Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DEL TALLO DE *Yucca baccata* E IDENTIFICACIÓN DE SUS FRACCIONES CON SAPONINAS

Por:

GABRIEL DARÍO PEREO VEGA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Enero del 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Gabriel Darío Pereo Vega, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.

Dr. Luis Quihui Cota
Director de Tesis

Dra. Evelia Acedo Félix
Asesora

M. C. María del Refugio Robles Burgueño
Asesora

Dr. Javier Hernández Martínez
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento y la oportunidad brindados para realizar mi Maestría.

Le agradezco además, al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Por prestar sus oficinas, aulas y laboratorios para llevar a cabo el proyecto de tesis que aquí desarrollo.

Al proyecto “Evaluación de la actividad antiparasitaria in vivo sobre *Giardia intestinalis* de extractos de saponinas de especies de *Yucca* del desierto sonorense” CONACyT 6152, que también ayudó a financiar mi trabajo durante la maestría.

También agradezco al Dr. Luis Quihui por la asesoría brindada durante los dos años para desarrollar las técnicas metodológicas de extracción e identificación de saponinas.

A la M. en C. Gloria Guadalupe Morales le agradezco toda su gran aportación durante el desarrollo del marco teórico del proyecto aquí presentado.

A una de las mejores amigas y jefas con las que trabajé a la par, la M. en C. Rocío León, que brindó asesoría y ayudó a adaptar las técnicas de extracción, cuantificación por espectrofotometría, e identificación de fracciones con saponinas del tallo de *Yucca baccata* por HPLC y cromatografía en capa fina.

A la M. en C. María del Refugio Robles, por su participación y asesoría para desarrollar la técnica de separación de fracciones con saponinas por HPLC semi-preparativa.

Al M. en C. Orlando Tortoledo, por su paciencia y gran apoyo durante su asesoría que llevó a cabo en la extracción de saponinas, la estandarización de la metodología para la separación de fracciones con saponinas mediante HPLC semi-preparativa y análisis de la eficiencia de separación de las mismas por cromatografía en capa fina.

Agradezco a la Dra. Evelia Acedo por toda la atención y ayuda prestada para realizar la estandarización de los cultivos y técnicas de identificación de la actividad antibacteriana del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*.

Al Dr. Javier Hernández por sus recomendaciones y modificaciones a la técnica de cuantificación de saponinas por espectrofotometría, así como las observaciones para la preparación de la separación de fracciones del extracto butanólico de *Yucca baccata* por HPLC.

A los técnicos Q. B. C. Carmen Lugo y Q. B. Rosalva Pérez Morales por su gran aportación y apoyo técnico a la modificación de la metodología para determinación de la actividad antibacteriana del extracto por difusión por disco en agar y determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida por microdilución.

A Soco, Cony, Luis Enrique, Amparo y Bianca, por compartir su laboratorio y darme la mano cuando más lo necesitaba para seguir persiguiendo mi meta.

Al M.I.I. Alfonso Coronado Sesma por apoyo técnico y modificaciones al formato tesis.

DEDICATORIA

A mi abuelo y mi tía Laura por no soltarme la “rienda” y siempre brindarme su apoyo. Siempre ahí para hablar y aconsejarme, por todo su afecto y compañía. Los quiero mucho.

A mi mamá, mi papá y mis hermanos, aunque los tenga lejos se siente como si siempre estuvieran a mi lado. Agradezco a Dios tener una familia que me quiera tanto.

Finalmente a todos mis amigos: Rocío, Miguel, Roger, Rodo, Jorge, Pelichuken, Mafer, Shidory y en su momento a Viri. Ustedes complementaron el lado party de la maestría. Tardes de risas, pisto y perreo intenso, siempre ayudándome a evaporar el estrés.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras…….	ix
Lista de Tablas……..	xii
Resumen……	xiii
Abstract……..	xv
Capítulo I. **Introducción**…….	1
Capítulo II. **Antecedentes**……..	4
II.I. Enfermedades causadas por bacterias patógenas……...	4
II.II. Breve descripción de los agentes etiológicos bacterianos usados durante el bioensayo de este estudio……..	5
II.II.I *Enterobacteriaceae*……...……...	5
II.II.II. *Listeria monocytogenes*……..…….	7
II.II.III. *Staphylococcus aureus*……..…….	7
II.II.IV. *Pseudomonas aeruginosa*……...	8
II.III. Transmisión de patógenos bacterianos hacia el humano……..	9
I.IV. Epidemiología de algunas enfermedades bacterianas……...	12
I.V. Fármacos antibacterianos y problemática involucrada…….....	15
II.V.I. Efectos secundarios asociados al tratamiento……..	15
II.V.II. Resistencia antimicrobiana…….…….	15
II.VI. Antimicrobianos vegetales……..……..	17
II.VI.I. Características de las plantas del género *Yucca*……...	18
II.VI.II. Saponinas en extractos de plantas medicinales…….....	20
Capítulo III. **Hipótesis**…….	22
Capítulo IV. **Objetivos**…….	23
IV.I. Objetivo general……	23
IV.II. Objetivos específicos……..	23
Capítulo V. **Materiales y métodos**……	25
V.I. Diseño experimental…….	25
V.II. Obtención de muestras de *Yucca baccata* y extracción butanólica……..	25
V.II.I. Colección de especímenes de *Yucca baccata*……...	25
V.II.II. Método de secado del tallo……..	26

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.II.III. Preparación de los extractos…….……	26
V.IV. Análisis *in vitro* de la actividad antibacteriana……..	27
V.IV.I. Cultivos bacterianos……..	27
V.IV.II. Medición de la actividad antibacteriana por difusión en agar…..	27
V.IV.III Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)….	28
V.IV.IV Concentración mínima bactericida (MBC)…….....	28
V.III. Cuantificación de saponinas y separación de fracciones del extracto……	29
V.III.I. Cuantificación de saponinas por espectrofotometría……	29
V.III.II. Estandarización de la identificación de las fracciones de saponinas por cromatografía en capa fina…….……..	30
V.III.III. HPLC semi-preparativa para separación de saponinas	30
Capítulo VI. **Resultados**.....	33
VI.I. Rendimiento de la extracción butanólica……	33
VI.II. Actividad antibacteriana del extracto……	33
VI.II.I Difusión del extracto en agar…….....	33
VI.III.II. Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida…….	34
VI.IV. Cuantificación e identificación de fracciones con saponinas….....	37
VI.IV.I. Cuantificación de la concentración de saponinas por espectrofotometría……	37
VI.IV.II. Estandarización de la identificación de saponinas por TLC…..	38
VI.IV.III. Separación de saponinas por HPLC semi-preparativa……	39
Capítulo VII. **Discusión**…….....	48
Capítulo VIII. **Conclusiones**……	53
Bibliografía……	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		**Página**
1	Principales puntos de control para prevención de contaminación y desarrollo de patógenos bacterianos en alimentos. Imagen resumida de la fuente: CDC, 2011.	10
2	Mapa esquemático de la localización de la clase Sarcocarpa de *Yucca*, sombreado en gris. Modificado de Pellmyr et al., 2007.	19
3	Fotografías de *Yucca baccata* en la zona aledaña a Cananea, Sonora, (izquierda) y *Yucca schidigera* (derecha).	19
4	Estructura química general de una saponina esteroidal. El grupo R representa uno o más sacáridos. (B) Representación gráfica de la molécula del colesterol. Modificado a partir de las fuentes: Skhirtladze et al., 2011 y Levitan, 2009; respectivamente.	20
5	Esquema del gradiente de separación del EBY (50 mg/100 µl) por HPLC semi-preparativa utilizado en este estudio**.**	32
6	Fotografía de la concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* ATCC 6538P (derecha y centro) y *L. monocytogenes* ATCC 7644 (izquierda).	35
7	Curva estándar de diosgenina utilizada para el cálculo de la concentración de saponinas en los extractos de *Y. baccata* (R^2=0.9932).	38
8	Cromatografía en capa fina del extracto butanólico de *Y. baccata*. Las saponinas son reveladas como manchas color verde y las sapogeninas tienen tonalidad amarilla-verdosa. El carril 1 es diosgenina y los carriles 2, 3, 4 y 5 las saponinas fraccionadas del extracto.	39

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
9	Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 50 mg/100 µl, λ = 248 nm, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 185 min, 23 °C.	42
10	Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 50 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 185 min, 23 °C.	42
11	Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 3 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 60% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.	43
12	Comparación de los cromatogramas HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 3 mg/100 µl, 9 mg/100 µl y 15 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 60% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.	43
13	Comparación a escala de un solo pico de los cromatogramas HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 3 mg/100 µl, 9 mg/100 µl y 15 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 60% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.	44
14	Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 25 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.	44
15	Cromatograma TLC de diosgenina 200 µg/ml (1), extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 1 mg/ml (2 y 3), fracción 23 1 mg/ml (4), fracción 24 1.3 mg/ml (5), fracción 25 1 mg/ml (6), fracción 26 1 mg/ml (7), fracción 27 0.9 mg/ml (8), fracción 28 0.7 mg/ml (9).	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
16	Cromatograma TLC de diosgenina 200 µg/ml (1), extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 1 mg/ml (2 y 3), fracción 23 1 mg/ml (4), fracción 24 1.3 mg/ml (5), fracción 25 1 mg/ml (6), fracción 26 1 mg/ml (7), fracción 27 0.9 mg/ml (8), fracción 28 0.7 mg/ml (9). Modificado para la mejor visualización de las bandas con saponinas.	46
17	Cromatograma del barrido HPLC-DAD 3D del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 50 mg/100 µl, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 185 min, 23 °C.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		**Página**
1	Gradiente paso a paso, con cambio lineal entre pasos, estandarizado para la separación de las fracciones por HPLC semi-preparativa.	31
2	Susceptibilidad antibacteriana ante los extractos del tallo de *Y. baccata* por la técnica de difusión por discos.	34
3	Concentración mínima inhibitoria de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Senftenberg ATCC 8400 y *S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Choleraesuis ATCC 14028.	36
4	Concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* atcc 6538P, *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.	37
5	Factores de retención calculados para cada fracción revelada a partir del extracto butanólico de *Y. baccata*.	40
6	Desglose de las características de las fracciones del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* separadas por HPLC.	45

RESUMEN

Las enfermedades causadas por bacterias son un problema grave para la población y generan un impacto económico negativo a la industria y al sector salud. Sumado a esto, el uso indiscriminado de los antibacterianos disponibles ha ocasionado una tasa elevada de resistencia antimicrobiana y efectos secundarios. Los antibacterianos naturales ofrecen una solución atractiva a estos problemas, ya que la naturaleza biológica de los metabolitos secundarios en las plantas, como saponinas y polifenoles, podría hacerlos más económicos, eficaces y con menos efectos adversos. En este trabajo se evaluó la actividad *in vitro* de los extractos butanólico (EBY) y acuoso (EAY) de *Yucca baccata* contra bacterias patógenas para humanos. Para llevarlo a cabo, se realizó la extracción acuosa el tallo de *Y. baccata*, y luego una extracción líquido-líquido con n-butanol. Después, se realizó un experimento piloto para probar la actividad antibacteriana de ambos extractos mediante la técnica de difusión por disco en agar. Se analizaron las concentraciones mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC) contra los patógenos bacterianos más comunes como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se cuantificó la concentración de saponinas por espectrofotometría y se evaluó la variedad de saponinas por cromatografía de capa fina por revelación con anisaldehído-ácido sulfúrico. Además, se llevó a cabo la separación del EBY en fracciones mediante HPLC semi-preparativa, para la purificación e identificación de las fracciones con saponinas. Los resultados mostraron que hay una concentración de 23.9% de saponinas en el extracto butanólico, mientras que en el extracto acuoso sólo hay 17.1%, con aproximadamente 8 fracciones de saponinas esteroidales en ambos. *Salmonella* Senftenberg, *E. coli* y *E. coli* O157:H7 fueron las bacterias más susceptibles contra el EBY por el método de difusión por disco (6 mg/disco). *P. aeruginosa* tuvo sensibilidad moderada contra el EBY y EAY pero fue resistente al antibiótico kanamicina (30 µg/disco). Por otro lado, las bacterias Gram positivas *S. aureus* y

L. monocytogenes presentaron las MICs más bajas entre todas las bacterias analizadas (15 mg/ml), con MBCs de 25 y 17.5 mg/ml, respectivamente. Se separaron 28 fracciones del EBY por HPLC semi-preparativa. Las mejores condiciones de separación para la inyección de 50 mg de EBY se lograron mediante un gradiente paso a paso de 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, con cambios lineales entre pasos, a un flujo de 3.5 ml/min. De las 28 fracciones, se identificaron 6 que contenían las 8 fracciones con saponinas esteroidales, previamente identificadas en el EBY. El promedio de recuperación de las fracciones con saponinas fue de 1.02 mg/50 mg de EBY. El efecto antibacteriano del EBY fue bacteriostático para el caso de bacterias Gram negativas y bactericida para Gram positivas. Dicho efecto pudiera deberse a la alta concentración y variedad de saponinas esteroidales encontradas en el EBY.

Palabras claves: *Yucca baccata*, extracto butanólico, saponinas, esteroidales, HPLC, antibacterianos

ABSTRACT

Bacterial diseases economically affect the industry and public health, causing major problems to people. In addition, the overuse of available antibiotics has caused high rates of antimicrobial resistance and side effects. Due to their biological nature, plant antibacterial secondary metabolites like saponins and polyphenols offer an attractive, effective, affordable and less adverse solution to these problems. In this study, we evaluated the *in vitro* activity of butanolic (EBY) and aqueous (EAY) saponin extracts from *Yucca baccata*, a Sonora desert plant, against human bacterial pathogens. To achieve this, aqueous extraction from *Y. baccata* stem and later, a liquid-liquid extraction with n-butanol were performed. A pilot experiment to test antibacterial activity of both extracts was carried out by disk diffusion method. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations were tested against some of the most common bacterial pathogens such as *Escherichia coli, Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Then, after saponin concentration was quantified by spectrophotometric methods and saponin variety was screened by thin layer chromatography and revealed with anisaldehyde-sulfuric acid. In addition, EBY fractionation by semi-preparative HPLC to purify and to identify saponin fractions was developed and analyzed. Results showed that the butanolic extract possess 23.9% saponin content, while aqueous extract 17.1%, with approximately 8 steroidal saponin fractions identified by TLC. *Salmonella* Senftenberg, *E. coli* and *E. coli* O157:H7 were the most susceptible bacteria to EBY according to the disk diffusion assay (6 mg/disk). *P. aeruginosa* had moderate sensitivity to EBY and to EAY but it was resistant to antibiotic kanamycin (30 µg/disk). On the contrary, the Gram positive bacteria S*. aureus* and *L. monocytogenes* had the lowest MICs (15 mg/ml), and they had MBCs of 25 and 17.5 mg/ml, respectively. EBY's Semi-preparative separation produced 28 fractions. Out of the 28 fractions, 6 were identified to contain the 8 steroidal saponin fractions previously identified in EBY. The mean recovery of saponin fractions was 1.02 mg/50 mg of EBY. The most

suitable separation conditions of the EBY at 50 mg concentrations were attained by a step by step gradient elution, with lineal changes between steps, of 7 - 50% MeCN with 0.1% formic acid, at 3.5 ml/min. EBY's antibacterial effect was bacteriostatic to Gram negative bacteria and it was bactericidal to Gram positive bacteria. That effect may be due to the saponin variety and concentration found in the EBY.

Keywords: *Yucca baccata*, butanolic extract, saponins, steroidal, HPLC, antibacterial

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por bacterias son un problema grave para la población y generan pérdidas económicas a la industria y al sector salud. Recientemente, se ha incrementado el número de estudios que involucran brotes epidémicos causados por bacterias patógenas. Entre los principales factores contribuyentes a esto se encuentran el consumo de alimentos y bebidas contaminados, la mala higiene y condiciones de vida insalubres (Colombari et al., 2007).

Las bacterias involucradas con mayor prevalencia en los brotes de enfermedades humanas son *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Torres-Vitela et al., 2012; Vandamm et al., 2013). Los síntomas que se presentan por la infección con estas bacterias abarcan desde diarrea y vómitos, hasta complicaciones como abortos, bacteriemias, septicemias y la muerte (Johnson et al., 2011; Kobayashi et al., 2013; Locatelli et al., 2013). La sintomatología suele ser más severa en grupos susceptibles, como los niños y embarazadas, que se caracterizan por tener deficiencias inmunológicas y cursar con desnutrición leve o moderada. En ellos, los síntomas leves como la diarrea causan estragos significativos debido a la malabsorción de nutrientes (como zinc), que en casos crónicos ocasiona desnutrición más severa (WHO, 2012; Iñigo-Figueroa et al., 2013).

A través del tiempo, se han desarrollado distintos métodos físicos y químicos para prevenir, controlar y eliminar los brotes que involucran bacterias patógenas. Los métodos físicos son muy efectivos y se enfocan principalmente en la prevención de brotes por contaminación de alimentos. No obstante, se ha demostrado que algunos tratamientos físicos como el procesamiento térmico de los alimentos generan compuestos dañinos para la salud (Guth et al., 2013).

Por otro lado, el control y la eliminación de brotes bacterianos patógenos involucran métodos químicos. Algunos ejemplos son la aplicación de agentes sanitizantes en la desinfección de superficies y, el consumo de antibióticos sintéticos para combatir enfermedades. Todos estos métodos antibacterianos son muy efectivos, sin embargo, existen problemas asociados a su uso que deben minimizarse en lo posible.

La aplicación indiscriminada de antibacterianos en las últimas décadas ha suscitado la aparición de resistencia antibacteriana y efectos secundarios ajenos a la infección. Por mencionar algunos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus* sp. resistente a vancomicina son ejemplos de bacterias patógenas que ya no responden a tratamiento con antibióticos que se utilizaban como primera elección. Los efectos secundarios asociados al consumo de antibióticos son variados e inespecíficos: náuseas, sarpullido, anafilaxis, entre otros (Little et al., 2013). El temor que ello provoca en la sociedad y la necesidad de gozar de buena salud, incrementan la preferencia de remedios homeopáticos y tradicionales (Upadhyay et al., 2013). Es entonces importante, estudiar el potencial antibacteriano de sustancias con menos efectos adversos, que puedan convertirse en nuevos antibióticos contra bacterias patógenas resistentes.

Los extractos de plantas presentan una solución atractiva a esta problemática porque tienen actividad bactericida *in vitro*, incluyendo eficacia contra cepas bacterianas resistentes a antibióticos, y son una opción natural aceptada ampliamente por los consumidores (Warnke et al., 2013; Sfeir et al., 2013). La composición química de los extractos vegetales dependerá del genotipo de la planta, su origen geográfico, así como el ambiente y condiciones agronómicas (Silva et al., 2013). Entre las sustancias que produce la planta se encuentran los metabolitos primarios, involucrados en su crecimiento, y los metabolitos secundarios (taninos, fenoles, saponinas, etc.) sintetizados con fines defensivos. Estos últimos han sido objeto de estudio en la caracterización química y antimicrobiana de los compuestos activos presentes en extractos vegetales (Zhang et al., 2008; Kowalczyk et al., 2011). Además, la naturaleza

biológica de los metabolitos secundarios podría facilitar su compatibilidad con otros seres vivos, minimizando o incluso eliminando efectos secundarios.

