaduras, debido a que estos compuestos perturban la membrana celular generando una pérdida en el control quimiosmótico y finalmente la muerte celular (Lambert, *et al.*, 2001).

Los taninos son compuestos polifenólicos que según se ha reportado poseen propiedades astringentes, y que se encuentran en casi todas las partes de las plantas como ramas, tallo, fruto y raíz (Scalbert *et al.*, 1991).

Las catequinas han captado gran interés por presentar una fuerte actividad antimicrobiana. Estos compuestos pueden encontrarse en extractos de algunas plantas como *Camellia sinensis*, en la cual se encuentran epicatequinas, galato de epigallocatequinas y otros más (Nagayama *et al.*, 2002; Tada *et al.*, 1988).

Así mismo, los alcaloides incluyen otro tipo de compuestos, comúnmente aislados de las plantas de la familia *Ranunculaceae* y que presentan fuerte actividad antimicrobiana (Atta-ur-Rahman *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1986).

Otro grupo de compuestos considerados fitoquímicos con actividad antimicrobiana, incluyen las poliaminas (Flayeh *et al.*, 1987), isotiocianatos, tiosulfatos y glucósidos (Iwu *et al.*, 1991; Murakami *et al.*, 1993; Tada *et al.*, 1988). Sin embargo, no se ha elucidado completamente su actividad antimicrobiana.

México es uno de los países con más riqueza en especies vegetales y es por ello que no sorprende que las plantas medicinales aparezcan como uno de los recursos más sobresalientes del arsenal del terapeuta tradicional. El estudio de compuestos activos, su purificación y utilización ha ido en aumento, sin embargo aún falta mucho por conocer (Rao and Ravishankar, 2002). De ahí el presente trabajo.

5.4. Actividad de plantas sobre Enteropatógenos.

En nuestro país, la Secretaría de Salud ha demostrado que uno de los principales problemas de salud que atañen a la población son las enfermedades gastrointestinales, que son debidas principalmente al consumo de agua y alimentos contaminados con microorganismos. Una de las alternativas actuales para la conservación de los alimentos o el control de la proliferación de microorganismos patógenos o deteriorantes es el uso de antimicrobianos naturales, los cuales van acordes con la tendencia mundial de volver a lo natural, así como la necesidad de encontrar nuevas alternativas a las cuales los microorganismos no hayan establecido mecanismos de resistencia (McDevitt *et al.*, 2002).

Se han reportado datos importantes sobre el efecto antimicrobiano de diferentes compuestos. Entre ellos mencionaremos el realizado por Vanhoof *et al.*, (1980) quienes probaron el efecto bacteriostático y bactericida de 24 agentes antimicrobianos (penicilina G, ampicilina, amoxicilina, entre otros) contra *Campylobacter jejuni* aislada de heces humanas. En el trabajo se encontró un alto grado de resistencia (23%) a estos antimicrobianos y la eritromicina fue la que presentó menor resistencia contra estos microorganismos. Con este antecedente se discutió la necesidad de nuevas alternativas para el control de estos microorganismos.

Con respecto a los compuestos antimicrobianos de plantas, Fernández de Celaya, *et al.*, (1972), demostraron que la fabitina (un péptido aislado del frijol que es muy semejante a la tioniina) inhibió el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus hirae*. Posteriormente, algunos experimentos mostraron que los extractos de *Prosopis juliflora*, poseían actividad inhibitoria contra de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus* (Aqeel *et al.*, 1989)

Así mismo Paulo *et al.* en 1994, demostraron la actividad antimicrobiana del extracto alcohólico de *Cryptolepis sanguinolenta* (una planta utilizada en la medicina tradicional del este de África), contra *Campylobacter* spp. y *Vibrio cholerae*. Un año después Tassou *et al.*, (1995) encontraron efecto antimicrobiano del aceite de menta (*Menta piperita*) contra *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. Así mismo Jones *et al.*, (1997) reportaron que la capsaicina, compuesto extraído del chile, tenía efecto inhibitorio contra *Helicobacter pylori* así como contra *Candida albicans*.

En otro estudio se demostró la actividad antimicrobiana de una planta medicinal utilizada en Guinea llamada *Terminalia marcoptera*, la cual mostró actividad antimicrobiana contra el crecimiento de *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Campylobacter* spp. (Silva *et al.*, 1997).

Smith –Palmer *et al.*, (1998), reportaron la actividad antibacteriana de aceites esenciales de canela, clavo y tomillo contra *Campylobacter* spp, *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*, siendo *Campylobacter* el más resistente. Se encontró también que el clavo y tomillo fueron los aceites que ofrecieron mayor inhibición teniendo una concentración bacteriostática al 0.075% contra todas las bacterias mencionadas.

Satish *et al.*, (1998) probaron el efecto de extractos acuosos de 30 plantas contra *Xantomonas campestris*, bacteria que ocasiona manchas en las hojas o caída de éstas y que se refleja en pérdidas económicas importantes en los cultivos de algunas plantas. Ellos reportaron que ocho de las plantas probadas mostraron mejor actividad destacando entre ellas: *Acacia arabica*, *Achras zapota*, *Lawsonia inermis* y *Viscum orientale*. Aún cuando la susceptibilidad de esta bacteria varió con cada planta, ésta fue similar al efecto causado por antibióticos (bacteriomicina y estreptociclina).

Así mismo se comprobó la susceptibilidad antimicrobiana de algunas bacterias como *Pseudomonas* spp. hacia el extracto crudo de *Myrtus communis*, planta tradicional Iraní (Manssouri *et al.*, 2001). Por otro lado, Lambert *et al.*, (2001), reportaron la acción bactericida del aceite esencial de orégano contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* encontrando que la primera fue mas susceptible.

En el año de 2002, Nagayama y su grupo de colaboradores, examinaron la actividad bactericida de algunos compuestos (fluorotaninos) extraídos de algas café en contra de *Staphylococcus* meticilina-resistente, *Streptococcus pyogenes* y algunas otras bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales.

Estos compuestos se compararon con el efecto producido por las catequinas, donde se determinó que los fluorotaninos presentaron mayor efectividad que las catequinas, siendo *Campylobacter* spp. el más sensible a concentraciones de

0.003 μ mol/ml mientras que las otras bacterias, aunque también presentaron susceptibilidad, lo hicieron a concentraciones mayores. Estos estudios se suman a los resultados reportados por Tsuchya *et al.*, (1996), en donde se encontró actividad antimicrobiana de flavonolas contra *S. aureus* meticilina-resistente.

Friedman *et al.*, (2003), evaluaron la actividad de 35 benzaldehidos, 34 ácidos benzoicos y un ácido benzoico-metil-ester contra *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, y *S. enterica*. Ellos encontraron que de los 70 agentes probados, 24 mostraron una muy buena actividad antimicrobiana contra las cuatro bacterias. En el caso de *C. jejuni*, se evidenció que fue cien veces más susceptible que las otras bacterias. Además se determinó que el grupo aldehído fue más activo como antimicrobiano que el grupo carboxilo.

Ziwei y Gauri (2003) probaron los efectos de algunos extractos de plantas contra microorganismos que pueden contaminar a la sidra de manzana, entre ellos *E. coli* O157:H7. Encontraron que el clavo y la menta disminuían la cantidad de estos microorganismos hasta en 2 y 3 logaritmos. Notaron una disminución de hasta 6 logaritmos, cuando la sidra tuvo un tratamiento previo de 45°C. Se concluyó, de acuerdo a los resultados, que el clavo fue el que poseía el mayor efecto antimicrobiano y cuando se sometía la muestra a un tratamiento previo se incrementaba la actividad antimicrobiana de todos los extractos.

Fitzgerald *et al.*, (2004) comprobaron que la vainillina (compuesto fenólico de la vainilla) posee actividad inhibitoria contra el crecimiento de *E. coli*, *Lactobacillus plantarum* y *Listeria innocua*.

Por su parte, Dadalioglu y Akademir (2004) evaluaron los efectos bactericidas de los aceites esenciales del orégano, laurel y lavanda sobre *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*; los estudios revelaron que el orégano

presentó una fuerte actividad antimicrobiana en concentraciones de 5µl/ml para *Salmonella*, 80µl/ml para *Listeria*, y 80µl/ml para *E. coli*. En este mismo estudio, se determinó por cromatografía de gases, que los componentes principales de estos aceites eran carvacrol (68.23%), cinolona (60.72%), fenconona (55.79%), y trans-anetola (85.63%).

Kisko y Roller (2005) evaluaron la capacidad antimicrobiana de los compuestos puros carvacrol y *p*-cymeno (tanto en forma individual como combinados) en muy bajas concentraciones (0.25-1.25mM) adicionándolos en jugos frescos de manzana (no pasteurizados) para medir su efecto sobre *E. coli* O157:H7 y así poder contar con una alternativa natural para eliminar a este patógeno sin que el jugo sea sometido al proceso normal de pasteurización, ya que este puede afectar las propiedades nutritivas del mismo. Se encontró que la combinación de ambos compuestos redujo significativamente la carga microbiana e inhibió al patógeno mencionado, y con ello aumentó la vida de anaquel del producto.

5.5. Actividad de plantas sobre la producción de toxinas

Con respecto al efecto de extractos de plantas sobre la producción de toxinas de microorganismos, Sakagami *et al.*, (2001), probaron el efecto de varios extractos de plantas sobre el crecimiento y la producción de verotoxina de *E. coli* O157:H7, encontrando que cuatro plantas (*Limonium californicum*, *Cupressus lustanica*, *Salvia urica* y *Jusieaea peruviana*) fueron efectivas aún en concentraciones más bajas que la CMB inhibiendo la producción de toxina, y no afectando el crecimiento de la bacteria.

Por otro lado Smith y Palmer (2004), investigaron la habilidad de las concentraciones subinhibitorias de aceites esenciales de plantas, para inhibir la producción de enterotoxinas A, B y α -toxina de *S. aureus*. Los aceites probados fueron canela, clavo, tomillo, nuez moscada y laurel.

De acuerdo a los resultados, no se encontraron efectos significativos en la inhibición de la producción de toxina pero sí en la capacidad para producir hemólisis (α -toxina). La inhibición de la misma pudo deberse a un efecto en algún punto de la síntesis de proteínas: transcripción, traducción, transporte o incluso una inactivación directa.

Desde hace tiempo se ha trabajado en nuestro laboratorio en la búsqueda de extractos de plantas con actividad contra bacterias enteropatógenas. A la fecha se han analizado más de 500 plantas, habiendo encontrado resultados satisfactorios con varias de éstas, sin embargo, en 3 de ellas, los resultados han sido muy alentadores. Se ha determinado que extractos de *Haematoxylon brasiletto*, *Acacia farnesiana* y *Artemisia ludoviciana* actúan inhibiendo el crecimiento de *Vibrio cholerae* y *Clostridium perfringens* (Alarcón, 2002; Araiza, 2001).

Aún más, se estableció que cuando concentraciones menores a la CMB de estos extractos se pusieron en contacto con los microorganismos, provocaron la inhibición de la producción de sus toxinas (García *et al.*, 2004a y García *et al.*, 2002) y en el caso de *V. cholerae* también provocan una disminución estadísticamente significativa de la adhesión de la bacteria a la línea celular Vero (García *et al.*, 2004a y García *et al.*, 2004b). Para el caso de *H. brasiletto* se ha establecido que el compuesto responsable de tal actividad es un dímero de brasileína, el cual es de característica polifenólica. Debido a todo lo anterior, resulta de gran interés la búsqueda de extractos de plantas activos, lo mismo que la determinación del mecanismo de acción de los fitoquímicos en la viabilidad o en los factores de virulencia de estos enteropatógenos (Toda *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1996).

Las investigaciones deben centrarse en desarrollar nuevos métodos y productos para reducir la presencia de *Campylobacter* en pollos de crianza y alimentos así como alternativas terapéuticas para el tratamiento de pacientes (Snelling *et al.*, 2005).

Por lo que la realización de este trabajo, contribuye con las investigaciones centradas en desarrollar una validación científica del uso de plantas medicinales, y mediante la elucidación del modo de acción, sugerir alternativas para el control de estos microorganismos de ahí el presente trabajo.

6. METODOS

6.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron: *Campylobacter jejuni* NADC 5653 proporcionada por la Dra. Irene Wesley del Centro Nacional de Enfermedades Animales del USDA, Ames, Iowa; *C. jejuni* 180 ip (Donada por el Dr. Guillermo Ruiz Palacios del Departamento de Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Ciencia Médica y Nutrición “Salvador Zubirán” México D.F.); y *C. coli* 1 (nativa, aislada de ave) del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Los cultivos se mantuvieron en alícuotas en ultracongelación a -80°C en medio infusión cerebro y corazón (ICC) adicionado con 0.6% de extracto de levadura y glicerol como crioprotector (García y Uruburu, 2000). Para la activación de las cepas se tomó una asada del medio de reserva y se sembró en placas de agar Mueller Hinton (Bioxon) adicionado con 5% de sangre hemolizada. Las placas se incubaron a 42°C por 48h bajo condiciones de microaerofilia (10%CO₂) (Ravishankar *et al.*, 2008).

Una vez activadas, las cepas fueron ajustadas en un espectrofotómetro (Sequoia Turner mod.) a 620nm hasta alcanzar una absorbancia de 0.45-0.5 que equivalía a una concentración celular aproximada de 5-9 X 10⁷ células (Friedman *et al.*, 2002).

6.2. Línea celular

En este estudio se utilizó la línea celular Vero (riñón de mono verde) donada por el Dr. Juan Francisco Contreras del Departamento de Microbiología e Inmunología de La Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

Las monocapas celulares se mantuvieron en medio D-MEM (Invitrogen) suplementado con 3% de suero fetal de bovino (Invitrogen) y 1% de L- glutamina (Invitrogen) y fueron incubadas con 5% de CO₂ a 37°C. Una vez obtenido el crecimiento en confluencia, las células fueron disgregadas por tripsinización, utilizando tripsina (Invitrogen) al 0.25mM; éstas se depositaron en placas de 96 y/o 24 pozos para ensayos posteriores.

6.3. Plantas utilizadas

Las plantas utilizadas en este estudio (Tabla 1) fueron colectadas en supermercados de Monterrey N.L y su área metropolitana; a excepción del Huizache el cual fue colectado en los jardines de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y el Nopal que fue proporcionado por el jardín botánico de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

Tabla 1. Nombre común y científico así como partes de las plantas utilizadas en nuestros ensayos.

