



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
en Celaya

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**Elucidación y efecto *in vitro* e *in vivo* de compuestos antimicrobianos de jamaica
(*Hibiscus sabdariffa*) sobre la célula bacteriana.**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

PRESENTA

M.C. Lizbeth Anahí Portillo Torres

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Aurea Bernardino Nicanor

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Javier Castro Rosas



“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

Celaya, Gto., **03/julio/2020** POSGRADO
DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
OFICIO No. DCIBQ/01/06/2020 **Asunto:**
Autorización de Impresión Tesis

ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
PRESENTE

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, para que en reunión de los miembros del comité tutorial de la tesis avalada por el Claustro Doctoral del Doctorado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica se examinara la tesis titulada:

“Elucidación y efecto *in vitro* e *in vivo* de compuestos antimicrobianos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) sobre la célula bacteriana.”

Presentada por la alumna, **C. Lizbeth Anahí Portillo Torres** con número de control **D1603017**, Aspirante al Grado de Doctor en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Después de intercambiar opiniones, los miembros del comité tutorial, manifestaron **APROBAR y AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

ATENTAMENTE
La técnica por un México mejor ®
EL COMITÉ TUTORIAL



Dra. Aurea Bernardino Nicanor
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Javier Castro Rosas
CO-DIRECTOR DE TESIS



Dr. Leopoldo González Cruz
SECRETARIO



Dr. Hugo Jiménez Islas
VOCAL



Dr. Lorenzo Guevara Olvera
VOCAL



Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
ASESOR EXTERNO

COORDINADOR DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
BIOQUÍMICA



Dr. Leopoldo González Cruz

C.c. p. Dr. Eloy Conde Barajas. - Presidente del Claustro Doctoral
LGC/mgg



DEDICATORIA

*A mis padres, Rosa Lidia Torres Fierro y José Ángel Portillo Gil,
por su apoyo y sobretodo su amor incondicional,
por confiar en mis decisiones y porque a través de su esfuerzo me han
permitido alcanzar esta meta.*

*A mis hermanos José Ángel y Jesús Hernán,
por todos los momentos vividos.*

*A mis sobrinos Katherine y Ángel Uriel,
porque llenan de alegría cada día de mi vida.*

Lizbeth Anahí Portillo Torres

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Aurea Bernardino Nicanor, por la orientación y ayuda que me brindó.

Al Dr. Javier Castro Rosas, mi especial reconocimiento y cariño, por su paciencia, dedicación y motivación. Ha sido un privilegio contar con su guía durante todos estos años.

Al Dr. Carlos Gómez Aldapa, por ser parte de este proyecto de tesis, por su apoyo en todo momento y por colaborar en mi formación como investigadora.

A mis asesores Dr. Leopoldo González Cruz, Hugo Jiménez Islas y Dr. Lorenzo Guevara Olvera, por sus grandes aportaciones y observaciones al presente trabajo.

A Ricardo Ramírez, por su amor, por su sacrificio y esfuerzo, por creer en mi capacidad, tu ayuda ha sido fundamental.

A mis amigas, Melissa Luna, Berenice Quintero y Mariel Amaya, porque han sido parte importante de mi vida, por motivarme y por confiar en mí, por sus consejos y sobre todo por estar siempre que las necesito.

A mis amigas Edna Martínez, Saraí Baena, Zaira Cabrera y Magda Cerón, por su amistad sincera, por los momentos compartidos y por permitirme aprender más de la vida a su lado. Por hacer de esos días de estrés, días más amenos.

A mis primas Lupita Portillo, Yarely Portillo y Yamilex Portillo, quienes han sido como mis hermanas y hemos compartido momentos inolvidables.

A mis compañeros de laboratorio Alex, Zenia y Monse, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma han sido clave importante en mi vida profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca doctoral.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs).....	5
2.2 Bacterias patógenas.....	6
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	6
2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	6
2.2.1.2 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	7
2.2.1.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	8
2.2.1.4 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	8
2.2.2. <i>Salmonella</i>	9
2.3 Antibióticos	10
2.3.1 Resistencia bacteriana a los antibióticos	10
2.3.2 Multirresistencia a los antibióticos	11
2.3.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos	11
2.3.3.1 Resistencia mutacional	12
2.4 Antimicrobianos naturales de origen vegetal	13
2.5 Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	13
2.5.1 Producción de jamaica	14
2.5.2 Reportes de efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).	15
2.5.3 Reportes de efecto antimicrobiano de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) en alimentos.....	16
2.5.4 Compuestos presentes en jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).	18

2.5.4.1	Ácidos orgánicos	18
2.5.4.1.1	Ácido hidroxycítrico	19
2.5.4.1.2	Ácido hibiscus	19
2.5.4.2	Antocianinas.....	20
2.5.4.3	Flavonoides	20
2.5.5	Estudios de compuestos identificados con actividad antimicrobiana de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	20
2.5.6	Estudios de efecto sinérgico de compuestos de plantas y antibióticos contra bacterias patógenas.....	21
2.6	Mecanismos de acción de los antimicrobianos	23
2.6.1	Reportes de mecanismos de acción de plantas con actividad antimicrobiana	24
3.	Justificación.....	26
4.	Hipótesis	27
5.	Objetivos	28
5.1.	General	28
5.2.	Específicos.....	28
6.	Materiales y métodos.....	29
6.1.	Materiales	29
6.1.1.	Cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	29
6.1.2.	Cepas bacterianas	29
6.1.3.	Animales experimentales.....	29
6.1.4.	Medios de cultivo.....	30
6.1.5.	Reactivos y disolventes	31
6.1.6	Antibióticos	31
6.1.6.	Aparatos, instrumentos y otros	31
6.2.	Métodos.....	31

6.2.1 Diagrama general experimental.....	31
6.2.1. Obtención de extractos a partir de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	32
6.2.2. Determinación del efecto antimicrobiano de extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	33
6.2.2.1. Preparación de cepas bacterianas	33
6.2.2.2. Preparación de soluciones de prueba.....	33
6.2.2.3. Tratamiento térmico	33
6.2.2.4. Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	34
6.2.3. Obtención de fracciones cromatográficas a partir del extracto acetónico de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	34
6.2.4 Obtención de ácido hibiscus	35
6.2.5. Identificación estructural.....	36
6.2.5.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	36
6.2.5.2. Espectroscopía de infrarrojo (IR) con sistema de reflexión total atenuada (FTIR-ATR)	36
6.2.5.3. Espectroscopía de rayos X.....	37
6.2.5.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y fusiómetro	37
6.2.6 Determinación del efecto antimicrobiano de colecciones cromatográficas y del ácido hibiscus.....	37
6.2.6.1 Preparación de cepas bacterianas	37
6.2.6.2 Preparación de las soluciones de prueba	38
6.2.6.3 Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de colecciones cromatográficas y del ácido hibiscus.....	38
6.2.7 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)	38
6.2.8 Efecto del ácido hibiscus en la sobrevivencia de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica y <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	39

6.2.9 Efecto antimicrobiano de extracto acuoso y ácido hibiscus obtenidos de cálices de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) y cloranfenicol en ratones CD-1 infectados con <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica y <i>Salmonella</i> Typhimurium multirresistentes a antibióticos	39
6.2.9.1. Resistencia a rifampicina de cepas bacterianas para su uso en ratones.....	39
6.2.9.2. Preparación de inóculo	40
6.2.9.3 Preparación de soluciones a administrar en los ratones	40
6.2.9.4 Inoculación de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC A R ⁺) y <i>Salmonella</i> Typhimurium (<i>Salmonella</i> C65 R ⁺) y administración de extracto acuoso, ácido hibiscus y mezclas a ratones CD-1.....	41
6.2.9.5 Cuantificación de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC A R ⁺) y <i>Salmonella</i> Typhimurium (<i>Salmonella</i> C65 R ⁺) en heces de los ratones.....	42
6.2.9.6. Tasa de mortalidad y manifestaciones patológicas	42
6.2.10. Efecto de extracto acuoso, acetónico y ácido hibiscus en la expresión de factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC A R ⁺ y EDL9333).....	43
6.2.10.1 Preparación de soluciones.....	43
6.2.10.2. Cepas patógenas y condiciones de crecimiento	44
6.2.10.3 Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	44
6.2.11. Determinación del efecto sobre la célula bacteriana de las moléculas activas	47
6.2.11.1 Medición de permeabilidad con cristal violeta	47
6.2.11.2 Cambios en la movilidad celular	47
6.2.11.3 Tinción de microscopía de fluorescencia	48
6.2.11.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	49
6.2.11.5 Fuga de material intracelular.....	49
7. Análisis estadístico	50
8. Resultados y discusión.....	51
8.1 Obtención de extractos.....	51
8.2. Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de extractos de acetato de etilo, metanol, agua y acetona	51

8.3. Obtención de colecciones cromatográficas a partir del extracto acetónico	59
8.4. Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de las colecciones cromatográficas contra bacterias patógenas	59
8.5 Obtención de cristales presuntivos de ácido hibiscus a partir del extracto acetónico de cálices de <i>H. sabdariffa</i>	65
8.6. Identificación estructural.....	66
8.6.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	66
8.6.1.1. Espectro de RMN de ¹ H del extracto de acetona de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	66
8.6.1.2 Espectro de RMN de ¹ H de ácido hibiscus de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	67
8.6.1.3. Espectro de RMN de ¹ H de ácido hibiscus de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> con tratamiento térmico por esterilización.	68
8.6.2. Espectroscopía de infrarrojo de ácido hibiscus de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	70
8.6.3 Cristalografía de rayos X de ácido hibiscus de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	72
8.6.4 Punto de fusión de ácido hibiscus extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	73
8.7.Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de ácido hibiscus extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	74
8.7 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de extracto acetónico, extracto acuoso y ácido hibiscus.	78
8.8 Efecto de ácido hibiscus en la sobrevivencia de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica y <i>Salmonella Typhimurium</i>	81
8.9 Efecto antimicrobiano de extracto acuoso y ácido hibiscus de cálices de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) y cloranfenicol en ratones CD-1 infectados con <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica y <i>Salmonella Typhimurium</i> multirresistentes a antibioticos	85
8.10. Efecto de extracto acuoso, acetónico y ácido hibiscus en la expresión de factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica y <i>Salmonella Typhimurium</i>	92

8.11 Determinación del efecto sobre la célula bacteriana de ácido hibiscus de extracto acetónico de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	102
8.11.1 Medición de permeabilidad de membrana con cristal violeta	102
8.11.2 Cambios en la movilidad celular	104
8.11.4 Tinción de microscopía de fluorescencia	108
8.11.5 Fuga de material intracelular	108
9.Conclusiones	112
10. Referencias bibliográficas.....	113
ANEXOS.....	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas patógenas resistentes a antibióticos utilizadas en este estudio	30
Tabla 2. Grupos de ratones y tratamientos para determinación de efecto de compuestos de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	43
Tabla 3. Preparación de solución de lisis (Solución A).....	46
Tabla 4. Diámetros de halos de inhibición de extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> producidos con 4 disolventes contra 5 cepas de <i>Salmonella</i>	52
Tabla 5. Diámetros de halos de inhibición de extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> producidos con 4 disolventes contra 9 cepas de <i>Escherichia coli</i>	53
Tabla 6. Fracciones obtenidas de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	60
Tabla 7. Colecciones de fracciones de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> obtenidas por cromatografía en capa fina.	62
Tabla 8. Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de colecciones cromatográficas de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> contra 5 cepas patógenas de <i>Salmonella</i> multiresistentes a antibióticos	63
Tabla 9. Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de colecciones cromatográficas de extracto acetónico de <i>Hibiscus sabdariffa</i> contra 9 cepas de <i>Escherichia coli</i>	64
Tabla 10. Fracciones obtenidas de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	65
Tabla 11. Colecciones de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> reunidas por cromatografía en capa fina.....	65
Tabla 12. Detalles de espectroscopia de rayos X de datos de cristal y parámetros de refinamiento de estructura de ácido hibiscus aislado de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	75
Tabla 13. Diámetros inhibición de ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización contra 5 cepas patógenas de <i>Salmonella</i> multiresistentes a antibióticos.	77
Tabla 14. Diámetros inhibición de ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización contra 9 cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> multiresistentes a antibióticos.	77
Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima bactericida (CMB) y relación de CMB/CMI de extracto acetónico y extracto acuoso con y sin tratamiento térmico por esterilización de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	79

Tabla 16. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB) y relación de CMB/CMI de ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización de extracto acetónico de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	82
Tabla 17. Efecto de tratamientos en ratones CD-1 sobre la excreción fecal de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica y <i>Salmonella</i> Typhimurium (UFC/g).....	87
Tabla 18. Síntomas clínicos y mortalidad observadas en grupos de ratones durante el curso del experimento.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácido cítrico y sus derivados.	19
Figura 2. Diagrama de metodología general.....	32
Figura 3. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en acetona-d ₆ del extracto de acetona de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	66
Figura 4. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en acetona-d ₆ de cristales purificados obtenidos de extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	67
Figura 5. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en acetona-d ₆ de ácido hibiscus de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> con tratamiento a 121 °C, 15 min y 15 lb/in ²	69
Figura 6. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en acetona-d ₆ de ácido hibiscus de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> con tratamiento a 121 °C, 1 h y 15 lb/in ²	69
Figura 7. Espectro de infrarrojo de ácido hibiscus de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	71
Figura 8. Espectro de infrarrojo de ácido hibiscus tratado térmicamente (121 °C, °15 min) de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	71
Figura 9. Espectro de infrarrojo de ácido hidroxicítrico obtenido de la corteza de <i>G. cambogia</i> (Ravikumar et al., 2017).	72
Figura 10. Estructura molecular del ácido hibiscus aislado del extracto acetónico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> determinado por difracción de rayos X. Elipsoides mostrados al 50 % de probabilidad.	73
Figura 11. Puentes de hidrogeno de ácido hibiscus aislado de cálices de extracto acetónico de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	74
Figura 12. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre recuentos de células viables de EHEC A en varios intervalos de tiempo. Los datos se representan como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.	83
Figura 13. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre recuentos de células viables de <i>Salmonella</i> C65 en varios intervalos de tiempo. Los datos se representan como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.	84
Figura 14. Electroforesis del RNA total de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.....	94
Figura 15. Expresión genética relativa de los genes <i>STBX2</i> y <i>exhA</i> de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EDL933).	94

Figura 16. Expresión genética relativa de los genes <i>grlA</i> , <i>espA</i> y <i>nleA</i> de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EDL933).....	95
Figura 17. Expresión genética relativa de los genes <i>flhD</i> y <i>fliC</i> de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EDL933).....	95
Figura 18. Expresión genética relativa de los genes <i>STBX2</i> y <i>exhA</i> de la CMSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EDL933).....	96
Figura 19. Expresión genética relativa de los genes <i>grlA</i> , <i>espA</i> y <i>nleA</i> de la CSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EDL933).....	96
Figura 20. Expresión genética relativa de los genes <i>flhD</i> y <i>fliC</i> de la CMSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EDL933).....	97
Figura 21. Expresión genética relativa de los genes <i>grlA</i> , <i>espA</i> y <i>nleA</i> de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC A).	98
Figura 22. Expresión genética relativa del gen <i>flhD</i> de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC A).....	98
Figura 23. Expresión genética relativa de los genes <i>grlA</i> , <i>espA</i> y <i>nleA</i> de la CMSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC A).	99
Figura 24. Expresión genética relativa del gen <i>flhD</i> de la CMSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC A).....	100
Figura 25. Cambio en la permeabilidad de la membrana bacteriana de EHEC A (analizado por la absorción de violeta cristal) en presencia de diferentes concentraciones de ácido hibiscus y EDTA.	103
Figura 26. Cambio en la permeabilidad de la membrana bacteriana de <i>Salmonella</i> C65 (analizado por la absorción de violeta cristal) en presencia de diferentes concentraciones de ácido hibiscus y EDTA.	104
Figura 27. Análisis de microscopía electrónica de barrido de EHEC A. A) Células sin tratamiento mostrando morfología intacta y regular. B) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI (5 mg/mL) y C) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI 10x (50 mg/mL).	107
Figura 28. Evaluación microscopía de EHEC A. La muerte celular bacteriana se examinó mediante tinción NA / BE y microscopía de fluorescencia. Las bacterias vivas emiten fluorescencia verde y las bacterias muertas fluorescencia roja A) Células sin tratamiento. B) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI (5 mg/mL) y C) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI 10x (50 mg/mL).	109