Las saponinas son metabolitos secundarios vegetales cuyo estudio es prometedor por sus propiedades antifúngicas, antiparasitarias, y su potencial en la industria. La actividad de las saponinas está relacionada a la estructura de su aglicona, que puede ser terpenoide o esteroidal, y a la variedad de azúcares unidos a ella. Esta organización química les permite interactuar con el colesterol y los lípidos de membrana, y así, formar poros que ocasionan lisis celular (Arabski et al., 2012).

Se han publicado algunos estudios que analizan la acción antimicrobiana de saponinas de distintas plantas como *Quillaja saponaria*, *Yucca schidigera* y *Yucca baccata* (Arabski et al., 2012; León, 2012; Qin et al., 2012). Las saponinas del extracto butanólico del tallo de *Y. baccata* poseen actividad contra *Giardia lamblia*, un parásito causante de diarrea y malabsorción intestinal (Quihui-Cota y León et al., 2014). Sin embargo, siendo *Y. baccata* una planta común del noroeste de México y suroeste de Estados Unidos, hay carencia de estudios que analicen su potencial antimicrobiano.

Por todo lo anterior, el presente estudio planteó como objetivo probar la eficacia del extracto butanólico con saponinas del tallo de *Y. baccata* contra bacterias patógenas en un modelo *in vitro*. Adicionalmente, se determinó la concentración y variedad de saponinas presentes en el mismo extracto. Esta tesis pretendió ayudar a planificar aplicaciones farmacológicas posteriores para las saponinas de la planta en cuestión. Entonces, es de notarse que las limitantes radican en la ciencia básica del proyecto y en la falta de un análisis *in vivo*, del uso de cepas resistentes a antibióticos, así como del estudio de bacterias aisladas a partir de especímenes clínicos.

II. ANTECEDENTES

Enfermedades Causadas por Bacterias Patógenas

Las infecciones bacterianas suelen ocasionar síntomas muy variados dependiendo del sitio de infección, el inóculo infectivo, la susceptibilidad del hospedero y la virulencia de la cepa, entre otros factores (Joo et al., 2011). Las bacterias patógenas para humanos pueden producir síntomas variados como gastroenteritis, problemas urinarios, abortos, etc. En casos crónicos y severos llegan a sobrepasar las barreras inmunológicas e infectan el torrente sanguíneo (bacteriemia), lo cual se asocia a altas tasas de mortalidad (Yamagishi et al., 2012).

A las enfermedades que ocasionan las bacterias se les conoce con el nombre genérico de “bacteriosis”; así la enfermedad causada por *Salmonella* sp. Se llama “salmonelosis”. Dentro de las bacteriosis, las enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella* sp., y algunos patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, tienen gran importancia epidemiológica (Kim et al., 2013; Bilavsky et al., 2013; Slifman et al., 2003). De ahí que, la mayoría de las investigaciones que prueban la susceptibilidad ante nuevos compuestos antibacterianos, utilicen cepas de esas bacterias como referencia (Fakruddin et al., 2012; Silva et al., 2013).

Breve Descripción de los Agentes Etiológicos Bacterianos Usados Durante el Bioensayo de Este Estudio

Enterobacteriaceae

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, los géneros más comunes y patológicos para el hombre son *Escherichia* y *Salmonella*. Ambos son bacilos Gram negativos facultativos, causales de enfermedad alimentaria y zoonosis (Piérard et al., 2012; Ruby et al., 2012). Las especies que derivan de estos géneros se clasifican en serotipos según el tipo de antígeno O y H, que corresponden al lipopolisacárido y a la flagelina, respectivamente, y son esenciales para su virulencia. La especie *S. enterica* y la cepa *E. coli* O157:H7 son las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia en brotes de enfermedades infecciosas alrededor del mundo (Scheiring et al., 2008; Bisi-Johnson et al., 2011; Hiriart et al., 2013). Por lo general causan gastroenteritis, colitis hemorrágica, meningitis, enfermedad sistémica, entre otros síntomas (Reis y Horn, 2010).

E. coli se divide en 7 patotipos diarreogénicos (DEPs). Los DEPs asociados al consumo de alimentos incluyen *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena típica y atípica (tEPEC, aEPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y productora de toxina Shiga (STEC) (Castro-Rosas et al., 2012; Gómez-Aldapa et al., 2014). La forma más prevalente es la STEC, dentro de la cual, la cepa capaz de producir diarrea sanguinolenta en humanos es referida como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

La EHEC usualmente posee factores de virulencia adicionales a la toxina Shiga (Stx), como la habilidad para adherirse a la superficie luminal de los enterocitos del hospedero y causar deformación de las microvellosidades. Esto explica la diarrea acuosa provocada por la pérdida de superficie de absorción intestinal (Taylor, 2008). Además, la EHEC es la causa más común de síndrome urémico hemolítico (HUS), cuyas características principales son la anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda. Entre las cepas de EHEC que ocasionan HUS, *E. coli* O157:H7 es el serotipo usualmente implicado (Scheiring et al., 2008; Hauswaldt et al., 2013).

Salmonella enterica se divide en 7 subespecies y, a su vez, la subespecie *enterica* consta de más de 1500 serotipos (Wiesner et al., 2009). *S. enterica* subespecie *enterica* serotipos Typhi, Paratyphi y Tiphymurium son responsables por la mayoría de los casos de salmonelosis humana, en especial, *S.* Typhi, que causa la fiebre tifoidea (Bisi-Johnson et al., 2011; Ruby et al., 2012; Hiriart et al., 2013). Otro serotipo importante es *Salmonella* Senftenberg, cuya infección se asocia al consumo de mariscos, como crustáceos y moluscos, y hojas de albahaca (Martinez-Urtaza y Liebana, 2005; Berger et al., 2010). La patogenicidad de *S.* Senftenberg es menor a la de los serotipos mencionados antes pero es típicamente más resistente al calor, lo que la hace un indicador biológico importante en análisis representativos de la especie (Murphy et al., 2002; De Clercq et al., 2007).

La habilidad de los patógenos entéricos para invadir y penetrar las células epiteliales intestinales es importante en la fisiopatología de la salmonelosis. El mecanismo clave involucra adherencia a las células de la mucosa intestinal y sistemas de secreción tipo III que son codificados por la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), y ayudan en la invasión de la célula hospedera (Ruby et al., 2012). Entre los factores de virulencia más comúnmente encontrados están los genes *invA* y *fliC*. El gen *invA* ayuda a la unión del patógeno a las células epiteliales, mientras que *fliC*, el gen de la flagelina, facilita la propagación sistémica de este patógeno (Bisi-Johnson et al., 2011; Paniagua et al., 2007).

Las cepas de *Salmonella* sp. tienen preferencia por las células M (ya sea de las placas de Peyer o del tejido linfoide intestinal), que son células especializadas que muestrean el contenido antigénico del intestino. Al adherirse en el epitelio intestinal, la bacteria se internaliza y una vez dentro, es encerrada en el fagolisosoma. Allí, altera la vía endocítica para evitar ser destruida y se replica, después las bacterias se diseminan desde las placas de Peyer hasta los nódulos linfáticos mesentéricos, generando una infección sistémica (Reis y Horn, 2010).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram positivo intracelular, no forma esporas y es móvil por flagelos peritricos. Esta bacteria puede sobrevivir e incluso desarrollarse en condiciones adversas, como temperaturas frías (3-4°C). Además posee mecanismos de adaptación, como la capacidad de formar biopelículas sobre superficies bióticas y fómites, comunicación por quórum sensing y genes de resistencia antibiótica, entre otros (da Silva y De Martinis, 2013; Whittaker, 2012; Espinoza et al., 2004; Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Uno de los mecanismos de patogenicidad cruciales para *L. monocytogenes* es su capacidad hemolítica, principalmente en septicemias. Entre las hemolisinas de *L. monocytogenes* que ocasionan bacteriemia, la listeriolisina O (LLO), le confiere habilidad de multiplicación intracelular en fagocitos, facilitando su distribución entre células (Stavru et al., 2011; Schnupf y Portnoy, 2007).

L. monocytogenes se disemina a diversos órganos, y causa infecciones en locaciones múltiples del organismo humano. La fisiopatología de la listeriosis, comienza con la entrada bacteriana al tracto gastrointestinal a través de alimentos y bebidas contaminados. Una vez en el intestino, si el sistema inmune no es capaz de combatir o eliminar la infección, se produce la bacteriemia primaria. A partir de aquí, *L. monocytogenes* puede viajar a través de nódulos linfáticos a hígado y baso. Si la infección no es controlada en esta etapa, se produce una bacteriemia secundaria. Así, el microorganismo llega a sitios como el sistema nervioso central y a la placenta, ocasionando meningoencefalitis, abortos y enfermedad neonatal, respectivamente (Hoelzer et al., 2012).

Staphylococcus aureus

El coco Gram positivo *Staphylococcus aureus* es una bacteria conocida por su característica de agrupación en forma de racimo. Esta bacteria coloniza las narinas, garganta e intestinos en el humano, pudiendo actuar como comensal de la microbiota humana (Acton et al., 2009; Treesirichod et al., 2014). Por otro lado,

el espectro clínico de las enfermedades causadas por *S. aureus* varía desde infecciones en la piel y tejido blando, hasta infecciones invasivas que ponen en peligro la vida (Mernelius et al., 2013). Algunos ejemplos son: infecciones urinarias, respiratorias, oculares, y bacteriemia asociada con endocarditis infectiva y sepsis (Sabouni et al., 2014).

S. aureus cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia que participan en su patogenicidad durante las diversas infecciones. Entre los más destacados se encuentran el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico, presentes en la pared celular de *S. aureus*. Estos factores participan en la producción de hipotensión hipovolémica, causada por la fuga del plasma hacia el espacio extravascular (Imamura, 2014). Las toxinas mayormente asociadas a este microorganismo son las hemolisinas, leucocidinas, enterotoxinas estafilocócicas estables al calor y la toxina que ocasiona el síndrome del choque tóxico-1 (TSST-1). Ésta última ocasiona envenenamiento alimentario, enterocolitis, síndrome de piel escaldada y choque tóxico (Sabouni et al., 2014).

Las proteasas ScpA y SspB son las más abundantes entre las enzimas proteolíticas extracelulares de *S. aureus*. Las proteasas juegan un papel importante en la sepsis y en la endocarditis infecciosa. Pueden activar o inactivar los factores de coagulación plasmáticos, impidiendo la inducción de defensas de coagulación del hospedero contra patógenos. Además degradan el colágeno, lo que destruye los tejidos y facilita la diseminación de *S. aureus* hacia la circulación (Imamura, 2014).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa sigue siendo un dilema terapéutico por el amplio rango de infecciones crónicas y agudas que ocasiona, incluyendo infecciones pulmonares, de heridas, e incluso sepsis (Nakamura et al., 2014). *P. aeruginosa* es un patógeno nosocomial y oportunista que puede ser aislado de pus, esputo, orina y otras muestras dependiendo de la infección provocada (Ravaoarinoro et al., 1996).

La bacteriemia con *P. aeruginosa* es una de las infecciones más temidas debido a sus altas tasas de mortalidad (20-39%) (Willmann et al., 2013). Este tipo de infección se asocia a inmunodeficiencias, presencia de catéteres venosos centrales y urinarios, entre otras causas (Joo et al., 2011). La mortalidad ulterior depende del ámbito hospitalario, la seriedad de las enfermedades de fondo y la administración oportuna de tratamiento apropiado.

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa no fermentadora de glucosa (Tsuchimochi et al., 2008). La patogenicidad de *P. aerugiosa* depende de la producción y secreción de múltiples factores de virulencia que son regulados a nivel transcripcional por el quórum sensing (Grosso-Becerra et al., 2014). Entre sus factores de virulencia se encuentran la capacidad de formar biopelículas, las lectinas y la secreción de pigmentos como fluoresceína y piocianina (Wu et al., 2014; Weiser et al., 2014). La biopelícula puede promover la transferencia horizontal de genes, originando una diversidad genética que confiere a la bacteria con ventajas adaptativas asociadas a su virulencia (Ramos et al., 2010).

Transmisión de Patógenos Bacterianos Hacia el Humano

Por lo general, las enfermedades causadas por *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, y *S. aureus*, han sido asociadas con el consumo de numerosos productos alimenticios y bebidas (Castro-Rosas et al., 2012). Se ha estimado que alrededor del 95% de casos humanos de salmonelosis son originados por el consumo de productos alimenticios contaminados (Hiriart et al., 2013). El uso de materiales crudos inseguros y las prácticas inadecuadas durante la manufactura y conservación de los alimentos, los hacen un riesgo potencial a la salud pública. Sin embargo, es aparente que el comportamiento patógeno es único al producto en cuestión. La disponibilidad de nutrientes, pH, u otros factores intrínsecos de los productos probablemente tengan un papel importante en la proliferación de patógenos a temperaturas abusivas (Torres-Vitela et al., 2012; Vandamm et al., 2013).

La calidad microbiológica de los alimentos y la prevalencia de las bacterias patógenas son de los puntos que necesitan mayor regulación para evitar enfermedades y brotes epidémicos. Es posible, incluso, encontrar altos niveles de contaminación por bacterias patógenas en alimentos preparados en restaurantes con reconocimientos en el ramo higiénico (Castro-Rosas et al., 2012). Esta contaminación no siempre se debe a las prácticas insalubres en el manejo y preparación de los alimentos sino también a la materia prima cruda, como vegetales, que son irrigados con aguas residuales en ciertos lugares. *E. coli* y *Salmonella* sp., por ejemplo, son bacterias capaces de resistir largos periodos de tiempo en lechuga y albahaca (Berger et al., 2010; Van der Linden et al., 2013). Así, los patógenos bacterianos sobreviven y se mantienen viables en alimentos hasta infectar al consumidor (Figura 1).

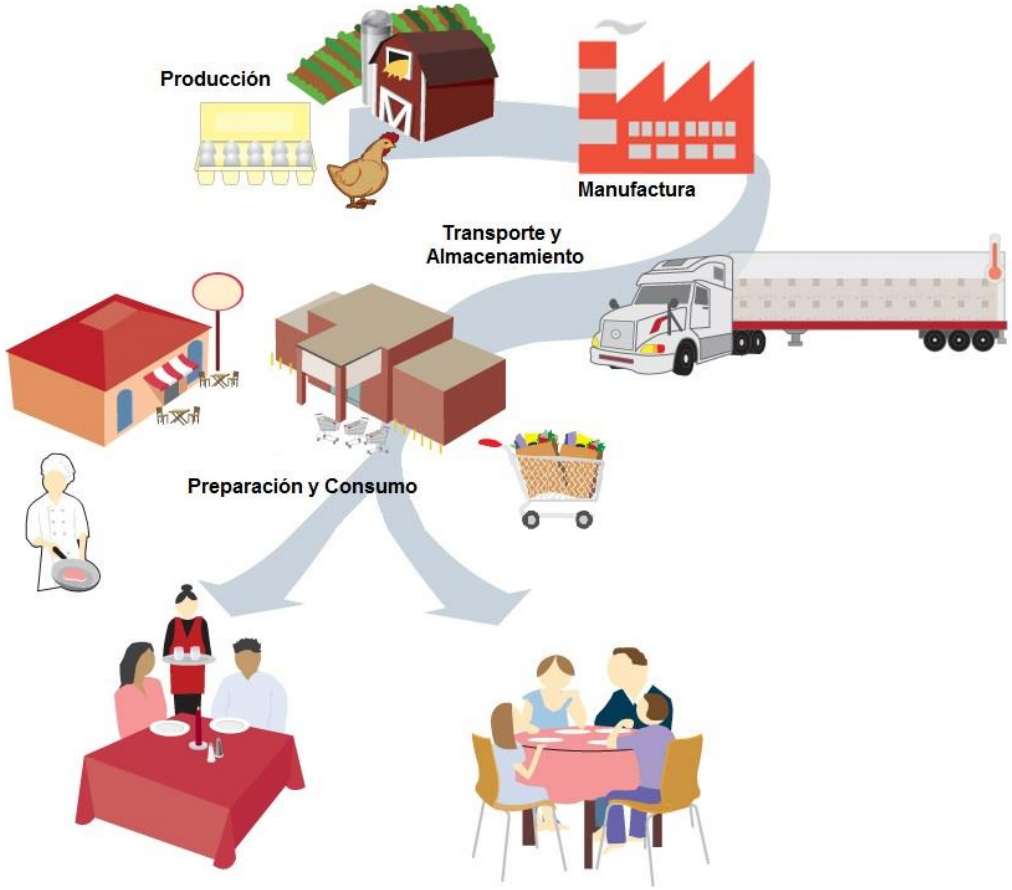

Figura 1. Principales puntos de control para prevención de contaminación y desarrollo de patógenos bacterianos en alimentos. Imagen resumida de la fuente: CDC, 2011.

Los alimentos listos para consumir (RTE, por sus siglas en inglés) suelen portar altos niveles de contaminación por patógenos bacterianos debido a su proceso de elaboración y almacenamiento. En un estudio de inspección de alimentos llevado a cabo durante diez años (2001-2010) en 15 comedores universitarios, se muestrearon un total de 135 sandwiches, 140 productos de panadería horneados, 30 postres con crema de leche y 122 pasteles congelados (Kotzekidou, 2013). Los porcentajes más elevados de patógenos transmitidos por alimentos se encontraron en los postres con crema de leche con 20% de *L. monocytogenes* y 12.5% de *S. aureus*. De igual forma, otro estudio llevado a cabo en México con quesos frescos hechos a mano, reveló que de 200 muestras, el 46% fueron positivas para al menos un patógeno bacteriano, entre los que destacan *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Torres-Vitela et al., 2012).

Por otra parte, *P. aeruginosa* es un patógeno que generalmente se transmite en hospitales. Los predictores clínicos para la infección con *P. aeruginosa* involucran presencia de catéter venoso central, dispositivo urinario y otros tratamientos invasivos (Joo et al., 2011; Willmann et al., 2013).

Otra fuente potencial de transmisión de patógenos bacterianos son los animales. Los animales pueden ser colonizados por bacterias que son claramente patógenas en humanos, sin expresar enfermedad. Esta situación de portador animal con potencial para transmitir enfermedad al humano, es conocida como zoonosis. El reservorio principal implica variedades de especies animales como ganado, ovejas, cabras, pollos y otras aves. Los cerdos y el ganado son el reservorio predominante de la ETEC y STEC (Gómez-Aldapa et al., 2014). Un ejemplo típico de STEC zoonótica es el serotipo O157:H7 (*E. coli* enterohemorrágica, EHEC) cuyo reservorio es el tracto intestinal de ganado saludable y otros rumiantes. La EHEC puede ser responsable de dos síndromes severos en humanos, la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (Taylor, 2008; Piérard et al., 2012). La contaminación fecal de los productos de origen animal y del agua para beber es la principal ruta de infección de estos patógenos hacia los humanos.