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Toda la planta
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i>	Toda la planta
Blue Berrie	<i>Vaccinum angustifolia</i>	Fruto
Cacahuate	<i>Arachis sp.</i>	Fruto
Cacahuate c/c	<i>Arachis sp.</i>	Fruto y cascara
Calabaza	<i>Curcubita pepo</i>	Fruto
Camote	<i>Ipomea batata</i>	Raíz
Chicosapote	<i>Manilkara zapota</i>	Fruto
Chile morrón	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
Chile piquín	<i>Copsicum frutescens</i>	Fruto
Chile poblano	<i>Capsicum sp.</i>	Semilla

Tabla 1. (Continuación)

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Chile poblano	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Tallo y hoja
Ciruela	<i>Prunus domestica</i>	Fruto
Ciruela pasa	<i>Prunus domestica</i>	Fruto
Coco	<i>Cocus nucifera</i>	Fruto
Cranberry	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	Polvo
Durazno	<i>Prunus sp.</i>	Fruto
Espárrago	<i>Asparagus officinalis</i>	Tallo y hoja
Estafiate	<i>Artemisia ludoviciana</i>	Tallo y hoja
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i>	Fruto
Hierbabuena	<i>Menta viridis</i>	Toda la planta
Huizache	<i>Acacia farneciana</i>	Tallo y hoja
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i>	Fruto
Mango	<i>Magnifera sp.</i>	Fruto
Melón Chino	<i>Cucumis melo</i>	Fruto
Nabo	<i>Brassica napus</i>	Raíz
Nopal	<i>Opuntia ficus</i>	Tallo
Orégano	<i>Poliomintha longiflora</i>	Tallo y hoja
Piña	<i>Anana comosus</i>	Fruto
Uva pasa	<i>vittis sp.</i>	Fruto
Vaina mezquite	<i>Prosopis glandulosa</i>	Fruto
Yerbaniz	<i>Tagetes filifolia</i>	Toda la planta
Yuca	<i>Yucca filifera</i>	Flor
Zacate limón	<i>Cymbopogun citratus</i>	Tallo y hoja

6.4. Obtención del extracto.

Se pesaron 20g de la planta utilizada y se trituraron en una licuadora (Osterizer mod. Classic) después se agregaron 100 ml de metanol absoluto como solvente de extracción. Se dejó macerando por 48h a temperatura ambiente, se filtró utilizando papel Whatman #1 y se dejó secar en platos de vidrio a temperatura ambiente hasta sequedad, una vez evaporado totalmente el solvente, los extractos fueron resuspendidos en 10 ml de metanol y/o PBS pH 7.2 (García *et al.*, 2004a).

6.5. Determinación del peso seco.

Para obtener el peso seco de cada extracto, se tomó 1ml de cada uno de ellos y se colocaron en tubos de ensaye previamente tarados; estos fueron colocados en una estufa a 50°C hasta obtener de nuevo un peso constante. Después se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la concentración del extracto (García *et al.*, 2004b) en mg/ml según la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco} = [\text{Peso del tubo} + \text{Peso del extracto}] - \text{peso del tubo}$$

6.6. Ensayos preeliminares de Susceptibilidad Antimicrobiana.

Para evaluar en forma preliminar el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas obtenidos, se utilizó el método de difusión del pozo en agar (Alarcón, 2002). El cual consistió en inocular 100 µl de las cepas bacterianas activadas, sobre placas Petri con agar Mueller Hinton adicionado con 5% de sangre hemolizada. Se sembró por extensión con una asa de Driglasky para posteriormente realizar pozos en el agar, utilizando un tubo Durham invertido (5 mm de diámetro). En cada pozo se agregaron 100 µl de los extractos a probar; como blanco se adicionó a uno de los pozos metanol o PBS. Las placas se incubaron a 42° C por 48 h en condiciones de microaerofilia (10% CO₂). El efecto del extracto se determinó mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo. De todas las plantas probadas se seleccionaron aquellas que presentaron dicha inhibición, para realizar los ensayos posteriores.

6.7. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el método propuesto por García *et al.*, (2004 a, b) en el cual se utilizaron tubos con 5 ml de caldo ICC (infusión cerebro y corazón, BBL) suplementado con 0.6% de extracto de levadura, a los cuales se les agregaron diferentes concentraciones de los extractos con actividad biológica, mas 50 µl del microorganismo ajustado a una concentración aproximada de 1×10^7 células/mL. Los cultivos se incubaron a 42°C / 48h en condiciones de microaerofilia. Trascurrido este tiempo, se tomaron 100 µl de cada tubo y se realizó una siembra por extensión en placas de agar Muller Hinton con 5% de sangre hemolizada. Las placas se incubaron a 42°C /48h en condiciones de microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación se determinó la CMB la cual se definió como la concentración mas baja del extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano.

6.8. Determinación del efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento microbiano.

Para determinar el efecto de la aplicación de concentraciones subletales de cada extracto sobre el crecimiento microbiano se utilizaron concentraciones del 25, 50 y 75% de la CMB. Dichas concentraciones se sembraron en tubos con ICC adicionado con 0.6% de extracto de levadura. Una vez sembrado el cultivo bacteriano con las concentraciones subletales se incubaron por 48h a 42°C en microaerofilia. Para el conteo microbiano se tomó una alícuota de 200µl y se realizaron diluciones decimales seriadas con solución salina fisiológica estéril (0.85% NaCl) (Ravishankar *et al.*, 2008), de cada dilución se tomó una alícuota y se sembró por extensión en placas de agar Muller Hinton suplementado con 5% de sangre hemolizada. Las placas se incubaron a 42°C por 48h en microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación se determinó el conteo de unidades formadoras de colonias. Como controles de crecimiento se utilizaron las cepas que no tuvieron contacto con el extracto (control) y las cepas incubadas con el solvente utilizado para los extractos (blanco).

6.9. Obtención de sobrenadantes para ensayos de citotoxicidad.

Las cepas activadas se cultivaron en caldo ICC adicionado con 0.6% de extracto de levadura enriquecidos con 1% de IsoVitaleX (BBL Microbiology System) a 42°C en condiciones de microaerofilia, y se les adicionó el extracto de planta a probar en la concentración subletal del 75% de la CMB; las cepas se incubaron en agitación (118 rpm) a 42°C con 10% de CO₂. El crecimiento bacteriano fue evaluado a las 48h, tiempo en el cual, se le adicionaron 2 mg/ml de polimixina B y se incubaron durante 10 minutos más en las mismas condiciones (esto con el fin de que se produzca la mayor cantidad de toxina posible).

Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm por 20 min a 5°C. El sobrenadante fue esterilizado a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm, se liofilizó y se almacenó a -20°C para su posterior análisis de citotoxicidad. Los sobrenadantes se utilizaron en un período no mayor a dos semanas (Klipstein, 1985; Johnson and Lior 1988; Bag *et al.*, 1997).

Para evaluar el efecto citotóxico *per sé* de cada cepa, éstas se cultivaron de la misma manera antes mencionada pero sin la adición de los extractos. Para asegurar que la citotoxicidad no fue producida por el extracto o componentes adicionados, se utilizó como control, el medio ICC adicionado con IsoVitaleX, polimixina B y el extracto probado (liofilizados y resuspendidos de la misma manera antes mencionada).

6.10. Ensayo celular para determinar citotoxicidad.

El método utilizado fue de acuerdo a Klipstein *et al.*, (1985) con algunas modificaciones. Se utilizaron monocapas de la línea celular Vero (Riñón de mono verde) las cuales fueron cultivadas en medio D-MEM (Invitrogen) suplementado con 3% de suero fetal bovino (Invitrogen), 1% L-glutamina (Invitrogen) y se incubaron con 5% de CO₂ a 37°C hasta alcanzar confluencia. La monocapa fue disgregada por tripsinización. La suspensión celular fue ajustada a una concentración de 10³ cel /ml aproximadamente; de esta suspensión se tomaron 150µl los cuales fueron agregados a

placas de 96 pozos para microtitulación. Las células fueron incubadas por 24-48 h con 5% de CO₂ a 37°C, para permitir la adherencia y confluencia de las mismas antes de agregar los sobrenadantes. Después del tiempo de incubación, se agregaron 100µl de los sobrenadantes liofilizados (resuspendidos en 600µl de agua miliQ estéril), se hicieron diluciones dobles seriadas y se incubaron de nuevo en las mismas condiciones antes mencionadas. Transcurridas 24 h y 48 h, las células se observaron bajo microscopio invertido y se compararon los efectos producidos tanto por los sobrenadantes de *Campylobacter*, como por los obtenidos de cultivos de *Campylobacter* más 75% de la CMB. Después de la incubación, se determinó si se presentó muerte celular (células redondeadas) o en su defecto distensión celular (inflamación), de ser así, se contaron 100 células por pozo, y si el 50% o más se encontraba redondeada, se consideró efecto citotóxico positivo, por lo tanto, presencia en el sobrenadante de al menos una toxina (Gun Britt *et al.*, 1989).

El título de un ensayo dado se reportó como el recíproco de la dilución más alta que causara al menos el 50% de destrucción celular (Engberg *et al.*, 2005). Los ensayos se realizaron en tres ocasiones con su respectivo duplicado. Como control positivo, se utilizó la toxina pura de *V. cholerae* (SIGMA) (Johnson and Lior 1988) y como blanco agua miliQ estéril y medio ICC más 0.6% de extracto de levadura con su respectivo extracto. Para evaluar la producción de citotoxicidad de las tres cepas utilizadas (*C. jejuni* 5653, 180ip y *C. coli* 1) se agregaron los sobrenadantes obtenidos de los cultivos sin adición de los extractos.

6.11. Ensayo para determinar la adhesión.

Este ensayo se realizó en la línea celular Vero de acuerdo al método mencionado por Lee *et al.*, (2004). Las células Vero se cultivaron de la misma forma ya mencionada, pero en este caso se agregaron 400µl de células en placas de poliestireno de 24 pozos (Costar, Corning Incorporated). Cuando las células presentaron confluencia, 100µl (aprox. 10⁷ UFC) de *C. coli* y *C. jejuni* tratadas previamente con concentraciones subletales (por 48h) de extractos de las plantas seleccionadas, se

agregaron en cada pozo. Como control positivo, se utilizaron las cepas sin adición de extractos de plantas y como blanco se utilizaron las cepas adicionadas con el solvente en el que se resuspendieron los extractos (metanol). Las placas se incubaron a 37°C por tres horas, pasado este tiempo, los pozos se lavaron dos veces con PBS 1M, pH 7.2 para remover las bacterias no adheridas. Las bacterias adheridas se recuperaron por la adición de desoxicolato al 0.5%, y se realizaron diluciones seriadas (solución salina 0.85%) para contar las bacterias adheridas en placas con agar Muller Hinton mas sangre hemolizada (5%).

6.12. Determinación colorimétrica de grupos químicos en los extractos seleccionados.

A los extractos de plantas que presentaron actividad biológica, se les realizaron ensayos químicos con las metodologías reportadas por Domínguez, (1988) para determinar en forma general qué grupos químicos poseen.

6.12.1. Insaturaciones.

Se utilizó la prueba de Bayer en donde se colocaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana y se agregaron 1-2 ml de acetona (CTR SCIENTIFIC), posteriormente se le agregó gota a gota una solución acuosa de permanganato de potasio (FERMONT) al 1%. La aparición de un precipitado café indicó la presencia de hidrocarburos insaturados (Domínguez, 1988).

6.12.2. Saponinas

Se colocó un mililitro del extracto concentrado en una placa de porcelana, posteriormente se agitó vigorosamente con un vortex. La aparición de abundante espuma indicó la presencia de saponinas (Domínguez, 1988).

6.12.3. Flavonoides

Se utilizó la Prueba de Shinoda donde el extracto fue mezclado con un fragmento de limadura de magnesio (CTR SCIENTIFIC) y cuatro gotas de ácido clorhídrico concentrado (CTR SCIENTIFIC). La prueba fue positiva cuando se presentaron coloraciones: naranja (flavonas), roja (flavononas), roja azulosa (flavonoles) ó violeta (xantanas o flavonoles) (Domínguez, 1988).

6.12.4 Sesquiterpenlactonas.

Se utilizó la prueba de Legal. En este caso, se depositaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana, se agregaron 3 gotas de piridina (BAKER) y una gota de nitroprusiato de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 0.5% y después se añadieron gota a gota, 4 gotas de hidróxido de potasio 2N. Una coloración rosa fue indicio de lactonas α y β insaturadas (Domínguez, 1988).

6.12.5. Carbohidratos.

Se determinaron carbohidratos mediante la prueba de la Antrona. Se colocó una gota de la muestra disuelta en agua con 1 gota de antrona (FERMONT) al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado (EM SCIENCE) sobre una placa de porcelana. La prueba se consideró positiva al formarse un anillo azul-verdoso en la interfase (Domínguez, 1988).

6.12.6. p-benzoquinonas

Se mezcló una gota de la muestra, sobre una placa de porcelana, con una gota de solución etanólica al 0.2% de p-nitrofenilacetoniitrilo (ALFA AESAR) y 1 gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC). La prueba fue positiva al observarse una coloración azul o violeta (Domínguez, 1988).

6.12.7. Alcaloides

Se utilizó la prueba de Dragendorff. Para esto se realizaron dos soluciones. La solución A se preparó mezclando 8 gr de nitrato de bismuto (FERMONT) con 20 ml

de ácido nítrico (CTR SCIENTIFIC) al 30%; y la solución B mezclando 27.2 gr de yoduro de potasio (TECNICA QUIMICA) en 50 ml de agua. Se mezclaron las soluciones A y B y se dejaron reposar 24 hr. Esta mezcla se filtró y se aforó a 100 ml con agua bidestilada. Se agregaron unas cuantas gotas de este reactivo a la muestra que se había colocado en una placa de porcelana. La prueba fue positiva cuando se presentó un precipitado de color naranja-marrón (Domínguez, 1988).

6.12.8. Cumarinas.

Se determinaron cumarinas con la prueba de Emerson. Se mezclaron 0.5% de carbonato de calcio (MERCK), 0.9% de 4-aminoantipirina (SPECTRUM), 5.4% de ferrocianuro de potasio (CTR SCIENTIFIC) en agua, una gota de esta mezcla se agregó a una gota de la muestra sobre una placa de porcelana. La prueba fue positiva al observarse una coloración amarilla (Domínguez, 1988). Por otro lado también se mezcló la muestra con una gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 10%; una coloración amarilla indicó la presencia de cumarinas (Domínguez, 1988).

6.12.9. Aldehídos y cetonas

Sobre una placa de porcelana, a una gota del extracto se le agregaron 2 gotas de etanol (DEQ) y 1 gota de 2,4-dinitrofenilhidracina (SPECTRUM), para lo cual se disolvió en caliente 5 gr de 2,4-dinitrofenilhidracina en 60 ml de ácido fosfórico (CTR SCIENTIFIC) al 85%, se diluyeron con 39.5 ml de etanol y después se filtró. La presencia de un precipitado rojo indicó positivo para carbonilos aromáticos, un precipitado anaranjado indicó carbonilos α o β insaturados y/o un precipitado amarillo fue positivo para carbonilos saturados (Domínguez, 1988).

6.12.10. Cloruros.

En una placa de porcelana se colocó 1 gota de extracto y se disolvió en agua bi-destilada (3 ml) y se le añadieron 2 o 3 gotas de una solución de nitrato de plata, la cual se preparó disolviendo 10 mg de nitrato de plata (CTR SCIENTIFIC) con 20 ml de agua bi-destilada. Para la presencia de cloruros se presentó un precipitado blanco (Domínguez, 1988).

6.12.11. Taninos

Se disolvió 1 ml de la muestra en 1 ml de agua y 1 ml de etanol (DEQ), se añadieron unas gotas de cloruro férrico (CTR SCIENTIFIC) al 5% en etanol (p/v); una coloración verde oscuro o negra fue indicativo de hidroxilos fenólicos. (Domínguez, 1988).

6.13. *Análisis estadístico.*

Para determinar la significancia de las variaciones en la población bacteriana, se realizó un análisis de comparación múltiple de medias por el método de Kruskal-Wallis.

En los casos en que hubo diferencia significativa se hizo la prueba de diferencia de medias de Dunn's.

7. RESULTADOS.

7.1 Prueba de pozo.

Se estudiaron un total de 33 plantas con las cuales se realizaron extractos metanólicos y acuosos. De los 33 extractos metanólicos probados, 27 presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. jejuni/coli* analizadas (Tabla 2).

Los halos de inhibición mostraron un rango de 1.0 a 4.0 cm de diámetro (Fig. 1). Además encontramos que, ninguno de los extractos acuosos presentó inhibición del crecimiento.

Las plantas que se seleccionaron para estudios posteriores fueron las que presentaron un halo mayor a 2.5cm de diámetro (Fig. 1).