Figura 29. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre la velocidad de liberación de material intracelular (260nm) de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A).....111

Figura 30. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre la velocidad de liberación de material intracelular (260nm) de *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella* C65).111

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Artículo científico publicado.....	132
---------------------------------------------	-----

RESUMEN

Se identificó, aisló y determinó el efecto antimicrobiano y el mecanismo de acción del ácido hibiscus obtenido a partir de fracciones cromatográficas de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y se determinó el efecto antimicrobiano *in vivo* del ácido hibiscus y extracto de jamaica. A partir de los cálices de *H. sabdariffa* se obtuvieron extractos con 4 disolventes (agua, metanol, acetona y acetato de etilo) y se determinó su efecto antimicrobiano. El extracto con mayor actividad antimicrobiana fue fraccionado mediante cromatografía en columna y las fracciones se agruparon en colecciones considerando la semejanza del perfil obtenido en cromatografía en capa fina. Se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos y colecciones sobre 9 cepas de *Escherichia coli* y 5 de *Salmonella*, (todas multiresistentes a antibióticos) por medio de la técnica de difusión en gel. A partir de la colección cromatográfica con mayor actividad antimicrobiana se aisló e identificó al ácido hibiscus mediante resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía de rayos X y punto de fusión. Se determinó el efecto antimicrobiano del ácido hibiscus y extractos de jamaica *in vitro* mediante la técnica de difusión en gel e *in vivo* sobre ratones CD-1. Finalmente, se determinó el efecto del extracto de jamaica y ácido hibiscus sobre los factores de virulencia de *E. coli* enterohemorrágica y sobre la permeabilidad de la membrada bacteriana. Los extractos de *H. sabdariffa* obtenidos con acetona, acetato de etilo y metanol, con y sin tratamiento térmico mostraron actividad antimicrobiana contra las 14 bacterias patógenas de estudio. Los extractos con tratamiento térmico de acetona y acetato de etilo fueron los extractos más efectivos para la mayoría de las bacterias. A partir del extracto acetónico, se obtuvieron 25 colecciones cromatográficas, de las cuales 17 mostraron efecto antimicrobiano contra al menos un patógeno de ensayo. Se realizó un segundo estudio cromatográfico, a partir de la colección IV se aisló e identificó el ácido hibiscus y se obtuvo un rendimiento del 1.3 %. Este compuesto con y sin tratamiento térmico mostró actividad antimicrobiana contra las 14 cepas. Después del tratamiento térmico se incrementó el efecto antimicrobiano contra la mayoría de las bacterias. Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Mínimas Bactericidas (CMI's y CMB's) de extracto acetónico fueron de 7 mg/mL y 10 mg/mL y para extracto de acetona con tratamiento térmico fue 5 mg/mL y 7 mg/mL, respectivamente. Las CMI's y CMB's para ácido hibiscus variaron de 4 a 7 mg/mL y 7 mg/mL, respectivamente, para la mayoría de las bacterias y para ácido hibiscus con tratamiento térmico presentó CMI's y CMB's de 4 mg/mL y 5 mg/mL, respectivamente. El estudio *in vivo* mostró que tanto el extracto acuoso como el ácido hibiscus

eliminan la carga microbiana de *S. Typhimurium* y EHEC de los ratones dentro de los 2 primeros días de tratamiento y contribuye a la mejora en la salud de los ratones infectados. En general, se observó que los factores de virulencia de EHEC se sobreexpresan al tratar a la bacteria con ácido hibiscus, extracto acuoso y extracto acetónico provocando un posible desequilibrio negativo en la bacteria. Finalmente, se observó que el ácido hibiscus altera la permeabilidad de la membrana de *E. coli* y *Salmonella*.

1. Introducción

Salmonella es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos, y la infección (salmonelosis) es prevalente en todo el mundo. Debido a su prevalencia, la salmonelosis constituye una carga importante para la salud pública representando costos significativos en muchos países. Diferentes tipos de productos frescos de frutas y vegetales han sido implicados en la infección por *Salmonella*, con mayor frecuencia los que se consumen crudos, como la lechuga, los germinados, el melón y los tomates (Gómez-Aldapa et al., 2012).

Otro grupo relevante de bacterias transmitidas por los alimentos son los patotipos diarreogénicos de *Escherichia coli* (DEPs, por sus siglas en inglés) que se clasifican en función de sus características de virulencia como Enterotoxigénica (ETEC), Enteropatógena (EPEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteroagregativa (EAEC), Adherente Difusa (DAEC) y Productora de Toxina Shiga (STEC) (Kaper et al., 2004). Los DEPs se han identificado en alimentos y bebidas de venta callejera en la Ciudad de México (Cerna-Cortes et al., 2012; Estrada-García et al., 2002; López-Saucedo et al., 2010). Además, los patotipos ETEC y EAEC son los patógenos más comunes identificados en muestras de heces diarreicas de viajeros estadounidenses a Guadalajara y Cuernavaca, México (Adachi et al., 2002; Paredes-Paredes et al., 2011).

La aparición de cepas de *Salmonella* y grupos patógenos de *E. coli* multirresistentes a los antibióticos se ha relacionado con el uso de antibióticos en animales criados para la alimentación. Las bacterias resistentes se pueden transmitir a los humanos a través de los alimentos, especialmente los de origen animal y los que se consumen crudos (Phillips et al., 2004). La presencia de bacterias resistente a múltiples antibióticos en vegetales crudos y vegetales frescos mínimamente procesados es un importante problema de salud pública (EFSA, 2008).

El aumento de la resistencia a los antibióticos en las bacterias patógenas ha llevado a una creciente demanda de antimicrobianos alternativos seguros y naturales para los productos alimenticios. La atención se centra actualmente en antimicrobianos aislados de especies de plantas utilizadas como alimentos o hierbas medicinales, ya que estos pueden ofrecer una nueva fuente de compuestos antibacterianos. Se ha reportado que extractos de cálices de jamaica (*H. sabdariffa*) tienen efecto antimicrobiano sobre diferentes microorganismos patógenos resistentes y no resistentes a antibióticos (Hatil y Moneer 2006; Kang et al., 2007; Liu et al., 2007; Olaleye 2007; Fullerton et al., 2011; Morales-Cabrera et al., 2013; Gutierrez-Alcantara et al., 2015, 2016; Gómez-Aldapa et al., 2016,

2017; Rangel-Vargas et al., 2017). Los extractos de cálices de *H. sabdariffa* podrían ser una forma de controlar a las bacterias resistentes a los antibióticos.

Se ha reportado que los extractos de cálices deshidratados de *H. sabdariffa* contienen diversos constituyentes químicos como ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido hibiscus, ácido oxálico, ácido tartárico) además, fitoesteroles, polifenoles, antocianinas entre otros (Mahadevan et al., 2009). Se ha sugerido que algunos compuestos como las antocianinas, los polifenoles o el ácido protocatéuico son responsables de la actividad antimicrobiana de *H. sabdariffa* (Liu et al., 2005; Yin y Chao, 2008; Chao y Yin, 2009). Sin embargo, ningún estudio ha demostrado completamente el efecto antimicrobiano de los compuestos químicos específicos en *H. sabdariffa* o ha informado el aislamiento de componentes antimicrobianos específicos de sus cálices, los cuales son usados en muchas regiones del mundo en bebidas frías y calientes. Es posible que en los cálices de *H. sabdariffa* haya otros compuestos distintos a los sugeridos y que sean los principales responsables de la actividad antimicrobiana.

El ácido hidroxícítrico, ácido hibiscus y sus derivados son los principales ácidos orgánicos en los extractos de hojas y cálices de *H. sabdariffa* (Beltrán-Debon et al., 2010).

Se ha demostrado que el ácido hibiscus tiene un efecto inhibitorio sobre la α -amilasa pancreática y la α -glucosidasa intestinal, lo que resulta en una reducción del metabolismo de los carbohidratos y los niveles de insulina en la sangre (Hansawasdi et al., 2001). Además, se demostró que el ácido hibiscus tiene un efecto vasodilatador en la aorta de la rata (Zheoat et al., 2019).

El ácido hibiscus no está disponible comercialmente; sin embargo, el ácido garcínico (obtenido de *Garcinia cambogia*) que es su diastereómero, está disponible comercialmente.

Por otro lado, no existe información sobre la forma en que actúan los compuestos antimicrobianos de *H. sabdariffa* sobre la célula bacteriana es por ello que el objetivo del presente estudio es elucidar la estructura química de algunos de los compuestos con actividad antimicrobiana que se encuentran en los cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y determinar su efecto *in vitro* e *in vivo* sobre célula bacteriana.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs)

Las bacterias patógenas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Djeussi et al., 2013). Las enfermedades se han agudizado en las últimas décadas por factores como el incremento poblacional, el urbanismo, la pobreza, el incremento en el comercio internacional de alimentos, además de la aparición de patógenos resistentes a antibióticos (Pérez et al., 2004).

En los países en vía de desarrollo las ETAs constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes con repercusiones que inciden en el ámbito económico, político y social y se reconoce cada vez más la importancia de sus repercusiones sobre la salud de la población, ya sea por la frecuencia con la que ocurren como por el impacto que pueden causar, afectando a una persona o a grupos de ellas y variando desde una indisposición hasta la muerte. Algunas enfermedades transmitidas por alimentos, si bien son conocidas, se consideran emergentes porque están ocurriendo con mayor frecuencia y han ocasionado brotes epidemiológicos en varios países poniendo en evidencia la fragilidad de los programas de prevención y control de las ETAs (Kumate e Isibasi, 1986; FAO y OMS, 2005; OPS y OMS, 2005). Es de destacar que las alergias por hipersensibilidad individual a ciertos alimentos no se consideran ETAs (OPS, 2001; FAO y OMS, 2005; OPS y OMS, 2005).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los siete principales patógenos bacterianos que pueden encontrarse en los alimentos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* O157:H7, *Shigella*., *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni*. (OMS, 2005).

Además de las enfermedades causadas por infección directa, algunas enfermedades transmitidas por los alimentos son ocasionadas por la presencia de toxinas producidas por microorganismos en los alimentos. Por ejemplo, *S. aureus* puede desarrollarse en algunos alimentos y producir una toxina que ocasiona vómitos intensos. El botulismo ocurre cuando la bacteria *Clostridium botulinum* prospera en los alimentos y produce una toxina paralizante poderosa. Estas toxinas pueden causar enfermedades aun cuando los microorganismos que las produjeron hayan desaparecido (FDA, 2001; MINSA, 2005). Las ETAs son el resultado de la falta de higiene en los alimentos. Esta falta se traduce en un alto número de brotes principalmente de origen microbiano. En los Estados Unidos de América (EUA), el estimado general anual de la carga total de enfermedades causada por alimentos contaminados

consumidos es de 47.8 millones de enfermedades, 127,839 hospitalizaciones y 3,037 muertes (CDC, 2011), mientras que en México el número de casos asciende a 200 millones por año (Fernández-Escartín, 2008).

2.2 Bacterias patógenas

2.2.1 *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria no esporulada, anaerobia facultativa, es normal habitante del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente y aves. Y en general, no es patógena. Debido a que normalmente está presente en un nivel muy alto en el intestino grueso, durante mucho tiempo se ha utilizado como un organismo índice para la posible contaminación fecal y la presencia de patógenos entéricos en alimentos y agua (Adams y Moss, 2005; Bibek, 2005).

E. coli es un mesófilo típico que crece de 7-10 °C hasta 50 °C con un óptimo de 37 °C, aunque se ha reportado de que algunas cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) que crecen a temperaturas tan bajas como 4 °C. No muestra resistencia notable al calor, con un valor D_{60} en 0.1 min, y puede sobrevivir el almacenamiento refrigerado o congelado durante largos períodos. Tiene un pH óptimo casi neutro para el crecimiento, pero el crecimiento es posible a pH 4.4. El mínimo de actividad de agua (A_w) para el crecimiento es 0.95 (Adams y Moss, 2008).

En general *E. coli* no es considerada como especie patógena, sin embargo, existen dentro de las especies algunas cepas patógenas. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Prescott et al., 2002; Rodríguez, 2002). A continuación, se detallan los 4 grupos patógenos empleados en la presente investigación.

2.2.1.1 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

ETEC se parece mucho a *V. cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy

poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se ven afectados. Forman enterotóxicas termolábiles y/o termoestables que producen una diarrea secretora similar a la producida por *V. cholerae*. La adherencia de las células bacterianas al epitelio intestinal es un requisito para la producción de toxinas (Fengs et al., 1998). Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (por sus siglas en inglés, Colonization Factor Antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotóxicas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) (Rodríguez-Ángeles, 2002).

2.2.1.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Las cepas EHEC producen una verotoxina, enterotoxina similar a la producida por *S. dysenteriae*, la toxina Shiga. La verotoxina producida por *E. coli* O157:H7 causa diarrea hemorrágica y fallo renal (Madigan et al., 2004). *E. coli* O157:H7 identificado en 1982 como causa de enfermedad en humanos después que un grupo de personas en Michigan y Oregón, enfermaron tras haber comido hamburguesas contaminadas con el microorganismo (Besser et al., 1993), se clasificó como *E. coli* enterohemorrágica, porque causa diarrea sanguinolenta, produce potentes toxinas y genera lesiones típicas de adhesión y daño tisular a nivel de las microvellosidades (Isaacson et al., 1993; Fey, 2000). En los últimos 20 años, *E. coli* O157:H7 (Enterohemorrágica, EHEC) ha sido considerado como un patógeno emergente de gran impacto en la salud pública. Esta bacteria ha sido identificada como una cepa causante de ETAs a nivel mundial, principalmente por alimentos de origen bovino. EHEC ha sido encontrado en la flora fecal de una amplia variedad de animales incluyendo vacas, cerdos, perros, pollos, etc. Sin embargo, el animal más importante en términos de infección al humano es el ganado vacuno. La transmisión de EHEC es por aguas y alimentos contaminados y el contacto persona a persona; la mayoría de los brotes son causados por alimentos de origen bovino especialmente hamburguesas y leches (Matlar et al., 2001).

El serotipo de *E. coli* O157:H7 se considera el prototipo del grupo y es el más estudiado, aunque existen otros con el mismo potencial patógeno. Es similar a *E. coli* típica, fermenta la lactosa, pero no el sorbitol dentro de 48 h, mientras el 93 % de las cepas de *E. coli* ordinarias lo hacen. Tampoco produce glucoronidasa (Thompson et al., 1990), base para la reacción de 4-metil-umbeliferil /J-D-glucurónico (MUG) ampliamente utilizada para identificar *E. coli*. La tercera cualidad muy distintiva

de este patógeno es su incapacidad para desarrollar a temperatura superior a 42 °C (Doyle y Schoeni, 1984). Estas tres características encuentran aplicación en la mayoría de las técnicas recomendadas para su identificación. Las cepas del serovar O157:H7 son muy homogéneas, como corresponde a un patógeno del que hay evidencias que surgió de una clonación. Debe destacarse que algunas cepas de *E. coli* con fenotipo y antígenos distintos al O157:H7 (sorbitol y b-glucoronidasa positivas y sin antígeno H) también pueden ser causa de síndrome urémico hemolítico (Gunzer et al., 1992).