Los cocineros y el personal médico también pueden actuar como portadores y ocasionar contaminación por bacterias patógenas. *S. aureus* y *E. coli* son dos microorganismos ampliamente detectados en estos tipos de trabajadores. En las manos de cocineros de escuelas primarias se ha encontrado una prevalencia de hasta 74% para *S. aureus* y de 14% para *E. coli* (Tan et al., 2014). El personal médico ha resultado portador asintomático de *S. aureus* en narinas, con tasas de prevalencia de hasta 20%, con aislado de enterobacterias en menor proporción (Treesirichod et al., 2014). Estos datos son preocupantes porque por lo general, se trata de trabajadores que atienden a individuos inmunocomprometidos, ancianos, embarazadas y niños. La transmisión de estos patógenos ya sea a partir de alimentos preparados por los cocineros, o a través de catéteres colocados por médicos, es un factor de riesgo que debe ser minimizado o eliminado.

Epidemiología de Algunas Enfermedades Bacterianas

El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) estima que 1 de cada 6 personas se enferma cada año por consumo de alimentos contaminados. Además, sustenta que se han reducido en 50% las infecciones por *E. coli* O157 desde 1997 (CDC, 2011). En contraste, el diagnóstico por infección con *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se ha incrementado con el tiempo, tal vez como resultado de mejores técnicas de identificación en el laboratorio. Del total de personas que sufre alguna infección bacteriana, los niños, mujeres embarazadas, ancianos e individuos inmunocomprometidos (o inmunodeprimidos), son clasificados como grupos de riesgo por ser más susceptibles al ataque bacteriano.

Los niños son muy susceptibles ante enfermedades bacterianas porque poseen sistemas inmunes débiles y sus órganos no están completamente desarrollados, incluyendo el estómago e intestinos (Kim et al., 2013). La mayor incidencia de síndrome urémico hemolítico (HUS) inducido por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) en Europa y Norteamérica ocurre en niños de 1-5

años. El número de niños con infección por EHEC que padece HUS se ha mantenido a través de los últimos 20 años. Se ha estimado que uno de cada diez niños expuestos a la infección desarrolla síntomas como dolores abdominales y diarrea, y 15% de los niños con estos síntomas desarrollan HUS; la mortalidad varía entre 3% y 5% (Taylor, 2008; Scheiring et al., 2008; Hauswaldt et al., 2013).

Otro patógeno comúnmente asociado con problemas gastrointestinales, principalmente en países en vías de desarrollo, es *Salmonella* sp. Esta bacteria causa más hospitalizaciones y muertes que cualquier otro microorganismo contaminante de alimentos, ocasionando un costo económico de 365 millones de dólares en gastos médicos directos al año (CDC, 2011).

En México, los casos de enfermedad gastrointestinal e infecciones alimentarias son escasamente reportados (Torres-Vitela et al., 2012). La razón se asocia principalmente a la idiosincrasia del mexicano. La mayoría de las personas prefieren vivir con síntomas molestos, a los cuales se acostumbran, antes que acudir al médico.

En el estado de Sonora, algunos brotes de salmonelosis han ocurrido por consumo de pollo y sushi contaminados. En el 2013, se reportó un brote de salmonelosis por consumo de sushi en una cadena de restaurantes locales de la ciudad de Hermosillo, donde 198 personas resultaron intoxicadas. Durante las dos semanas que duró el brote, la Dirección General de Epidemiología (DGE) de México reportó un aumento desde 7 hasta 40 casos semanales de intoxicación alimentaria bacteriana en el estado (DGE, 2013-2). Otro caso, fue el de Suaqui Grande, Sonora, donde resultaron intoxicadas 103 personas por consumo de pollo contaminado con *Salmonella* sp. De igual forma, la DGE reportó un salto desde 3 y 14 casos en las semanas 34 y 35 respectivamente, hasta 109 casos de intoxicación alimentaria a la semana 36 del 2013, tiempo en que se llevó a cabo el brote (DGE, 2013). Este tipo de hechos culminan en la reducción de ventas y tienen un impacto médico y económico negativo en la región.

L. monocytogenes, P. aeruginosa y *S. aureus* son patógenos oportunistas altamente riesgosos para pacientes hospitalizados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a *L. monocytogenes* como uno de los patógenos

emergentes que lideran las enfermedades alimentarias (Ramirez et al., 2012; da Silva y De Martinis, 2013; Locatelli et al., 2013). Los casos leves son difíciles de identificar ya que presentan sintomatología inespecífica, y porque esta bacteria no se detecta con facilidad por cultivos rutinarios (Scallan et al., 2011). Además, la listeriosis en personas inmunocompetentes puede ser confundida con enfermedades de sintomatología general y esporádica. Esta es la razón principal por la cual no se cuenta con datos epidemiológicos actuales sobre prevalencia o incidencia de *L. monocytogenes* en México (Tovar et al., 2005).

P. aeruginosa es un patógeno nosocomial, común en pacientes en cuidado intensivo y en pacientes neutropénicos, víctimas de quemaduras recipientes de trasplante de órganos, etcétera. Se aísla hasta en 30% de muestras de pus, 20% de esputo y 20% de especímenes urinarios; es difícil asociarla a un sitio de infección dado (Ravaoarinoro et al., 1996; Tsuchimochi et al., 2008). Las infecciones con *P. aeruginosa* en el torrente sanguíneo son especialmente perjudiciales y asociadas con tasas de mortalidad que van desde 18% hasta 62% (Yamagishi et al., 2012). Aunque la falla clínica es más frecuente en la bacteriemia con *P. aeruginosa* que con *Enterobacteriaceae*, la tasa de mortalidad entre ambos grupos suele ser igual (Joo et al., 2011). Cabe mencionar que las infecciones por *P. aeruginosa* tienen una tasa de curación clínica de hasta 83%, cuando se realiza un estudio profundo de su sensibilidad antimicrobiana en lugar de tratamientos empíricos (Nakamura et al., 2014).

S. aureus es un patógeno que puede causar lesiones de piel, colonización de garganta, enteritis y bacteriemia, entre otros síntomas (Mernelius et al., 2013). Aproximadamente el 20% de los sujetos sanos son identificados como portadores persistentes de *S. aureus* (Treesirichod et al., 2014). Los hombres adultos son colonizados más a menudo que las mujeres. En niños con enfermedad dental, esta cifra puede aumentar hasta 28%. Cuando se trata de la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), la tasa de detección se encuentra alrededor del 9% (Acton et al., 2009). Las tasas de bacteriemia ocasionada por *S. aureus* van desde 40% para cepillado dental y 60% subsecuente a extracción dental, hasta 88% después de cirugía peridontal. Aproximadamente el 40% de los pacientes

con sepsis, y que cursan con desórdenes de coagulación ocasionados por esta bacteria, sufren de falla de órganos múltiple y están ligados a una tasa de mortalidad alta (Imamura, 2014).

Fármacos Antibacterianos y Problemática Involucrada

Efectos Secundarios Asociados al Tratamiento

La aparición de nuevos síntomas, ajenos a la infección bacteriana, es una preocupación fuerte de los médicos y pacientes. Si bien existen pacientes alérgicos al uso de los antibióticos, también hay quienes presentan náuseas, sarpullido, angioedema e incluso anafilaxis, sin ser sensibles al tratamiento.

Las reacciones adversas a drogas (ADR, efectos secundarios) están definidas por la OMS como cualquier efecto nocivo, involuntario, e indeseado de una droga que ocurre a dosis normalmente toleradas por un individuo. Los pacientes con ADR son etiquetados frecuentemente como alérgicos sin ser evaluados por análisis confirmatorios. Las ADR van de un 3% a 6% del total de admisiones hospitalarias y ocurren en 10% a 15% de pacientes hospitalizados, resultando en morbilidad, hospitalización prolongada y mayor riesgo de mortalidad (Thalayasingam et al., 2013).

Las ADR se han estudiado y registrado con mayor frecuencia respecto a la antigüedad de uso del medicamento. Tal es el caso de la amoxicilina (antibiótico β-lactámico, derivado de la penicilina), antiinflamatorios y paracetamol. La incidencia de efectos secundarios por amoxicilina ha sido reportada hasta en 28.7% de los pacientes tratados por infecciones respiratorias. Los síntomas se desarrollan en menos de 3 meses en el 40% de los casos (Little et al., 2013).

Resistencia Antimicrobiana

La presión resultante del uso exhaustivo de antimicrobianos en las últimas décadas ha llevado a la aparición de resistencia bacteriana. La atención y

prescripción primaria de antibióticos es una de las causas más importantes de resistencia antimicrobiana (Little et al., 2013). Tanto así, que ahora es necesario tener receta médica para comprar antibióticos para los cuales antes no era requerida. Hay una necesidad creciente de nuevos agentes antibacterianos, especialmente contra patógenos comunes en hospitales y en nuestras comunidades, como *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Sabouni et al., 2014).

Las bacterias multi-resistentes a drogas son aquellas que son resistentes ante al menos dos clases de antibióticos. Existen 5 categorías principales de antibióticos de acuerdo a sus mecanismos de acción: inhibición de la síntesis celular, inhibición de la síntesis proteica, alteración de las membranas celulares, antimetabolitos e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos. La resistencia antibiótica se presenta en el 25% de los aislados de *E. coli* y hasta en 82% de los aislados de *S. aureus*. Un alto porcentaje de las cepas de *E. coli* y *S. aureus* es resistente a penicilina y ampicilina, que inhiben la síntesis proteica y de pared celular. De las cepas positivas de *E. coli* y *S. aureus*, aproximadamente el 85% y 5.4% respectivamente, resulta multi-resistente hasta para 3 ó 4 clases de antibióticos (Tan et al., 2014).

La resistencia a antibióticos, como la penicilina, ha inducido el desarrollo de compuestos derivados dentro de la familia de los β-lactámicos. La aparición de β-lactamasas provocó el uso de antimicrobianos como la vancomicina pero ya se han reportado casos de resistencia a este último. Por lo tanto, se hace urgente el estudio del potencial antibacteriano de moléculas naturales que puedan convertirse en nuevos antibióticos activos contra agentes infectivos multi-resistentes (Casero et al., 2013). Además del desarrollo de nuevas terapias antibióticas efectivas, la exploración de remedios antibacterianos tradicionales ha ganado mucha atención recientemente.

Antimicrobianos Vegetales

El uso de las plantas como remedios medicinales, especias y conservadores, tiene una historia antigua en todas las culturas (Upadhyay et al., 2012). Los tratamientos tradicionales con plantas varían desde su aplicación tópica directa, hasta el consumo de extractos medicinales. Dentro de los extractos vegetales más estudiados se encuentran los de tipo alcohólico (contenido de taninos, saponinas, etc.) y los aceites esenciales (fenoles, aldehídos, terpenos, entre otros). Ambos presentan actividad bactericida *in vitro*, incluyendo eficacia contra cepas bacterianas resistentes a antibióticos (Sfeir et al., 2013; Warnke et al., 2013). Por ello, el uso de plantas medicinales se ha puesto de moda con nuevas corrientes "verdes", como el naturismo (medicina homeopática) y la química verde. De ahí que, junto a la concientización poblacional y otros aspectos de conducta contemporánea, se trace el camino a seguir para la obtención de nuevos fármacos.

Actualmente, se ha caracterizado una amplia gama de compuestos activos antimicrobianos a partir de extractos vegetales. Algunos son metabolitos primarios involucrados en el crecimiento de la planta, mientras que otros, son sustancias desarrolladas con fines defensivos (metabolitos secundarios) (Upadhyay et al., 2012). La composición química de los antimicrobianos biológicos se debe al genotipo de la planta, su origen geográfico, así como el ambiente y condiciones agronómicas (Silva et al., 2013). Por ejemplo, el aquirofurano, metabolito activo de la planta sudamericana *Achyrocline satureioides*, muestra resultados bactericidas tan buenos como la ampicilina contra bacterias Gram positivas (Casero et al., 2013).

En Estados Unidos, los antimicrobianos derivados de plantas (PDAs, por sus siglas en inglés) deben pasar evaluaciones de citotoxicidad, para ser probados en animales de experimentación y obtener concentraciones seguras. Así, se minimiza la aparición de efectos secundarios por el diseño de una dosis adecuada, y se clasifican como compuestos generalmente reconocidos seguros (GRAS) (Upadhyay et al., 2012). Individualmente los PDAs muestran resultados

prometedores, pero hay mayor interés en probar combinaciones de GRAS que promuevan la destrucción de los patógenos bacterianos (Silva et al., 2013).

Entre los extractos ricos en metabolitos secundarios, como las saponinas, y que constan con el reconocimiento de GRAS, destacan los de *Yucca schidigera*. Existen múltiples extractos de *Y. schidigera*, pero la concentración y variedad de las saponinas en estos depende del proceso y de la parte de la planta que se utilice (Kaneda et al., 1987). Los más estudiados y con reconocimiento GRAS, son aquellos obtenidos por exprimido del tallo y los extractos de macerados alcohólicos (Kowalczyk et al., 2011). Generalmente, los extractos de *Y. schidigera* son utilizados como aditivos alimenticios animales para el control de la microbiota y mejora de la digestión intestinal, así como agentes espumantes en bebidas y en la agricultura para el control de nematodos y hongos (Cheeke, 2000; Cheeke et al., 2006).

Características de las Plantas del Género *Yucca*

Las plantas del género *Yucca* (familia Agavaceae) abarcan alrededor de 40 especies; la mayoría concentrada en México y suroeste de Estados Unidos. Dentro del género se encuentran 3 secciones monofiléticas: Chaenocarpa con *Yucca* de frutos capsulares, Sarcocarpa con frutos carnosos, y Clistocarpa. Las primeras dos comprenden la mayor proporción de especies, y la última sólo incluye a *Y. brevifolia* con dos variedades descritas (Smith-Hall et al., 2012; Rentsch y Leebens-Mack, 2012).

El grupo de Pellmyr et al. (2007) realizó un extenso análisis filogenético de *Yucca* y logró establecer relaciones entre clases, taxones y clados. Establecieron un área geográfica compuesta por el género, donde se observa que en la parte sur de E. U. domina la clase Sarcocarpa. Dentro del noroeste de México gobernado por esta clase, se encuentran los estados de Sonora, Baja California y Chihuahua (Figura 2). Además, lograron relacionar la especie *Y. baccata,* muestreada extensivamente en la región norte donde se ubica la Sarcocarpa, junto a *Y. arizonica* y *Y. schidigera* (Figura 3). De esta forma, sus datos

filogenéticos refuerzan especulaciones sobre introgresión en el género y la posibilidad de similitud entre sus metabolitos secundarios, como las saponinas.

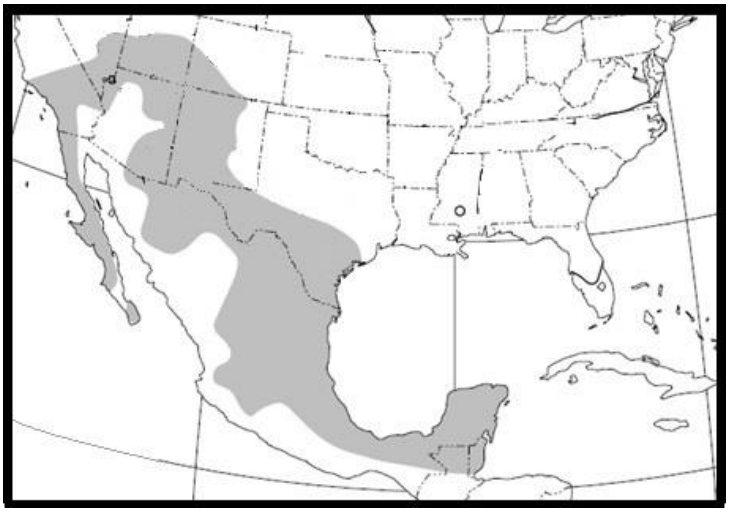

Figura 2. Mapa esquemático de la localización de la clase Sarcocarpa de *Yucca*, sombreado en gris. Modificado de Pellmyr et al., 2007.

Figura 3. Fotografías de *Yucca baccata* en la zona aledaña a Cananea, Sonora, (izquierda) y *Yucca schidigera* (derecha).

Saponinas en Extractos de Plantas Medicinales

Las saponinas son metabolitos secundarios ubicuos en las plantas. Alrededor del mundo, se han extraído y caracterizado muchas saponinas a partir de hojas, tallo, corteza y raíces, provenientes de plantas medicinales de usanza regional. Estos compuestos son estudiados desde hace décadas debido a su amplio espectro de aplicación en la industria, tanto en diseño de fármacos como por uso cosmético. Las fuentes comerciales más comunes de saponinas son *Quillaja saponaria* (saponinas terpenoides) y *Yucca schidigera* (saponinas esteroidales).

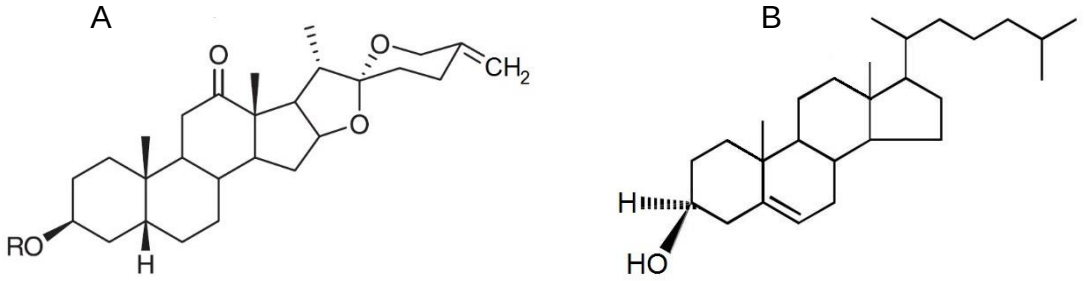

Figura 4. (A) Estructura química general de una saponina esteroidal. El grupo R representa uno o más sacáridos. (B) Representación gráfica de la molécula del colesterol. Modificado a partir de las fuentes: Skhirtladze et al., 2011 y Levitan, 2009; respectivamente.

Las saponinas dañan o eliminan protozoarios y hongos, tanto patógenos como comensales de humanos y animales (Wisloff et al., 2008; Zhang et al., 2008; Qin et al., 2012). Su actividad está relacionada a la estructura de su aglicona (sapogenina), que puede ser terpenoide o esteroidal, y a la variedad de azúcares unidos a ella. La organización química de las saponinas es similar a la del colesterol, lo que les permite interactuar con éste y con los lípidos de membrana, y así, formar poros que ocasionan lisis celular (Arabski et al., 2012) (Figura 4). El análisis del efecto antibacteriano de las saponinas es importante porque a diferencia de muchos compuestos de origen similar, muestran actividad bactericida (Ramirez Merida et al., 2012).