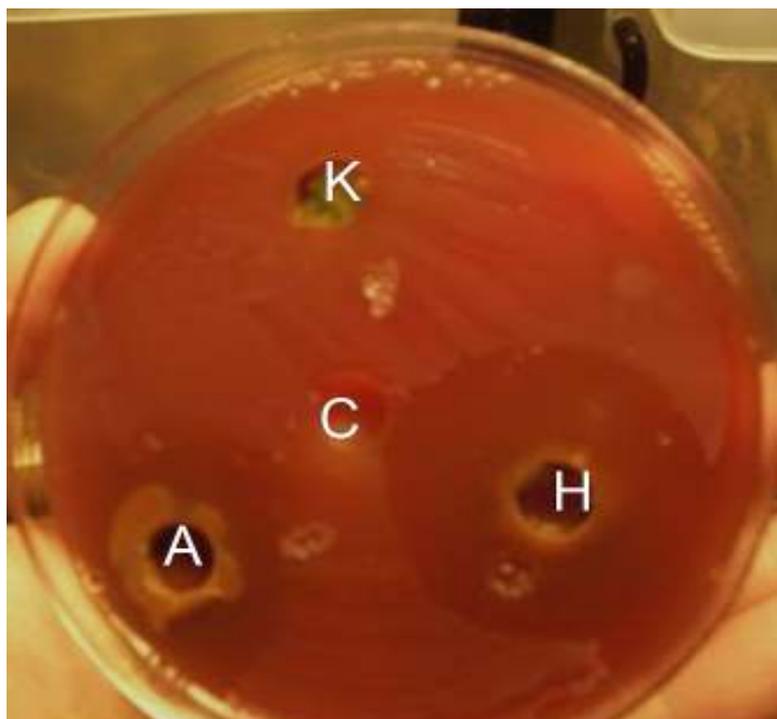


Figura 1. Efecto antimicrobiano del extracto de alcachofa (A), huizache (H), kiwi (K) sobre el crecimiento de *C. jejuni* 5653. (C) solvente utilizado (metanol) como control negativo.

Tabla 2. Efecto sobre el crecimiento de *C. jejuni/coli* por extractos metanólicos de diferentes plantas. (Se muestran los diámetros de los halos de inhibición en centímetros).

Extracto	Nombre Científico	Cepas analizadas		
		Halos de inhibicion (cm)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni 180ip</i>
Albácar	<i>Ocimum basilicum</i>	4± 0.05	4.1± 0.1	4.3± 0.3
Alcachofa	<i>Synara scolymus</i>	4.2± 0.2	3.2±0.4	3.5±0.3
Blue Berry	<i>Vaccinum angustifolia</i>	NI	NI	NI
Cacahuete c/c	<i>Arachis sp.</i>	1.8± 0.5	3.1± 0.3	2.1± 0.3
Caacahuete s/c	<i>Arachis sp.</i>	1.2± 0.3	2.5± 0.4	1.3± 0.3
Calabaza	<i>Curcubita pepo</i>	NI	NI	NI
Camote	<i>Ipomea batata</i>	3.1± 0.5	3.2± 0.6	3.1± 0.5
Chicozapote	<i>Manilkara zapota</i>	2.1± 0.4	1.5± 0.3	1.5± 0.3
Chile morrón	<i>Capsicum sp.</i>	3.2± 0.4	2.5± 0.4	2.5± 0.5
Chile piquin	<i>Copsicum frutescens</i>	2.1± 0.3	2.1± 0.3	2.4± 0.2
Chile poblano	<i>Capsicum sp.</i>	3.3± 0.4	3.2±0.2	3.2±0.3
Chile poblano *	<i>Capsicum sp.</i>	1.8±0.2	1.9±0.4	1.8±0.2
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	3.0± 0.05	2.8± 0.2	2.1±0.2
Ciruella	<i>Prunus domestica</i>	4±0.05	3±0.03	3.5± 0.3
Ciruella pasa	<i>Prunus domestica</i>	3± 0.04	2± 0.06	1.5±0.2
Coco	<i>Cocus nucifera</i>	NI	NI	NI
Cranberry	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	NI	NI	NI
Durazno	<i>Prunus sp.</i>	NI	NI	NI
Espárrago	<i>Asparagus officinalis</i>	1.5±0.3	1.5±0.3	1.8±0.3
Estafiate	<i>Artemisia ludoviciana</i>	4±0.04	4.5± 0.4	4± 0.05
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i>	2± 0.02	2± 0.05	2.5± 0.2
Hierbabuena	<i>Menta viridis</i>	NI	NI	NI
Huizache	<i>Acacia farneciana</i>	4±0.01	3.8±0.2	3.9±0.4
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i>	2±0.05	1.5±0.3	1.8±0.3
Mango	<i>Magnifera sp.</i>	4±0.01	3±0.05	3.5± 0.1

Tabla 2. (Continuación)

Extracto		Cepas analizadas		
		Halos de inhibicion (cm)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni 180ip</i>
Melón chino	<i>Cucumis melo</i>	NI	NI	NI
Nabo	<i>Brassica napus</i>	NI	NI	NI
Nopal	<i>Opuntia ficus</i>	3±0.02	2.9±0.1	3±0.05
Oregano	<i>Poliomintha longiflora</i>	3±0.06	3±0.05	3.2±0.1
Piña	<i>Anana comosus</i>	2.2± 0.2	2.5±0.2	2.5±0.3
Uva pasa	<i>vittis sp.</i>	3±0.05	1.8±0.2	2±0.05
Vaina de mezquite	<i>Prosopis glandulosa</i>	1.5±0.2	1.2±0.1	1.8±0.3
Yerbaniz	<i>Tagetes filifolia</i>	1.8±0.3	1.5±0.4	1.3±0.3
Yuca	<i>Yucca filifera</i>	2±0.05	1.8±0.3	2±0.06
Zacate limón	<i>Cymbopogun citratus</i>	3.2±0.3	3±0.06	3.5±0.4

c/c.- con cáscara.

s/c.- sin cáscara.

NI.- no presentó inhibición.

7.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de 11 extractos metanólicos seleccionados ya que mostraron un halo de inhibición mayor de 2.5 cm. Como se puede observar (Tabla 3) la CMB obtenida varió desde 0.2 a >10mg/ml. Sin embargo por cuestiones prácticas, fueron seleccionados aquellos en los que el CMB no fuera mayor a 2 mg/ml que en este caso corresponden a los extractos de nopal (0.3-0.4 mg/ml), huizache (0.2-0.75mg/mL), estafiate (0.5-0.6 mg/mL) y alcachofa (1.0-2.0 mg/ml).

Tabla 3. Concentración Mínima Bactericida (CMB) en mg/ml sobre *Campylobacter*.

Extracto	CMB (mg/ml) \pm desviación estándar		
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni 180ip</i>
Albacar	4 \pm 0.516	5 \pm 0.516	4 \pm 0.516
Alcachofa	2 \pm 0.03	1.5\pm0.5	1\pm0.35
Chile morrón	>10	>10	> 6
Chile poblano	4 \pm 0.837	3 \pm 1.10	3 \pm 0.823
Ciruela	6 \pm 1.10	4 \pm 0.516	4 \pm 0.516
Estafiate	0.6\pm0.083	0.60\pm0.09	0.525\pm0.179
Frambuesa	>10	>10	>10
Huizache	0.75\pm0.092	0.39\pm0.04	0.2\pm0.103
Mango	>5	> 5	> 5
Nopal	0.4\pm0.07	0.4\pm .0.07	0.3\pm0.07
Zacate limón	>5	>5	>5

7.3. Determinación del efecto de las concentraciones subletales sobre el crecimiento microbiano.

El análisis estadístico realizado mostró que el efecto de las concentraciones subletales de los extractos de plantas sobre el crecimiento bacteriano, no fue significativo ($p \geq 0.05$), ya que durante los tratamientos con diferentes concentraciones de los extractos (25, 50 y 75% de la CMB) la población bacteriana se mantuvo siempre en el mismo logaritmo, equivaliendo aproximadamente a 1×10^7 UFC/ml (Figuras 2-4). Lo mismo podemos observar en el control (cultivo bacteriano sin tratamiento) y en el blanco (metanol); sin embargo, al utilizar el 100% de la CMB, las cuentas bacterianas disminuyeron drásticamente hasta no detectar células viables, mientras que en los controles sin extracto, se mantuvieron siempre en el mismo logaritmo después de 48h de incubación.

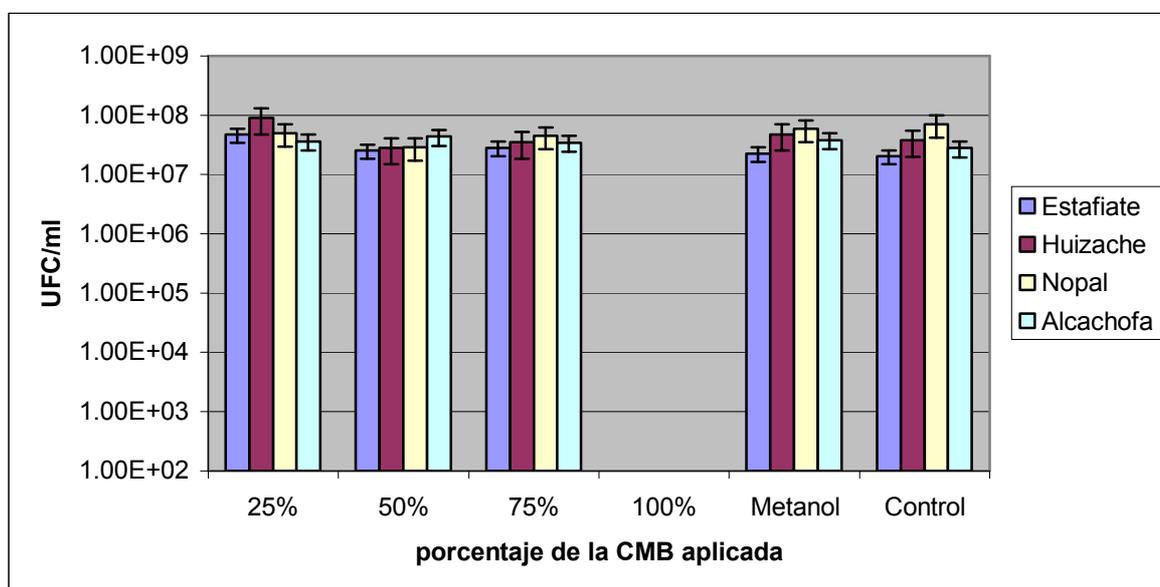


Figura 2. Efecto de las concentraciones subletales de extractos metanólicos sobre el crecimiento de *C. jejuni* 5653.

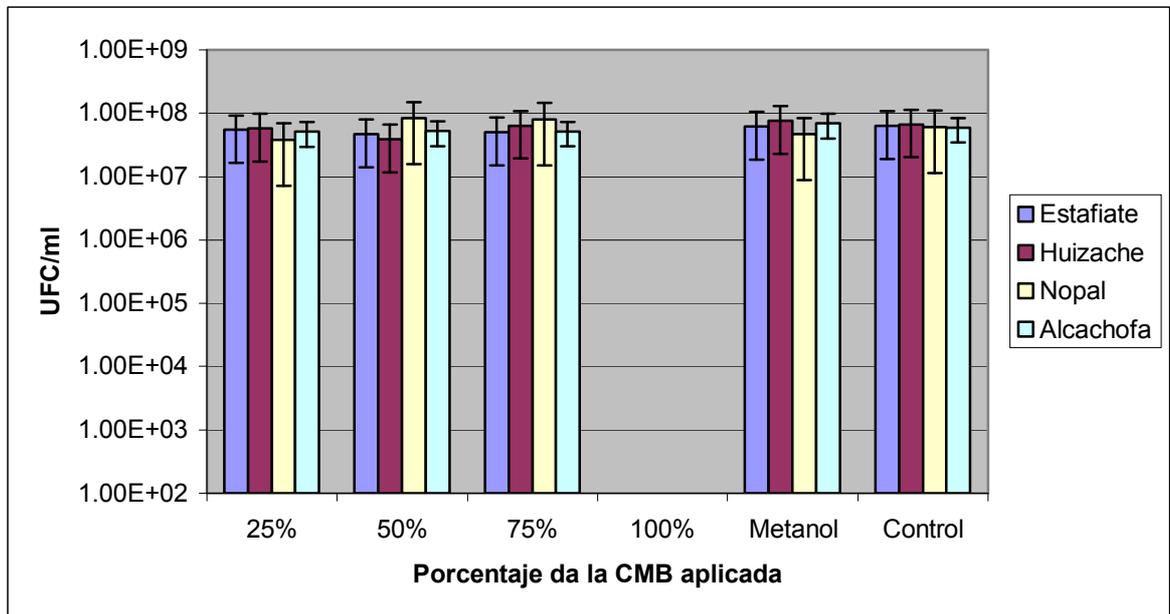


Figura 3. Efecto de las concentraciones subletales de extractos de plantas sobre el crecimiento de *C. coli* 1.

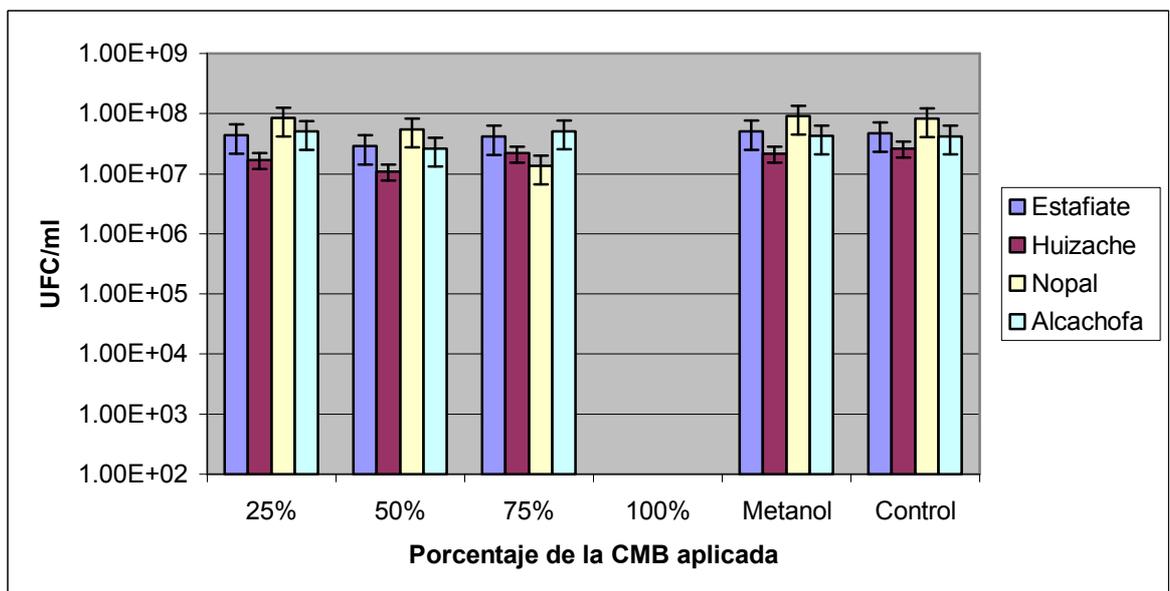


Figura 4. Efecto de las concentraciones subletales de extractos de plantas sobre el crecimiento de *C. jejuni* 180ip.