2.2.1.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

El grupo EIEC y *Shigella*, están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosas negativas. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Rodríguez-Ángeles, 2002; Fernández-Escartín, 2008).

Estas cepas normalmente no producen enterotóxicas como las ETEC, pero pueden penetrar y multiplicarse en las células epiteliales del colon y después dispersarse a células adyacentes de forma similar a *Shigella*. Las cepas de EIEC poseen plásmidos invasivos de 140 MDa (pINV) y son esenciales para su capacidad invasora (Molina et al., 2010).

El mecanismo de patogenicidad de EIEC al igual que el de *Shigella* consiste en la invasión del epitelio del colon, por medio de la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes, hasta la muerte de la célula huésped. Las cepas de EIEC se han aislado de personas con diarrea del viajero, y en comúnmente en deposiciones diarreicas de niños (Rodríguez-Ángeles 2002; Jay et al., 2009).

2.2.1.4 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Este grupo patógeno fue el primer identificado en 1940. Una de las fuentes principales de este grupo patógeno es el humano. Este grupo afecta principalmente a niños recién nacidos (Fernández - Escartín, 2008).

El sello distintivo a las infecciones producidas por EPEC es la adherencia a la mucosa intestinal y el enfacelamineto de la microvellosidad epitelial, fenómeno conocido como Attaching and Effacing Lesion (A/E), con traducción al español como lesión unión-necrosamiento (Nataro y Kaper., 1998).

EPEC causan síndromes diarreicos sobre todo en niños. La patogenia no está clara; sin embargo, las reacciones inflamatorias y los cambios degenerativos epiteliales que se observan en cortes de tejidos pueden ser secundarios a propiedades adherentes de la bacteria. Más habitualmente están involucrados los serogrupos 06, 08, 025, 0111, 0119 y 0142 (Fengs et al., 1998). Los alimentos de todo tipo pueden contaminarse con cepas de *E. coli* enteropatógena a partir de manipuladores, excretas humanas, entre otras. En la transmisión de la enteritis en adultos parecen desempeñar un papel importante los alimentos y el agua, mientras que en la enteritis infantil el contagio más frecuente sería por contacto directo (Mossel y Moreno, 2003).

2.2.2. *Salmonella*

Salmonella es el agente causante de salmonelosis. Son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Son Gram negativas, bacilos no formadores de esporas (típicamente de 0.5 por 1-3 μm), anaerobios facultativos, catalasa positiva, oxidasa negativa, y en general son inmóviles y con flagelos peritricos (McClelland et al., 2001; Adams y Moss, 2008). Entre los más de 2.300 serotipos de *Salmonella* reconocidos estrechamente relacionadas, *S. Typhi* y *S. Paratyphi* son patógenos exclusivamente de los seres humanos, y causan infecciones sistémicas y la fiebre tifoidea, mientras que otros, tales como *S. Typhimurium* causan gastroenteritis (McClelland et al., 2001).

La salmonelosis se desarrolla más frecuentemente en algunas regiones del mundo como África, Asia y América del Sur. En los seres humanos, la salmonelosis se manifiesta en dos formas: fiebre entérica que puede ser la fiebre tifoidea o paratifoidea y gastroenteritis que es no tifoidea. La fiebre tifoidea es una enfermedad aguda, potencialmente mortal causada por la bacteria *S. Typhi* y *Paratyphi*, y se estima 20 millones de casos y 200.000 muertes en el mundo cada año (Crump et al., 2004). Estas bacterias son mesófilas, con temperatura de crecimiento óptima entre 35-37 °C, aunque generalmente tienen un rango de crecimiento de 5-46 °C. *Salmonella* es sensible al calor y es fácilmente destruida por las temperaturas de pasteurización (Bibek, 2005; Adams y Moss, 2008). Es capaces de crecer a pH bajo y generalmente es sensible a concentraciones elevadas de sal. *Salmonella* forma cadenas

filamentosas cuando crece a las temperaturas extremas de 4-8 °C o 44 °C y también cuando crece a pH de 4.4-9.4 (Bhunja, 2008).

El mínimo de A_w para el crecimiento es de alrededor de 0.93 pero las células sobreviven bien en alimentos secos, la tasa de supervivencia aumenta a medida que la A_w se reduce (Adams y Moss, 2008).

Las salmonelas son habitantes naturales del tracto gastrointestinal del hombre, así como de animales domésticos y silvestres. Esta bacteria es liberada al medio ambiente cuando se expulsa por las heces fecales por lo que también han sido aislados de suelo, agua y de aguas residuales contaminadas con materia fecal (Bibek, 2005; Fernández- Escartín, 2008).

2.3 Antibióticos

Se denomina antibiótico (del griego, anti, “contra”; bios, “vida”), a cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos tanto en seres humanos como en animales. Los antibióticos son elaborados, en su metabolismo propio, por seres vivos: plantas, animales, bacterias y hongos. Por lo que se puede decir que un antibiótico puede definirse como una sustancia derivada de un organismo vivo, generalmente un microorganismo o una modificación química de la misma, que inhibe la reproducción, el crecimiento o incluso destruye otros microorganismos y células anormales. Una propiedad común a todos los antibióticos es el tipo de toxicidad selectiva, es decir que la toxicidad hacia los organismos invasores es superior a la toxicidad frente a los animales o seres humanos (Cruz, 2001).

2.3.1 Resistencia bacteriana a los antibióticos

De acuerdo con la OMS (2015) la aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural en microorganismos que se reproducen de forma errónea o se intercambian características de resistencia, sin embargo, su aparición se acelera también con el uso indebido de antimicrobianos. Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, las malas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de alimentos propician de igual forma la propagación de las resistencias.

Desde su descubrimiento hace más de 80 años, los antibióticos y compuestos relacionados han permitido mantener la tasa de letalidad por enfermedades infecciosas en niveles bajos, a la vez que

han contribuido sustancialmente al incremento de la esperanza de vida. Sin embargo, en las últimas décadas, estos logros se están viendo amenazados por la emergencia y diseminación de microorganismos resistentes a los antibióticos. Así, la resistencia a los antibióticos, que involucra a los principales agentes patógenos y compuestos antimicrobianos, es percibida como un peligro para la salud pública mundial, que afectará especialmente a las futuras generaciones (Capita y Calleja, 2013). La resistencia a antibióticos ha sido definida como una pandemia global (EASAC, 2007), una de las mayores amenazas para la salud pública y uno de los principales desafíos sanitarios del siglo XXI (WHO, 2009).

2.3.2 Multirresistencia a los antibióticos

Para fines epidemiológicos, los microorganismos multirresistentes se definen como microorganismos, predominantemente bacterias, que son resistentes a 1 o más clases de agentes antimicrobianos. Estos patógenos son con frecuencia resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos disponibles. Estos organismos altamente resistentes merecen especial atención en el cuidado de la salud al igual que otros que son resistentes a múltiples clases de agentes antimicrobianos (Jane et al., 2007).

2.3.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Las bacterias tienen una notable plasticidad genética que les permite responder a una amplia gama de amenazas ambientales, incluida la presencia de moléculas de antibióticos que pueden poner en peligro su existencia. Las bacterias que comparten el mismo nicho ecológico con los organismos productores de antimicrobianos han desarrollado mecanismos para resistir el efecto de la molécula antibiótica dañina y, en consecuencia, su resistencia intrínseca les permite prosperar en su presencia. Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias usan dos estrategias genéticas principales para adaptarse al "ataque" antibiótico, i) mutación genética, a menudo asociadas con el mecanismo de acción del compuesto, y ii) la adquisición de ADN extraño que codifica los determinantes de la resistencia a través de la transferencia horizontal de genes (HGT) (Munita y Arias, 2016).

2.3.3.1 Resistencia mutacional

En este escenario, un subconjunto de células bacterianas derivadas de una población susceptible, desarrolla mutaciones en genes que afectan la actividad del fármaco, lo que resulta en la supervivencia celular preservada en presencia de la molécula antimicrobiana. Una vez que emerge un mutante resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y predominan las bacterias resistentes. En muchos casos, los cambios mutacionales que conducen a la resistencia son costosos para la homeostasis celular (es decir, disminución del estado físico) y solo se mantienen si es necesario en presencia del antibiótico. En general, las mutaciones que producen resistencia a los antimicrobianos alteran la acción del antibiótico a través de uno de los siguientes mecanismos, a) modificaciones del sitio de acción que ataca el antimicrobiano (disminución de la afinidad por el fármaco) b) disminución de la absorción del fármaco, c) activación de los mecanismos de eflujo para eliminar a la molécula dañina, o d) cambios globales en vías metabólicas importantes a través de la modulación de las redes reguladoras. Por lo tanto, la resistencia que surge debido a los cambios mutacionales adquiridos es diversa y varía en complejidad (Munita y Arias, 2016).

2.3.3.2 Transferencia horizontal de genes

La adquisición de material de ADN extraño a través de HGT es uno de los impulsores más importantes de la evolución bacteriana y frecuentemente es responsable del desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos. La mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados en la práctica clínica son (o se derivan) de productos que se encuentran de forma natural en el medio ambiente (principalmente suelo). Como se mencionó anteriormente, las bacterias que comparten el medio ambiente con estas moléculas albergan determinantes genéticos intrínsecos de la resistencia y hay pruebas sólidas que sugieren que dicha "resistencia ambiental" es una fuente prolífica para la adquisición de genes de resistencia a antibióticos en bacterias clínicamente relevantes. Además, este intercambio genético se ha implicado en la diseminación de la resistencia a muchos antibióticos de uso frecuente. Clásicamente, las bacterias adquieren material genético externo a través de tres estrategias principales: i) transformación (incorporación de ADN desnudo), ii) transducción (mediada por fagos) y, iii) conjugación ("sexo" bacteriano) mediada por pilis (Munita y Arias, 2016).

2.4 Antimicrobianos naturales de origen vegetal

Los agentes antimicrobianos pueden ser bien compuestos sintéticos que se adicionan intencionalmente a los alimentos o compuestos naturales que son sustancias de origen biológico (también denominadas antimicrobianos naturales), que pueden usarse comercialmente como aditivos para conservar alimentos, además de mostrar propiedades antimicrobianas en los sistemas biológicos donde se encontraban originalmente (López, 2000).

Los antimicrobianos de origen vegetal se pueden encontrar en muchas plantas e incluyen compuestos fenólicos provenientes de semillas, raíces, cortezas, tallos, hojas, flores; ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas (Beuchat, 2001).

Más de 1.300 especies de plantas se han reportado para producir compuestos químicos con actividad antimicrobiana, muchos de los cuales han sido aislados y se utilizan en muchos campos, incluyendo la industria de alimentos (Burt, 2004; Tajkarimi et al., 2010).

Las plantas, las hierbas y las especias, así como sus aceites esenciales, poseen un gran número de sustancias que se sabe inhiben varias actividades metabólicas de bacterias, levaduras y mohos, aunque algunas de estas permanecen explotadas tan solo parcialmente. Los compuestos antimicrobianos en las plantas están comúnmente contenidos en la fracción del aceite esencial de las hojas (romero, salvia), flores y brotes de flores (clavo), bulbos (cebolla, ajo), rizomas (asafétida), frutas (pimiento, cardamomo) u otras partes de la planta (López, 2000).

2.5 Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

Hibiscus sabdariffa (familia malvácea) es una planta anual, tropical o subtropical que es originaria de una zona desde Malasia hasta India. Esta planta se cultiva en muchos países entre ellos Sudán, México, India y Tailandia. Mientras que muchas especies de *Hibiscus* se utilizan como plantas ornamentales, los cálices rojos de *H. sabdariffa* se utilizan en la preparación de saborizante, bebida fría o caliente, ha sido utilizada en la medicina como diurético, laxante, y en el tratamiento de enfermedades cardiacas, nerviosas y cáncer (Chewonarin et al., 1999). Los cálices de *H. sabdariffa* han demostrado contener numerosos compuestos bioactivos. La mayoría de estos compuestos que se encuentran dentro de los cálices que exhiben actividad antimicrobiana son compuestos polifenólicos, algunos de los cuales también han demostrado tener actividad antioxidante (Haslam, 1998; Tsai et al., 2002).

Un grupo de compuestos polifenólicos presente en el extracto de cálices de *Hibiscus* son los flavonoides, que incluye los pigmentos vegetales llamados antocianinas. Las antocianinas presentes en mayor cantidad que se han identificado en *Hibiscus* son la delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido, estas dos son responsables del pigmento de color rojo oscuro de los cálices y también se encontró que eran los principales contribuyentes a la actividad antioxidante (Tsai et al., 2002). Otros compuestos que se encuentran en los cálices incluyen ácidos fenólicos como gálico y ácido protocatéuico (Ramírez et al., 2011).

Muchos estudios se han llevado a cabo en diferentes partes del mundo para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos de diversas partes de *H. sabdariffa*, como los cálices, y la mayoría de estos estudios revelaron que la planta tiene propiedades antimicrobianas (El-Kamali y Mohammed, 2006; El Manama et al., 2011).

2.5.1 Producción de jamaica

La flor de jamaica en México se agrupa en el sector de especias y plantas medicinales, siendo un cultivo no tradicional que se desarrolla en regiones donde predomina un clima cálido-seco. La producción a nivel mundial de este cultivo la encabeza China con 27.76 % de la producción, seguido por la India con 17.91 %, Sudan con 9.1 %, Uganda con 8.40 %, Indonesia con el 6.23 %, Malasia con el 5.53 % y en séptimo lugar se encuentra México con el 5.14 % (SAGARPA-CONACyT, 2010).

México cuenta con una producción de casi 7 mil toneladas de jamaica y es el estado de Guerrero el principal productor. Su cultivo se realiza en la época primavera-verano, al iniciar la temporada de lluvias; mientras que su cosecha en los meses de octubre y noviembre. Asimismo, su comercialización, en granel (sin empacar) y el resto en extractos y mermeladas.

La principal producción de jamaica se concentra en los estados de Guerrero con 77.52 %, Oaxaca con el 12.61 %, Michoacán con el 3.60 %, Nayarit con 2.68 %, Puebla con 1.89 % y el 1.7 % restante se produce en los estados de Campeche, Colima, Jalisco y Veracruz.

En Guerrero, entidad en la que más se produce, se cultiva a manera de tradición y cultural; principalmente en los municipios de Tecoaapa, Ayutla, Juan R. Escudero y San Marcos. Es igualmente un producto de gran demanda comercial en el mercado nacional e internacional, gracias a sus diversas utilidades culinarias (SAGARPA, 2016).

2.5.2 Reportes de efecto antimicrobiano *in vitro* de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

Se ha demostrado que extractos de *H. sabdariffa* tienen un amplio rango de actividad antimicrobiana contra bacterias. Extractos metanólico de cálices de *H. sabdariffa* han presentado actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium sporogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, y *Pseudomonas sp.* a concentraciones de 0.30 ± 0.2 a 1.30 ± 0.2 mg/mL (Olaleye, 2007).

Navarro-García et al. (2006) encontraron que las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de extracto acuoso de cáliz de *H. sabdariffa* fueron de 0,5 y 1,0 mg / mL para *S. aureus* ATCC 6358 y *E. coli* ATCC 8937, respectivamente.

El-Kamali y Mohammed (2006) demostraron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos, etanólico, acuoso y de acetato de etilo de *H. sabdariffa* en medios de cultivo, utilizando 5 antibióticos como estándares (gentamicina, tetraciclina, ampicilina, penicilina y cefalosporina). Se observó que el extracto más efectivo fue el acuoso mostrando un halo e inhibición de 30 mm para *E. coli* (ATCC 25922), incluso claramente mayor a los mostrados por los antibióticos estándar.