Por otro lado, la toxicidad potencial que pueden presentar las saponinas, como las de *Yucca*, debe ser analizada cuidadosamente. Wisloff et al. (2008),

administraron jugo de *Yucca schidigera* en dosis que contenían 63 mg/kg de sapogenina vía intra-ruminal a corderos para investigar su toxicidad. Durante el experimento 12 corderos murieron y al realizar autopsias se descubrió necrosis aguda en los riñones. Resultados similares fueron obtenidos por Quihui-Cota y León et al. (2014) al aplicar extracto butanólico con saponinas de *Yucca baccata* en jerbos. En ese experimento se dividieron a los jerbos en 5 grupos de 8, y se les administraron dosis orales de 0.5 ml de PBS (control negativo), metronidazol (2 mg/ml en PBS, control positivo), y 3 tratamientos diferentes con extracto de *Y. baccata* (6.1 mg/ml, 12.2 mg/ml y 24.4 mg/ml). Al final del ensayo, 3 jerbos de cada grupo tratado con extracto de *Y. baccata* murieron pero no fue así para los controles. En contraste, Arabski et al. (2012), demostraron que concentraciones de 12 µg/ml (20-35% sapogenina) no ocasionan efectos citotóxicos en células eucariotas. Esta disonancia debe ser resuelta mediante investigaciones más extensas y específicas sobre los efectos de saponinas provenientes de distintas fuentes.

III. HIPÓTESIS

El extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* presenta actividad *in vitro* contra bacterias patógenas para humanos y contiene alta concentración y gran variedad de saponinas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* en un modelo *in vitro*, contra *Escherichia coli* ATCC 25922*, E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipos Senftenberg ATCC 8400 y Choleraesuis ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y establecer la concentración mínima inhibitoria y bactericida para cada una de esas bacterias, para posteriormente cuantificar la concentración de saponinas e identificar sus fracciones en el extracto.

Objetivos Específicos

1. Realizar la extracción líquido-líquido, con n-butanol, del extracto acuoso del tallo de *Yucca baccata*.
2. Evaluar la actividad antibacteriana del extracto butanólico de *Y. baccata* (EBY) por difusión en agar, contra *Escherichia coli* ATCC 25922*, E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipos Senftenberg ATCC 8400 y Choleraesuis ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
3. Valorar la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del EBY contra las bacterias seleccionadas.
4. Cuantificar el contenido de saponinas en el EBY por espectrofotometría, utilizando diosgenina como estándar.

5. Estandarizar la Identificación de saponinas en el EBY mediante cromatografía en capa fina (TLC).
6. Separar las fracciones con saponinas del EBY por HPLC semi-preparativa e identificarlas por TLC.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El estudio se dividió en dos fases generales, una fase de extracción y separación de saponinas y una etapa de análisis microbiológico. En la primera fase se utilizó estadística descriptiva para cada análisis de cuantificación de saponinas. La etapa microbiológica incluyó 5 bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890*, E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipos Senftenberg ATCC 8400 y Choleraesuis ATCC 14028, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) y 2 Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P*, Listeria monocytogene*s ATCC 7644). Las bacterias fueron sometidas a un ensayo de actividad antibacteriana semi-cuantitativa por difusión en agar y a otro cuantitativo, por la determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida. Todos los análisis involucraron un control positivo a base del antibacteriano comercial kanamicina y un control negativo con el diluyente a utilizar (agua destilada estéril). Las pruebas se realizaron por triplicado y se usó un ANOVA de una vía para probar diferencia entre todas las medias y la prueba de Tukey-Kramer para analizar diferencias entre 2 medias con la ayuda del programa estadístico NCSS 2007.

Obtención de Muestras de *Yucca baccata* y Extracción Butanólica

Colección de Especímenes de *Yucca baccata*

Los tallos de la planta *Yucca baccata* fueron colectados cerca de las coordenadas 30°53’35.8’’N 110°42’30.0’’O, en Abril del 2013. Se cortó el tallo de cada planta

desde la parte más cercana a la raíz y se despojó de sus hojas. Las muestras fueron llevadas al herbario de la Universidad de Sonora para su autentificación taxonómica por el responsable del Herbario Universitario.

Método de Secado del Tallo

Se cortaron los tallos en rodajas de aproximadamente 2 cm de ancho para facilitar su proceso de secado por exposición al sol. El material seco se pulverizó con un molino Whiley (Molino Thomas-Whiley Model 4, Laboratory Mill USA) hasta obtener un polvo de 2 mm de tamaño de partícula, que fue pesado y utilizado para preparar los extractos (León, 2012).

Preparación de los Extractos

Para la extracción de saponinas se utilizó el método descrito previamente por Newbold et al., (1997). Consistió en suspender el polvo de *Y. baccata* en agua (33 g/L), mantenido en agitación durante una noche a temperatura ambiente (25-30°C). Seguido, se centrifugó la suspensión a 3000 rpm durante 10 min a 4°C. Después se filtró y agitó la suspensión acuosa en un volumen igual de n-butanol por 30 min a temperatura ambiente. Luego, se separó el n-butanol de la mezcla y la extracción se repitió con n-butanol fresco una segunda vez, para mejorar la eficiencia del método. Las capas orgánicas del extracto, fueron agrupadas y secadas en un evaporador con rotación acoplado a una bomba de vacío a 40°C (Rotavapor Buchi 011, Buchi Laboratoriums, Suiza). Como paso final, se pesó el sólido extraído y se almacenó en seco a 4 °C, para su uso posterior.

Para la comparación del extracto butanólico con un control similar, se utilizó el extracto acuoso obtenido por macerado y filtración del polvo del tallo de *Y. baccata* que se obtiene del paso previo a la extracción con butanol. En lugar de evaporarse por calentamiento, se procedió a liofilizar el extracto acuoso por la facilidad que ofrece el método.

Análisis *In vitro* de la Actividad Antibacteriana

Cultivos Bacterianos

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922*, E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipos Senftenberg ATCC 8400 y Choleraesuis ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Molecular del CIAD A. C. Todas las cepas se cultivaron en agar Mueller-Hinton a 37 °C durante 24 h para el ensayo de difusión en agar por discos. Para el ensayo de concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida, las bacterias fueron cultivadas en 15 ml de caldo Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 18 h. Los cultivos fueron utilizados en los bioensayos inmediatamente después de la incubación.

Medición de la Actividad Antibacteriana por Difusión en Agar

Para evaluar la actividad antibacteriana se llevó a cabo el método de difusión por disco en agar Mueller-Hinton. Se impregnaron discos estériles de papel filtro Whatman No. 1, de 6 mm de diámetro, con 25 µl de los extractos con saponinas (6 mg/disco) diluidos en agua destilada estéril. Luego se dejaron secar los discos 20 min a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar. Los cultivos bacterianos se ajustaron a un estándar de turbidez 0.5 de McFarland con solución salina estéril. Se esparció de manera uniforme el inóculo usando un hisopo estéril para obtener crecimiento bacteriano homogéneo en las placas con agar. El siguiente paso fue incubar las placas por 24 h a 37°C. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se midió el halo de inhibición y se clasificó como sigue: >20 mm correspondió a “altamente inhibitorio”; 10-20 mm, “moderadamente inhibitorio” y un halo de inhibición <10 mm correspondió a “no inhibitorio” (Silva et al., 2013). Como control se utilizaron discos con kanamicina (30 µg) para referencia positiva, y discos con 25 µl agua destilada estéril como control

negativo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para obtener una media representativa.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Se llevó a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por microdilución en placas estériles con 96 pocillos. Se ajustó a 0.1 la densidad óptica (595 nm) del inóculo de cada una de las bacterias (equivalente al estándar 0.5 McFarland; aprox. 1.5 x 10^8 UFC/ml) con solución salina estéril. A continuación, se preparó la solución madre del extracto butanólico a 250 mg/ml y se diluyó a 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5 y 30 mg/ml. El pocillo sin extracto (0 mg/ml) fue utilizado como control de crecimiento para el cálculo de la MIC. También se ensayaron dos controles: el control positivo de kanamicina (1 mg/ml) y un control negativo con el diluyente (0.6 ml de agua destilada más 4.4 ml de caldo Mueller-Hinton) (Campion et al., 2013; Hill et al., 2013).

Se agregaron 200 µl de cada una de las diluciones del extracto butanólico y controles a los pocillos (triplicado), y se añadieron 15 µl de cada uno de los inóculos bacterianos ajustados. Se procedió a incubar las placas a 37 °C por 24 h y luego se agitaron suavemente durante 20 seg para la lectura posterior de la densidad óptica a 595 nm (D. $O._{595nm}$). Para ajustar la D. $O._{595nm}$ de cada una de las diluciones con bacterias, se midieron los blancos de cada dilución por triplicado y se restaron sus D. $O._{595nm}$ a las de las muestras. La MIC se consideró como aquella dilución del extracto que inhibió el 90% del crecimiento bacteriano en comparación al control sin extracto ni diluyente (Velázquez et al., 2007).

Concentración Mínima Bactericida (MBC)

Se sumergió un asa estéril en cada uno de los pocillos con dilución del extracto que mostró inhibición, y se estrió en agar Mueller-Hinton por duplicado. Después se incubó cada placa con agar durante 24 h a 37 °C. Aquellas placas que no

mostraron crecimiento bacteriano post-incubación, se consideraron como MBC (Hill et al., 2013).

Cuantificación de Saponinas y Separación de Fracciones del Extracto

La cuantificación total de saponinas en el extracto butanólico de *Y. baccata* se realizó por espectrofotometría. Se llevó a cabo la estandarización de la identificación de las fracciones con saponinas del extracto por cromatografía en capa fina (TLC) y la separación de las mismas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) semi-preparativa. Como estándar externo se utilizó diosgenina, una sapogenina esteroidal.

Cuantificación de Saponinas por Espectrofotometría

Se adaptó la técnica de Baccou et al. (1977) para llevar a cabo la cuantificación espectrofotométrica de saponinas. Se pesaron 2 mg de los extractos acuoso, butanólico y del estándar de diosgenina (98%), y se aforaron con metanol a 10 ml. A partir de la solución de diosgenina se realizaron 5 diluciones: 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml. Para la mezcla de reacción se añadió 1 ml de solución de p-anisaldehído al 0.5% en metanol, más 1 ml de ácido sulfúrico al 50% (con agua destilada). Se agregaron 2 ml de cada una de las diluciones del estándar en tubos de ensaye con la mezcla de reacción por triplicado. El blanco consistió en la misma mezcla de reacción pero en lugar de la muestra se añadieron 2 ml de metanol. Se agitaron los tubos y fueron incubados durante 30 min a 100 °C. Al terminar, se pasaron a un baño de agua-hielo durante 15 min para detener la reacción. Luego se procedió a leer cada una de las diluciones y la muestra problema (extractos) a 430 nm de absorbancia, en una celda de cuarzo de 1 cm^3. Con las mediciones realizadas para las diluciones de diosgenina, se realizó una curva de calibración, cuya ecuación ayudó a determinar la concentración de saponinas en el extracto (Baccou et al., 1977).

Estandarización de la Identificación de Saponinas por TLC

La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en placas de aluminio pre-cubiertas con sílica gel F_{254} (0.2 mm grueso de capa, Merck) en una cámara de vidrio. La fase móvil se compuso de acetato de etilo, metanol y agua destilada, en proporciones de 9:3:1.5 respectivamente. La composición de la solución reveladora fue de 85 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.5 ml de p-anisaldehído. Se agregó la fase móvil a la cámara y se selló para su saturación durante 2 h. Se pre-activó la placa de TLC por 1 h a 100 °C y, una vez pasado el tiempo, se marcó la base a 1.5 cm de distancia del borde. Se marcaron carriles de 2 cm de ancho y se agregaron 10 µl de solución metanólica del extracto butanólico de *Y. baccata* (1 mg/ml) por carril, mientras que en otro, se agregaron 10 µl de solución de diosgenina (200 µg/ml) como estándar. Se colocó la placa en la cámara y se dejó correr durante 1:20 h. Al finalizar, se atomizó la placa con la solución reveladora y se horneó a 100 °C durante 8 min para la generación de color. Se calculó el factor de retención (Rf) de cada banda, dividiendo la distancia recorrida por el solvente entre la distancia recorrida de la base al centro de cada banda revelada (Ebada et al., 2008). Las saponinas esteroidales son reveladas color verde con el reactivo de anisaldehído/ácido sulfúrico (Hostettmann y Marston, 1995).

HPLC Semi-preparativa para Separación de Saponinas

La separación semi-preparativa de las fracciones en el extracto butanólico del tallo de *Y. baccata* (EBY) fue llevada a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el equipo Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

El extracto crudo seco de *Y. baccata* (3, 9, 15, 25 y 50 mg) fue disuelto con agua de grado HPLC hasta un volumen final de 100 µL. Las soluciones fueron filtradas con membranas PTFE de 0.20 µm (Millex, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, CO). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB C-18

de 9.4 x 250 mm i.d., 5 µm y una precolumna Eclipse XDB C-18 de 9.4 x 15 mm, 5 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Los componentes de la fase móvil fueron: A) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico y B) agua con 0.1% ácido fórmico. La elución de la fase móvil fue por paso a paso (con gradiente lineal entre cada paso); a un flujo de 3.5 ml/min durante 185 min (Tabla 1 y Figura 5). El HPLC se operó a temperatura ambiente (23 ± 0.8 °C) y los picos eluídos se analizaron mediante un barrido de longitudes de onda por el detector de arreglo de diodos acoplado al HPLC (Gnoatto et al., 2005; Kowalczyk et al., 2011; Qin et al., 2012).

Finalmente, se colectaron las fracciones correspondientes a los tiempos de elución seleccionados y el solvente presente se evaporó a 60°C con inyección de nitrógeno en un evaporador N-EVAP 112 (Organomation Associates Inc., Berlin, MA). Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC de la marca J. T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA). La identificación de las fracciones con saponinas se realizó mediante la técnica de TLC estandarizada anteriormente, por dilución de las fracciones en 1 ml de metanol.

Tabla 1. Gradiente paso a paso, con cambio lineal entre pasos, estandarizado para la separación de las fracciones por HPLC semi-preparativa.

T (min)	% Acetonitrilo – Ác. Fórmico 0.1%	% Agua – Ác. Fórmico 0.1%
0.00 – 120.00	7 - 18	93 – 82
120.01 – 140.00	18 - 25	82 – 75
140.01 – 170.00	25 - 39	75 – 61
170.01 – 180.00	39 - 50	61 – 50
180.01 – 185.00	50 - 7	50 – 93

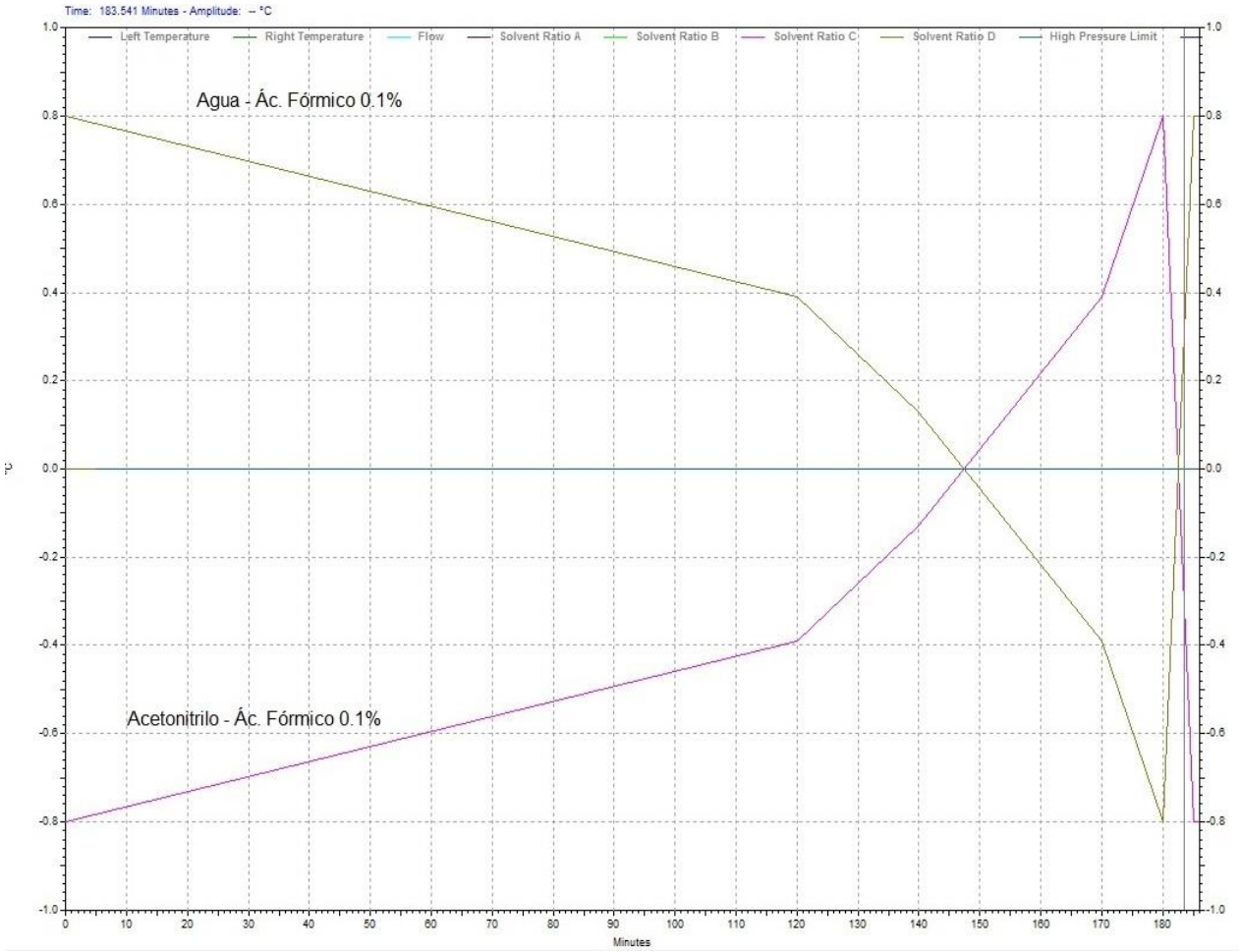

Figura 5. Esquema del gradiente de separación del EBY (50 mg/100 µl) por HPLC semi-preparativa utilizado en este estudio.

VI. RESULTADOS

Rendimiento de la Extracción Butanólica

El extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* (EBY) evaporado se obtuvo como un polvo fino color café-ambar y el extracto acuoso (EAY) fue aún más fino y color amarillo. Se obtuvo un rendimiento promedio de extracción butanólica de 2.58 g (7.8%) de extracto seco por cada 33 g de polvo del tallo de *Y. baccata*. Para el caso de la extracción acuosa, el rendimiento fue de 8.50 g (25.7%) de extracto liofilizado por cada 33 g de polvo de tallo de *Y. baccata*.