7.4 Ensayo de citotoxicidad de sobrenadantes.

7.4.1. Evaluación de la citotoxicidad de los sobrenadantes de *Campylobacter*.

Para esto, se obtuvieron sobrenadantes de cultivos de las cepas bacterianas: *C. jejuni* 5653, 180ip y *C. coli* 1. Dichos cultivos no fueron sometidos a ningún tratamiento con extractos de plantas. Los sobrenadantes liofilizados y resuspendidos en 600µl de agua miliQ estéril, fueron agregados a placas de 96 pozos que contenían células Vero en monocapa confluyente. Como control negativo se agregó el medio de cultivo ICC adicionado con extracto de levadura (0.6%), IsoVitaleX (1%), Polimixina B (2mg/mL). Como blanco se agregó agua miliQ. Como control positivo, se agregó la toxina pura de *V. cholerae* (SIGMA).

Después de 24h, se observó que las tres cepas causaron un fuerte efecto citotóxico sobre la monocapa de células Vero al compararse con los controles los cuales no mostraron signos de citotoxicidad (Fig. 5 d, e). Al analizar el efecto causado por los sobrenadantes en las respectivas diluciones, se observó una destrucción celular de más del 50% hasta en la dilución 1:64 para las cepas *C. jejuni* 5653 y 180ip (Fig. 5 a, c). Mientras que para *C. coli* 1, la destrucción de más del 50% se observó únicamente hasta la dilución 1:8 (Fig. 5 b) ya que en la dilución 1:16 aunque la monocapa estaba muy afectada, las células se apreciaban inflamadas mas no destruidas y en las diluciones subsecuentes, las células se apreciaban en muy buen estado (Fig. 6 a, b, c). Este efecto sugiere que la producción de toxina por *C. coli* 1 es menor que en el caso de *C. jejuni* 5653 y 180ip.

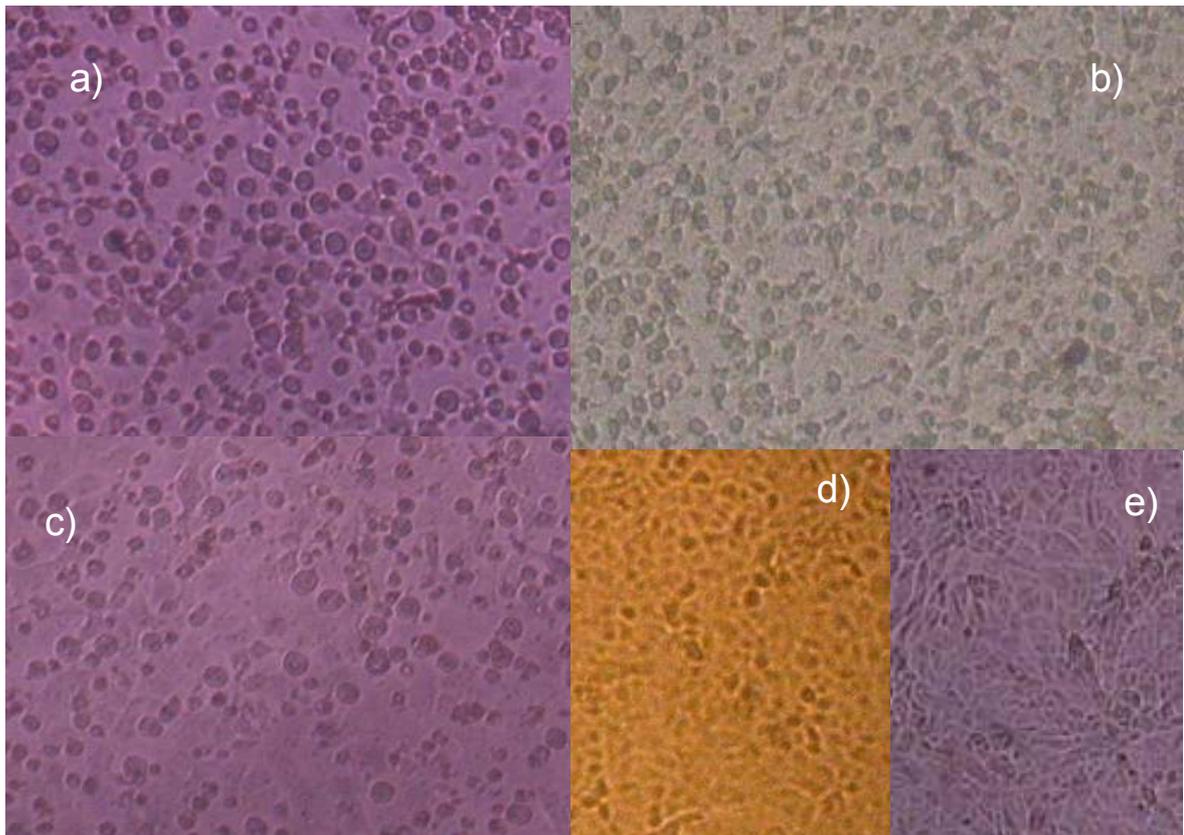


Figura 5. Efecto citotóxico de los sobrenadantes bacterianos sobre células Vero. a) Sobrenadante de *C. jejuni* 5653 dilución 1:64; b) Sobrenadante de *C. coli* 1 dilución 1:8; c) Sobrenadante de *C. jejuni* 180 ip dilución 1:64; d) Control negativo (medio de cultivo) dilución 1:2; e) blanco (agua miliq).

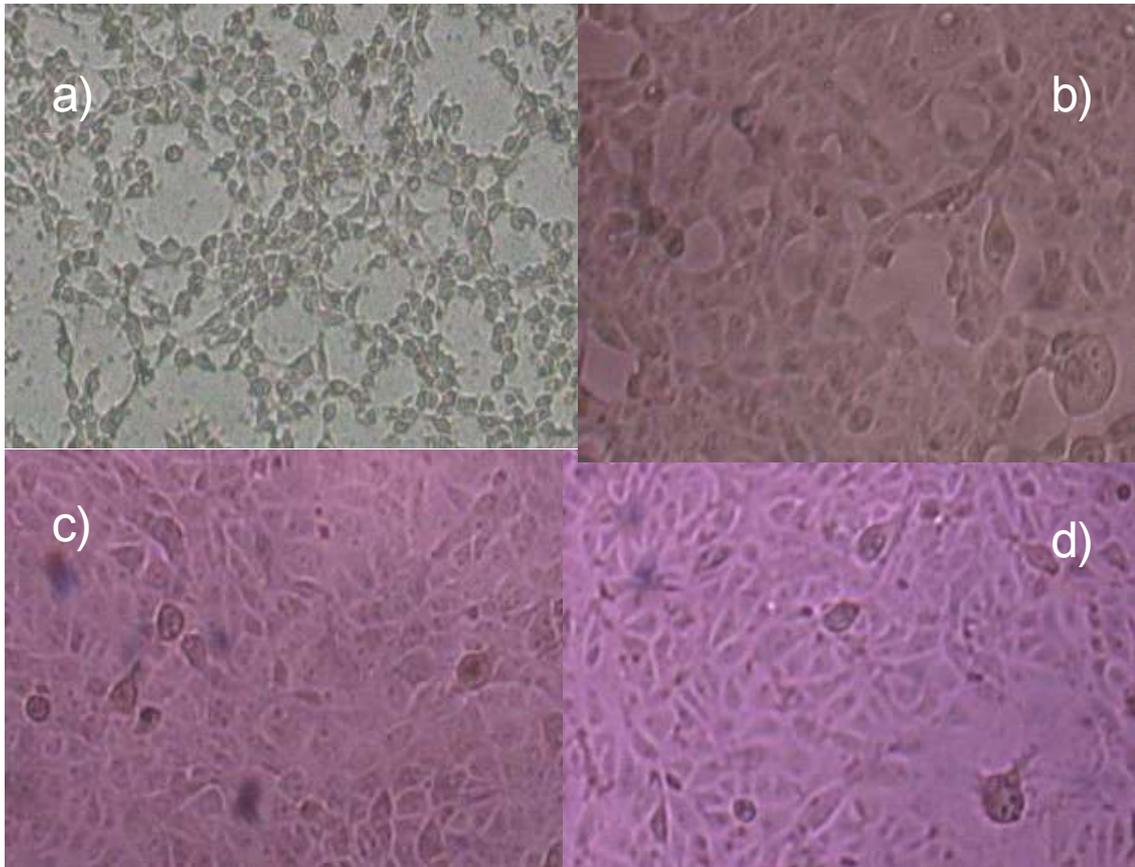


Figura 6. Disminución gradual del efecto citotóxico de los sobrenadantes de *C. coli* 1 sobre células Vero. a) dilución 1:16; b) dilución 1:32 c) dilución 1:64; d) blanco. Objetivo 20x.

7.4.2. Evaluación del efecto de los extractos de plantas sobre la citotoxicidad de sobrenadantes de *Campylobacter*.

Se obtuvieron sobrenadantes de cultivos de las cepas bacterianas: *C. jejuni* 5653, 180ip y *C. coli* 1. Dichos cultivos fueron tratados con el 75% de la CMB de los extractos seleccionados (estafiate, huizache, alcachofa, nopal). Los sobrenadantes liofilizados fueron agregados a placas de 96 pozos que contenían células Vero en monocapa confluyente y se incubaron por 24 h. Como control se adicionaron los sobrenadantes que contenían únicamente medio y extracto los cuales en ensayos anteriores, no presentaron daño citotóxico en ninguna dilución.

Los resultados obtenidos para el caso de los sobrenadantes de *Campylobacter* tratados con el extracto de Huizache, indicaron que las células Vero, fueron mínimamente afectadas en su confluencia y en su morfología (Fig. 7 a, b y c), en comparación con el control positivo (toxina *V. cholerae*) (Fig. 7 d). Este efecto fue presentado por las tres cepas bacterianas probadas, desde la dilución 1:2 lo que sugirió que el extracto de huizache tuvo la capacidad de inhibir la acción citotóxica de la o las toxinas producidas por *Campylobacter*.

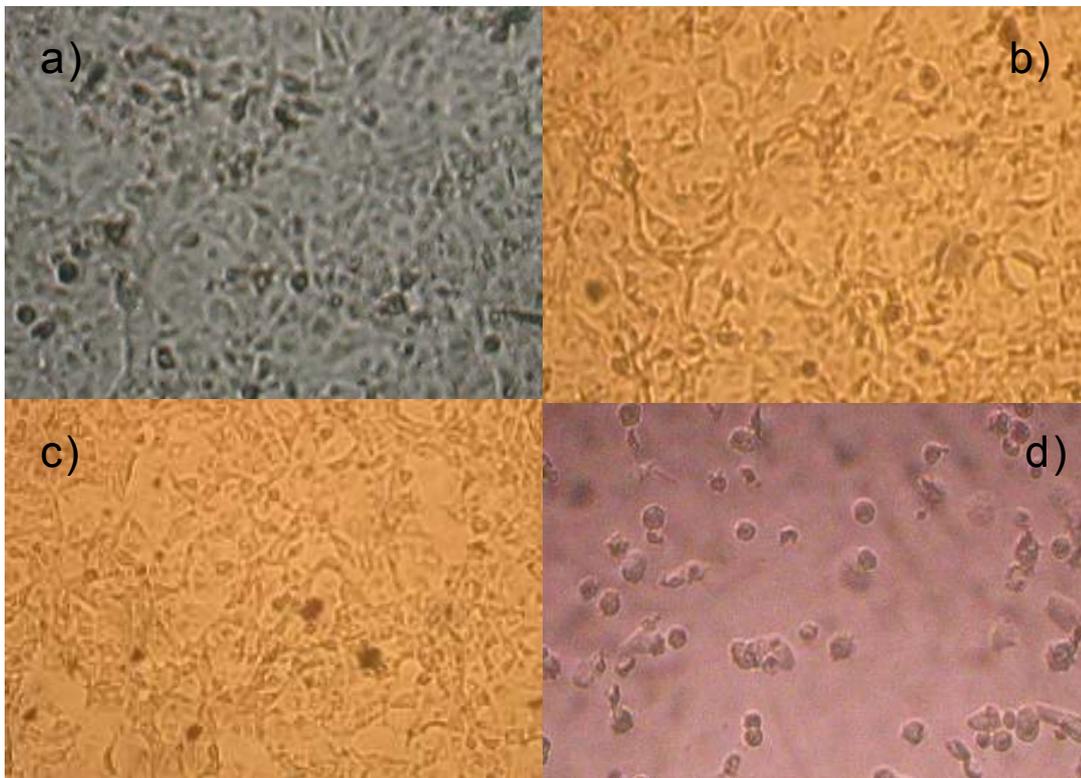


Figura 7. Efecto citotóxico sobre células Vero de sobrenadantes tratados con extracto de huizache, todas en la dilución 1:2. a) Sobrenadante de *C. jejuni* 5653 b) Sobrenadante de *C. coli* 1; c) Sobrenadante de *C. jejuni* 180 ip y d) Control positivo (toxina de *V. cholerae*) objetivo 20x.

Por otro lado, las células Vero expuestas a los sobrenadantes de *C. jejuni* 5653 tratados con el extracto de estafiate presentaron signos de inflamación y pérdida de monocapa en la dilución mas baja (Fig. 8 a), sin embargo al realizar una dilución posterior, el efecto dañino del sobrenadante fue eliminado por completo.

Y para el caso de *C. coli* 1 y *C. jejuni* 180 ip, el efecto citotóxico fue mucho menor que el encontrado en la cepa 5653, ya que la monocapa se mantuvo confluyente aunque la morfología se vio ligeramente afectada también en la dilución mas baja (Fig. 8 b y c) sin embargo al igual que en el caso anterior, todo signo de citotoxicidad se eliminó en la siguiente dilución.

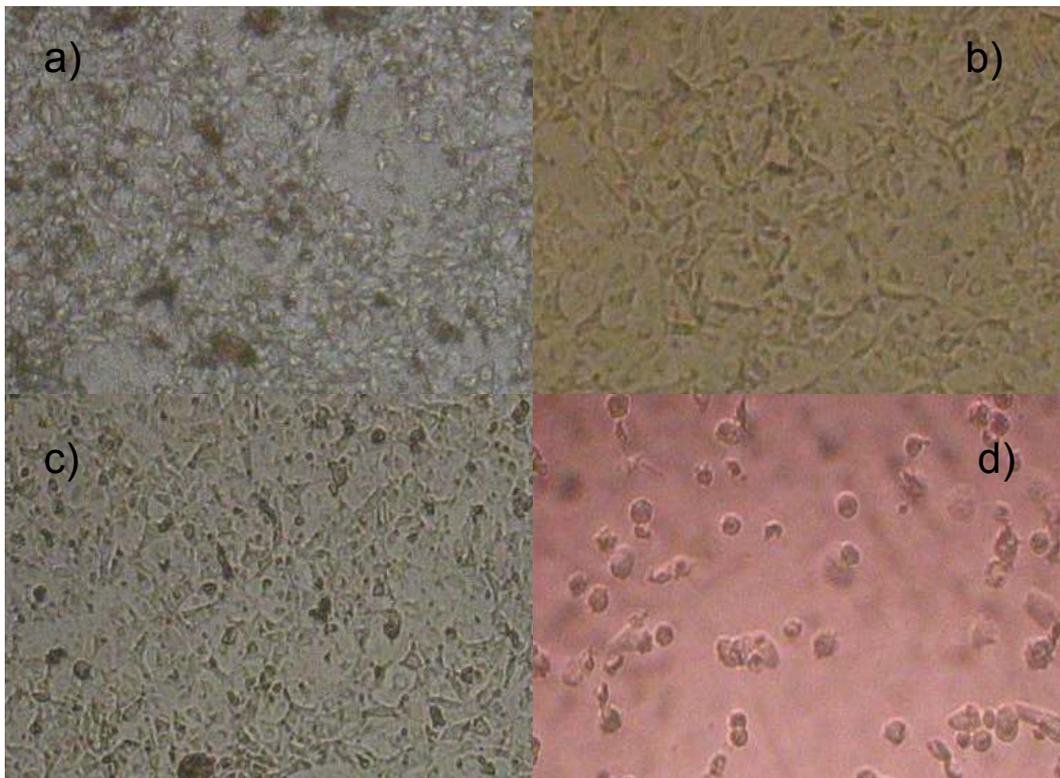


Figura 8. Efecto citotóxico sobre células Vero de sobrenadantes tratados con extracto de estafiate, todas en la dilución 1:2. a) Sobrenadante de *C. jejuni* 5653; b) Sobrenadante de *C. coli* 1; c) Sobrenadante de *C. jejuni* 180 ip y d) Control positivo (toxina de *V. cholerae*).