Otro estudio realizado por Abd et al. (2015) mostraron el efecto antimicrobiano de extracto metanólico de hojas de la planta de jamaica (*H. sabdariffa*). En este artículo se obtuvo como resultados una alta actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (26 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (22 mm), *Klebsiella pneumoniae* (22 mm), *Bacillus subtilis* (21 mm), *Escherichia coli* (20 mm), *Proteus vulgaris* (19 mm), *Candida albicans* (24 mm) y *Aspergillus niger* (17 mm). Según los autores, a actividad antimicrobiana del extracto metanólico de hojas de *H. sabdariffa* podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides. En ese estudio, *S. aureus* fue el microorganismo más sensible al extracto metanólico de *H. sabdariffa*. Por lo tanto, las bacterias Gram positivas fueron más sensibles que las Gram negativas. Se sabe que el patrón de inhibición varía de acuerdo con la parte de la planta, el disolvente utilizado y el microorganismo de prueba (Morales-Cabrera et al., 2013).

Lessoy et al. (2012), reportaron en su estudio una alta actividad antimicrobiana de aceite de semillas de *H. sabdariffa* contra *S. aureus*, *Aspergillus fumigatus* y *Trychophyton mentagrophytes*.

En otro estudio se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de extracto etanólico de cálices de *H. sabdariffa* (250 mg / mL) contra cuatro cepas bacterianas. Los resultados se compararon con cefuroxima en una concentración de 100 mg / mL, la cual es un antibiótico de un amplio espectro. Este extracto mostró halos de inhibición de 22 y 23 mm para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente

(Nizar et al., 2013). Estos autores mencionan que la actividad antibacteriana del extracto puede ser atribuido a los compuestos fitoquímicos que contiene especialmente los de naturaleza fenólicos tales como ácido gálico, quercetina, rutina y luteolina y análogos, los cuales han sido previamente reportados en literatura (El-Kamali y Mohammed, 2006; Olaleye, 2007; Alaa, 2012).

Alaa (2012) reportó la actividad antibacteriana de extracto acuoso y etanólico de *H. sabdariffa* L., los cuales presentaron efecto inhibidor del crecimiento de varios microorganismos. La zona de inhibición fue amplia frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans* y *P. aeruginosa* para ambos extractos. El extracto acuoso de *H. sabdariffa* mostró capacidad de inhibición igual contra *E. coli* y *S. aureus* (40 mm), el extracto etanólico exhibió mayor capacidad de inhibición contra a *E. coli* (47 mm) que contra *S. aureus* (20 mm).

Fullerton et al. (2011) demostraron la actividad antimicrobiana de extractos de *H. sabdariffa*, contra diferentes cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de 3 fuentes: clínica, alimenticia y veterinaria. El halo de inhibición más bajo que se presentó fue de 7.00 mm contra *E. coli* O157:H7 aislada de fuente clínica, mientras que el halo de inhibición más alto fue de 15,37 mm contra el microorganismo aislado a partir de una fuente de alimento.

Djeussi et al. (2013) encontraron que los extractos metanólicos de *H. sabdariffa* inhiben cepas multirresistentes a antibióticos de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Providencia stuartii*. Dicha actividad se atribuye a la variedad de compuestos encontrados en el extracto tales como alcaloides, flavonoides, fenoles, polifenoles, saponinas, esteroides y triterpenos, atribuyendo la actividad antimicrobiana a los alcaloides principalmente por su capacidad de interferir con la división celular.

En la mayoría de los artículos en los que se reporta el efecto antimicrobiano *in vitro* de *H. sabdariffa* no se reporta cuales son exactamente los compuestos responsables del efecto antimicrobiano observado, sólo se supone o se plantean hipótesis de los posibles compuestos con actividad antimicrobiana.

2.5.3 Reportes de efecto antimicrobiano de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en alimentos.

Los cálices de *H. sabdariffa* contienen compuestos que exhiben actividad antimicrobiana, sin embargo, se ha realizado poca investigación sobre su posible uso como antimicrobiano en sistemas alimentarios o bebidas.

Extractos acuosos y etanólicos de *H. sabdariffa* mostraron efecto inhibitorio contra *E. coli* O157: H7, *Salmonella* entérica serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* y *S. aureus* en carne picada y en jugo de manzana, después de 3 días de almacenamiento, demostrando mayor actividad antimicrobiana los extractos etanólicos (Chao y Yin, 2009).

Jaroni y Ravishankar (2012) realizaron un estudio empleando extracto acuoso de *H. sabdariffa* en lechuga contra *E. coli* O157: H7 y en germinado de alfalfa contra *S. entérica*. Se redujeron aproximadamente 4 log UFC/g de *E. coli* O157: H7 y *S. entérica* después de 24 h en ambos productos. Higginbotham et al. (2014a) hicieron una investigación del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de *H. sabdariffa*, se determinó el efecto antimicrobiano contra *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* en leche ultrapasteurizada con diferentes concentraciones de grasa. Se logró la inactivación de *S. aureus* en leche descremada y leche entera, esto se observó después de 168 h empleando una concentración del extracto de 40 mg / mL; con respecto a *E. coli*, ésta se inactivó después de 96 h utilizando 60 mg / mL de extracto en todos los tipos de leche.

De igual forma Higginbotham et al. (2014b) evaluaron el efecto antimicrobiano de extractos de *H. sabdariffa* liofilizado, el cual fue empleado como enjuague en salchichas para hot dogs, esto contra *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Las salchichas fueron inoculadas por inmersión. Las salchichas inoculadas se enjuagaron con extractos (120, 240 mg /mL) o agua (control) durante 5, 15, 30, o 60 min y después se sembraron inmediatamente (0 h; sin almacenamiento) o almacenada a 4 ° C durante la noche y se sembraron a las 24 h.

Los extractos fueron más efectivos que el control (agua) para reducir el crecimiento bacteriano, los extractos de 240 mg/mL fue más efectivo que 120 mg/mL contra ambas bacterias.

Gutiérrez-Alcántara et al. (2016) reportan la actividad antimicrobiana de extractos de *H. sabdariffa* en zanahorias contra cepas de *Salmonella* multirresistente a antibióticos, en este estudio los extractos de jamaica causaron una mayor reducción de la concentración de *Salmonella* que el hipoclorito de sodio, ácido acético y plata coloidal en zanahorias contaminadas.

Otro estudio realizado en carne molida almacenada a 15 °C durante 6 días, demostró que el extracto de cálices de jamaica y el ácido protocatéuico inhibieron la sobrevivencia y crecimiento de microorganismos aerobios, y especies de *Campylobacter* susceptibles y resistentes a los antibióticos (Yin y Chao, 2008).

Portillo-Torres et al. (2015) realizaron un estudio en el que se evaluó el efecto antimicrobiano de 3 extractos (metanólico, acetónico y de acetato de etilo) de *H. sabdariffa* sobre fresa, dando como

resultado los siguientes datos: el tratamiento que presentó mayor efecto para *E. coli* O157:H7 fue el extracto de metanol, ya que logró reducir 1.3 Log₁₀ UFC/cm² comparado con el control (agua), en cuanto a *L. monocytogenes*, el extracto de metanol y de acetato de etilo fueron los tratamientos más efectivos, reduciendo 1.2 y 1.1 Log₁₀ UFC/cm², respectivamente. Cabe mencionar que Los 3 extractos de la planta de estudio exhibieron mayor reducción en la concentración de los patógenos que el hipoclorito de sodio y el ácido acético. De igual forma en este mismo estudio se elaboraron soluciones, mezclando fracciones cromatográficas del extracto de *H. sabdariffa* con otras sustancias, siendo la solución 1 elaborada con mezcla de fracciones (XV, XVI, XVII), hipoclorito de sodio 200 ppm, ácido acético al 5 % y Tween 80, la que logró reducir 3.3, 4.8, 4.4 y 4.4 Log₁₀ UFC/cm² comparada con el control en *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. flexneri*, respectivamente.

También se ha reportado que soluciones elaboradas con extractos y/o fracciones cromatográficas obtenidas a partir de cálices de Jamaica combinadas con ácidos orgánicos, hipoclorito de sodio y tensoactivos, reducen al menos 4 log de la concentración de *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 presentes en chile jalapeño y serrano (Castro-Rosas et al., 2013), lechuga (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2013a), manzana (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2013b), jitomate (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2013c), y cilantro (Castro-Rosas y Gómez-Aldapa, 2013d).

2.5.4 Compuestos presentes en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

Los principales constituyentes de *H. sabdariffa* relevantes son ácidos orgánicos, antocianinas, polisacáridos y los flavonoides (Müller y Franz, 1990; Eggenesperger y Wilker, 1996).

2.5.4.1 Ácidos orgánicos

Extractos de *H. sabdariffa* contienen un alto porcentaje de ácidos orgánicos, incluyendo ácido cítrico, ácido hidroxícítrico, ácido hibiscus, málico y tartárico como compuestos principales, y ácido oxálico y ascórbico como compuestos menores. El porcentaje de ácido hibiscus representa del 13-24 % del total de ácidos orgánicos, el ácido cítrico del 12 a 20 %, ácido málico 2-9 %, ácido tartárico 8 % y 0.02- 0,05 % de ácido ascórbico (Schilcher, 1976; Eggenesperger y Wilker, 1996).

A finales de 1930, la presencia de los ácidos cítrico y málico se reportaron por primera vez en extractos acuosos de cálices de *H. sabdariffa* (Buogo y Picchinenna, 1937; Indovina y Capotummino, 1938; Rea Bourg y Monceaux, 1940) y también en cinco variedades diferentes (desde Egipto, Senegal,

India, Tailandia y América Central) de *H. sabdariffa* var. *sabdariffa* (Khafaga et al., 1980). El ácido ascórbico también está presente en los cálices de *H. sabdariffa*, pero su contenido varía entre el estado de los cálices: frescos (6,7 a 14 mg / 100 g) (Morton, 1987; Ismail et al., 2008) y secos (260 a 280 mg/100 g) (Ismail et al., 2008).

2.5.4.1.1 Ácido hidroxícítrico

Este ácido tiene un grupo hidroxilo adicional en el segundo carbono de ácido cítrico. Tiene cuatro estereoisómeros, (2S, 3S), (2R, 3R), (2S, 3R) y (2R, 3S), y sus formas de lactona (Figura 1). El principal ácido orgánico encontrado en cálices de *H. sabdariffa* es (2S, 3R) ácido hidroxícítrico (Hida et al., 2007).

2.5.4.1.2 Ácido hibiscus

Este ácido es la forma de lactona de (+) – allo- ácido –hidroxícítrico (Figura 1). Une un resto de ácido cítrico con un grupo hidroxilo adicional en la segunda molécula de carbono y tiene dos diastereómeros debido a la existencia de dos centros quirales en la molécula (Griebel y Lebensm de 1939, 1942; Boll et al., 1969; Eggenesperger y Wilker, 1996). Ácido hidroxícítrico, ácido hibiscus y sus derivados son los principales ácidos orgánicos presentes en extractos de hojas y cálices de *H. sabdariffa* (Rodríguez-Medina et al., 2009; Beltran-Debon et al., 2010; Peng et al., 2011; Ramírez - Rodríguez et al., 2011; Herranz-López et al., 2012).

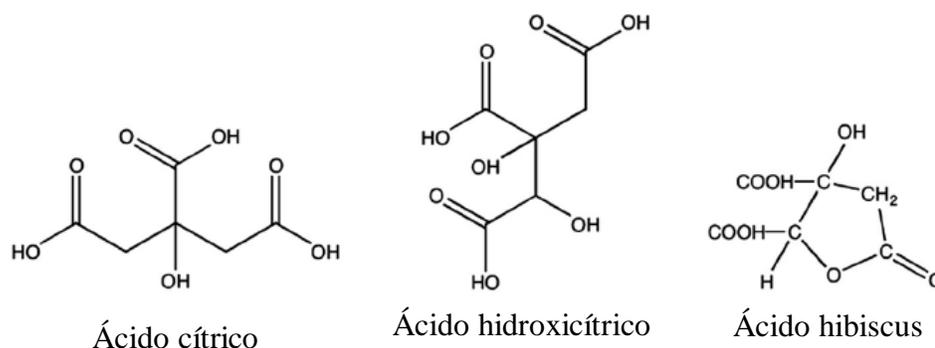


Figura 1. Ácido cítrico y sus derivados.

Fuente: Da-Costa-Rocha et al., 2014.

2.5.4.2 Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de derivados de flavonoides y pigmentos naturales presentes en las flores secas de *H. sabdariffa* y su color varía con el pH.

Antocianinas basadas en delfinidina y cianidina, incluyen delfinidina-3- sambubiosido (hibiscina) y cianidina-3-sambubiosido (gossipicianina), cianidina-3,5-diglucósido, delfinidina (antocianidina) y otros (Williamson et al., 2009).

2.5.4.3 Flavonoides

H. sabdariffa contienen polifenoles del tipo de flavonoles y flavanoles en forma simple polimerizado. Los siguientes flavonoides han sido descritos en extractos de *H. sabdariffa*: hibiscitrina (hibiscetina-3-glucósido), sabdaritrina, gossipitrina, gossitrina y otros glucósidos de gosipetina, quercetina y luteolina, así como ácido clorogénico, ácido protocatéuico, ácido pelargonidíco, eugenol y los esteroides b-sitosterol y ergosterol (McKay, 2009; Williamson et al., 2009).

2.5.5 Estudios de compuestos identificados con actividad antimicrobiana de *Hibiscus sabdariffa*

En la actualidad se han identificado algunos compuestos que están presentes en los extractos de *H. sabdariffa*, sin embargo, no se han evaluado el efecto de todos los compuestos identificados sobre distintas bacterias patógenas para determinar que compuestos son los responsables de la actividad antimicrobiana de esta planta.

Existen algunos artículos sobre la actividad antimicrobiana de algunos compuestos de *H. sabdariffa* como los siguientes:

Fernández et al. (1996) y Aziz et al. (1998) mencionan que el ácido protocatéuico, un polifenol que contiene una subestructura 3,4-dihidroxi, es un compuesto que se produce naturalmente en el cáliz de jamaica. Varios estudios *in vitro* han indicado que este compuesto puede inhibir el crecimiento de *E. coli* y hongos.

En estudios realizados por Chao y Yin (2009) se menciona la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso y etanólico, además del ácido protocatéuico (compuesto identificado para ambos extractos) frente a *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *B. cereus*. Los

extractos acuosos, etanólicos, así como el ácido protocatéuico presentaron rangos de CMI de 112–144, 72–96 y 24–44 µg/ml, respectivamente. Después de tratamiento térmico (75 y 100 °C) el extracto acuoso mostró un decremento en la actividad antimicrobiana. Para el extracto etanólico no hubo cambios en la actividad antimicrobiana cuando fueron sometidos a 50 y 75 °C, sin embargo, se presentó una reducción de la actividad a 100 °C, mientras que el ácido protocatéuico no fue afectado por la temperatura. Cabe mencionar que el ácido protocatéuico utilizado en este estudio no fue aislado directamente de *H. sabdariffa* si no fue adquirido comercialmente.

El extracto acuoso de cálices de *H. sabdariffa* y ácido protocatéuico (5 mg/mL) inhibieron el crecimiento de *S. aureus* resistente a metilicina, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Liu et al., 2005).

Además, el ácido protocatéuico (en una dosis de manera dependiente) mostró mayor actividad antimicrobiana contra estos patógenos en caldo que en el plasma humano. El estudio también reveló que el efecto antibacteriano era independiente de la temperatura, como se muestra por un tratamiento térmico. Extracto de *H. sabdariffa* y el ácido protocatéuico han demostrado efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*, bacteria cariogénicas de la cavidad oral, con una Concentración Mínima Inhibitoria de 2,5 mg / mL (Afolabi et al., 2008), y especies de *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter fetus*) que contamina la carne de pollo, carne de res y cerdo (Yin y Chao, 2008). Cabe mencionar que el ácido protocatéuico empleado en este estudio fue también adquirido comercialmente.