Actividad Antibacteriana del Extracto

Difusión del Extracto en Agar

Los ensayos de actividad antibacteriana mostraron que las bacterias Gram negativas, *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 y *E. coli* ATCC 25922 fueron sensibles al EAY con diámetros de inhibición de 20.0 ± 0.6 mm y 43.0 ± 3.0 mm, respectivamente, y al EBY (23.3 ± 0.3 mm y 28.7 ± 2.4 mm, en ese orden) a la concentración de 6 mg/disco ($P>0.05$). *S.* Choleraesuis ATCC 14028 presentó resistencia a ambos extractos, mientras que *S.* Senftenberg ATCC 8400 fue sensible con diámetros de inhibición de 24.0 ± 0.0 y 27.3 ±1.4 mm para EBY y EAY respectivamente. *P. aeruginosa* ATCC 27853 tuvo sensibilidad moderada contra el EBY (19.7 ± 1.7 mm) y resultó resistente al EAY (11.3 ± 2.0 mm) ($P<0.05$).

Para el caso de las bacterias patógenas Gram positivas utilizadas en el bioensayo, *S. aureus* ATCC 6538P y *L. monocytogenes* ATCC 7644 fueron

resistentes al EBY. *S. aureus* ATCC 6538P resultó moderamente sensible (10.0 ± 1.1 mm) al EAY, pero *L. monocytogenes* ATCC 7644 mostró resistencia. Todas las bacterias fueron sensibles ante el antibiótico control de kanamicina (30 µg/disco) a excepción de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tabla 2).

Tabla 2. Susceptibilidad antibacteriana ante los extractos del tallo de *Y. baccata* por la técnica de difusión por discos.

		Diámetro de inhibición (mm)		
Bacteria	Cepa de ATCC	Extracto butanólico (6 mg/disco)	Extracto acuoso (6 mg/disco)	Kanamicina 30 µg
Salmonella enterica subespecie *enterica* serotipo Choleraesuis	14028	---	9.0 ± 0.6[a]	20.0 ± 0.0[b]
Salmonella enterica subespecie *enterica* serotipo Senftenberg	8400	24.0 ± 0.0[a]	27.3 ± 1.4[a]	24.3 ± 0.9[a]
Escherichia coli	25922	28.7 ± 2.4[a]	43.0 ± 3.0[b]	19.0 ± 0.6[a]
E. coli O157:H7	43890	23.3 ± 0.3[a]	20.0 ± 0.6[b]	24.0 ± 0.6[a]
Pseudomonas aeruginosa	27853	19.7 ± 1.7[a]	11.3 ± 2.0[b]	---
Staphylococcus aureus	6538P	9.3 ± 0.3[a]	10.0 ± 1.1[a]	22.0 ± 0.0[b]
L. monocytogenes	7644	---	---	23.5 ± 1.0

Media ± SEM [a] Diferente literal entre un mismo renglón indica diferencias significativas por Tukey-Kramer (P<0.05). ATCC: American Type Culture Collection. La kanamicina fue utilizada por ser un antibiótico de amplio espectro. El halo reportado es la media de 3 réplicas.

Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Bactericida

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima bactericida para el EBY (Tablas 3 y 4). Las bacterias con las MICs más bajas fueron *S. aureus* ATCC 6538P y *L. monocytogenes* ATCC 7644 con 93% y 94% de inhibición, respectivamente, para la dilución de 15 mg EBY/ml. Les siguió *S.* Senftenberg ATCC 8400 al verse inhibida en un 91% por la dilución del extracto butanólico a

20 mg EBY/ml. No se encontró la MIC para *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 ni para *E. coli* ATCC 25922, sin embargo, se observó una tendencia de inhibición para los 30 mg EBY/ml (de 76% a 84% de inhibición). *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S.* Choleraesuis ATCC 14028 crecieron bien en todas las diluciones del EBY ensayadas.

La concentración mínima bactericida (MBC) fue analizada para todas las bacterias en el ensayo. La MBC para *S. aureus* ATCC 6538P fue de 25 mg EBY/ml y para *L. monocytogenes* ATCC 7644 de 17.5 mg EBY/ml (Figura 6). No se logró determinar la MBC para ninguna otra cepa bacteriana incluida en el bioensayo.

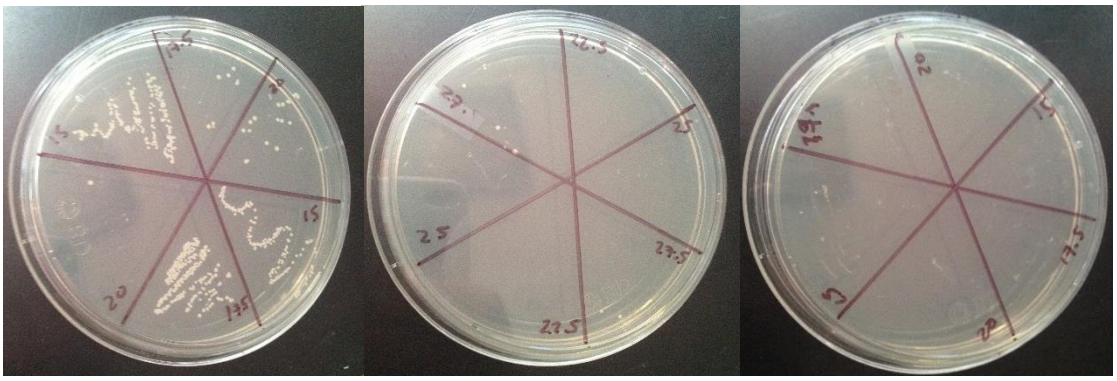

Figura 6. Fotografía de la concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* ATCC 6538P (derecha y centro) y *L. monocytogenes* ATCC 7644 (izquierda).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Senftenberg ATCC 8400 y *S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Choleraesuis ATCC 14028.

Extracto butanólico (mg/ml)	***E. coli* O157:H7 ATCC 43890**		***E. coli* ATCC 25922**		***S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Senftenberg ATCC 8400**		***S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Choleraesuis ATCC 14028**	
	D. O. $_{595nm}$	Inhibición (%)	D. O. $_{595nm}$	Inhibición (%)	D. O. $_{595nm}$	Inhibición (%)	D. O. $_{595nm}$	Inhibición (%)
0	0.290	---	0.751	---	0.324	---	0.742	---
15	0.261	10	0.239	68	0.077	76	0.658	11
17.5	0.256	12	0.211	72	0.117	64	0.566	24
20	0.143	51	0.168	78	0.029	91*	0.531	28
22.5	0.119	59	0.106	86	0.018	94	0.330	55
25	0.147	50	0.070	91*	0.007	98	0.389	48
27.5	0.124	57	0.135	82	0.053	84	0.304	59
30	0.070	76	0.117	84	0.059	82	0.255	65
C (+)	0.186	36	0.133	82	0.063	80	0.003	99
C (-)	0.185	36	0.860	---	0.248	23	0.528	28

*Concentración mínima inhibitoria. D. O. 595 nm: Densidad óptica de la suspensión bacteriana medida a 595 nm. ATCC: American Type Culture Collection.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* atcc 6538P, *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Extracto butanólico (mg/ml)	***S. aureus* ATCC 6538P**		***L. monocytogenes* ATCC 7644**		***P. aeruginosa* ATCC 27853**	
	D. O. $_{595nm}$	Inhibición (%)	D. O. $_{595nm}$	Inhibición (%)	D. O. $_{595nm}$	Inhibición (%)
0	0.664	---	0.161	---	0.745	---
15	0.062	91*	0.010	94*	0.670	10
17.5	0.023	97	0.000	99	0.648	13
20	0.043	93	0.000	99	0.575	23
22.5	0.004	99	0.009	94	0.451	39
25	0.041	94	0.008	95	0.446	41
27.5	0.072	89	0.037	77	0.324	56
30	0.130	80	0.059	63	0.194	74
C (+)	0.141	78	0.102	36	0.530	99
C (-)	0.541	18	0.103	36	0.003	29

*Concentración mínima inhibitoria. D. O. 595 nm: Densidad óptica de la suspensión bacteriana medida a 595 nm. ATCC: American Type Culture Collection.

Cuantificación e Identificación de Fracciones con Saponinas

Cuantificación de la Concentración de Saponinas por Espectrofotometría

La curva estándar para diosgenina tuvo un coeficiente de correlación R^2 de 0.9932 a una absorbancia de 430 nm (Figura 7). La concentración de saponinas en el EBY, calculada a partir de la ecuación para la curva estándar de diosgenina (ecuación 1), fue de 47.78 ± 0.04 µg de saponinas (equivalentes de diosgenina) por cada 200 µg de extracto butanólico. Mientras que para el EAY se obtuvo una concentración de 34.17 ± 0.05 µg de saponinas/200 µg de extracto acuoso. Esto representa una concentración de 23.9% p/p y 17.1% p/p seco de saponinas en los extractos butanólico y acuoso del tallo de *Y. baccata*, respectivamente. En

general, el tallo de *Y. baccata* presentó una concentración de 1.9% p/p seco de saponinas.

$$[Saponinas] = (Absorbancia\ 430\ nm + 0.1647)/0.452 \quad (1)$$

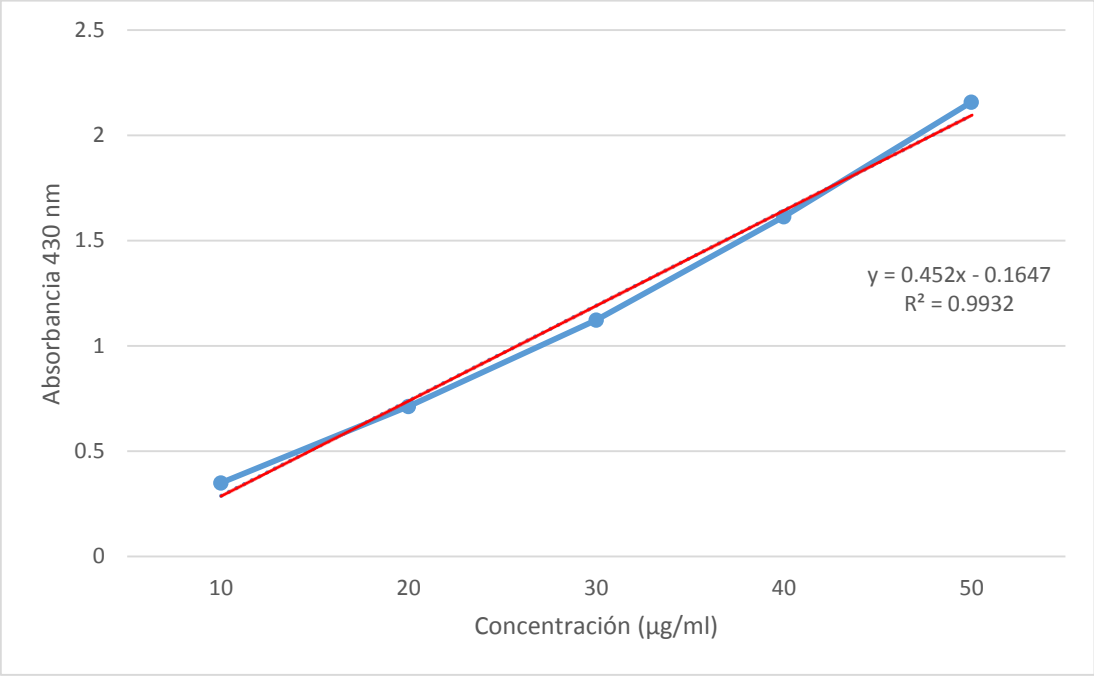

Figura 7. Curva estándar de diosgenina utilizada para el cálculo de la concentración de saponinas en los extractos de *Y. baccata* (R^2=0.9932). El color azul representa cada una de las concentraciones medidas y el rojo la tendencia lineal de la curva.

Estandarización de la Identificación de Saponinas por TLC

Se lograron identificar hasta 8 fracciones con saponinas por cromatografía en capa fina (TLC). El color verde revelado con reactivo de anisaldehído-ácido sulfúrico indica que se trata de saponinas exclusivamente del tipo esteroidal y no se encontró ninguna fracción con saponinas terpenoides. No se encontró diosgenina en el extracto butanólico del tallo de *Y. baccata*. Los factores de retención calculados para cada fracción y para el estándar de diosgenina se

presentan en la tabla 5. Las primeras cuatro bandas reveladas con factores de retención 0.538 ± 0.010, 0.577 ± 0.007, 0.623 ± 0.007 y 0.651 ± 0.005 fueron las más marcadas, lo que indica que están un poco más concentradas que las últimas cuatro.

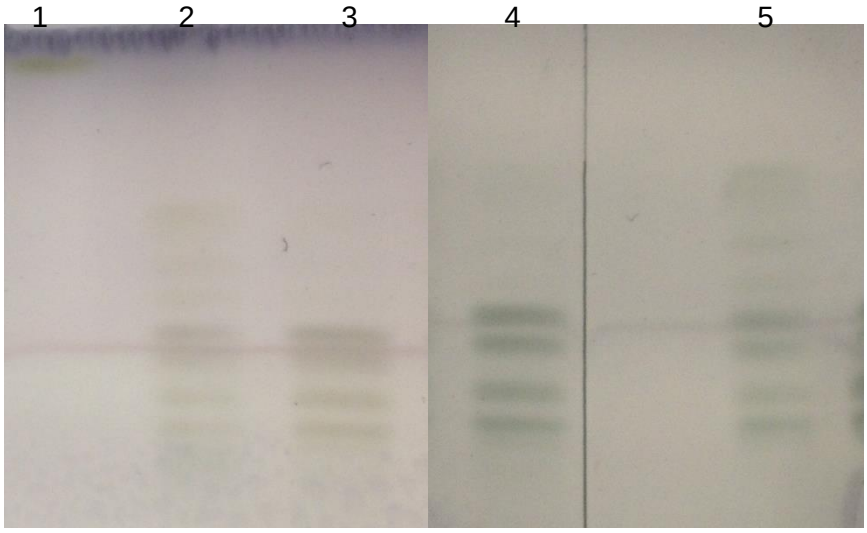

Figura 8. Cromatografía en capa fina del extracto butanólico de *Y. baccata*. Las saponinas son reveladas como manchas color verde y las sapogeninas tienen tonalidad amarilla-verdosa. El carril 1 es diosgenina y los carriles 2, 3, 4 y 5 son EBY (1 mg/ml) con las saponinas fraccionadas del extracto.

Separación de Saponinas por HPLC Semi-preparativa

Se analizaron diferentes gradientes para llevar a cabo la resolución más efectiva de los picos bajo la mayor eficiencia del método. La combinación de un gradiente paso a paso, con cambios lineales entre pasos, fue la técnica que ofreció mejores resultados a concentraciones más elevadas del EBY. Por el barrido de las longitudes de onda que reportó el detector de arreglo de diodos (DAD) del HPLC, se observó que los compuestos en el extracto tenían mayor absorbancia a 248 y 300 nm (Figuras 9 y 10).

Tabla 5. Factores de retención calculados para cada fracción revelada a partir del extracto butanólico de *Y. baccata*.

Longitud recorrida (cm)		**Factor de retención Calculado (Rf)**
EBY metanol	Color	
6.97 ± 0.13	Verde	0.538 ± 0.010
7.47 ± 0.09	Verde	0.577 ± 0.007
8.07 ± 0.09	Verde	0.623 ± 0.007
8.43 ± 0.07	Verde	0.651 ± 0.005
8.93 ± 0.07	Verde	0.690 ± 0.005
9.37 ± 0.09	Verde	0.723 ± 0.007
9.87 ± 0.03	Verde	0.762 ± 0.003
10.13 ± 0.07	Verde	0.782 ± 0.005

Frente de elución 12.95 ± 0.05 cm; Diosgenina 12.35 ± 0.05 cm (amarilla, Rf = 0.954 ± 0.002).

Se logró la separación de 28 fracciones de acuerdo a los picos que presentaron mayor absorbancia y resolución en el cromatograma, así como a los tiempos de elución (Tabla 6). La inyección de una concentración de 3 mg/100 µl de EBY mostró mejor separación de los picos. Para aumentar el rendimiento se inyectó desde 3 hasta 50 mg por cada 100 µl de inyección, obteniendo una recuperación de fracciones de hasta 1.67 ± 0.04 mg. Sin embargo, el aumento de la concentración de la muestra obligó a cambiar el gradiente y el tiempo de elución. Mientras que la mejor separación del EBY a 3 mg/100 µl, 9 mg/100 µl y 15 mg/100 µl se logró con un gradiente lineal de 7- 60% de acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico en 80 min (Figuras 11 - 13), al aumentar a 25 mg/100 µl y 50 mg/100 µl se necesitó modificar el gradiente hasta 7 – 50% de acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico en 180 min (Figuras 10 y 14). La viscosidad de la muestra a esta última concentración no permitió aumentar aún más la cantidad EBY por inyección por cuidados a la columna de HPLC. El total de las fracciones fue separado de

acuerdo al cromatograma obtenido para la concentración de 50 mg/100 µl de inyección.

La identificación posterior de las 28 fracciones recuperadas por HPLC mediante la cromatografía en capa fina (TLC) indicó que las fracciones 23 (1.07 ± 0.08 mg), 24 (1.37 ± 0.03 mg), 25 (1.00 ± 0.03 mg), 26 (1.10 ± 0.05 mg), 27 (0.87 ± 0.03 mg) y 28 (0.73 ± 0.03 mg) son las únicas que contienen saponinas esteroidales por revelado con anisaldehído/ácido sulfúrico (Figura 15). El patrón de bandas de las fracciones concuerda con el del EBY crudo. Las fracciones 23 y 24 del HPLC fueron las de menor pureza ya que se reveló que contienen 4 de las 8 fracciones con saponinas reveladas por TLC, correspondientes a las bandas con los factores de retención (Rf) 0.538, 0.577, 0.623 y 0.651. Las fracciones de la 25 y 26 contenían una sola banda verde indicativa de saponinas esteroidales a la misma distancia de la base, coincidiendo con la banda de Rf 0.762. La fracción 27 resultó contener una sapogenina (color amarillo-verdoso) similar a la fracción con saponina de Rf 0.768 del extracto. Mientras que la fracción 28, estuvo conformada por dos bandas (Rfs 0.690 y 0.723) concordando con el total de fracciones con saponinas en el EBY (Figura 16).

Al separar las fracciones por HPLC hay una mayor pureza de los compuestos, lo que permite identificarlos más específicamente. Estos datos concuerdan con el cromatograma en 3 dimensiones que reporta el barrido HPLC-DAD (Figura 17). Para las fracciones identificadas con saponinas, el HPLC-DAD presenta más de dos compuestos solapados entre sí a un tiempo determinado al medir la absorbancia de los compuestos en diferentes longitudes de onda. Estos compuestos podrían ser saponinas isómeras o incluso otras moléculas de estructura similar.