Al agregar los sobrenadantes tratados con el extracto de alcachofa, se obtuvieron los siguientes resultados: se presentó una severa destrucción celular desde la dilución 1:2 hasta la dilución 1:16 para el caso del sobrenadante de *C. jejuni* 5653 y *C. jejuni* 180ip (Fig. 9 a y c), mientras que para *C. coli* 1 la destrucción se presentó únicamente hasta la dilución 1:8 (Fig. 9 b); sin embargo, para diluciones subsecuentes la citotoxicidad fue disminuida casi al 100% para las tres cepas (Fig. 10 a, b, c). Cabe señalar que al evaluar la citotoxicidad de los sobrenadantes de cada cepa, *C. coli* 1 presentó la menor citotoxicidad con títulos de 1:8 (Fig. 5 b) mientras que la citotoxicidad de las otras dos cepas se mantuvo hasta la dilución 1:64 (Fig. 5 a, c).

Es por ello que para *C. coli* 1 no se considera un efecto inhibitorio de la citotoxicidad causada por esta cepa, por parte del extracto, mientras que para las cepas *C. jejuni* 5653 y 180ip, se presentó una disminución de dos diluciones por lo que refleja un efecto inhibitorio.

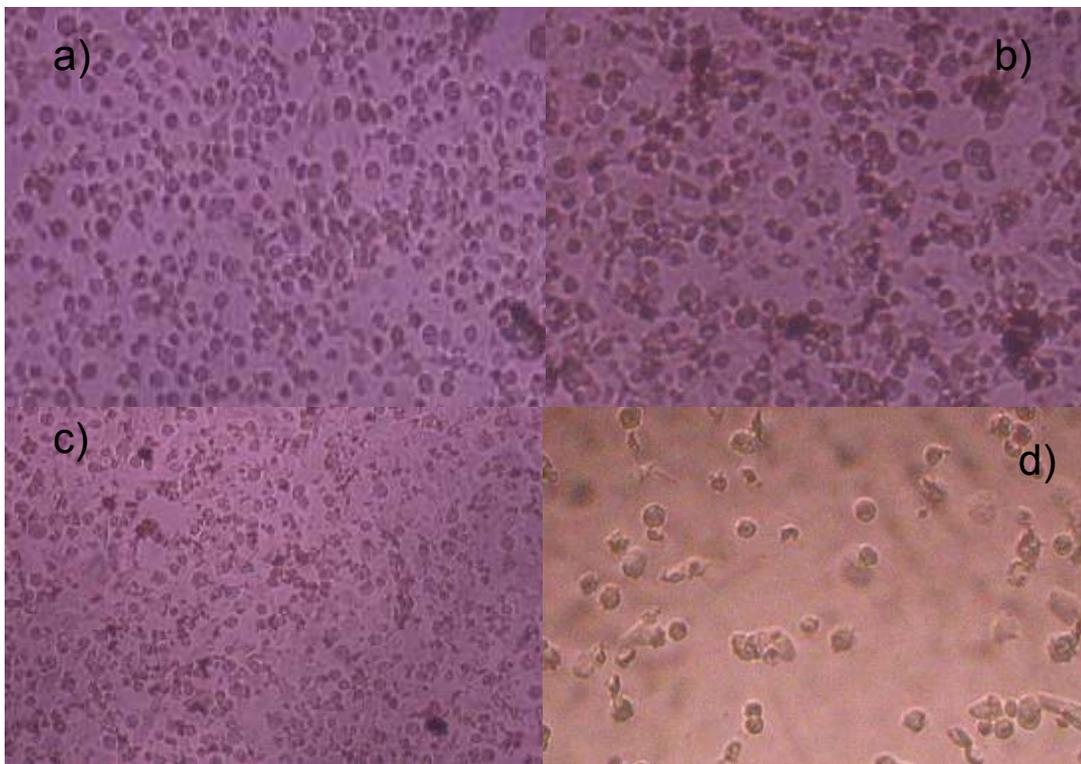


Figura 9. Efecto citotóxico sobre células Vero de sobrenadantes tratados con extracto de alcachofa. a) Sobrenadante de *C. jejuni* 5653 dilución 1:16; b) Sobrenadante de *C. coli* 1 dilución 1:8; c) Sobrenadante de *C. jejuni* 180ip dilución 1:16 y d) Control positivo (toxina de *V. cholerae*)

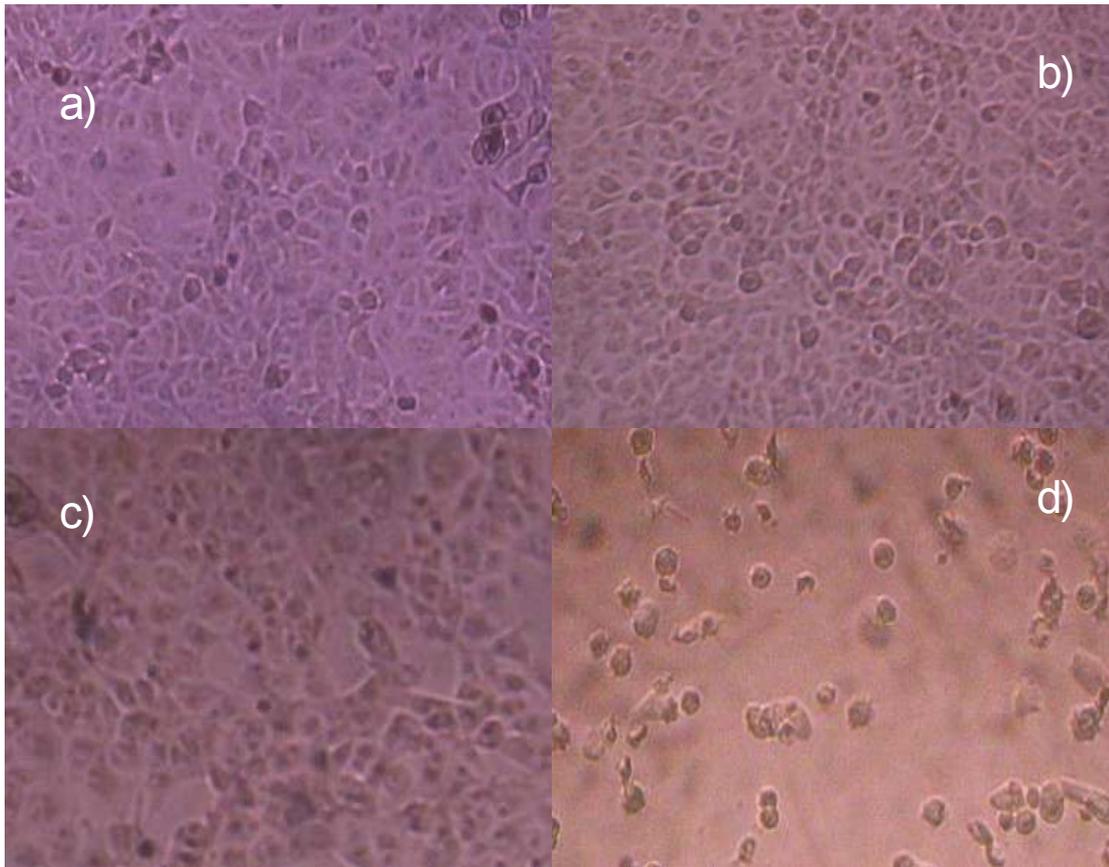


Figura 10. Disminución de citotoxicidad sobre células Vero al agregar los sobrenadantes tratados con alcachofa. a) Sobrenadante de *C. jejuni* 5653 dilución 1:32; b) Sobrenadante de *C. coli* 1 dilución 1:16; c) Sobrenadante de *C. jejuni* 180 ip dilución 1:32 d) Control positivo (toxina de *V. cholerae*)

En el caso de los sobrenadantes tratados con nopal, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas comparados con los sobrenadantes de *Campylobacter* no tratados; ya que la citotoxicidad causada por los sobrenadantes tratados con este extracto sobre la monocapa celular Vero se presentó desde la concentración mas alta hasta la dilución de 1:32 para las dos cepas de *C. jejuni* (Fig. 11 a, c) mostrando una disminución de la citotoxicidad para las diluciones subsecuentes (Fig. 12 a, c), sin embargo el daño seguía siendo significativo en comparación con el blanco (monocapa adicionada con agua miliQ) (Fig. 12 d) y con el control negativo (Fig.5 d), en donde se apreciaron las células Vero en perfecto estado.

En el caso de *C. coli* 1 el daño se presentó desde la dilución más concentrada hasta en la dilución 1:8 (Fig. 11 b) con una disminución de la citotoxicidad en la siguiente dilución (Fig. 12 b). En ninguno de los tres casos se consideró un efecto inhibitorio por parte del extracto, ya que el daño fue comparable con el causado por los sobrenadantes de *Campylobacter* respectivos (no tratados) (Fig. 5 a, b, c).

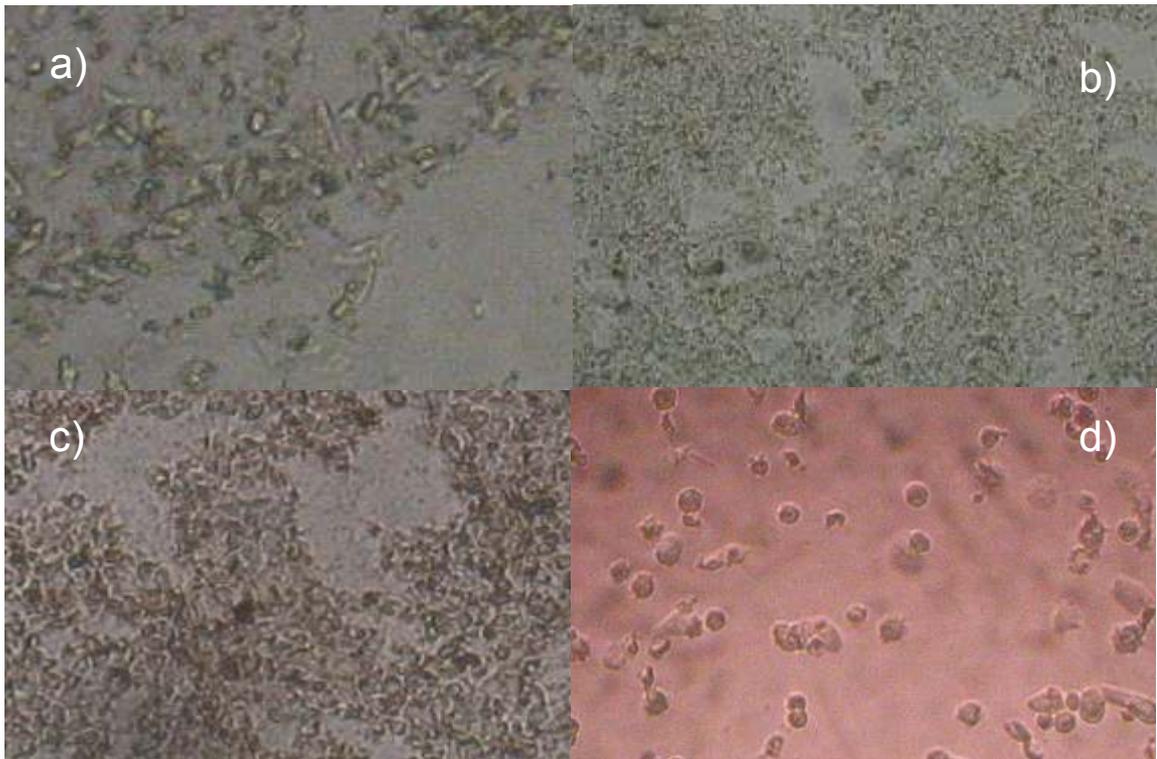


Figura 11. Efecto citotóxico sobre células Vero al agregar los sobrenadantes tratados con nopal. a) Sobrenadante de *C. jejuni* 5653 dilución 1:32; b) Sobrenadante de *C. coli* 1 dilución 1:8; c) Sobrenadante de *C. jejuni* 180ip dilución 1:32 d) Control positivo (toxina de *V. cholerae*, SIGMA).

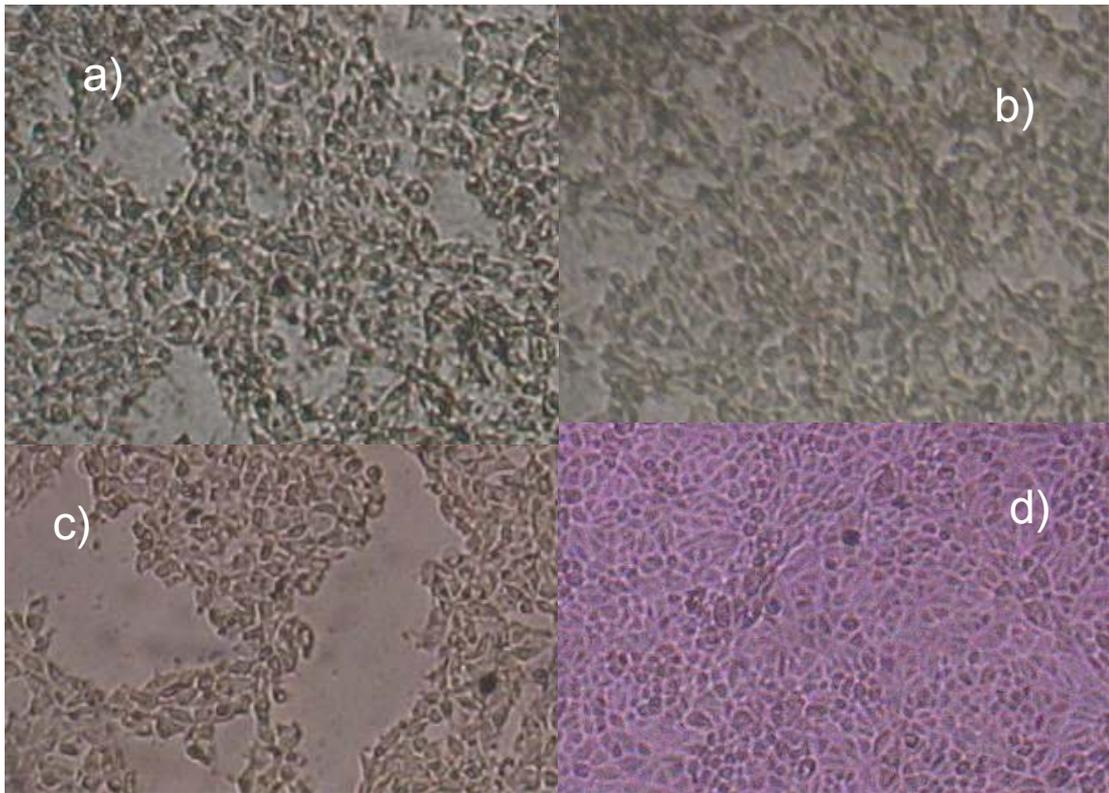


Figura 12. Disminución de citotoxicidad sobre células Vero al agregar los sobrenadantes de *Campylobacter* tratados con nopal. a) Sobrenadante de *C. jejuni* 5653 dilución 1:64; b) Sobrenadante de *C. coli* 1 dilución 1:16; c) Sobrenadante de *C. jejuni* 180ip dilución 1:64; d) blanco (agua miliQ).