Mounnissamy et al. (2002) reportan actividad antimicrobiana del flavonoide gopipetina, el cual se encuentra en la jamaica, presentando inhibición de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* y *Pseudomona aeruginosa*, no obstante, el efecto antimicrobiano que se observó fue muy bajo.

2.5.6 Estudios de efecto sinérgico de compuestos de plantas y antibióticos contra bacterias patógenas.

Se ha reportado que las plantas con actividad antimicrobiana pueden ser potenciadoras sinérgicas, es decir, solas, pueden presentar un determinado efecto antimicrobiano, pero cuando se toman simultáneamente con antibióticos, se incrementa de manera significativa el efecto antimicrobiano de la mezcla (Kamatou et al., 2006). El efecto sinérgico resultante de la combinación de antibióticos con

diversos extractos de plantas, ha sido reportado por diversos investigadores (Ibezim et al., 2006; Esimone et al., et al., 2008).

El efecto sinérgico ocurre cuando el efecto de la mezcla dos antimicrobianos juntos es mayor que el efecto de uno solo. La indiferencia se produce cuando el efecto de la mezcla de dos antimicrobianos es menor que el efecto de uno solo. El antagonismo ocurre cuando dos antimicrobianos juntos no tienen efecto (Kalpna y Sumitra, 2012).

Se han reportado algunos estudios sobre el efecto sinérgico de compuestos de plantas y antibióticos, sin embargo, no hay reportes donde se demuestre el posible efecto sinérgico que puede ejercer extractos o compuestos de *H. sabdariffa* con algunos antibióticos contra bacterias patógenas.

Sang et al. (2011) realizaron un estudio en el que evaluaron el efecto sinérgico entre aceite de clavo y sus componentes en mezcla con antibióticos, contra bacterias orales. La actividad antimicrobiana del aceite de clavo fue más alta que β - Cariofileno, pero fue similar a eugenol contra todas las bacterias orales probadas. La CMI y la CMB fueron reducidas considerablemente como resultado de la combinación de aceite de clavo o eugenol con antibióticos. La interacción de sinergismo fue verificada por la curva de tiempo de muerte usando aceite de clavo o eugenol en combinación con antibióticos. 60 min de tratamiento con la CMI de aceite de clavo o eugenol con ampicilina o gentamicina dieron como resultado un incremento en la tasa de muerte en unidades de UFC/mL en un grado mayor que el observado solo.

Otro estudio elaborado por Palaniappan y Holley (2010), demostró que la interacción de timol y carvacrol es altamente eficaz en la reducción de la resistencia de *Salmonella* Typhimurium SGI 1 (*Tet A*) a la ampicilina, tetraciclina, penicilina, bacitracina, eritromicina y novobiocina y en la disminución de la resistencia de *Streptococcus pyogenes ermB* a la eritromicina. Con *Escherichia coli* N00 666, se encontró que la mezcla de timol y cinamaldehído tienen un efecto similar en la reducción de las CMI's de ampicilina, tetraciclina, penicilina, eritromicina y novobiocina. La mezcla de carvacrol, timol y cinamaldehído fue efectiva contra *S. aureus blaZ* y en la reducción de CMI's de la ampicilina, penicilina y bacitracina. En este estudio además de demostrar el sinergismo entre compuestos, también se observó que un antimicrobiano natural puede hacer sensible a las bacterias resistentes a antibióticos. Kalpna y Sumitra (2012) compararon la actividad sinérgica de extracto metanólico de hojas de *T. catappa* y de *C. papaya* contra diferentes antibióticos sobre diferentes bacterias. El efecto sinérgico de *T. catappa* se encontró sólo contra *B. subtilis*, cuando el extracto metanólico de *T. catappa* se combinó con penicilina, ampicilina, cefalotina, rifampicina, amikacina, cloranfenicol, o ofloxacina.

Esto sugiere potencial de esta planta para mejorar el efecto de estos antibióticos. Por otro lado, se observó efecto sinérgico de *C. papaya* con casi todos los antibióticos usados contra todas las bacterias ensayadas. El efecto sinérgico máximo se encontró en *C. papaya* con cefalotina y ofloxacina. Se encontró efecto antagonista con ampicilina y amoxyclav contra *M. flavus* y *E. aerogenes* respectivamente. *S. epidermis* y *K. pneumoniae* fueron las bacterias Gram positivas y Gram negativas más susceptibles, respectivamente.

La sinergia de fármacos entre agentes antimicrobianos conocidos y extractos de plantas bioactivas es un concepto novedoso y se ha reportado recientemente. Por lo tanto, la terapia de combinación es a menudo rentable para pacientes con infecciones graves causadas por patógenos resistentes a antibióticos (Dawis et al., 2003).

2.6 Mecanismos de acción de los antimicrobianos

El mecanismo de acción de los antimicrobianos naturales no está entendido completamente. Sin embargo, se piensa que los terpenoides y los compuestos fenólicos provocan la disrupción de la membrana, los flavonoides y fenoles la quelación de metales, y que las cumarinas y los alcaloides afectan el material genético (Cowan, 1999). Los objetivos exactos de los antimicrobianos naturales a menudo no son conocidos o bien definidos, es difícil identificar un sitio de acción específico donde muchas reacciones que interactúan tienen lugar simultáneamente. Ellos observaron que los compuestos disruptores de la membrana también pueden causar fugas del contenido celular, interferencia con el transporte activo o enzimas metabólicas, o disipar la energía celular en forma de ATP (Davidson, 2001).

Diferentes estudios han demostrado la eficacia de los antimicrobianos y sus compuestos para controlar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro. La degradación de la pared celular, el daño a la membrana citoplasmática y proteínas de membrana, filtración de los contenidos intracelulares, la coagulación de citoplasma y agotamiento de la fuerza protón motriz puede causar la muerte celular (Nychas et al., 2003; Burt, 2004; Tiwari et al., 2009).

La eficacia de los compuestos antimicrobianos depende de una diversidad de factores presentes en los alimentos como el pH, el tipo y número de microorganismos contaminantes, y el tipo y concentración de los antimicrobianos. La temperatura de almacenamiento también puede influir en la eficacia de los antimicrobianos debido a que la difusión de los compuestos está relacionada con la temperatura

(Friedman et al., 2004). Compuestos antimicrobianos tales como timol, eugenol, y carvacrol han demostrado que causan la ruptura de la membrana celular, la inhibición de la actividad ATPasa, y la liberación de ATP intracelular y otros constituyentes de los microorganismos (Lambert et al., 2001; Burt, 2004; Gill y Holley, 2006; Oussalah et al., 2006; Raybaudi-Massilia et al., 2009).

2.6.1 Reportes de mecanismos de acción de plantas con actividad antimicrobiana

Como se ha venido mencionando, no existen reportes sobre la identificación de todos los posibles compuestos en *H. sabdariffa* con actividad antimicrobiana, para así conocer que compuestos son los responsables del efecto antimicrobiano, de igual manera, se desconoce la forma en que actúan estos compuestos sobre la célula bacteriana. Sin embargo, existen diferentes reportes del posible mecanismo de acción de diferentes compuestos obtenidos de distintas plantas sobre la célula bacteriana.

El cinamaldehído produce una disminución en el ATP intracelular por la actividad ATPasa sin cambios aparentes en la membrana celular de *E. coli*, *E. coli* O157: H7 y *Listeria monocytogenes* (Oussalah et al., 2006 y Gill y Holley, 2004, 2006). Sin embargo, Kim et al. 1995, reportaron que el cinamaldehído provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana y la filtración de citoplasma, y también interactúa con enzimas localizadas en la pared celular (Frag et al., 1989). La interacción de cinamaldehído con la membrana celular puede provocar su ruptura y dispersar la fuerza motriz por la fuga de pequeños iones, o puede inhibir la actividad de las enzimas necesarias para la biosíntesis de aminoácidos (Wendakoon y Sakaguchi, 1995).

Otro estudio demuestra que el carvacrol y timol parecen hacer permeable la membrana de la célula (Lambert et al., 2001) mediante la disolución de la bicapa de fosfolípidos (Ultee et al., 2002a). Esta distorsión provoca la expansión y la desestabilización de la membrana, incrementando la fluidez de la membrana, que a su vez aumenta la permeabilidad pasiva (Ultee et al., 2002a, 2002b). El timol se une a las proteínas de la membrana hidrófobamente y cambia las características de permeabilidad de membrana (Juven et al., 1994).

Los compuestos fenólicos probablemente ejercen sus efectos tóxicos a nivel de la membrana, se observó alta correlación entre la toxicidad y hidrofobicidad de diferentes compuestos fenólicos (Beltrame et al., 1988; Sierra-Álvarez y Lettinga, 1991).

El fenol cambia el funcionamiento de la membrana, influye en las relaciones proteínas -lípidos en la membrana (Keweloh et al., 1990) e induce el flujo de salida de iones potasio (Heipieper et al., 1991).

Las catequinas han demostrado que alteran la integridad de membrana, ya que provocan la fuga de liposomas (Ikigai et al., 1993). Las catequinas y galato de epigalocatequina interactúan en la zona polar exterior de la bicapa de lípidos y liposomas causando alteración de la membrana (Terao et al, 1994; Kitano et al, 1997; Hashimoto et al, 1999).

La vainillina mostró efecto antimicrobiano al afectar funciones de la membrana (Vaara, 1992) y a través de la inhibición de la respiración en bacterias (Fitzgerald et al., 2004). Los terpenos se acumulan en la membrana y provocan una pérdida de integridad de la membrana y la disipación de la fuerza protón motriz (Sikkema et al., 1995) así como también desorganizan las estructuras de los lípidos (Williams y Barry, 1991; Kararli et al, 1995). Lisis de la pared celular también se ha informado en las bacterias después del tratamiento con compuestos fenólicos (Borneman et al., 1986).

3. Justificación

La resistencia a los antibióticos es un problema mundial importante. El uso inadecuado de antibióticos es el factor más influyente de la resistencia a los antibióticos y la aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos limita cada vez más la eficacia de los fármacos actuales y causa un fracaso terapéutico significativo. Las infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos podrían llegar a ser consideradas como una infección emergente, debido a que su tratamiento es cada vez más limitado con el potencial de afectar a todas las personas en el mundo, tanto en países con mayores recursos económicos como en aquellos en vías de desarrollo. Una estrategia para evitar esto es mediante el uso de agentes terapéuticos alternativos como lo son las plantas que son eficaces contra las bacterias resistentes a los antibióticos. Los extractos de plantas y sus compuestos específicos tienen una amplia gama de aplicaciones en diversos campos. Se sabe que los metabolitos vegetales poseen actividades antimicrobianas contra bacterias Gram negativas y positivas. Las plantas han desarrollado numerosas estrategias químicas para protegerse de los ataques microbianos. Diversos productos naturales son bien conocidos por sus actividades antimicrobianas y son una fuente fundamental de diversidad química.

La jamaica es una planta que se conoce por los múltiples beneficios que brinda a la salud. Se ha demostrado que tiene capacidad antioxidante, antitumoral, diurética, antihipertensiva, antiinflamatoria, antiobesidad, anticolésterol, entre otras. De igual forma, se ha reportado que los cálices de *H. sabdariffa*, tienen un efecto antimicrobiano contra diferentes microorganismos patógenos y de deterioro de los alimentos. Sin embargo, no se ha identificado a los compuestos responsables de tal actividad; tampoco se sabe el mecanismo de acción de tales compuestos sobre la célula bacteriana, además, no se han realizado estudios directamente en animales para saber si el efecto antimicrobiano de la jamaica o compuestos puros obtenidos de la jamaica se mantiene cuando se administran a un modelo *in vivo*.

4. Hipótesis

A partir de los cálices de jamaica (*H. sabdariffa*) se pueden aislar e identificar compuestos puros que son los responsables del efecto antimicrobiano de los cálices de jamaica. Los compuestos puros obtenidos de la jamaica presentan efecto antimicrobiano *in vitro* contra cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella* multirresistentes a antibióticos, así como efecto *in vivo* en ratones CD-1 infectados con ambos patógenos. Además, se puede determinar el mecanismo mediante el cual los compuestos antimicrobianos obtenidos de la jamaica actúan sobre la célula bacteriana.

5. Objetivos

5.1. General

- Elucidar y determinar el efecto *in vitro* e *in vivo* de compuestos antimicrobianos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) sobre la célula bacteriana.

5.2. Específicos

- Obtener extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) utilizando agua, metanol, acetona y acetato de etilo y evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos contra cepas patógenas multiresistentes a antibióticos mediante la técnica de difusión en agar, método de dilución en caldo (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI) y vaciado en placa (Concentración Mínima Bactericida, CMB).
- Fraccionar mediante cromatografía en columna el extracto con mayor efecto antimicrobiano para obtener compuestos aislados y evaluar el efecto antimicrobiano de colecciones y compuestos contra cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Salmonella* multiresistentes a antibióticos.
- Identificar compuestos antimicrobianos aislados de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), mediante técnicas estructurales.
- Determinar el efecto antimicrobiano de ácido hibiscus y extracto acuoso de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en ratones CD-1 infectados con *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella* Typhimurium multiresistentes a antibióticos.
- Determinar el efecto de compuestos antimicrobianos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) sobre la estructura y expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella* Typhimurium multiresistentes a antibióticos.

6. Materiales y métodos

6.1. Materiales

6.1.1. Cálices de *Hibiscus sabdariffa*

Se trabajó con un lote de 10 kg de cálices deshidratados de *H. sabdariffa* (variedad “criolla de Oaxaca”) cultivada en el estado de Oaxaca, México. Los cálices se manejaron en condiciones asépticas y se transportaron al laboratorio en bolsas de plástico. En el laboratorio se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente de polietileno cerrado hasta su uso.

6.1.2. Cepas bacterianas

A partir de muestras de alimentos se aislaron catorce cepas de *E. coli* y *Salmonella* multirresistentes a antibióticos (Tabla 1). Todas las bacterias fueron resistentes a 10 antibióticos (kanamicina, neomicina, estreptomycin, amikacina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ceftriaxona, ácido nalidixico y trimetoprima / sulfametoxazol) según el Criterio del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) (CLSI, 2005).

6.1.3. Animales experimentales

Se utilizaron 96 ratones machos sanos CD-1 de 21-25 días de edad y con un peso inicial de 20-25 g. Los ratones se obtuvieron del bioterio certificado de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), estos se asignaron al azar en grupos de 6 en jaulas aisladas en la misma habitación en condiciones de temperatura de 22 ± 2 °C, con un ciclo de 12/12 luz-oscuridad. Los ratones estuvieron una semana de adaptación antes de la inoculación con las cepas patógenas. El alimento y el agua fueron administrados *ad libitum*. Es importante señalar que el protocolo experimental con los ratones fue analizado y aprobado por el comité ético para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la UAEH.