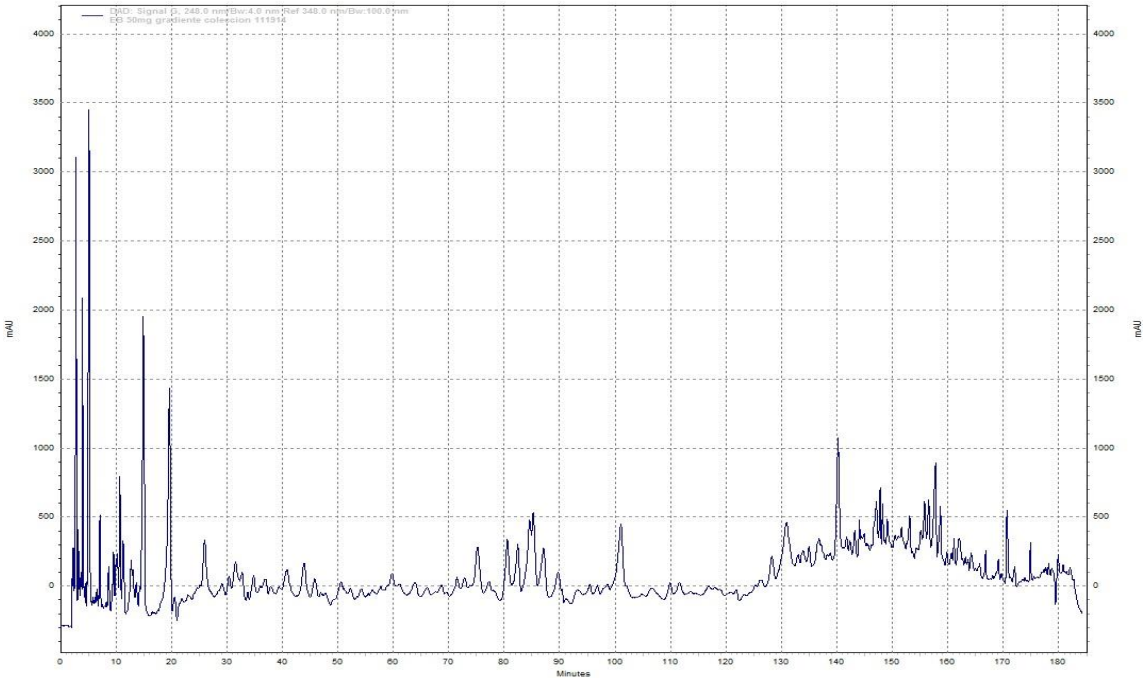

Figura 9. Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 50 mg/100 µl, λ = 248 nm, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 185 min, 23 °C.

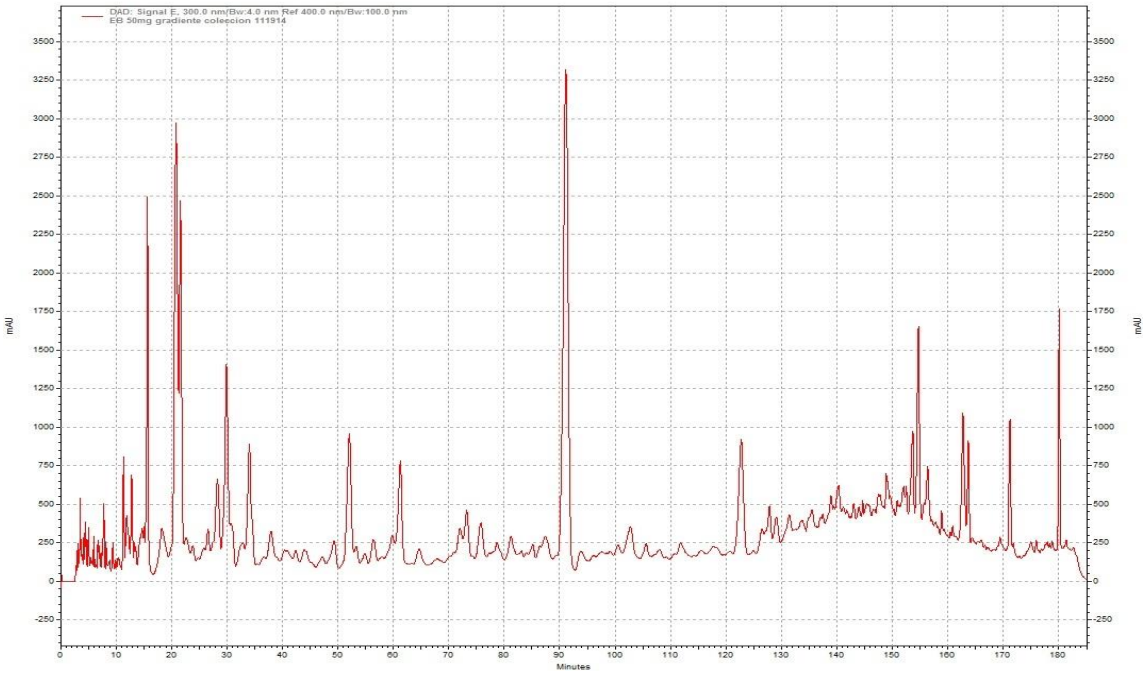

Figura 10. Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 50 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 185 min, 23 °C.

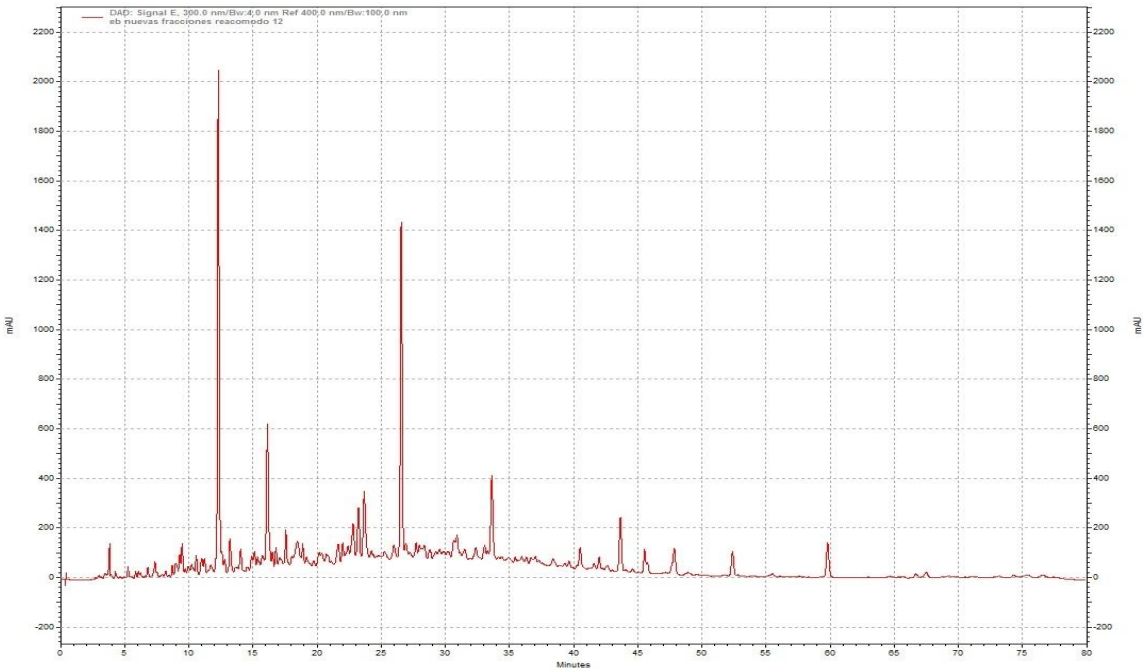

Figura 11. Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 3 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 60% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.

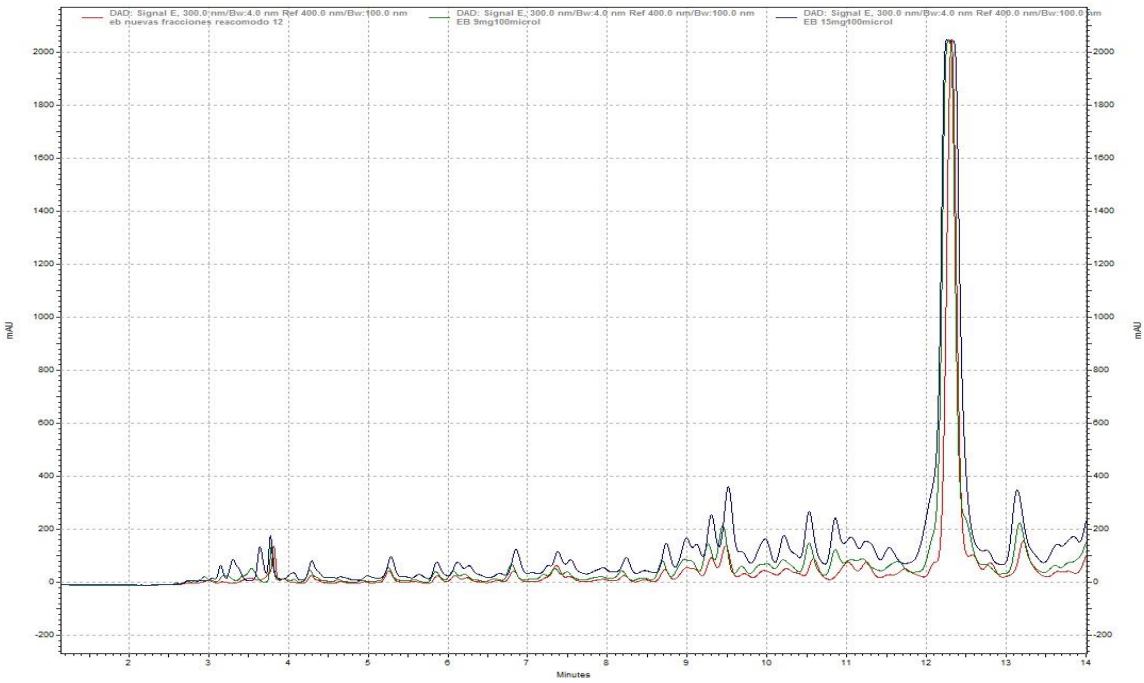

Figura 12. Comparación de los cromatogramas HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 3 mg/100 µl, 9 mg/100 µl y 15 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 60% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.

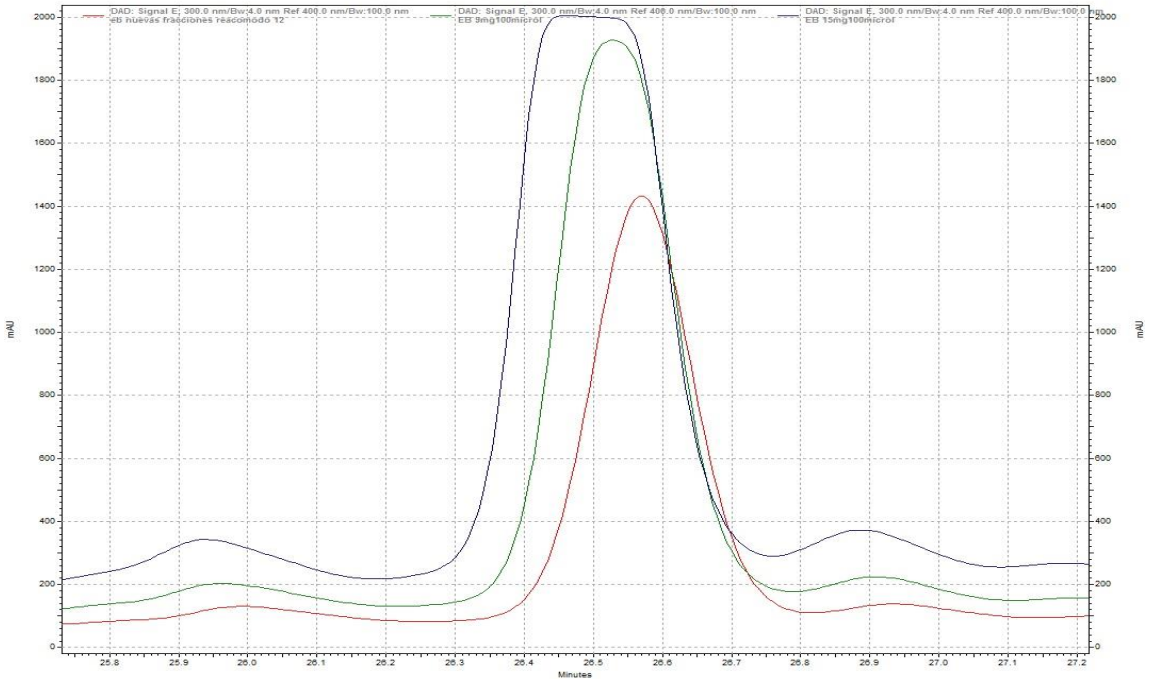

Figura 13. Comparación a escala de un solo pico de los cromatogramas HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 3 mg/100 µl, 9 mg/100 µl y 15 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 60% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.

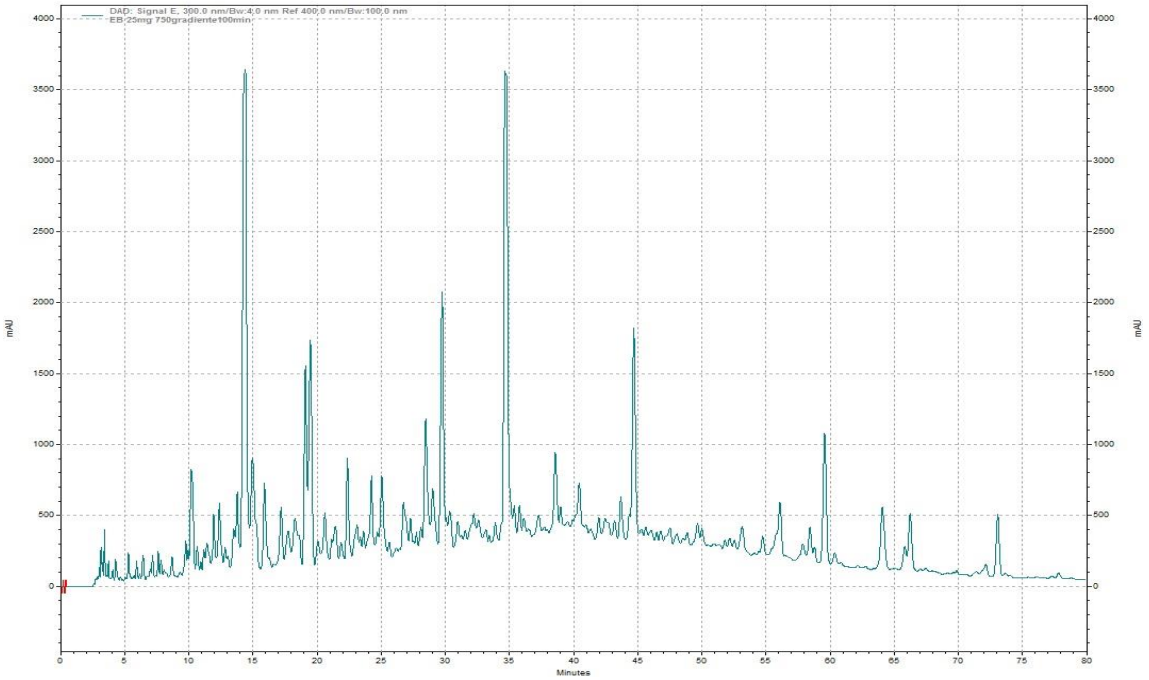

Figura 14. Cromatograma HPLC del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 25 mg/100 µl, λ = 300 nm, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 80 min, 23 °C.

Tabla 6. Desglose de las características de las fracciones del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* separadas por HPLC.

Fracción	Tiempo de elución (min)	Volumen (ml)	Peso seco ± SEM (mg)
1	3.10 – 3.80	2.45	0.73 ± 0.06
2	4.50 – 4.84	1.19	0.63 ± 0.11
3	5.53 – 6.00	1.64	1.10 ± 0.00
4	11.14 – 11.54	1.40	0.33 ± 0.05
5	12.68 – 13.00	1.12	1.06 ± 0.02
6	15.39 – 16.00	2.13	1.23 ± 0.07
7	20.35 – 21.06	2.48	1.13 ± 0.07
8	21.46 – 22.00	1.89	0.53 ± 0.09
9	27.89 – 28.69	2.80	1.23 ± 0.04
10	29.39 – 30.20	2.83	0.89 ± 0.06
11	33.56 – 34.36	2.80	1.30 ± 0.03
12	51.54 – 52.60	3.71	0.50 ± 0.03
13	60.84 – 61.99	4.20	0.77 ± 0.03
14	75.58 – 76.67	3.81	0.87 ± 0.04
15	80.49 – 81.35	3.01	0.73 ± 0.09
16	82.58 – 83.31	2.55	0.90 ± 0.06
17	84.67 – 85.31	2.24	0.80 ± 0.05
18	85.65 – 86.20	1.92	1.00 ± 0.03
19	90.10 – 92.03	6.75	1.03 ± 0.09
20	101.19 – 101.96	2.69	0.30 ± 0.10
21	122.12 – 123.78	5.81	0.50 ± 0.06
22	140.48 – 141.09	2.13	1.67 ± 0.04
23	153.17 – 153.92	2.62	1.07 ± 0.08*
24	154.30 – 154.93	2.20	1.37 ± 0.03*
25	162.32 – 163.03	2.48	1.00 ± 0.03*
26	163.44 – 164.03	2.06	1.10 ± 0.05*
27	170.80 – 171.51	2.48	0.87 ± 0.03*
28	179.73 – 180.32	2.06	0.73 ± 0.03*

(*) Fracciones con saponinas; SEM = Error Estándar de la Media.