7.5. Adhesión a Células Vero.

Cada cepa bacteriana fue sometida a un tratamiento con el 75% de la CMB de cada extracto de planta. Los microorganismos tratados, fueron agregados a placas de poliestireno de 24 pozos las cuales tenían adheridas células Vero en monocapa confluyente. Después del período de incubación (3h) se realizó un plaqueo por el método de cuenta en placa para contabilizar el número de bacterias adheridas. Los resultados obtenidos mostraron diferente comportamiento según la cepa y el extracto. Para el caso del huizache, la recuperación de bacterias adheridas con respecto al control (bacterias sin tratamiento con extracto), no fue significativa de acuerdo al análisis estadístico ($p \leq 0.5$). La población bacteriana recuperada se mantuvo en el logaritmo 10^5 para todas las cepas tanto en las bacterias con tratamiento como para las no tratadas (controles) (Figura 13). Por lo que los extractos no afectaron la adhesión bacteriana.

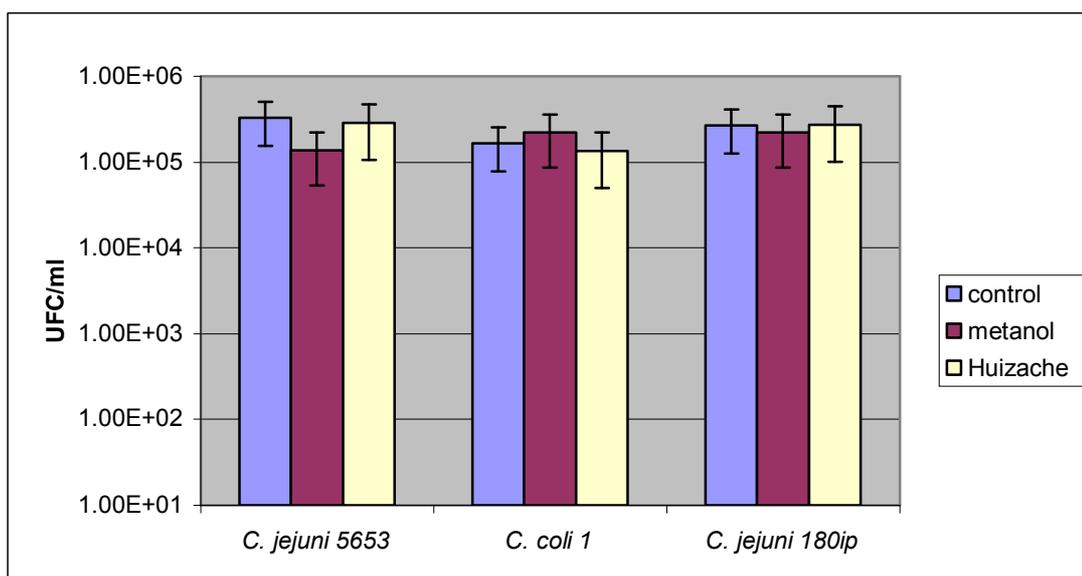


Figura 13. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con huizache al 75% de la CMB (UFC/ml).

Para el caso de las bacterias tratadas con extracto de estafiate, la recuperación de bacterias se mantuvo en 10^{4-5} tanto para el tratamiento como para los controles (Figura 14); y el análisis estadístico mostró que no existía una diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.5$). La población bacteriana recuperada se mantuvo en el logaritmo 10^4 para todas las cepas tanto en las bacterias con tratamiento como para las no tratadas (controles). Por lo que los extractos no afectaron la adhesión bacteriana.

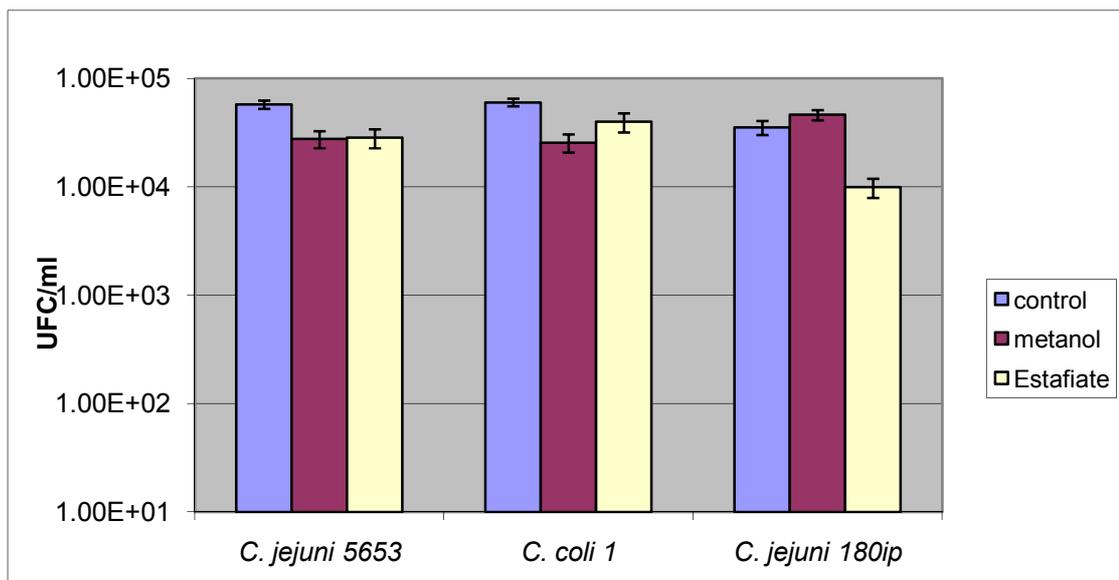


Figura 14. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con estafiate al 75% de la CMB (UFC/ml).

Para el caso del extracto de alcachofa, la recuperación de bacterias no tratadas se mantuvo en 10^5 , mientras que las que se les agregó el extracto a una concentración del 75% de la CMB disminuyeron un logaritmo (Figura 15). El análisis estadístico mostró diferencia significativa únicamente en el caso de la cepa 180ip comparada con el control ($p \leq 0.05$).

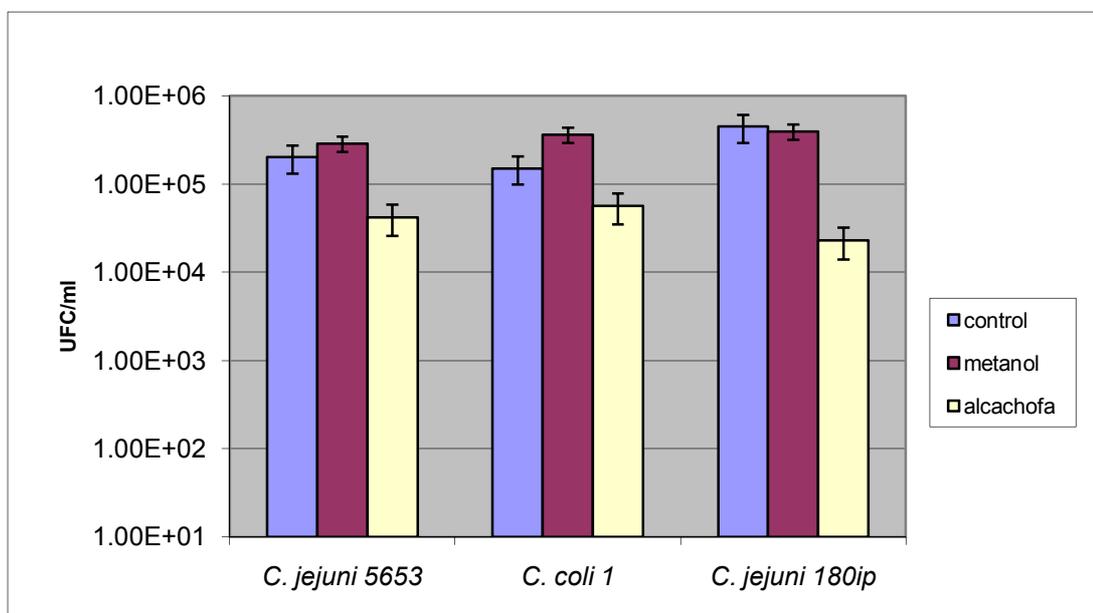


Figura 15. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con alcachofa al 75% de la CMB (UFC/ml).

En el caso del nopal, la recuperación de células adheridas se mantuvo en 10^5 para *C. jejuni* 5653 y 180ip. Mientras que para *C. coli*, estuvo en 10^4 . Después del tratamiento con el extracto (al 75% de la CMB) la recuperación de células disminuyó para *C. jejuni* 180ip hasta 10^4 y para *C. coli* 10^3 . Mientras que para *C. jejuni* 5653, se mantuvo en 10^5 (Figura 16). El análisis estadístico, indicó que existía diferencia significativa para *C. coli* y *C. jejuni* 180ip, con respecto a los controles ($p \leq 0.05$). No así para el caso de *C. jejuni* 5653.

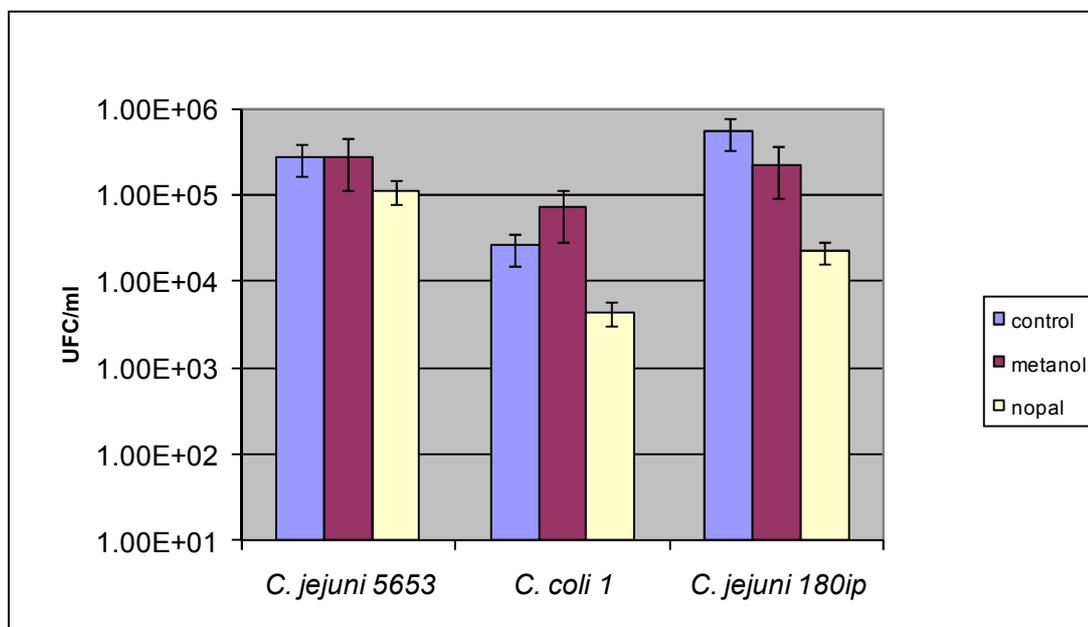


Figura 16. Recuperación de bacterias adheridas después del tratamiento con nopal al 75% de la CMB (UFC/ml)

7.6. Caracterización parcial de los compuestos presentes.

Después de realizarse las pruebas colorimétricas correspondientes descritas en el apartado 6.12 se obtuvieron los resultados detallados en la tabla 4. En general, podemos decir que alcaloides y taninos se encontraron presentes en los cuatro extractos.

Tabla 4. Determinación de grupos químicos presentes en los extractos seleccionados.

	Extracto utilizado			
	Estafiate	Huizache	Aalcachofa	Nopal
Insaturaciones	+	+	+	+
Saponinas	-	+	+	-
Flavonoides	-	-	-	+
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	+
Carbohidratos	-	-	+	-
p-benzoquinonas	+	+	+	-
Alcaloides	+	+	+	+
Coumarinas	+	-	+	-
Cetonas	+	-	-	-
Cloruros	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+

(+) presencia.

(-) ausencia.

8. DISCUSION

En años recientes se ha incrementado la búsqueda de compuestos naturales con actividad antimicrobiana; dicha búsqueda, va enfocada a las plantas ya que diversas investigaciones alrededor del mundo han demostrado la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana en una gran variedad de plantas utilizadas con fines medicinales (Cowan, 1999). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, algunas las plantas analizadas poseen una actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* y *C. coli*.

Mediante la técnica de inhibición de crecimiento en pozo, se encontró que la mayoría de los extractos acuosos, no presentaron efecto inhibitorio, lo que coincide con Cowan (1999), el cual mencionó que la mayor parte de los compuestos antimicrobianos presentes en plantas se extraen en mayor cantidad con solventes orgánicos como el metanol por lo que en muchos estudios se evita el uso de extracciones acuosas. Cabe mencionar que la mayoría de los compuestos extraídos con este solvente carecen de propiedades antimicrobianas.

Sin embargo al determinar el efecto antimicrobiano contra cepas de *C. jejuni/coli*, encontramos efecto inhibitorio contra las tres cepas utilizadas. Esto podría atribuirse a que la actividad antimicrobiana está dada probablemente por compuestos aromáticos u orgánicos saturados que se extraen mejor con solventes orgánicos como el metanol (Cowan, 1999). Aunado a esto, se seleccionaron para ensayos posteriores los extractos que presentaron mayor halo de inhibición ya que la literatura menciona que en la mayoría de los casos el diámetro del halo inhibitorio es directamente proporcional a la actividad antimicrobiana (García *et al.*, 2004a).

Cuando determinamos la CMB encontramos que la mejor actividad encontrada fue para los extractos metanólicos de nopal y huizache en donde se requirió una

concentración de 0.3 y 0.2 mg/mL de extracto respectivamente para inhibir por completo el crecimiento de *C. jejuni/coli*, encontrándose que la cepa más susceptible fue *C. jejuni* 180ip para todos los tratamientos. Dicha diferencia en la susceptibilidad puede atribuirse a la variabilidad genética que existe para cada cepa, ya que según Nadeau *et al.*, (2003) y Bang *et al.*, (2003), las cepas de *C. jejuni/coli*, poseen una diversidad de propiedades patogénicas diferentes que pueden variar de acuerdo a su origen y esto puede derivar en la susceptibilidad de cada una de las cepas.

Por otro lado, la variación de las CMB encontradas para cada extracto puede deberse a los compuestos presentes en cada uno de ellos, así como la sinergia que pudiese existir entre los compuestos, la concentración y/o el estado de oxidación de los mismos (Cowan, 1999).

Según las pruebas colorimétricas realizadas a los extractos utilizados en este estudio, se encontró que los cuatro extractos presentaron taninos y alcaloides, lo que les pudiera proporcionar este poder antimicrobiano ya que según Atta-ur-Rahman *et al.* (1995) y Jones *et al.* (1986), los alcaloides y taninos confieren fuertes efectos antimicrobianos. Este poder antimicrobiano, podría acrecentarse con la presencia otros compuestos como los flavonoides, sesquiterpenlactonas, y parabenzoquinonas (Cowan, 1999); los dos primeros encontrados en el nopal y las últimas en el estafiate, alcachofa y huizache. Sin embargo, sería conveniente continuar con extracciones y purificaciones más específicas que eluciden exactamente el tipo de compuesto que está actuando como bactericida o si existe una acción sinérgica entre ellos (Cowan, 1999).