Tabla 1. Cepas patógenas resistentes a antibióticos utilizadas en este estudio

Cepa	Microorganismo	Referencia	Origen de aislamiento
<i>Salmonella</i> C1	<i>Salmonella</i> Montevideo	Rangel-Vargas et al., 2017	Cilantro
<i>Salmonella</i> C60	<i>Salmonella</i> Typhi	Rangel-Vargas et al., 2017	Cilantro
<i>Salmonella</i> C65	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Rangel-Vargas et al., 2017	Cilantro
<i>Salmonella</i> C63	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Gutiérrez-Alcántara et al., 2016	Zanahorias
<i>Salmonella</i> C14	<i>Salmonella</i> Gaminara	Gutiérrez-Alcántara et al., 2016	Zanahorias
E+TES B	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Gómez-Aldapa et al., 2016	Cilantro
EPEC MAC A	<i>E. coli</i> enteropatógena	Gómez-Aldapa et al., 2016	Cilantro
EPEC MAC B	<i>E. coli</i> enteropatógena	Gómez-Aldapa et al., 2016	Cilantro
EIEC MAC A	<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Gómez-Aldapa et al., 2013	Jitomates
EC C558	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	Hernández-Hernández et al., 2017	Carne cruda de res
EC C636	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	Hernández-Hernández et al., 2017	Carne cruda de res
EC C808	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	Hernández-Hernández et al., 2017	Carne cruda de res
EC C199	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	Hernández-Hernández et al., 2017	Carne cruda de res
EHEC A	<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Hernández-Hernández et al., 2017	Carne cruda de res

6.1.4. Medios de cultivo

Agar para Métodos Estándar (AME, Bioxon Becton Dickinson, México), Caldo de Soya Trypticaseína (CST, Bioxon Becton Dickinson, México), Peptona de caseína (Bioxon Becton Dickinson, México). Agar de Soya Trypticaseina (AST, Bioxon Becton Dickinson, México), caldo Luria-Bertani (LB, Difco, México), Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen, México), Agar de Eosina y Azul de Metileno (EMB, Bioxon, México), Agar Verde Brillante (BGA, Bioxon, México).

6.1.5. Reactivos y disolventes

Agua destilada, acetato de etilo (J.T. Baker, U.S.A), hexano (J.T. Baker, U.S.A), metanol (J.T. Baker, U.S.A), acetona (J.T. Baker, U.S.A), Tween 80 (Sigma-Aldrich, México), silica gel (Sigma Aldrich, Suiza), agua deuterada (Sigma Aldrich, Suiza), Solución Salina Isotónica (SSI, Becton Dickinson, México).

6.1.6 Antibióticos

Kanamicina, neomicina, estreptomicina, amikacina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ceftriaxona, ácido nalidixico, trimetoprima / sulfametoxazol y rifampicina (Sanofi Aventis, México).

6.1.6. Aparatos, instrumentos y otros

Autoclave eléctrica (Yamato Scientific, SM 200, Japón.), agitador Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, U.S.A.), balanza analítica (Ohaus, U.S.A.), incubadora bacteriológica (Blue M, U.S.A.), campana de flujo laminar (Labconco, U.S.A), cuenta colonias (Darkfield Québec, Cia. American Optical, U.S.A.), parrilla eléctrica (Thermolyne Cimarec, U.S.A.), refrigerador (Lab-Line Environmenters Inc., U.S.A.), evaporador rotatorio (BÜCHI, Vacuum Controller, V-800, Suiza), lámpara de luz ultravioleta (Entela U.V, U.S.A), espectrómetro de resonancia magnética nuclear (400 MHz), estufa con recirculación de aire (Lab-Line, Ambi-Hi-Low Chamber, Iowa, USA), centrifuga, Papel filtro (Whatman #4, México), parafilm (Bemis, México)

6.2. Métodos

6.2.1 Diagrama general experimental

La estrategia metodológica desarrollada en esta investigación organizada por objetivos se muestra en la Figura 2.

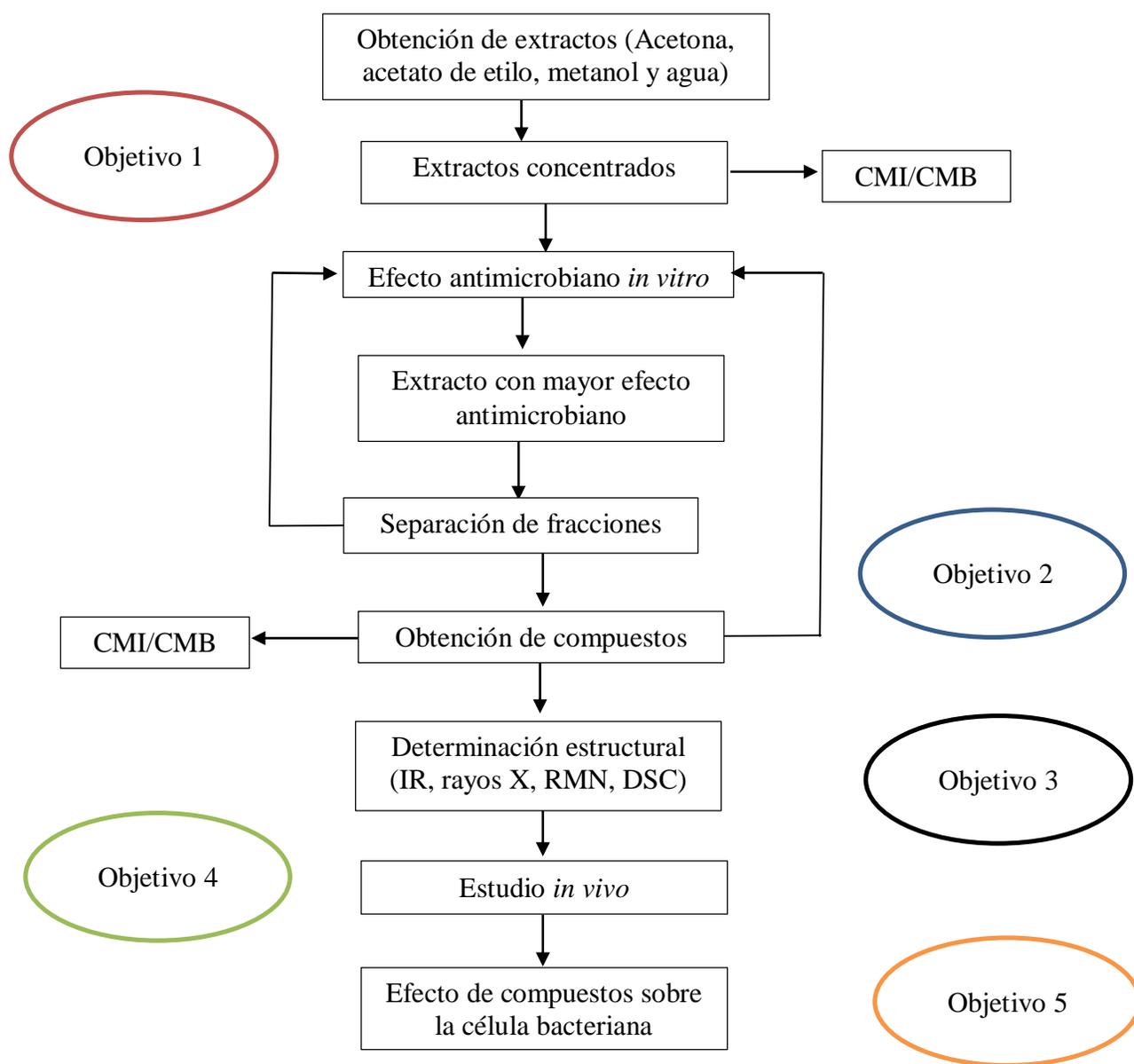


Figura 2. Diagrama de metodología general

6.2.1. Obtención de extractos a partir de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

Los extractos de *H. sabdariffa* con acetona, acetato de etilo, metanol (J.T Baker, México) y agua destilada se obtuvieron exactamente como se describió anteriormente (Cruz-Gálvez et al., 2013; Morales-Cabrera et al., 2013). Brevemente, se pesaron porciones de 100 g de cálices deshidratados, y por separado, se colocaron en frascos de vidrio y se añadieron 900 mL de cada uno de los disolventes. Los frascos de vidrio se cerraron herméticamente y se almacenaron a temperatura ambiente durante

siete días con agitación manual por 1 min una vez al día. Después del periodo de extracción, la fase líquida se filtró a través de papel filtro (Whatman #4). Estos extractos filtrados se concentraron en un evaporador rotatorio (BÜCHI, Vacuum Controller, V-800, Suiza). Los disolventes se eliminaron por completo del concentrado rotaevaporado colocándolo en una estufa con recirculación de aire (Lab-Line, Ambi-Hi-Low Chamber, Iowa, USA) durante 24 h a 45 ± 1 °C.

6.2.2. Determinación del efecto antimicrobiano de extractos de *Hibiscus sabdariffa*

6.2.2.1. Preparación de cepas bacterianas

Las 14 cepas resistentes a antibióticos fueron sembradas en 3 mL de Caldo Soya Tripticaseína (CST, Bioxon, Becton Dickinson, México) y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 18 h. Los cultivos se lavaron dos veces en Solución Salina Isotónica estéril (SSI, 0.85 % de NaCl) en un centrifuga a 3,500 rpm durante 20 min, las pastillas bacterianas se resuspendieron en SSI estéril aproximadamente 10^9 UFC/mL, finalmente se realizó una dilución decimal de estos cultivos lavados con SSI para producir una concentración de 8 Log UFC/mL (Cruz-Gálvez et al., 2013; Morales-Cabrera et al., 2013).

6.2.2.2. Preparación de soluciones de prueba

Se prepararon soluciones de cada extracto: acetónico, metanólico, acetato de etilo y acuoso a concentraciones finales de 100 mg/mL. Para preparar las soluciones del extracto acetónico, extracto metanólico y extracto acuoso se utilizó solo agua destilada. Para obtener las soluciones del extracto de acetato de etilo se utilizó una mezcla de agua destilada con Tween 80 (Sigma-Aldrich, México) al 20 %. De igual manera se prepararon otras soluciones a la par y se trataron térmicamente como se indica en la sección 6.2.2.3.

6.2.2.3. Tratamiento térmico

Las soluciones de cada uno de los extractos fueron selladas con una película de parafilm (Bemis, México) y se sometieron a proceso de esterilización en autoclave (Yamato Scientific, SM 200, Japón) a 121°C, 15 min y 15 lb/in². Después de que las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente, se determinó la zona de inhibición de estas soluciones con tratamiento térmico contra las 14 bacterias de ensayo (Tabla 1).

6.2.2.4. Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de extractos de *Hibiscus sabdariffa*

Se utilizó la técnica de difusión en gel utilizando discos de papel. Brevemente, 100 µL de los cultivos bacterianos lavados, a partir de una concentración de 1×10^8 UFC/mL, se inocularon en placas de Agar de Soya Trypticaseína (AST, Bioxon Becton Dickinson, México) y se distribuyeron en el agar por la técnica de extensión en superficie. Se colocaron discos de papel esterilizados (Whatman #4, México, 6 mm de diámetro) sobre la superficie del agar inoculado. Luego, se colocaron alícuotas de 20 µL que contenían extracto acetónico, extracto de acetato de etilo, extracto metanólico y extracto acuoso, (sin y con tratamiento térmico por esterilización) en los discos de papel (dosis final por disco: 2 mg de extracto, colección cromatográfica o ácido hibiscus). Los tratamientos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron durante 24 h a 35 ± 2 °C. Para cada tratamiento, se midieron los diámetros (mm) de las zonas de inhibición resultantes y se expresaron como el promedio (Cruz-Gálvez et al., 2013).

6.2.3. Obtención de fracciones cromatográficas a partir del extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa*

92.5 gramos de extracto acetónico seco de cálices de *H. sabdariffa*, se separaron por cromatografía en columna. El extracto seco se mezcló con silica gel (Sigma-Aldrich, México) (1:2, extracto: silica). La silica gel previamente se activó a 120 °C durante 1 h en una estufa de secado con recirculación de aire. Una vez empaquetada la columna, se recuperaron las fracciones en cantidades de 100 mL utilizando como fase móvil hexano (Sigma-Aldrich, México), mezclas de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo sólo (Sigma-Aldrich, México), mezcla de acetato de etilo-metanol y metanol sólo (Sigma-Aldrich, México) en diferentes proporciones (Tabla 6). Cada una de las fracciones (100 mL) se concentró en un evaporador rotatorio y se colocaron en frascos de vidrio una vez eliminado el disolvente. El cambio de mezcla de disolventes se realizó con apoyo de los resultados de cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina utilizando hexano, mezcla de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo solo, mezcla de acetato de etilo-metanol y metanol solo como fases móviles. Las fracciones cuyos componentes presentaron el mismo nivel de desplazamiento en la placa, se reunieron en lo que se llamó colección cromatográfica (Tabla 7). Las colecciones se colocaron en una estufa a 40 °C con la finalidad de

evaporar residuos del disolvente presente. Estas colecciones se utilizaron para evaluar su actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas de estudio. Las colecciones con la mayor actividad antimicrobiana se sometieron a una segunda cromatografía y se obtuvieron nuevas fracciones cromatográficas a las cuales se les determinó su efecto antimicrobiano para aislar e identificar alguno de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana; de estos exámenes, se identificó preliminarmente al ácido hibiscus como uno de los posibles responsables del efecto antimicrobiano. Con esta información, se estableció ahora el procedimiento para aislar sólo el ácido hibiscus, como se describe en la sección 6.2.4, para confirmar su estructura y su efecto antimicrobiano.

6.2.4 Obtención de ácido hibiscus

230 g de extracto acetónico seco de cálices de *H. sabdariffa* fueron empacados con silica gel en una columna cromatográfica como se describió en la sección 6.2.3. Se utilizó hexano como fase móvil inicial para separar los aceites presentes en el extracto. Se recuperaron fracciones de 600 mL en matraces de vidrio. Todas las fracciones cromatográficas obtenidas se sometieron a rotaevaporación para retirar los disolventes y concentrar los compuestos separados. Una vez separados la mayoría de los aceites del extracto, se utilizó ahora como fase móvil la mezcla de disolventes hexano y acetato de etilo en una proporción 9:1 para retirar los aceites residuales. Posteriormente, se utilizó ahora como fase móvil la mezcla hexano con acetato de etilo en una relación 8:2, esta mezcla se pasó por la columna empacada hasta que se observaron en las fracciones recuperadas de 600 mL, y después de retirar el disolvente por rotaevaporación, pequeños cristales en el fondo del matraz. A partir de ahí se utilizó la mezcla de hexano y acetato de etilo en una proporción 7:3 (70 %: 30 %); con esta mezcla, después de retirar el disolvente por rotaevaporación de las fracciones recuperadas, se obtuvieron cristales bien definidos en los concentrados de las fracciones cromatográficas. Los cristales obtenidos fueron analizados por cromatografía en capa fina para conocer su nivel de pureza. Los cristales aislados fueron sometidos a un proceso de recristalización en un embudo de separación para purificarlos, para ello se utilizó una mezcla de acetona y acetato de etilo en una proporción 7:3 (70 %: 30 %) en donde los cristales se disolvieron y posteriormente se dejó reposar durante 24 h para la recristalización. Transcurrido este periodo, se observó la formación de cristales sobre la pared del embudo de separación, se decantó el líquido y se recuperaron los cristales. Finalmente, la acetona residual fue retirada completamente en una estufa con recirculación de aire a 45 °C por 2 h.

6.2.5. Identificación estructural

6.2.5.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

El extracto acetónico de *H. sabdariffa* y los cristales obtenidos (ácido hibiscus) se analizaron mediante RMN, previo a este análisis, se realizaron pruebas de solubilidad del extracto y de los cristales para determinar el disolvente a utilizar en la preparación de las muestras. Para ello se tomaron pequeñas muestras con ayuda de una espátula y se colocaron en viales por separado a los cuales se les agregó 1 mL del disolvente (Agua, metanol, acetona, cloroformo o dimetilsulfoxido) y se agitó con la finalidad de observar el mejor disolvente.

Las muestras elegidas para RMN, completamente secas, se disolvieron nuevamente con disolventes deuterados. Para ello, en cada vial se colocaron 2 mL del disolvente el cual se mezcló con ayuda de una pipeta Pasteur. Se utilizó una pipeta Pasteur con un trozo de algodón para filtrar la muestra la cual se depositó dentro de un tubo para RMN. Finalmente se cerró el tubo y la muestra se colocó en el equipo de RMN para determinar el espectro del protón H^1 utilizando el equipo Jeol NMR (Japón, 400 MHz).

Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa MestReNova 2009 (Mestrelab Research S.L. v 6.0.2-5475, España).

6.2.5.2. Espectroscopía de infrarrojo (IR) con sistema de reflexión total atenuada (FTIR-ATR)

Los cristales obtenidos se molieron en un mortero para reducir el tamaño de partícula, la muestra se analizó mediante espectroscopia de infrarrojo utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo (Frontier, Perkin Elmer, USA) equipado con un sistema de reflexión total atenuada (ATR) con celda de cristal de diamante. Las condiciones de ensayo fueron temperatura de 25 ± 2 °C. Se aplicó el modo de reflectancia total atenuada, con una resolución de 4 cm^{-1} en 64 barridos por muestra en un rango de 400 a $4,000\text{ cm}^{-1}$.

6.2.5.3. Espectroscopía de rayos X

Los cristales de ácido hibiscus, fueron crecidos por evaporación lenta de una solución de acetona con agua. La estructura cristalina se determinó mediante análisis de rayos X de monocristal; sus detalles cristalográficos y refinamientos de la estructura de presenta en la Tabla 12.

Los datos de difracción de rayos X se tomaron a temperatura ambiente en un difractómetro Oxford Diffraction GEMINI CCD (Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, England) usando radiación de CuK α monocromado con grafito ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$). Los datos se procesaron utilizando el paquete de software CRYSTALS (Versión 1.171.33.3, 2009, Oxford Diffraction Ltd. Abingdon, United Kingdom). La estructura se definió utilizando OLEX2 (Dolomanov et al., 2009) y ShelXT (Sheldrick, 2015a) usando métodos de fase intrínseca o métodos directos y se refinó con el paquete de refinamiento ShelXL (Sheldrick, 2015b) utilizando la minimización de Mínimos cuadrados.

6.2.5.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y fusiómetro

El punto de fusión del ácido hibiscus se midió utilizando un fusiómetro (Ecoshel, WRS-1B, Ciudad de México, México) y un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés, TA Instrument, Q 2000, New Castle, NJ, USA), previamente calibrado con indio a una temperatura y flujo de calor de $T_0 = 156.6 \text{ }^\circ\text{C}$ y $\Delta H = 28.4 \text{ J/g}$, respectivamente. 5 mg de cristales de ácido hibiscus se colocaron en un crisol de aluminio para DCS. Los crisoles se sellaron y calentaron a una velocidad de calentamiento de $5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ a una temperatura desde $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Las temperaturas de la transición y la entalpía de transición (ΔH) se obtuvieron directamente del análisis con el software TA Instruments (versión 4.4A, New Castle, NJ, USA).

6.2.6 Determinación del efecto antimicrobiano de colecciones cromatográficas y del ácido hibiscus

6.2.6.1 Preparación de cepas bacterianas

Se utilizaron las 14 cepas resistentes a antibióticos mencionadas en la Tabla 1, las cuales fueron sembradas e incubadas como se menciona en la sección 6.2.2.1 (Cruz-Gálvez et al., 2013; Morales-Cabrera et al., 2013).

6.2.6.2 Preparación de las soluciones de prueba

Se prepararon soluciones de las colecciones cromatográficas y del ácido hibiscus a concentraciones finales de 100 mg/mL. Para preparar la solución del ácido hibiscus se utilizó solo agua destilada. Para obtener las soluciones de las colecciones de fracciones se utilizó una mezcla de agua destilada con Tween 80 (Sigma-Aldrich, México) al 20 %.

6.2.6.3 Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de colecciones cromatográficas y del ácido hibiscus

Se utilizó la técnica de difusión en gel utilizando discos de papel como se menciona la sección 6.2.2.4 (Cruz-Gálvez et al., 2013).

6.2.7 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se empleó el método de dilución en caldo de cultivo (Vanden y Vlietinck, 1991). Se prepararon tubos con Caldo de Soya Trypticaseína (CST) conteniendo extracto acetónico, extracto acuoso o ácido hibiscus de *H. sabdariffa* a concentraciones desde 100 hasta 1 mg/mL. Los tubos fueron inoculados con una suspensión final de microorganismos de 1×10^5 UFC/mL. Todos los tubos inoculados fueron incubados a 37 °C durante 24 h. Se consideró como CMI la última dilución del extracto acetónico o del ácido hibiscus que inhibió el crecimiento bacteriano sin observar turbidez en los tubos.; Para la determinación de la CMB, los tubos de CST con las menores concentraciones de extracto o ácido hibiscus en donde no se observó desarrollo se sembraron en agar de soya tripticaseína por la técnica de vertido en placa y se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 a 48 h. Se consideró como la CMB la menor concentración del extracto o ácido hibiscus contenida en el CST en la que no se obtuvo desarrollo de colonias en el AST.

6.2.8 Efecto del ácido hibiscus en la sobrevivencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella Typhimurium*

La actividad bactericida del ácido hibiscus contra EHEC A y *Salmonella* C65 se evaluó midiendo la reducción en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) según estudios previos (Chauhan y Kang, 2014). Brevemente, se inocularon células de EHEC A y *Salmonella* C65 en CST que contenía ácido hibiscus en diferentes concentraciones, a una Concentración Mínima Sub-inhibitoria CMSI (1.25 mg/mL y 1.75 mg/mL para EHEC A y *Salmonella* C65, respectivamente), CMI (5 mg/mL y 7 mg/mL para EHEC A y *Salmonella* C65, respectivamente), 10x CMI (50 mg/mL y 70 mg/mL, para EHEC A y *Salmonella* C65, respectivamente), CMB (7 mg/mL) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, control positivo, 0.25 M) y se incubaron a 35 ± 2 °C. Esta técnica se realizó a diferentes tiempos de incubación 0, 30, 60, 90 y 120 min, el cultivo se sembró en placa en medio de Agar Métodos Estándar con diluciones apropiadas, seguido de incubación a 35 ± 2 °C durante 24 h. Las colonias se contaron después del período de incubación. Simultáneamente, los controles sin ácido hibiscus también se establecieron en las mismas condiciones experimentales.

6.2.9 Efecto antimicrobiano de extracto acuoso y ácido hibiscus obtenidos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y cloranfenicol en ratones CD-1 infectados con *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella Typhimurium* multirresistentes a antibióticos

Este estudio se realizó en el bioterio certificado de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. El protocolo científico se presentó ante el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CIEQUAL) para su aprobación para el uso de ratones CD-1.

6.2.9.1. Resistencia a rifampicina de cepas bacterianas para su uso en ratones

Se obtuvieron cepas mutantes con resistencia a la rifampicina (Sanofi aventis, México) a partir de las cepas nativas *S. Typhimurium* (*Salmonella* C65) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC A) multirresistentes a antibióticos. Brevemente, se preparó una suspensión de cada patógeno centrifugando cultivos de 24 h cultivados en Caldo de Soya Trypticaseína (CST, Bioxon, Becton Dickinson, México), descartando el sobrenadante y lavando dos veces en agua salina (NaCl 0.85 %)

con peptona (0.1 %) Las células lavadas finalmente se resuspendieron en un 1 mL peptona estéril al 0.1 %. Esta suspensión se extendió sobre tres placas de AST (en un volumen de 0.3 mL) que contenían 1 mL de rifampicina (Rif) por cada 100 mL de AST. Las placas de AST-Rif inoculadas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h, y se seleccionaron de tres a cinco colonias para la formación de estrías en tubos inclinados de AST (Castro-Rosas y Fernández-Escartín, 2000). Estas cepas se nombraron como EHEC A R⁺ y *Salmonella* C65 R⁺.

6.2.9.2. Preparación de inóculo

Las cepas resistentes a rifampicina de EHEC A y *Salmonella* C65 fueron sembradas en CST, se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h. Cada uno de los cultivos activados se diluyó en serie en tubos de ensayo con peptona de caseína hasta que se obtuvo una concentración celular de 1×10^5 UFC/mL.

6.2.9.3 Preparación de soluciones a administrar en los ratones

Para este estudio se utilizó ácido hibiscus y extracto acuoso obtenido de cálices de *H. sabdariffa*, se consideró el extracto acuoso debido a que es la forma común en que las personas consumen la jamaica, a pesar de que no presenta la actividad antimicrobiana más alta de forma *in vitro*. Para preparar las soluciones del ácido hibiscus y extracto acuoso se consideró la Concentración Mínima Bactericida (CMB) reportada *in vitro* en este estudio y en el caso del cloranfenicol, mezcla de ácido hibiscus y cloranfenicol se consideró la CMB reportada por Mercado-Monroy et al. (2018). Estas soluciones se prepararon de la siguiente forma: solución de cloranfenicol a una concentración de 8.2 µg/mL, la solución de ácido hibiscus a una concentración de 7 mg/mL, la solución de ácido hibiscus-cloranfenicol (80 % ácido hibiscus, 20 % cloranfenicol; mezcla que obtuvo mayor actividad antimicrobiana *in vitro* según Mercado-Monroy et al (2018) a una concentración de 5.7 mg/mL de ácido hibiscus + 0.4 µg/mL de cloranfenicol. La solución de extracto acuoso a una concentración de 50 mg/mL, la solución extracto acuoso-cloranfenicol (50 % extracto acuoso, 50 % cloranfenicol) a una concentración de 25 mg/mL de extracto acuoso + 25 µg/mL de cloranfenicol. Todas estas soluciones fueron tratadas térmicamente en autoclave a 121 °C por 15 min antes de administrarse a los ratones, cabe destacar que las soluciones que contenían cloranfenicol, fueron esterilizadas y el antibiótico fue agregado después del tratamiento térmico.

6.2.9.4 Inoculación de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A R⁺) y *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella* C65 R⁺) y administración de extracto acuoso, ácido hibiscus y mezclas a ratones CD-1.

Para este estudio se eligieron 2 cepas patógenas: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC A R⁺) y *S. Typhimurium* (*Salmonella* C65 R⁺), las cuales se hicieron resistentes a rifampicina como se menciona en la sección 6.2.9.1 y se prepararon como se describe en la sección 6.2.9.2. Se utilizaron un total de 96 ratones machos CD-1, los cuales se dividieron en 16 grupos, cada grupo de ratones se formó por 6 ratones (n=6). Los tratamientos y grupos utilizados se muestran en la Tabla 2. Todos los grupos se mantuvieron durante 1 semana de adaptación, suministrándoles alimento estándar y agua *ad libitum*, transcurrido este tiempo de adaptación, se inocularon los ratones con EHEC A R⁺ y *Salmonella* C6 R5 R⁺ dependiendo del grupo. Los ratones se sujetaron firmemente por la zona del cuello en posición vertical antes de inocular por vial oral con la cepa patógena y los diferentes tratamientos, utilizando una cánula con jeringa estéril desechable sin aguja.

El grupo I no se infectó con cepa patógena y no se les administro ningún tratamiento (blanco, sin infectar y no tratado; solo se administró agua destilada vía oral), los grupos del II al IV no se infectaron con cepa patógena, pero fueron tratados con las soluciones de cloranfenicol, ácido hibiscus y extracto acuoso, respectivamente (Controles, no infectados y tratados), los grupos V y VI se inocularon por vía oral con aproximadamente 1×10^5 UFC/mL de *Salmonella* C65 R⁺ y EHEC A R⁺, respectivamente, en un volumen de 0.1 mL, y 6 h después de la infección se administró agua destilada por vía oral, en un volumen de 0.5 mL (Controles negativos, infectados y no tratados), los grupos VII, IX, XI, XIII y XV se inocularon por vía oral con aproximadamente 1×10^5 UFC/mL de *Salmonella* C65 R⁺, en un volumen de 0.1 mL y 6 h después de la infección se administró cloranfenicol, ácido hibiscus, ácido hibiscus-cloranfenicol, extracto acuoso y extracto acuoso-cloranfenicol por vía oral, respectivamente, en un volumen de 0.5 mL (grupos infectados con *Salmonella* C65 R⁺ y tratados), los grupos VIII, X, XII, XIV y XVI se inocularon por vía oral con aproximadamente 1×10^5 UFC/mL de EHEC A R⁺, en un volumen de 0.1 mL y 6 h después de la infección se administró cloranfenicol, ácido hibiscus, ácido hibiscus-cloranfenicol, extracto acuoso y extracto acuoso-cloranfenicol por vía oral, respectivamente, en un volumen de 0.5 mL (grupos infectados con EHEC A R⁺ y tratados). Cada uno de los tratamientos se administraron cada 12 h durante 7 días.

6.2.9.5 Cuantificación de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A R⁺) y *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella* C65 R⁺) en heces de los ratones.

Las heces de los animales de prueba se tomaron directamente de la cama de aserrín con pinzas esterilizadas a 121 °C por 15 min y se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético, la recolección de las heces se realizó una vez al día, a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y 7 días), esto para determinar el número de bacterias por gramo de heces presentes en los 16 grupos de estudio (Itelima y Agina, 2014). Las se cambiaron diariamente durante la recolección de muestras fecales para evitar la contaminación cruzada. EHEC A R⁺ y *Salmonella* C65 R⁺ se cuantificaron en cada muestra fecal de la siguiente manera: Se agregó 9 mL de peptona de caseína estéril a la bolsa de plástico que contenía 1.0 g de heces, se homogeneizó la muestra, se realizaron diluciones seriadas (10⁻¹ y 10⁻²) de alícuotas de 1 mL de suspensiones fecales en peptona estéril, se realizó siembra por vaciado en placa con Agar Métodos Estándar con rifampicina (AME-Rif). De cada dilución se sembraron por triplicado. Las cajas se incubaron a 35 ± 2 ° C durante 24 h, después de la incubación, se realizó conteo de cada una de las diluciones. Para su identificación la cepa de EHEC A R⁺ se cultivó en Agar de Eosina y Azul de Metileno (EMB-Rif) con rifampicina y la cepa de *Salmonella* C65 R⁺ en Agar Verde Brillante con rifampicina (BGA-Rif), que posteriormente se incubaron durante 24 h a 35 ± 2 ° C (Lee et al., 2006; Itelima y Agina, 2014).

6.2.9.6. Tasa de mortalidad y manifestaciones patológicas

La tasa de mortalidad de los ratones en los diferentes grupos se calculó como el número de ratones que murieron durante el curso del experimento en relación con todos los ratones utilizados en cada grupo (Eman y Hoda, 2008). Los animales fueron observados para la consistencia del material fecal. Los animales también fueron observados por cualquier anomalía y manifestación patológica (pérdida de peso, pérdida de apetito, debilidad/movimiento lento y mortalidad) durante el período del experimento. Al final del estudio (7 días después de la inoculación y el tratamiento), todos los ratones infectados y sin infectar se sacrificaron por dislocación cervical, para prevenir la propagación de la infección asociada con EHEC A y *Salmonella* C65 en el medio ambiente.

6.2.10. Efecto de extracto acuoso, acetónico y ácido hibiscus en la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A R⁺ y EDL9333)

Este estudio fue realizado en la Ciudad de México en el Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN XXI) en la Unidad de Investigación Médica de enfermedades Infecciosas y Parasitarias.

Tabla 2. Grupos de ratones y tratamientos para determinación de efecto de compuestos de *Hibiscus sabdariffa*.