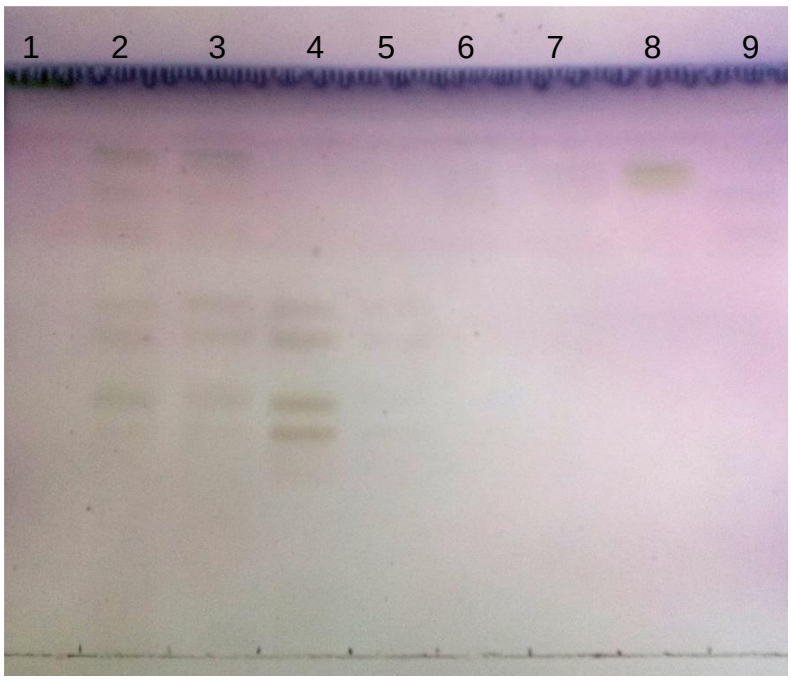

Figura 15. Cromatograma TLC de diosgenina 200 µg/ml (1), extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 1 mg/ml (2 y 3), fracción 23 1 mg/ml (4), fracción 24 1.3 mg/ml (5), fracción 25 1 mg/ml (6), fracción 26 1 mg/ml (7), fracción 27 0.9 mg/ml (8), fracción 28 0.7 mg/ml (9).

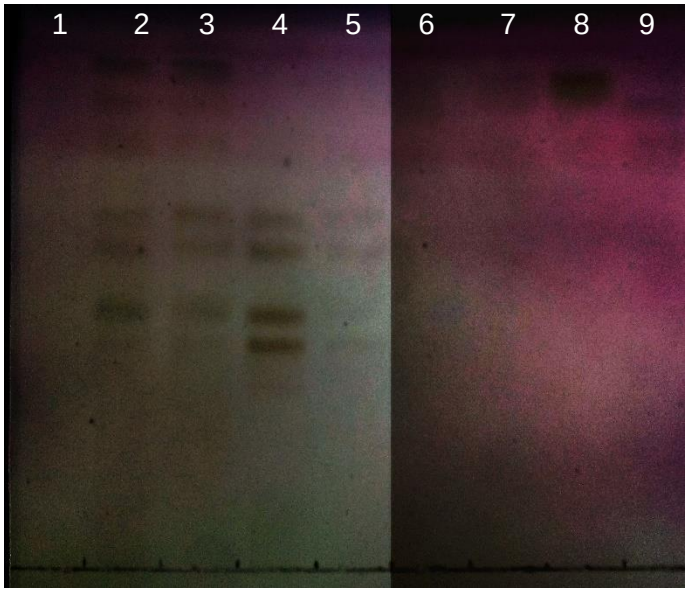

Figura 16. Cromatograma TLC de diosgenina 200 µg/ml (1), extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* 1 mg/ml (2 y 3), fracción 23 1 mg/ml (4), fracción 24 1.3 mg/ml (5), fracción 25 1 mg/ml (6), fracción 26 1 mg/ml (7), fracción 27 0.9 mg/ml (8), fracción 28 0.7 mg/ml (9). Modificado para la mejor visualización de las bandas con saponinas.

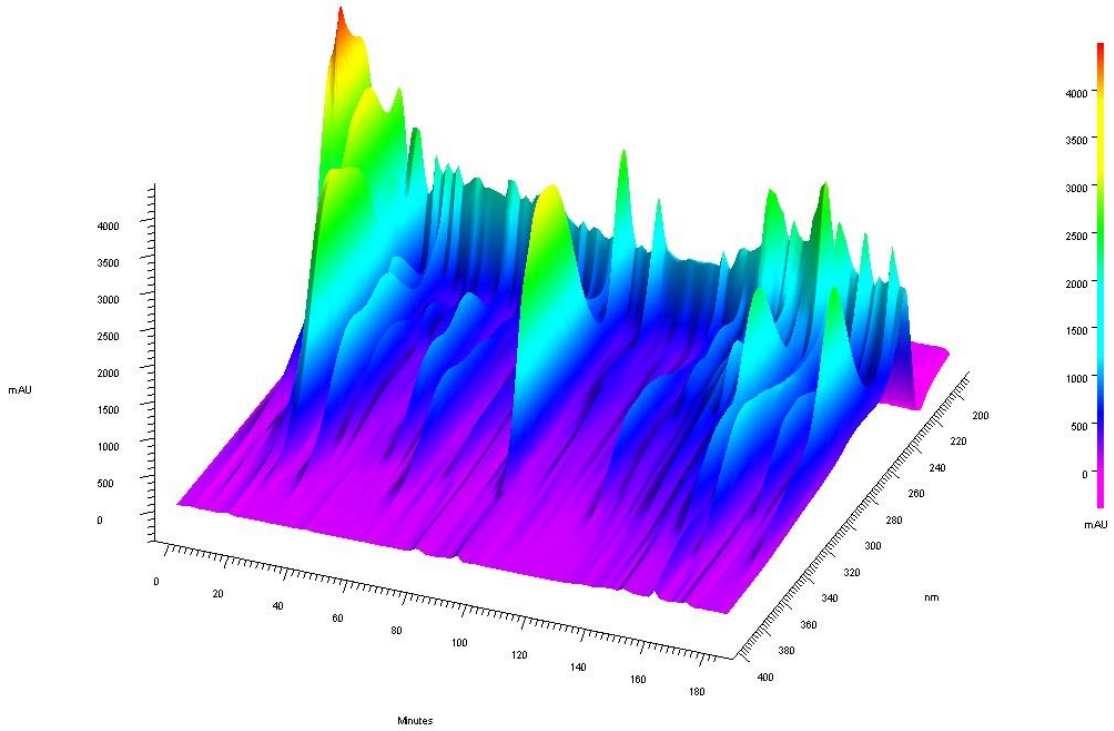

Figura 17. Cromatograma del barrido HPLC-DAD 3D del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata*: 50 mg/100 µl, 7 - 50% MeCN con 0.1% ácido fórmico, flujo 3.5 ml/min, tiempo de elución 185 min, 23 °C.

VII. DISCUSIÓN

La concentración total de saponinas de 1.9% p/p seco, encontrada en el tallo de *Yucca baccata,* es comparable con la reportada en otros estudios para plantas del mismo género. Por ejemplo, *Yucca gloriosa* contiene de 5-6% de saponinas en los rizomas y es considerada como una planta con alto contenido de estos metabolitos (Skhirtladze et al., 2011).

La eficiencia y el rendimiento de extracción obtenidos con la técnica utilizada fueron iguales o mayores que los de algunos de los extractos con saponinas comerciales más usuales. Mientras que se ha reportado que el extracto comercial de *Yucca schidigera*, DK sarsaponin 30, contiene de 8 - 10% de saponinas (Sen et al., 1998), el extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* (EBY) resultó contener 23.9% de saponinas. Incluso el extracto acuoso previo a la extracción butanólica presentó mayor concentración (17.1%) que el DK sarsaponin 30. Este resultado es importante porque *Yucca schidigera* es la fuente comercial más común de saponinas esteroidales disponible actualmente (Cheeke, 2000; Oleszek et al., 2001). Es por ello que se puede considerar a *Y. baccata* como una buena fuente de saponinas esteroidales.

La medición espectrofotométrica del producto colorido de la reacción utilizada para la cuantificación de saponinas es un método que mide directamente las saponinas y/o sapogeninas. La reacción se basa en la interacción de los anillos E y F de la sapogenina con anisaldehído y ácido sulfúrico (Baccou et al., 1977). Por ello es de suponer que el 23.9% de saponinas medido, asimismo representa el contenido de sapogeninas en el extracto. También se puede discutir que la concentración de estos compuestos en el EBY, es similar a la reportada para el extracto comercial de *Quillaja saponaria* de Sigma Aldrich, que contiene de 20-35% de sapogeninas. Este extracto contiene exclusivamente saponinas

terpenoides, lo que nos indica que el EBY podría ser una fuente potencial competitiva incluso con las fuentes comerciales de otros tipos de saponinas.

La actividad antibacteriana cualitativa de los extractos acuoso y butanólico del tallo de *Y. baccata* fue efectiva y eficaz. En este experimento se inhibió el crecimiento de las bacterias Gram negativas. *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 fueron sensibles a ambos extractos a una concentración de 6.0 mg/disco y la actividad fue igual o mejor que la del antibiótico kanamicina. Además, la actividad antibacteriana del EBY y del EAY es comparable a la actividad antibacteriana encontrada para los extractos obtenidos por procesos similares a partir de otras plantas. El extracto etanólico de *Claussena heptaphylla* analizado por Fakruddin et al. (2012) a una concentración de 4 mg/disco, no tuvo efecto sobre estas mismas bacterias, mientras que el extracto metanólico de *Calendula officinalis,* analizado a 4.5 mg/disco tuvo un efecto similar a los extractos aquí ensayados contra las mismas bacterias (Efstratiou et al., 2012). La efectividad de los resultados depende de la concentración y variedad de los metabolitos activos en cada extracto, lo que a su vez depende tanto de la planta como de las técnicas de extracción y el solvente utilizado.

Cabe resaltar el comportamiento antibacteriano totalmente contrario al observar los resultados obtenidos para la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del EBY. Al cuantificar la actividad del extracto, es notorio el efecto antibacteriano más pronunciado en las bacterias Gram positivas. Incluso, el EBY mostró efecto bactericida y no sólo bacteriostático para este tipo de bacterias a concentraciones tan bajas como 17.5 y 25 mg/ml. Sin embargo, esto sí concuerda con otros estudios que han encontrado una reducción de bacterias Gram positivas en el ganado, al suplementarlo con extractos ricos en saponinas (Narvaez et al., 2013).

La concentración y variedad de saponinas encontradas en *Y. baccata* pueden ser factores que estén influenciando en su actividad antibacteriana. En este estudio, se obtuvieron alrededor de 8 fracciones con saponinas en el EBY. Esto puede deberse al método de extracción empleado. No obstante, ha sido comprobado que las extracciones con n-butanol sustraen saponinas esteroidales

con alta eficiencia (Duffy et al., 2001; Hassan et al., 2010). Además, la cromatografía en capa fina es un procedimiento cualitativo, por lo que puede haber más de una saponina que no se alcance a detectar en cada fracción. En el extracto comercial con saponinas esteroidales *Y. schidigera* se han revelado hasta 5 - 6 fracciones con saponinas por cromatografía en capa fina de alta presión (Wang y McAllister, 2010), pero se han caracterizado hasta 19 saponinas esteroidales por métodos como HPLC acoplado a espectrometría de masas (Kowalczyk et al., 2011). Es claro que dependiendo de la sensibilidad del método que se utilice, se pueden detectar nuevas saponinas en las distintas especies de *Yucca*.

La estandarización del método para la separación por HPLC semi-preparativa del EBY en particular, se determinó basada primeramente en datos de la bibliografía para extractos similares. Los solventes más utilizados y reportados por otros autores para la separación óptima de saponinas esteroidales son acetonitrilo y agua con 0.1% de ácido fórmico o ácido trifluoroacético (Oleszek y Bialy, 2006; Kowalczyk et al., 2011). Asimismo, el tipo de columnas más comunes en la separación de saponinas (de polaridad intermedia) son las C-18 para HPLC de fase reversa como la utilizada en este estudio (Ganzera et al., 2001; Li et al., 2012). Las dimensiones de la columna (300 mm x 8 mm id., 250 mm x 10 mm id.), la cantidad de muestra (3 - 100 mg), el volumen de inyección (20 - 100 µl), la temperatura (20 - 30 °C) y el flujo (3 - 5 ml/min) para las separaciones por HPLC semi-preparativa varían muy poco (Hostettmann et al., 1986; Kim y Park, 2001; Ebada et al., 2008; Li et al., 2012).

Por otro lado, los gradientes de separación y los tiempos de elución oscilan a menudo, incluso para la separación de compuestos del mismo tipo. Inicialmente se optó por escoger un gradiente paso a paso (MeCN-H_2O 35:65 de 0 a 15 min → MeCN-H_2O 40:60 de 15 a 30 min) según el análisis de Qin y colaboradores en el 2011, para la separación de saponinas esteroidales con una columna Zorbax-C18. Bajo las condiciones de dicho experimento no se logró separar con buena resolución ningún compuesto, por lo que se decidió modificar el gradiente al tipo isocrático y disminuir un poco la polaridad de la fase móvil (MeCN-H_2O 50:50 de

0 a 30 min). La separación obtenida tuvo menor resolución, deduciendo así que las saponinas y los compuestos en el EBY podrían ser más polares que apolares, lo que concuerda con los reportes previos para saponinas esteroidales (Dinan et al., 2001).

Luego, disminuimos el flujo de elución para intentar separar mejor los picos en el cromatograma, manteniendo un gradiente isocrático más polar (MeCN-H_2O 40:60 de 0 a 30 min). Al pasar de un flujo de 5 ml/min a 3.5 ml/min se observó mejor separación de algunas sustancias en el cromatograma, sin embargo, aún no fue suficiente para la separación más efectiva.

La mejor separación de todos los compuestos del EBY se llevó a cabo mediante la aplicación de un gradiente lineal manteniendo más polar la fase móvil durante mayor tiempo y disminuyéndola progresivamente. El gradiente de 7 - 60% MeCN 0.1% ácido fórmico ofreció la mejor separación a un flujo de 3.5 ml/min durante 80 min para una concentración de 3 mg por inyección de muestra. Sin embargo, con el fin de aumentar el rendimiento y la eficiencia del método se inyectaron 50 mg de muestra, cambiando así a un gradiente óptimo por combinación de pasos lineales a mayor tiempo de elución. Sobrecargar la columna con exceso de muestra es una técnica muy utilizada para aumentar la recuperación de los compuestos deseados (Hostettmann et al., 1986). Las condiciones finales para la separación de 50 mg de EBY, fueron 7 - 50% MeCN 0.1% ácido fórmico, flujo de 3.5 ml/min, 185 min como tiempo de elución y una temperatura de 23 °C. Estas características de ensayo son similares a las utilizadas para la separación de saponinas en otros extractos como los de *Yucca schidigera* (2.5 - 60% MeCN 0.1% ácido fórmico) y *Platycodon grandiflorum* (columna Zorbax XDB 250 mm x 9 mm id., 10 µm; flujo 3.5 ml/min) (Kowalczyk et al., 2011; Li et al., 2012).

Las saponinas por lo general son detectadas alrededor de los 200 – 210 nm (Gnoatto et al., 2005; Oleszek y Bialy, 2006). Sin embargo, el equipo utilizado Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) cuenta con un detector de arreglo de diodos que nos permitió realizar un barrido del espectro de absorción para determinar las longitudes de onda ideales en la lectura de

nuestros cromatogramas. Se eligieron las longitudes de onda de 248 y 300 nm por ser aquellas en la que la mayoría de los componentes del extracto presentaban una mayor absorbancia.

Según los resultados de la TLC, las fracciones con saponinas se encontraron en los picos con menor polaridad dentro del extracto, detectados casi al final de la elución cromatográfica. Sólo la fracción 27 parece contener una sapogenina, por el color amarillo-verdoso igual al revelado para la sapogenina diosgenina, no detectada previamente en el extracto. No obstante, su patrón de retención es similar y muy cercano al de la banda verde revelada en el EBY con Rf de 0.768. Esto puede indicar que durante el proceso de purificación la saponina que pertenecía a esa banda fue deglicosilada, obteniéndose la sapogenina correspondiente (Wang y McAllister, 2010).

Este estudio fue realizado para sentar parte de las bases que darán lugar a la obtención y aplicación de las saponinas en el EBY como un producto con propiedades farmacológicas. Asimismo, resalta la importancia del análisis de extractos de plantas regionales que pueden ser fuentes potenciales de nuevos antibióticos de origen natural que ayuden a reducir costos y efectos no deseados. Es necesario conducir análisis de purificación con mayor eficiencia y sensibilidad, además de la caracterización de las saponinas de *Yucca baccata*. El efecto antibacteriano si bien puede ser debido a las saponinas en el extracto, también puede adjudicarse a la interacción de los distintos compuestos presentes en el EBY, ya sea por sinergismo, efecto aditivo o incluso antagónico. Se recomienda seguir con bioensayos que analicen el efecto antibacteriano y citotóxico de cada saponina una vez purificadas para reducir esa incertidumbre.

VIII. CONCLUSIONES

Los extractos acuoso y butanólico del tallo de *Yucca baccata* contienen 17.1% y 23.9% de saponinas, respectivamente, con propiedades bacteriostáticas a patógenos Gram negativos.

El extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* (EBY) tiene efectos bactericidas contra dos patógenos humanos Gram positivos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P a 25 mg/ml y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a 17.5 mg/ml.

La separación cromatográfica por HPLC-DAD de las 28 fracciones del EBY llevó a la identificación por TLC de 6 fracciones polares con 8 bandas de saponinas esteroidales.

El promedio de recuperación fue de 1.02 ± 0.04 mg de fracción con saponinas por cada 50 mg de EBY.

BIBLIOGRAFÍA

Acton, D. S., Tempelmans Plat-Sinnige, M. J., Wamel, W., Groot, N., and Belkum, A. (2009). Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28 (2):115-27.

Al-Sakkaf, A. (2013). Domestic food preparation practices: a review of the reasons for poor home hygiene practices. *Health Promot Int*.

Arabski, M., Wegierek-Ciuk, A., Czerwonka, G., Lankoff, A., and Kaca, W. (2012). Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *J Biomed Biotechnol* 2012:286216.

Baccou, J. C., Lambert, F., and Sauvaire, Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *Analyst* 102 (1215):458-65.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., and Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* 12 (9):2385-97.

Bilavsky, E., Pfeffer, I., Tarabeia, J., Schechner, V., Abu-Hanna, J., Grisaru-Soen, G., Schwartz, D., Navon-Venezia, S., and Carmeli, Y. (2013). Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection following urodynamic studies traced to contaminated transducer. *J Hosp Infect* 83 (4):344-6.

Bisi-Johnson, M., Obi, C., Vasaikar, S., Baba, K., and Hattori, T. (2011). Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathogens* 3 (1):1-8.

Campion, A., Casey, P. G., Field, D., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2013). *In vivo* activity of nisin A and nisin V against *Listeria monocytogenes* in mice. *BMC Microbiol* 13:23.

Casero, C., Estevez-Braun, A., Ravelo, A. G., Demo, M., Mendez-Alvarez, S., and Machin, F. (2013). Achyrofuran is an antibacterial agent capable of killing methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in the nanomolar range. *Phytomedicine* 20 (2):133-8.

Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., and Estrada-Garcia, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International journal of food microbiology* 156 (2):176-80.

CDC. (2011). Vital signs: making food safer to eat In Diseases., N. C. f. E. a. Z. I. (ed). Centers for Disease Control and Prevention., http://www.cdc.gov/VitalSigns/pdf/2011-06-vitalsigns.pdf.

Cheeke P. R. (2000). Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. Springer. 45 (25): 241 - 54.