Al analizar los efectos de las concentraciones subletales sobre el crecimiento microbiano, se pudo encontrar que no hay una disminución significativa en el crecimiento bacteriano entre los tratamientos subletales a los que se sometió al microorganismo tanto con el extracto como con el control (que en este caso fue metanol, ya que fue el solvente utilizado). La concentración bacteriana se

mantuvo en el mismo logaritmo lo cual coincide con Venegas *et al.* (2004) y Sakagami *et al.* (2001), quienes encontraron que las concentraciones subletales de extractos de plantas no afectaban significativamente el crecimiento microbiano. Esto nos indicó que el extracto *per se* no disminuyó la población bacteriana a estas concentraciones. Por lo tanto si existiese una disminución de la citotoxicidad y/o bien una recuperación menor de células adheridas a la línea celular Vero, será probablemente debido al efecto del extracto sobre estos factores y no a la disminución de la población bacteriana causada por el 100% de la CMB.

Al realizar las prueba de citotoxicidad de sobrenadantes de *C. jejuni/coli*, se pudo observar un daño severo a las 24 h de incubación sobre la línea celular Vero en diluciones hasta de 1:64 para *C. jejuni* 5653 y 180ip y 1:16 para *C. coli* 1. Esto nos indicó que las tres cepas son productoras de al menos una toxina. En ningún caso se observó un efecto de distensión celular progresiva, ya que las células se monitorearon hasta las 72h y no presentaron cambio alguno. Esto concuerda con algunos resultados como los de Johnson y Lior (1986) en los que se reportó que las células Vero son más sensibles a los efectos citotóxicos (mortalidad) que a los citotónicos (inflamación) lo que conlleva a pensar que las cepas evaluadas producen al menos una citotoxina de las que se han propuesto como activas en células Vero (Wassenaar, 1997). Sería prematuro hasta la fecha asegurar cual de estas citotoxinas se están produciendo ya que aún que se han realizado muchas investigaciones al respecto, existen muchas contradicciones tanto en la neutralización de las mismas, así como en la detección de cada una de ellas por métodos moleculares y/o inmunológicos (Wassenaar, 1997; Nadeau *et al.*, 2003).

Al evaluarse el efecto de la enterotoxina de *V. cholerae* sobre las células Vero, se pudo observar que el efecto causado por ésta (al menos 50% de células redondeadas), se presentó únicamente al adicionar la toxina pura no diluída, ya que las diluciones siguientes no presentaron ninguna alteración visible. Según Johnson y Lior (1986)

esto puede deberse a que las células más sensibles a la enterotoxina son las CHO (células de ovario de hamster) y no las Vero. Esto también sugirió la presencia en el sobrenadante de al menos una citotoxina ya que los títulos de daño obtenidos difirieron por mucho a los causados por la enterotoxina (Johnson and Lior, 1986). Es difícil tener la certeza de que la citotoxina producida es la CDT; para ello se tendrían que hacer estudios moleculares para determinar la presencia de los genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* en su caso y hacer un análisis de expresión de los mismos para asegurar que esta citotoxina está siendo producida (Manal-AbuOun *et al.*, 2004).

Las diferencias en títulos de daño celular causados por los sobrenadantes de *C. jejuni* y *C. coli* indicaron que la cantidad de toxina producida por ésta última cepa fue menor, lo que coincide con Dang *et al.* (2001) donde se reportó que los títulos de daño producidos por sobrenadantes de *C. coli* fueron menores que *C. jejuni*. En dicho estudio se reportó que ciertas cepas de *C. coli* causaron daño celular en las diluciones 1:16, 1:8 e incluso algunas cepas del mismo no presentaron daños detectables. En el caso de nuestros resultados, el daño más severo presentado por *C. coli* 1 lo encontramos hasta en títulos de 1:8, mientras que en la dilución 1:16 el daño disminuyó, aunque siguió presentándose. Para el caso de *C. jejuni* reportaron daño en diluciones hasta 1:64 coincidiendo con nuestros resultados.

Por otro lado, en los sobrenadantes bacterianos tratados con los extractos de plantas, el daño observado en las células Vero fue mucho menor (tanto en porcentaje de células redondeadas como en títulos de daño) en comparación con aquellas cepas no tratadas con extracto (sobrenadantes bacterianos). Es por esto que se presume que los extractos afectaron la producción de toxinas de las tres cepas lo que coincide con algunos autores como Smith y Palmer (2004) y Alarcón (2002), quienes reportaron una disminución en la síntesis de toxinas por parte de los extractos contra *S. aureus* y *V. cholerae* respectivamente.

En el caso de los sobrenadantes tratados con extractos de huizache y estafiate, no se presentó daño aparente en la monocapa Vero (dil. 1:2), lo que probablemente indica que la toxina pudo haber sido inhibida por el efecto de los extractos (Smith and Palmer, 2004) influenciados por la presencia de algunos compuestos presentes tales como taninos y quinonas (Cowan, 1999), los cuales encontramos presentes en ambos extractos al hacer las determinaciones colorimétricas correspondientes. A estos compuestos se les ha asociado como inhibidores de proteínas y/o enzimas induciendo la pérdida de función de éstas. Estos resultados coinciden con García *et al.* 2004a, quienes demostraron que el extracto metanólico de *Haematoxylon brasiletto*, inhibió la producción de toxina de *V. cholerae*.

Mientras tanto, al analizar los sobrenadantes tratados con extracto metanólico de alcachofa, se observaron daños pero en títulos mucho menores (1:16 para *C. jejuni* 5653 y 180ip) que los causados por los sobrenadantes bacterianos sin tratamiento (1:64), esto nos pudiera indicar que el efecto de la toxina fue contrarrestado por el efecto del extracto. En el caso de *C. coli*, sería arriesgado asegurar una disminución de la citotoxicidad, ya que al momento de evaluar los sobrenadantes de *Campylobacter*, se evidenció para *C. coli* 1 una destrucción hasta en títulos de 1:8 y después del tratamiento con extracto de alcachofa, el daño causado por el sobrenadante se presentó en la misma dilución (1:8), lo que indicó que el efecto siguió presente aún después del tratamiento.

En las determinaciones colorimétricas, se encontraron para este extracto (alcachofa) taninos y quinonas; a pesar de lo cual, el efecto inhibitorio sobre la citotoxicidad fue menor que en el caso de los extractos de huizache y estafiate. Esto pudiera atribuirse, a la concentración de los mismos o a la sinergia con otros compuestos que no se encontraron en la alcachofa (Cowan,1999).

En el caso de los tratamientos con extractos metanólicos de nopal, se pudo observar que el daño citotóxico no disminuyó en ninguna dilución, por lo que se evidenció que no hubo un efecto inhibitorio por parte del extracto para ninguna de las cepas. Sin embargo, al determinarse colorimétricamente los compuestos presentes, se observó la presencia de flavonoides y según Cowan (1999), estos compuestos son inhibidores de la toxina de *V. cholerae* contraponiéndose con nuestros resultados. Esto pudiera estar influenciado probablemente por la concentración y/o tipo de flavonoides presentes en el nopal (Cowan, 1999).

Cuando analizamos la capacidad de adhesión de nuestras cepas a células Vero, se recuperaron las bacterias adheridas que no fueron sometidas al tratamiento con extracto, en logaritmos de $10^4 - 10^5$ UFC/pozo lo que coincidió con Lee *et al.* (2004) en donde la capacidad de adhesión de *Campylobacter* se encontró en niveles de $\geq 10^4$ UFC/pozo para algunas cepas.

En nuestro estudio, cuando se analizaron las bacterias tratadas con extractos se pudo observar una disminución significativa en la capacidad de adhesión para el caso del tratamiento con alcachofa únicamente con *C. jejuni* 180ip. Para el nopal, se presentó una disminución significativa en la capacidad de adhesión para las cepas *C. jejuni* 180ip y *C. coli* 1 con recuperación de células en logaritmos de 10^3 después del tratamiento con el extracto. Esto coincidió con algunos estudios, en donde extractos de algunas plantas han disminuido la capacidad de adhesión a células como el caso de *V. cholerae* por extractos de *Haematoxylon brasiletto* (García *et al.*, 2004a), y *Campylobacter sp.* por extractos de la fruta de la Okra (Lengsfeld *et al.*, 2007).

Esta disminución de la adhesión ha sido atribuida a compuestos presentes en los extractos de plantas como taninos y quinonas (Cowan, 1999), y al hacer las pruebas colorimétricas correspondientes se detectaron taninos en el extracto de nopal y

ambos compuestos en el extracto de alcachofa. En el caso del huizache y estafiate, no se presentó un efecto significativo en la capacidad de adhesión de *Campylobacter*, a pesar de que en estos dos extractos las pruebas colorimétricas indicaron la presencia de taninos y quinonas. Pero como anteriormente se ha mencionado, el efecto puede variar, según el tiempo de cosecha, el tipo de suelo y la concentración de compuestos presentes entre otros (Cowan, 1999).

Estos resultados dejan claro los efectos que pueden tener los extractos de plantas sobre los microorganismos. Sin embargo resulta de suma importancia determinar si este tipo de compuestos inhiben o ejercen algún efecto sobre los factores de virulencia de *C. jejuni/coli*.

En el caso de *C. jejuni/ coli*, sería de particular importancia el poder identificar cuál de las toxinas producidas es la que se inhibió, así mismo el mecanismo por el cual fue inhibida lo cual pudiera darse a nivel transcripción, traducción, post-traducción, transporte o incluso inhibición directa (Smith y Palmer 2004). En el caso de la CDT producida por *C. jejuni* se pudiera tener una certeza de su producción únicamente determinando la presencia y expresión de los genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*; ya que los efectos citotóxicos causados por citotoxinas en líneas celulares, pueden variar debido a que están influenciados por diferentes factores como la concentración de la toxina (Dassanayake *et al.*, 2004) y la sensibilidad de la línea celular (Johnsson and Lior, 1988) entre otras.

Aun así en nuestro caso, al determinar el efecto citotóxico en células Vero podemos de alguna manera minimizar el efecto de la enterotoxina ya que esta línea celular se ha reportado menos sensibles a ésta. Y como ejemplo, tenemos el caso de *C. coli* 1 que presentó una menor citotoxicidad ya que se ha comprobado en estudios previos que esta especie en algunos casos produce niveles muy bajos o incluso indetectables de la CDT (Pickett *et al.*, 1996; Dang *et al.*, 2001).

Para conocer con exactitud a qué nivel actúan cada uno de los extractos probados en este estudio, se necesitarían hacer determinaciones a nivel molecular. Sería interesante determinar químicamente y caracterizar el compuesto presente en nuestros extractos que es el responsable de los efectos inhibitorios.

Con esta investigación queda asentado el poder antimicrobiano que algunas plantas poseen y por ello es que podrían considerarse una vez más como alternativas para minimizar la resistencia a antibióticos que muchas bacterias han adquirido. De hecho en algunos lugares del mundo (Suiza, Holanda y otros países de Europa), se utilizan las plantas como reforzadoras del sistema inmunológico; esto previene enfermedades y más que utilizarse como curativas, se utilizan como precautorias. Tal vez esto sería una magnífica opción en la cultura médica de México en la que se suman esfuerzos para curar y no se toma en cuenta la prevención.

9. CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de huizache, alcachofa, estafiate y nopal probados poseen un efecto antimicrobiano contra *Campylobacter jejuni* y *C. coli*.

La CMB varió para cada cepa con valores que fueron para el nopal 0.3-0.4mg/ml, huizache 0.3-0.7 mg/ml, estafiate 0.5-0.7mg/ml y alcachofa 1.0-2.0 mg/mL.

Las concentraciones subletales de la CMB (25, 50, 75%) los extractos de estafiate, huizache, alcachofa y nopal no afectaron significativamente la concentración bacteriana de *C. jejuni/coli*.

Los extractos metanólicos de estafiate y huizache inhibieron la citotoxicidad de sobrenadantes de *C. jejuni/coli* sobre células Vero.

El extracto de alcachofa disminuyó la citotoxicidad de los sobrenadantes de *C. jejuni* sobre células Vero.

Los extractos de alcachofa y nopal afectaron la capacidad de adhesión de *C. jejuni/coli* a células Vero.

10. LITERATURA CITADA.

1. Alarcón GG. 2002. Actividad de extractos de plantas en el crecimiento, la producción de toxina y la unión de *Vibrio cholerae*. Tesis Maestría. UANL, FCB.
2. Allos, BM. 2001. *Campylobacter jejuni* infection: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis.* 32, 1201- 1206.
3. Amit S, Ghose AC. 2002. *Vibrio* Pathogenicity Island and Cholera Toxin Genetic Element/Associated Virulence Genes and Their Expression in Non-01 Non-0139 Strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* Vol. 70. No. 8. pp.: 4735-4742.
4. Aqeel A, Khursheed AK, Viqaruddin A, Sabiha Q. 1989. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. *Arzneimittelforschung.* 39: 652-655.
5. Araiza ME. 2001. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens*. Tesis Maestría. UANL, FCB.
6. Atta-ur-Rahman MI, Choudhary M. 1995. Diterpenoid and steroidal alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 12: 361-379.
7. Bag PK, Ramamurthy T, and Nair UB. 1993. Evidence for the presence of a receptor of Cytotoxic distending toxin (CLDT) of *Campylobacter jejuni* on CHO and He-La cell membranes and development of a receptor- based enzyme- linked immunoabsorbent assay for detection of CLDT. *FEMS Microbiol. Lett.* 114: 285-292.

8. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, and Blasser MJ. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* in humans. *J. infect disease.* 157:472-479.
9. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
10. Carvalho CT, Ruiz-Palacios G, Ramos P, Cervantes L, Jiang X and Pickering L. 2001. Molecular Characterization of Invasive and non-Invasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *Journal and Clinical Microbiology.* Vol. 39 No. 4 pp. 1353-1359.
11. Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582.
12. Cox SD and Wyllie SG. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol* 88: 170
13. Dadalioglu I and Akademir G. 2004. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano (*Oreganum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare* on common foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 52:8255-8260.
14. Daikoku TS, Suzuki S, Oka S, and Takama K. 1989. Profiles of enterotoxin and cytotoxin production in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 58:33-36.
15. Dang DB, Flemming S, Ahrens P, Pedersen K, Bloom J, and Madsen M. 2001.

Prevalence of Cytolethal Distending Toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. Isolated from Danish broilers. J. Med. Microbiol. Vol. 50 (2001), 1087-1094.

16. Dassanayake RP, You Z, Hinkley S, Stricker C, Plauche G, Borda T, Sestack K, Dahanmel G. 2004. Characterization of cytolethal distending toxin of *Campylobacter* species isolated from captive macaque monkeys. Journal of clinical microbiology. Vol 43, No.2: 641-649.
17. De Melo MA and Pechere JC. 1990. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to eucaryotic cells in vitro. Infect. Immun 58:1749-1756.
18. Dixon RA, Dey PM, Lamb CJ. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular Biol. Adv. Enzimol. 55:1-69.
19. Domínguez, X. A. 1988. Métodos de Investigación Fotoquímica. Limusa (eds). México, pp. 39- 43.
20. Duke JA. 1985. Hand book of medicinal herbs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
21. Duke JA. 1992. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. CRC Press, Boca Raton, FL..
22. Duke SO, and Duke MV. 2000. Strategies for the discover of bioactive phytochemicals. In: Phytochemicals as bioactive agents. Ed. Wayne R. Bidlack and Debra K. Topham. CRC PRESS. pp. 1-16.
23. Engberg J, Bang DD, Aabenhus R, Aarestrup FM, Fussing V and Gerner-Smith P. 2005. *Campylobacter concisus*: an evaluation of certain phenotypic and

genotypic characteristics. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 10.1111/j.1469-0691.

24. Evertest PH, Goossens H, Butzler JP, Lloyd D, Knutton S, Ketley JM and Williams PH. 1992. Differentiated CaCo-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. J Med. Microbiol. 37: 319-325.
25. Fernandes DC, Gonzalez PB Garcia OF, Carbonero P. 1972. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. Appl. Microbiol. 23: 998–1000.
26. Fields PI. and Swerdlow MD. 1999. *Campylobacter jejuni*. Clin lab Med. 19, 489-504.
27. Fitzgerald DJ, Narbad A. 2004. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. J. Appl. Microbiol. 97: 104-113.
28. Flayeh KA, and Sulayman KD. 1987. Antimicrobial activity of the amine fraction of cucumber (*Cucumis sativus*) extract. J. Appl. Microbiol. 3:275–279.
29. Forsythe SJ. 2000. Food poisoning microorganisms. In *The Microbiology of Safe Food*. Ed. Forsythe, SJ. Pp. 87-148. Abingdon: Blackwell Science Publishers.
30. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2000. Bacterial Activities of plants essential oils and some of their constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. J. of food protection. 65:1545-1560.
31. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*,

- Listeria Monocytogenes, and Salmonella enterica*. J. of Food Protection. 66(10); 1811-1821.
32. García LM, y Uruburu FF.2000. La conservación de cepas microbianas. Temas de Actualidad SEM 30: 12-17.
33. García S, Alarcón G, Gómez M, Heredia N. 2004a. Haematoxylon brasiletto extracts inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. Food Biotechnology. *In press*.
34. García S, Alarcón G, Gómez M, Heredia N. 2004b. Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. J. Ethnopharmacol. Int. W.J. Biotech. *In press*.
35. García S, Araiza M, Gómez M, Heredia N. 2002. Inhibition of Growth, Enterotoxin and Spore Production of *Clostridium perfringens* by Extracts of Medicinal Plants. J. Food Prot. 65: 1667-1669.
36. Geissman TA. 1963. Flavonoid compounds, tanins, linins and related compounds, p.265. In M. Florkin and E.H. Stotz (ed). Pyrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituent, vol. 9. Elsevier, new York, N.Y.
37. Goossens H, Butzler JP, and Takada Y. 1985. Demonstration of Cholerae –like enterotoxin production by *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiol. Letters 29: 73-76.
38. Gun-Britt L, Kaisjer B, Sjogren E. 1989. Enterotoxin production and serogroups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from patients with diarrhea and from healthy laying hens. Journal of clinical Microbiology. Vol. 27, No. 6. pp. 1272-1276.

39. Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. 1998. Effects of tea oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 198-198.
40. Haslam E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59:205–215.
41. Hoult JRS, Paya M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* 7:713–722.
42. Hugo, WB. 1978. Membrane-active antimicrobial compounds a reappraisal of their mode of action in the light of the chemi-osmotic theory. *Int. J. Pharma.* 1: 127-131.
43. Iwu M M, Unaeze NC, Okunji CO, Corley DG, Sanson DR, Tempesta MS. 1991. Antibacterial aromatic isothiocyanates from the essential oil of *Hippocratea welwitschii* roots. *Int. J. Pharma.* 29:154–158.
44. Johnson WM, and Lior H. 1984. Toxins produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lancet* i: 229-230.
45. Johnson WM, and Lior H. 1986. Cytotonic and Cytotoxic factors produced by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter laridis*. *J. clin. Microbiol.* 24: 275-281.
46. Johnson WM, and Lior H. 1988. A new Heat Labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* 4: 115 126.
47. Jones NL, Shabib S, Sherman PM. 1997. Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 146: 223–227.

48. Jones SB, Luchsinger AE. 1986. Plant systematics. McGraw- Hill Book Co., New York, N.Y. 512 pp.
49. Kadohama N, McCarter JA. 1971. Inhibition of DNA polymerase of *E. coli* by proflavine. *Can. J. Biochem.* 50: 901-908.
50. Kazmi MH, Malik A, Hameed S, Akhtar N, Noor S. 1994. An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochem.* 36:761–763.
51. Kawaguchi M, Takama K, and Susuky S. 1989. Distribution and solubilization of *Campylobacter jejuni* toxins. *Microbios Lett.* 42: 113-118.
52. Kinghorn AD, Balandrin MF. 1993. Human medicinal agents from plants. American Chemical Society, Washington, DC. 359 pp.
53. Kisko Gabriela and Roller Sibel. 2005. Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *MBC Microbiology.* doi:10.1186/1471-2180-5-36.
54. Klipstein FA, and Engert RF. 1985. Purifications of *Campylobacter jejuni* enterotoxin. *Lancet* i: 1123-1124.
55. Klipstein FA, Egert RF, Short HB, 1986. Enzyme-Linked immunoabsorbent assays for virulence properties of *Campylobacter jejuni* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 3 no. 10
56. Konkel ME, Hayes SF, Joens LA and Cieplak W. 1992. Characteristics of the internalization and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human epithelial cells cultures. *Microbial. Pathog.* 13: 357-360.

57. Konkel, ME, Mead DJ, Hayes SF, and Cieplak WJr. 1992c. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayers cultures. *J Infect. Disease.* 166: 308-315.
58. Konkel ME, Kim BJ, Klena JD, Young CR, and Ziprin R. 1998. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 66, 3666-3672.
59. Konkel ME, Monteville MR, Rivera V, L Joens. 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni* mediated enteritis. *Current Issues in Intestinal Microbiology.* 2 (2): 55-71.
60. Kopecko DJ, Hu L, and Zaal JM. 2001. *Campylobacter jejuni* microtubule-dependent invasion. *Trends Microbiol* 9, 389-396.
61. Lambert RJ, Nychas JE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453-462.
62. Lee MK, Stephen JB, Lynn AJ. 2004. Potential Virulence and Antimicrobial Suceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from food and companion animals. *Food Borne Pathogens and Disease.* Vol 1 No. 4. pp. 223-230.
63. Lengsfeld C, Faller G and Hensel A. 2007 okra polysaccharides inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry *in vitro* but not *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology.* 135:113-125.
64. Logan SM, and Trust TJ, 1984. Structural and antigenic heterogeneity of lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infect. Immun.* 45: 210-216.

65. Manal-AbuOun, Manning G, Shawn A, Riddley A, Ahmed H, Wassenaar T, and Newel D. 2005 Cytolethal Distending Toxin (CDT)-Negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT Neutralizing Antibodies are induced during Human Infection but not during colonization in Chickens. *Infection and Immunity*. Vol 73, No. 5. pp. 3053-3062
66. Manssouri SH, Foroumadi A, Ghaneie T and Najar A. 2001. Antibacterial Activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 39. Issue 5: 399-401.
67. Mc Cardell BA, Madden JM, and EC Lee. 1986. Effect of Iron concentration on toxin production of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Can. J. Microbiol.* 32: 395-401.
68. Mc Devitt D, Payne DJ, Holmes DJ and Rosemberg M. 2002. Novel Targets for the future Development of antibacterial agents. *Journal of applied Microbiol. Symposium supplement*.92:28S-34S.
69. McSweegan E, Walker RI. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infection and Immunity*. Vol. 53 No.1: 141-148.
70. Mendoza L, Wilkens M, Urzua A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 58:85–88.
71. Miall SH, Walker IO. 1966. Structural studies on ribosomes. The binding of proflavine to *Escherichia coli* ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 145: 82-95.

72. Mooney A, Clyne M, Curran T, Doherty D, Kilmartin B and Bourke B. 2001. *Campylobacter upsaliensis* exerts a cytolethal distending toxin effect on HeLa cells and T lymphocytes. *Microbiol.* 147: 735-743.
73. Morooka T, Umeda A. and Amako K. 1985. Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *J. gen. Microbiol.* 131:1973-1980.
74. Murakami A, Ohigashi H, Tanaka S, Tatematsu A, Koshimizu K. 1993. Bitter cyanoglucosides from *Lophira alata*. *Phytochem* 32:1461–1466.
75. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. 1998. *Campylobacter* species and Guillian Barré syndrome. *clin. Microbiol. Rev.* 11: 555-567.
76. Nachamkin Irving. 2002. Chronic effects of *Campylobacter* Infection. *Science direct.* Vol. 4 Issue 4: 399-403.
77. Nadeau E, Messier S. and Quessy S. 2003. Comparison of *Campylobacter* Isolates from Poultry and Humans: Association Between In Vitro Virulence Properties, Biotypes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Clusters. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 69 No. 10 p. 6316-6320.
78. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Izumi H, and Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia Kurome*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 50, 889-893.
79. Nascimento GG, Locatelli J, Freitas P. and Silva G. 2000. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.* 31: 247-256.
80. Newel DG. 2001. Animal model of *Campylobacter jejuni* colonization an disease and the lessons to be learned from similar *Helicobacter pylori* models. *J Appl Microbiol* 90, 57S- 67S.

81. Obrig TG. 1994. Toxins that inhibit host protein synthesis. *Methods Enzimol.* 235: 647-656.
82. Paulo A, Pimentel M, Viegas S, Pires I, Duarte A, Cabrita J, Gomes E. *Cryptolepis sanguinolenta* activity against diarrheal bacteria. 1994. *J. Ethnopharmacology.* 44(2):73-7.
83. Peterson MC. 1994. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. *Western J med* 161, 148-152.
84. Phillipson JD, O'Neill MJ. 1987. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharm. Nord.* 1:131-144.
85. Pickett C, Everet C, Cottle D, Russell G, Nalca A, and Zetyn H. 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* ssp. *CdtB* genes.
86. Pokorny E, Szikla K, Palvi I, Holczinger L. 1983. The effect of N-formilleuroisine on DNA synthesis of Ehrlich ascites tumor. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 19:1113-1119.
87. Rao SR, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20: 101- 153.
88. Ravishankar S, Libin Z, Law B, Joens L, and Mendel F. 2008. Plant derived compounds Inactivate Antibiotic-Resistant *Campylobacter jejuni* strains. *J. of Food Protection.* Vol. 71, 6:1145-1149.
89. Ross Z, OGara E, Hill D, Sleightholme V, and Maslin D. 2000. Antimicrobial proerties of Garlic oil against Human Enteric Bacteria: Evaluation of Methodologies and comparisons with Garlic oil sulfides and Garlic powder. *Applied and Enviromental Microbiology.* Vol.67 No. 1 p.475-480.

90. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Newburg DS et al. 1992. In vitro models for studying *Campylobacter* infections. In: *Campylobacter jejuni* current status and future trends. Nachamkin I, Blaser MJ, and LS Tomkins (eds). American Society of Microbiology. Washington DC, pp.148-175.
91. Ruiz-Palacios GM, Torres J, Torres NI, Escamilla E, Ruiz Palacios BR, and Tamayo J. 1983. Cholera-Like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*: Characterization and clinical significance. *Lancet* 2:250-253
92. Ruiz-Palacios GM, Cervantes L, Ramos P, Chavez V, and Newburg D. 2002. *Campylobacter jejuni* binds Intestinal H(O) antigen (Fuc- α 1, Gal- β 1, 4GIcNAc) and flucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278, No. 16. pp. 14112-14120.
93. Rusell AD. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J. Hosp. Infect.* 43: S57-S68.
94. Sakagami Y, Murata H, Nakanishi T, Inatomi Y, Watabe K, Iinuma M, Tanaka T, Murata J, and Lang F. 2001. Inhibitory effect of Plant extracts on Production of Verotoxin by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Health Science*, 47 (5) 473-477.
95. Satish S. Raveesha KA, and Janardhana GR. 1999. Antibacterial activity of plants extracts on phytopathogenic *Xantomonas campestris* pathovars. *Letters in Applied Microbiology*. 28, 145-147.
96. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, Ohkawa Y. 1996. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 54 :171–176.
97. Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30: 3875–3883.

98. Silva O, Duarte A, Pimentel M, Viegas S, Barroso H, Machado J, Pires I, Cabrita J, and Gomez E. 1997. Antimicrobial Activity of *Terminalia macroptera* root. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 57, Issue 3.
99. Skirrow MB and Butzler JP. 2000. Foreward. In *Campylobacter* ed. Nachamkin I and Blaser MJ. pp. xvii-xxiii. Washington DC: ASM press.
100. Smith –Palmer A, Stewart J, and Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 26, 118-122.
101. Smith –Palmer A, Stewart J and Fyfe L. 2004. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and α -toxin by *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*. 53, 1023-1027.
102. Snelling WJ, Matusda M, Moore JE. 2005. Under The Microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in applied Microbiology*. 41, 297-302.
103. Spangler BD. 1992. Structure and Function of cholerae toxin and the related *E. coli* Heat- labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56:622-647.
104. Szymansky CM, King M, Haardt M and Armstrong GD. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infect immun* 63, 4295- 4300.
105. Tada M, Hiroe Y, Kiyohara S, Suzuki S. 1988. Nematicidal and antimicrobial constituents from *Allium grayi* Regel and *Allium fistulosum* L. var. *caespitosum*. *Agric. Biol. Chem.* 52:2383–2385.

106. Takata T, Fujimoto S, and Amako K. 1992. Isolation of non chemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect Immun* 60, 3596-3600.
107. Tamplin ML, Honda T, Tsuji T, Miwatani T, Colwell RR. 1988. Evidence of common epitopes in the ganglioside binding site of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 7-11.
108. Tassou CC, Drosinos EH, Nychas GJE. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. *J. Appl. Bacteriol.* 78:593– 600.
109. Toda M, Okubo S, Ohnishi R, Shimamura T. 1989. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Jpn. J. Bacteriol.* 45:561– 566.
110. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Linuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 50: 27–34.
111. Vanhoff R, Gordts B, DierickxR, Coignau H, and Butzler JP. 1980. Bacteriostatic and Bactericidal activities of 24 antimicrobial agents against *Campylobacter fetus* sbsp. *jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol.18 No. 1. pp. 118-121.
112. Van Vliet AH and Keteley JM. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J. applied Microbiol.* 90: 45S- 56S.
113. Vatter D, Reza G and Shetty K. 2005. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on Cranberry. *Asia pac. J Clin Nutr.* 14(2):120-130.

114. Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ and GM, Ruiz-Palacios. 1986. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microb. Rev.* 50:81-84.
115. Walsh SE, Bartolo RG. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94: 240-247.
116. Wassenaar TM, and Newel DG. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ Microbiol.* 66, 1-9.
117. Wassenaar Trudy M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews.* Vol 10, No. 3. pp. 466-476
118. Ziwei L. and Gauri M. 2003. Inactivation of microorganisms in apple cider using spice powders, extracts and oils as antimicrobials with and without low-energy electric field. *Food, Agriculture & Environment* Vol.1 (2): 28-33.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Sandra Loruhamá Castillo Hernández

Candidata para el grado de:
Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología.

TESIS:

Productos naturales como inhibidores de *Campylobacter jejuni/coli*: Estudio sobre actividad biológica y mecanismo de acción.

Campo de estudio: Productos naturales e inocuidad alimentaria.

Biografía.

Nacida en Monterrey N. L. el 21 de Enero de 1972. Hija de Alejandro Castillo y Sandra Hernández. Se graduó de La Universidad Autónoma de Nuevo León en el año de 1995 obteniendo el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Tuvo estudios adicionales de música y canto ya que siempre mostró afición por ello.

De 1998 al 2003, Se desempeñó como docente en ambas habilidades (Laboratorio de química/física y música y canto) y posteriormente en el año de 2005 se desempeñó como docente en la Universidad Autónoma de Nuevo León en donde labora actualmente.

Tesista:

Q.B.P. Sandra L. Castillo Hdz