Cheeke P. R., Piacente S., Oleszek W. (2006). Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *Yucca schidigera*: a review. *J Inflamm* 3: 1 - 6.

Colombari, V., Mayer, M. D., Laicini, Z. M., Mamizuka, E., Franco, B. D., Destro, M. T., and Landgraf, M. (2007). Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *J Food Prot* 70 (2):489-93.

da Silva, E. P., and De Martinis, E. C. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97 (3):957-68.

De Clercq, D., Ceustermans, A., Heyndrickx, M., Coosemans, J., and Ryckeboer, J. (2007). A rapid monitoring assay for the detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Senftenberg strain W775 in composts. *J Appl Microbiol* 103 (6):2102-12.

DGE. (2013). Boletín Epidemiológico de la Semana 36. In Epidemiológica, S. N. d. V. (ed). Dirección General de Epidemiología.

DGE. (2013) (2). Boletín Epidemiológico de la Semana 43. In Epidemológica, S. N. d. V. (ed). Dirección General de Epidemiología.

Dinan L., Harmatha J., Lafont R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *J Chromatogr A* 935 (1-2): 105 - 23.

Duffy, C. F., Killeen, G. F., Connolly, C. D., and Power, R. F. (2001). Effects of Dietary Supplementation with *Yucca schidigera* Roezl ex Ortgies and Its Saponin and Non-saponin Fractions on Rat Metabolism. *J Agric Food Chem* 49 (7):3408-13.

Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., and Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nat Protoc* 3 (12):1820-31.

Efstratiou, E., Hussain, A. I., Nigam, P. S., Moore, J. E., Ayub, M. A., and Rao, J. R. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract* 18 (3):173-6.

Espinoza M, A., De La Torre B, M., Salinas F, M., and Sánchez P, V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 21:71-75.

Fakruddin, M., Mannan, K. S., Mazumdar, R. M., and Afroz, H. (2012). Antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the ethanol extract of the stem bark of *Clausena heptaphylla*. *BMC Complement Altern Med* 12:232.

Ganzera, M., Bedir, E., Khan, I. A. (2001). Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. J Pharm Sci 90 (11): 1752-8.

Gnoatto, S. C. B., Schenkel, E. P., Bassani, V. L. (2005). HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16: 723-5.

Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Gordillo-Martínez, A. J., and Castro-Rosas, J. (2014). Behavior of shiga toxin-producing *Escherichia coli,* enteroinvasive *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* strains on whole and sliced jalapeño and serrano peppers. *Food Microbiol* 40 (0):75-80.

Grosso-Becerra, M.-V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J.-L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Servín-González, L., Alcaraz, L.-D., and Soberón-Chávez, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 15 (1):1-14.

Guth, S., Habermeyer, M., Baum, M., Steinberg, P., Lampen, A., and Eisenbrand, G. (2013). Thermally induced process-related contaminants: The example of acrolein and the comparison with acrylamide: Opinion of the Senate Commission on Food Safety (SKLM) of the German Research Foundation (DFG). *Mol Nutr Food Res*.

Hassan, S. M., Byrd, J. A., Cartwright, A. L., and Bailey, C. A. (2010). Hemolytic and antimicrobial activities differ among saponin-rich extracts from *Guar, Quillaja, Yucca*, and soybean. *Appl Biochem Biotechnol* 162 (4):1008-17.

Hauswaldt, S., Nitschke, M., Sayk, F., Solbach, W., and Knobloch, J. M. (2013). Lessons Learned From Outbreaks of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli. Current Infectious Disease Reports* 15 (1):4-9.

Hill, L. E., Taylor, T. M., and Gomes, C. (2013). Antimicrobial efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped cinnamon bark extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium. J Food Sci* 78 (4):N626-32.

Hiriart, Y., Serradell, M., Martínez, A., Sampaolesi, S., Maciel, D., Chabalgoity, J., Yim, L., Algorta, G., and Rumbo, M. (2013). Generation and selection of anti-flagellin monoclonal antibodies useful for serotyping *Salmonella enterica. SpringerPlus* 2 (1):1-9.

Hoelzer, K., Pouillot, R., and Dennis, S. (2012). Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet Res* 43:18.

Hostettmann K., Marston A. (1995). Saponins. Chemistry and pharmacology of natural produtcs. *Cambridge university press*, NY. 124 - 6.

Hostettmann K., Hostettmann M., Marston A. (1986). Preparative chromatographic techniques. Applications in natural product isolation. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, NY. 27 - 75.

Imamura, T. Staphopains in *Staphylococcus aureus* bacteremia: Virulence activities related to the onset of septic shock, coagulation disorders, and infectious endocarditis. *Journal of Oral Biosciences* (0).

Inigo-Figueroa, G., Mendez-Estrada, R. O., Quihui-Cota, L., Velasquez-Contreras, C. A., Garibay-Escobar, A., Canett-Romero, R., and Astiazaran-Garcia, H. (2013). Effects of dietary zinc manipulation on growth performance, zinc status and immune response during *Giardia lamblia* infection: a study in CD-1 mice. *Nutrients* 5 (9):3447-60.

Johnson, L. R., Gould, L. H., Dunn, J. R., Berkelman, R., and Mahon, B. E. (2011). Salmonella infections associated with international travel: a Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) study. *Foodborne Pathog Dis* 8 (9):1031-7.

Joo, E.-J., Kang, C.-I., Ha, Y. E., Kim, J., Kang, S.-J., Park, S. Y., Lee, N. Y., Wi, Y. M., Chung, D. R., Peck, K. R., and Song, J.-H. (2011). Clinical predictors of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia among Gram-negative bacterial infections in non-neutropenic patients with solid tumor. *Journal of Infection* 63 (3):207-14.

Kaneda N., Nakanishi H., Staba J. (1987). Steroidal constituents of *Yucca schidigera* plants and tissue cultures. *Phytochemistry* 26 (5):11425 - 29.

Kim, M. J., Kim, S. A., Kang, Y. S., Hwang, I. G., and Rhee, M. S. (2013). Microbial diversity and prevalence of foodborne pathogens in cheap and junk foods consumed by primary schoolchildren. *Lett Appl Microbiol* 57 (1):47-53.

Kim N., Park I. S. (2001). Purification of saponin compounds in Bupleurum falcatum by solvent partitioning and preparative LC. *Biosci Biotechnol Biochem* 65 (7): 1648 - 51.

Kobayashi, N., Lee, K., Yamazaki, A., Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., Maeda, E., Isobe, J., Sugita-Konishi, Y., and Hara-Kudo, Y. (2013). Virulence Gene Profiles and Population Genetic Analysis for Exploration of Pathogenic Serogroups of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 51 (12):4022-8.

Kotzekidou, P. (2013). Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiol* 34 (2):337-43.

Kowalczyk, M., Pecio, L., Stochmal, A., and Oleszek, W. (2011). Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extract and bark powder of *Yucca schidigera* Roezl. *J Agric Food Chem* 59 (15):8058-64.

León, R. (2012). Actividad antiparasitaria del extracto de *Yucca baccata* del desierto sonorense empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con Giardia lamblia. Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

Levitan, I. (2009). Cholesterol and Kir channels. IUBMB Life 61 (8): 781-90.

Li W., Sun Y., Wang Z., Zheng Y. (2012). Isolation and purification of saponins from *Platycodon grandiflorum* by semi-preparative high performance liquid chromatography and LC/ESI-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 35 (4): 547-57.

Little, P., Stuart, B., Moore, M., Coenen, S., Butler, C. C., Godycki-Cwirko, M., Mierzecki, A., Chlabicz, S., Torres, A., Almirall, J., Davies, M., Schaberg, T., Molstad, S., Blasi, F., De Sutter, A., Kersnik, J., Hupkova, H., Touboul, P., Hood, K., Mullee, M., O'Reilly, G., Brugman, C., Goossens, H., and Verheij, T. (2013). Amoxicillin for acute lower-respiratory-tract infection in primary care when pneumonia is not suspected: a 12-country, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis* 13 (2):123-9.

Locatelli, A., Depret, G., Jolivet, C., Henry, S., Dequiedt, S., Piveteau, P., and Hartmann, A. (2013). Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods. *J Microbiol Methods* 93 (3):242-50.

Mark Taylor, C. (2008). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatric Nephrology* 23 (9):1425-31.

Martinez-Urtaza, J., and Liebana, E. (2005). Investigation of clonal distribution and persistence of *Salmonella* Senftenberg in the marine environment and identification of potential sources of contamination. *FEMS Microbiol Ecol* 52 (2):255-63.

Mernelius, S., Löfgren, S., Lindgren, P. E., and Matussek, A. (2013). The role of broth enrichment in *Staphylococcus aureus* cultivation and transmission from the throat to newborn infants: results from the Swedish hygiene intervention and transmission of S. aureus study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 32 (12):1593-98.

Murphy, R. Y., Duncan, L. K., Johnson, E. R., Davis, M. D., and Marcy, J. A. (2002). Thermal Inactivation of *Salmonella* Senftenberg and Listeria innocua in Beef/Turkey Blended Patties Cooked via Fryer and/or Air Convection Oven. *J Food Sci* 67 (5):1879-85.

Nakamura, I., Yamaguchi, T., Tsukimori, A., Sato, A., Fukushima, S., Mizuno, Y., and Matsumoto, T. (2014). Effectiveness of antibiotic combination therapy

as evaluated by the Break-point Checkerboard Plate method for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical use. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20 (4):266-69.

Narvaez, N., Wang, Y., and McAllister, T. (2013). Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *Yucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations *in vitro*. *J Sci Food Agric* 93 (10):2517-22.

Newbold, C. J., el Hassan, S. M., Wang, J., Ortega, M. E., and Wallace, R. J. (1997). Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br J Nutr* 78 (2):237-49.

Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., and Cheeke, P. (2001). Steroidal saponins of *Yucca schidigera* Roezl. *J Agric Food Chem* 49 (9):4392-6.

Oleszek W., Bialy Z. Chromatographic determination of plant saponins: an update (2000 - 2005). (2006). *J Chromatogr A* 1112 (1-2): 78 - 91.

Paniagua, G. L., Monroy, E., Garcia-Gonzalez, O., Alonso, J., Negrete, E., and Vaca, S. (2007). Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 6:17.

Pellmyr, O., Segraves, K. A., Althoff, D. M., Balcazar-Lara, M., and Leebens-Mack, J. (2007). The phylogeny of yuccas. *Mol Phylogenet Evol* 43 (2):493-501.

Piérard, D., De Greve, H., Haesebrouck, F., and Mainil, J. (2012). O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Vet Res* 43 (1):1-12.

Qin, X. J., Sun, D. J., Ni, W., Chen, C. X., Hua, Y., He, L., and Liu, H. Y. (2012). Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. yunnanensis. *Steroids* 77 (12):1242-8.

Quihui-Cota L., León-Trujillo R, Astiazarán-García H., Esparza-Romero J., Robles M., Robles-Zepeda R., Canett R., and Sánchez-Escalante J. (2014). Marked antigiardial activity of Yucca baccata extracts: A potential natural alternative for treating protozoan infections. *BioMed Research International 2014* (2014): 1-6. doi: 10.1155/2014/823492.

Ramirez Merida, L. G., Moron de Salim, A., Catinella, R., and Castillo, L. (2012). [Bacteriostatic and/or bactericidal extract of *Aloe vera* gel on cultures of Listeria monocytogenes]. *Arch Latinoam Nutr* 62 (1):73-8.

Ramos, A. N., Peral, M. C., and Valdez, J. C. (2010). Differences between *Pseudomonas aeruginosa* in a clinical sample and in a colony isolated from it: Comparison of virulence capacity and susceptibility of biofilm to inhibitors. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33 (3):267-75.

Ravaoarinoro, M., Mohapatra, S., Shore, J., Rawal, S., Omri, A., Yaghi, J., and Oriol, F. (1996). Serotyping clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to infection site antibiotic susceptibility and beta-lactamase production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 7 (1):65-68.

Reis, R., and Horn, F. (2010). Enteropathogenic *Escherichia coli, Samonella, Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens* 2 (1):1-12.

Rentsch, J. D., and Leebens-Mack, J. (2012). Homoploid hybrid origin of *Yucca gloriosa*: intersectional hybrid speciation in *Yucca* (Agavoideae, Asparagaceae). *Ecol Evol* 2 (9):2213-22.

Ruby, T., McLaughlin, L., Gopinath, S., and Monack, D. (2012). *Salmonella*'s long-term relationship with its host. *FEMS Microbiol Rev* 36 (3):600-15.

Sabouni, F., Mahmoudi, S., Bahador, A., Pourakbari, B., Sadeghi, R. H., Ashtiani, M. T. H., Nikmanesh, B., and Mamishi, S. (2014). Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolates in an Iranian Referral Children's Hospital. *Osong Public Health and Research Perspectives* 5 (2):96-100.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., and Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17 (1):7-15.

Scheiring, J., Andreoli, S., and Zimmerhackl, L. (2008). Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology* 23 (10):1749-60.

Schnupf, P., and Portnoy, D. A. (2007). Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes Infect* 9 (10):1176-87.

Sfeir, J., Lefrancois, C., Baudoux, D., Derbre, S., and Licznar, P. (2013). *In vitro* Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:269161.

Silva, N., Alves, S., Goncalves, A., Amaral, J. S., and Poeta, P. (2013). Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Sci Technol Int* 19 (6):503-10.

Skhirtladze, A., Perrone, A., Montoro, P., Benidze, M., Kemertelidze, E., Pizza, C., and Piacente, S. (2011). Steroidal saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes: LC-MS profiling, isolation and quantitative determination. *Phytochemistry* 72 (1):126-35.

Slifman, N. R., Gershon, S. K., Lee, J. H., Edwards, E. T., and Braun, M. M. (2003). *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum* 48 (2):319-24.

Smith-Hall, C., Larsen, H. O., and Pouliot, M. (2012). People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. *J Ethnobiol Ethnomed* 8:43.

Stavru, F., Archambaud, C., and Cossart, P. (2011). Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol Rev* 240 (1):160-84.

Swaminathan, B., and Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 9 (10):1236-43.

Tan, S. L., Lee, H. Y., and Mahyudin, N. A. (2014). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. *Food Control* 44 (0):203-07.

Thalayasingam, M., Davies, L. J., Llanora, G. V., Gerez, I. F., Van Bever, H. P., and Shek, L. P. (2013). Clinical characteristics and outcomes of patients undergoing drug provocation tests (DPTs). *Ann Acad Med Singapore* 42 (4):184-9.

Torres-Vitela, M. R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C. A., Garay-Martinez, L. E., Navarro-Hidalgo, V., and Villarruel-Lopez, A. (2012). Incidence of *Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *J Food Prot* 75 (1):79-84.

Tovar G, Castillo I, Quiñónez E, Rodas R, Vázquez C. *Listeria*. Una aproximación práctica al microorganismo. *Rev Dig UNAM*. 2005; 6:1-8.

Treesirichod, A., Hantagool, S., and Prommalikit, O. (2014). Nasal carriage and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* among medical students at the HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn Medical Center, Thailand: A follow-up study. *Journal of Infection and Public Health* 7 (3):205-09.

Tsuchimochi, N., Takuma, T., Shimono, N., Nagasaki, Y., Uchida, Y., and Harada, M. (2008). Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological analysis of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 14 (2):99-104.

Upadhyay, A., Johny, A. K., Amalaradjou, M. A., Ananda Baskaran, S., Kim, K. S., and Venkitanarayanan, K. (2012). Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors *in vitro*, and down-regulate expression of virulence genes. *Int J Food Microbiol* 157 (1):88-94.

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., Ananda Baskaran, S., Mooyottu, S., Karumathil, D., and Venkitanarayanan, K. (2013). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide. *Int J Food Microbiol* 163 (2-3):114-8.

Van der Linden, I., Cottyn, B., Uyttendaele, M., Vlaemynck, G., Maes, M., and Heyndrickx, M. (2013). Long-term survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on butterhead lettuce seeds, and their subsequent survival and growth on the seedlings. *International journal of food microbiology* 161 (3):214-19.

Vandamm, J. P., Li, D., Harris, L. J., Schaffner, D. W., and Danyluk, M. D. (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. *Food Microbiol* 34 (1):151-7.

Velázquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Domínguez Z., Robles R., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F. M., Velázquez E. F., Aztiazarán H., Hernández J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. J Appl Microbiol 103 (5): 1747-56.

Wang Y., McAllister T. A. (2010). A modified spectrophotometric assay to estimate deglycosylation of steroidal saponin to sapogenin by mixed ruminal microbes. *J Sci Food Agric* 90 (11): 1811 - 8.

Warnke, P. H., Lott, A. J., Sherry, E., Wiltfang, J., and Podschun, R. (2013). The ongoing battle against multi-resistant strains: *in-vitro* inhibition of hospital-acquired MRSA, VRE, *Pseudomonas*, ESBL *E. coli* and *Klebsiella* species in the presence of plant-derived antiseptic oils. *J Craniomaxillofac Surg* 41 (4):321-6.

Weiser, R., Donoghue, D., Weightman, A., and Mahenthiralingam, E. (2014). Evaluation of five selective media for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a strain panel from clinical, environmental and industrial sources. *J Microbiol Methods* 99 (0):8-14.

Whittaker, P. (2012). Evaluating the use of fatty acid profiles to differentiate human pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *J AOAC Int* 95 (5):1457-9.

WHO, O. M. d. l. S. (2012). Reducción de la mortalidad en la niñez. In, *Nota descriptiva*.

Wiesner, M., Zaidi, M. B., Calva, E., Fernandez-Mora, M., Calva, J. J., and Silva, C. (2009). Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol* 9:131.

Willmann, M., Kuebart, I., Vogel, W., Flesch, I., Markert, U., Marschal, M., Schröppel, K., Autenrieth, I. B., Hölzl, F., and Peter, S. (2013). Time to positivity as prognostic tool in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Journal of Infection* 67 (5):416-23.

Wisloff, H., Uhlig, S., Scheie, E., Loader, J., Wilkins, A., and Flaoyen, A. (2008). Toxicity testing of saponin-containing Yucca schidigera Roetzl. juice in relation to hepato- and nephrotoxicity of *Narthecium ossifragum* (L.) Huds. *Toxicon* 51 (1):140-50.

Wu, X., Chen, J., Li, X., Zhao, Y., and Zughaier, S. M. Culture-free diagnostics of *Pseudomonas aeruginosa* infection by silver nanorod array based SERS from clinical sputum samples. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (0).

Yamagishi, Y., Terada, M., Ohki, E., Miura, Y., Umemura, T., and Mikamo, H. (2012). Investigation of the clinical breakpoints of piperacillin–tazobactam against infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 18 (1):127-29.

Zhang, Y., Zhang, Y. J., Jacob, M. R., Li, X. C., and Yang, C. R. (2008). Steroidal saponins from the stem of *Yucca elephantipes*. *Phytochemistry* 69 (1):264-70.