Grupo	Ratones CD-1	Tratamiento
I	Blanco	Ratón sin infectar y sin tratamiento
II	Control positivo	Ratón + <i>Salmonella</i> C65 R ⁺
III	Control positivo	Ratón + EHEC A R ⁺
IV	Control	Ratón + cloranfenicol
V	Control	Ratón + ácido hibiscus
VI	Control	Ratón+ extracto acuoso
VII	Tratamiento	Ratón + <i>Salmonella</i> C65 R ⁺ + cloranfenicol
VIII	Tratamiento	Ratón + ratón + EHEC A R ⁺ + cloranfenicol
IX	Tratamiento	Ratón + ratón + <i>Salmonella</i> C65 R ⁺ + ácido hibiscus
X	Tratamiento	Ratón + ratón + EHEC A R ⁺ + ácido hibiscus
XI	Tratamiento	Ratón + <i>Salmonella</i> C65 R ⁺ + ácido hibiscus + cloranfenicol
XII	Tratamiento	ratón + EHEC A R ⁺ + ácido hibiscus + cloranfenicol
XIII	Tratamiento	Ratón + <i>Salmonella</i> C65 R ⁺ + extracto acuoso
XIV	Tratamiento	Ratón + EHEC A R ⁺ + extracto acuoso
XV	Tratamiento	Ratón + <i>Salmonella</i> C65 R ⁺ + extracto acuoso + cloranfenicol
XVI	Tratamiento	Ratón+ EHEC A R ⁺ + extracto acuoso + cloranfenicol

Salmonella C65= *S. Typhimurium*, EHEC A= *E. coli* enterohemorrágica, R⁺= Resistente a rifampicina.

6.2.10.1 Preparación de soluciones

Las soluciones de extracto acuso, acetona y ácido hibiscus a utilizar para la expresión de los factores de virulencia de *E. coli* enterohemorrágica, se prepararon según las CMI's obtenidas en el presente estudio. Para el extracto acuoso fue de 20 mg/mL, para extracto acetónico de 7 mg/mL y para ácido hibiscus de 5 mg/mL, esto para *E. coli* enterohemorrágica. A partir de estas CMI's, se prepararon soluciones 10x de cada uno de los tratamientos. De igual forma se preparó una concentración menor

a la CMI que se denominó como Concentración Mínima Sub-Inhibitoria (CMSI). Para el extracto acuoso se preparó una solución de 5 mg/mL, para extracto acetónico 1.75 mg/mL y para ácido hibiscus de 1.25 mg/mL. Estas soluciones fueron esterilizadas por filtración en campana, utilizando filtros de 0.20 μm .

6.2.10.2. Cepas patógenas y condiciones de crecimiento

Para este estudio se utilizó *E. coli* enterohemorrágica resistente a rifampicina (EHEC A R+) utilizada en el estudio *in vivo* en ratones CD-1. De igual forma se utilizó *E. coli* enterohemorrágica EDL933 (proporcionada en el CMN XXI). No se realizó este estudio con *S. Typhimurium* (*Salmonella* C65) debido a que esta bacteria no logro infectar a los ratones.

Las cepas se cultivaron en tubos con 5 mL caldo Luria-Bertani (LB, Difco), se crecieron en agitación a 37 °C / 150 rpm durante la noche. Se determinó la densidad óptica (DO) de los cultivos para iniciar con una DO₆₀₀ de 0.02. Con estos cultivos se inocularon frascos de 100 mL que contenían 30 mL de medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen). Se incubaron los frascos a las condiciones mencionadas anteriormente durante 3 h. Se midió la densidad óptica hasta alcanzar una DO de 1. Una vez alcanzada la DO requerida, se distribuyó los 30 mL de cada frasco en 4 tubos, teniendo un volumen final de 7 mL por tubo (6,300 μL de Caldo DMEM con cepa patógena + 700 μL solución 10x de cada tratamiento). Teniendo un total de 8 tubos (8 tratamientos, control EHEC A R+, extracto acuoso + EHEC A R+, extracto acetona + EHEC A R+, ácido hibiscus + EHEC A R+, control EDL933, extracto acuoso + EDL933, extracto acetona + EDL933 y ácido hibiscus + EDL933). Una vez preparados los 8 tubos con 7 mL cada uno, se incubaron con agitación a 35 \pm 2 °C, 150 rpm durante 1 h. Se centrifugaron a 4,500 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se congelo la pastilla a -70 °C. Se procedió al aislamiento de RNA total de bacterias con fenol ácido.

6.2.10.3 Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La purificación de ARN, la síntesis de cDNA, los iniciadores, las condiciones de ciclos de qRT-PCR y el análisis de datos siguieron los protocolos descritos previamente (Riordan et al., 2010; Neupane et al., 2011).

Los cultivos bacterianos se cultivaron hasta DO_{600} de 1 antes de la extracción de ARN (kit RNeasy™, Qiagen, Valencia, CA) como se mencionó anteriormente. Luego, se calentó en el Thermomixer 500 μ L de fenol-ácido a 65 °C (fase orgánica inferior) en tubos de 2 mL, a las pastillas de los cultivos congelados se les añadió 500 μ L de solución A (Tabla 3, nota: esta solución se preparó al momento), se resuspendieron las pastillas agitando o raspando con la punta de una micropipeta y se colocaron en hielo.

Los tubos con las células se agitaron en vortex 30 s, se colocaron en hielo, este proceso se repitió 2 veces más (total 3 veces). Se pasaron las células del cultivo a un tubo con fenol-ácido y se agitaron en vortex por 30 segundos. Se incubaron por 5 min a 65 °C y 1,500 rpm en el Thermomixer. Se agitaron en vortex por 30 s. Se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min a 4 °C (nota: a partir de este punto los tubos se mantuvieron en hielo y se usaron micropipetas exclusivas para RNA, puntas con filtro y guantes). Se pasó la fase acuosa (fase superior de cada uno de los tubos, aproximadamente 500 μ L a tubos de 1.5 mL limpio), se añadió 1 mL de etanol absoluto frío a cada uno de los tubos y se agitaron en vortex por 5 segundos y se colocaron en hielo. Se incubaron los tubos a -70 °C para precipitar el RNA durante la noche. Se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se decantó el líquido de cada uno de los tubos y las pastillas se colocaron en hielo. Se añadió a cada uno de los precipitados 1 mL de etanol frío al 70 % y se agitaron en vortex por 5 s. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 2 min a 4 °C. Se decantó el líquido de cada tubo y las pastillas se colocaron en hielo. Se resuspendieron las pastillas en 400 μ L de solución A. Se agitaron en vortex por 30 s y se repitió el procedimiento desde añadir 1 mL de etanol absoluto frío hasta la segunda decantación omitiendo el paso de incubar los tubos a -70 °C. Las pastillas se secaron en speedvac de 15 a 20 min, se añadieron 50 μ L de agua DEPC y se resuspendieron las muestras dando suaves golpeteos (por 10 min, todos los tubos intercalando golpe, hielo y golpe). Para la purificación del RNA se dio un tratamiento con DNA turbo (Kit DNA free). Para esto, se agregó a cada uno de los tubos, 1 μ L de Ribolock (enzima), 5 μ L de solución tampón de la DNAsa turbo 10x (ambion cat AM1907) y 1 μ L de DNAsa turbo (ambion), posteriormente se mezclaron suavemente cada uno de los tubos. Se incubaron a 37 °C por 30 min en Thermomixer (Se agitaron los tubos cada 10 min en equipo 5 s a 300 rpm). Se añadieron 5 μ L de reactivo de inactivación de la DNAsa (resina) y se mezclaron bien. Se incubaron 5 min a temperatura ambiente, mezclando constantemente, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min a 4 °C. Se transfirieron con micropipeta las fases acuosas (RNA, fase superior) a tubos de 1.5 mL (aproximadamente un volumen de 45 μ L) y se repitió el paso de la purificación una vez más. Se

determinó la concentración y pureza en Nanodrop y se realizó gel de agarosa al 1 % en condiciones desnaturalizantes para observar integridad del RNA. Se guardó el RNA a -70 °C.

Tabla 3. Preparación de solución de lisis (Solución A)

Solución A*	Cantidad para 1 reacción	Concentración final
Agua	910 µL	
SDS 10 % (calentar hasta homogeneizar)	50 µL	0.5 %
Acetato de sodio 1 M	20 µL	20 mM
EDTA 0.5 M	20 µL	10 mM
Volumen final	1000 µL	10 mM

*Agitar, vortex y trasvasar para quitar espuma.

Para la síntesis de cDNA (Kit Rivertaid First Strand cDNA Synthesis, ThermoScientific, Vilnius, Lithuania) se siguieron los siguientes pasos: Se preparó el mix RT-PCR (para 1 reacción, 4 µL de solución tampón, 2 µL de dNTP 10 Mm, 1 µL de iniciador random, 1 µL de Ribolock y 1 µL de Rivertaid) en tubo de 0.6 mL, se añadió 9 µL de mix a tubos de 0.2 mL, se realizaron cálculos a partir de la concentración determinada en Nanodrop para determinar el volumen de RNA a colocar para una concentración final de cDNA de 1,000 ng/µL y un volumen final de 20 µL. Una vez colocado el mix, H₂O y RNA, los tubos se colocaron en el equipo para que se llevara la retrotranscripción. El cDNA obtenido se diluyó 1:50 a un volumen final de 750 µL. Las diluciones de cDNA se guardaron a -20 °C.

Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando iniciadores para *rrsH* (gen 16S rRNA) para normalizar los niveles de cDNA e iniciadores para *E. coli* enterohemorrágica (*espA*, *grlA*, *nleA*, *flhD*, *fliC*, *STBX2* y *exhA*). Los iniciadores se prepararon a una concentración de 20 µg. Una vez que se tuvo preparados los oligonucleótidos, se preparó un mix para RT-PCR (kit light cycler 480 SYBR Green I master), para una reacción se preparó 1.5 µL de H₂O, 0.5 µL de oligonucleótido 5', 0.5 µL de oligonucleótido 3' y 5 µL de SyBr. Se colocaron 7.5 µL del mix y 2.5 µL del cDNA (para un volumen final de 10 µL) en el pozo de la placa para RT-PCR. Pegar hoja de sellado en la placa y colocarla en el equipo para RT-PCR (light cycler 480) y analizar los datos en el programa lightcycler 480.

Las condiciones de reacción incluyeron 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C, seguido de alineamiento a 60 °C y por ultimo elongación a 72 °C para el *rrsH*, cambiando la temperatura de

alineamiento para los demás iniciadores de 58 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres días diferentes y los resultados mostrados son la media de los datos producidos.

6.2.11. Determinación del efecto sobre la célula bacteriana de las moléculas activas

6.2.11.1 Medición de permeabilidad con cristal violeta

La alteración de la permeabilidad de la membrana se detectó mediante el ensayo de cristal violeta descrito anteriormente (Devi et al., 2010). Brevemente, se inocularon 100 µL de *Salmonella* C65 y EHEC A en CST y se incubaron a 37 °C durante 6 h. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se desechó y los sedimentos celulares se lavaron dos veces con solución tampón de fosfato de potasio (PBS) 0.5 mM. La suspensión celular bacteriana se preparó resuspendiendo el sedimento celular en PBS. Las suspensiones de células bacterianas lavadas se incubaron con diferentes concentraciones de ácido de hibiscus, CMSI; 1.25 mg/mL y 1.75 mg/mL para EHEC A y *Salmonella* C65, respectivamente), CMI (5 mg/mL y 7 mg/mL para EHEC A y *Salmonella* C65, respectivamente), CMI 10x (50 mg/mL y 70 mg/mL, para EHEC A y *Salmonella* C65, respectivamente), CMB (7 mg/mL) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, control positivo, 0.25 M) a 37 °C durante 60 min. Las muestras de control se prepararon de manera similar sin tratamiento. Las células se centrifugaron (10,000 rpm durante 5 min) y se suspendieron en PBS que contenía cristal violeta (CV, 10 µg/mL). La suspensión celular se incubó (10 min a 35 ± 2 °C) y se centrifugó (10,000 rpm durante 5 min). La densidad óptica (DO, 590 nm) del sobrenadante se midió usando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific, Nanodrop, Verona, Wisconsin, EE. UU.). La DO del sobrenadante de la célula normal no tratada se usó como blanco. El porcentaje de absorción de violeta cristal para todas las muestras se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Absorción de cristal violeta} = \frac{\text{Valor DO de la muestra}}{\text{Valor DO de la solución de cristal violeta}} \times 100 \quad (1)$$

6.2.11.2 Cambios en la movilidad celular

Los experimentos de movilidad se realizaron en 2 cepas de estudio (EHEC A y *Salmonella* C65). Se empleó la técnica descrita por Gill y Holley (2006), con algunas modificaciones. Se inocularon 10 µL de *Salmonella* C65 y EHEC A por separado en tubos para centrifuga con 10 mL de Caldo de Soya

Tripticaseina enriquecido con Extracto de Levadura (CST+EL) y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 18 h. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se desechó y los sedimentos celulares se lavaron dos veces con 10 mL de solución tampón de fosfato de potasio (PBS, 0.5 Mm, pH 7.4). La suspensión celular bacteriana se preparó resuspendiendo el sedimento celular en un tubo con 10 mL de PBS. Se tomó una alícuota de 350 μ L de las células bacterianas en solución tampón, se colocaron en tubos eppendorf con 350 μ L de CST + EL (2x). Tras 5 min de incubación a 20 °C, se añadió el ácido hibiscus a diferentes concentraciones (CMSI, CMI, CMB, CMI 10x). Se utilizó como control las células sin tratamiento y EDTA como control positivo. Una muestra de 10 μ L de las células bacterianas se colocaron inmediatamente en un portaobjetos de vidrio con cubreobjetos y la muestra se examinó mediante microscopio de contraste de fases con un aumento de 100x durante 10 min. Las muestras en las que la mayoría de las células se puedan observar activas se tomaron como móviles positivos. Las muestras en las cuales sólo una pequeña minoría de las células pueda mostrar movimiento se tomaron como como movilidad reducida. Las muestras en las que sólo se observe vibración de células fueron tomadas como no móviles.

6.2.11.3 Tinción de microscopía de fluorescencia

Se siguió la metodología descrita por Hameed et al. (2016) con algunas modificaciones. Las células vivas y muertas se evaluaron mediante tinción fluorescente NA / BE (Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio). Se inocularon 10 μ L de *Salmonella* C65 y EHEC A por separado en tubos para centrifuga con 3 mL de Caldo de Soya Tripticaseina y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se desechó y los sedimentos celulares se lavaron dos veces con 3 mL de solución tampón de fosfato de potasio (PBS, 0.5 Mm, pH 7.4). Las células de EHEC A y *Salmonella* C65 se trataron con ácido hibiscus a diferentes concentraciones (CMI y CMI 10x) durante 60 min a 35 ± 2 °C. Después de la incubación, las células bacterianas se obtuvieron por centrifugación, se lavaron con PBS y se tiñeron con NA / BE (1:1, a una concentración de 100 μ g / mL) durante 30 min. Después de 30 min de incubación, las células se lavaron con PBS por centrifugación y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia.

6.2.11.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El efecto potencial del ácido hibiscus sobre la morfología celular de EHEC A y *Salmonella* C65 se determinó con la ayuda de SEM (Por sus siglas en ingles). Brevemente, se inocularon 10 μ L de *Salmonella* C65 y EHEC A por separado en tubos para centrifuga con 3 mL de Caldo de Soya Tripticaseina y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 5,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se desechó y los sedimentos celulares se lavaron dos veces con 3 mL de solución tampón de fosfato de potasio (PBS, 0.5 Mm, pH 7.4). Las células bacterianas se incubaron con diferentes concentraciones de ácido hibiscus (CMI y CMI 10x) y con solución tampón (control negativo) a 35 ± 2 °C durante 3 h, y transcurrido este tiempo se lavaron se lavaron tres veces usando PBS y luego se centrifugaron a 4,500 rpm durante 25 min. El sedimento obtenido se liofilizó en una liofilizadora (Labconco, Freezone 6, 77500, Canadá). Las células liofilizadas se les aplicó un doble revestimiento con oro en un recubrimiento por pulverización catódica durante 3 min cada uno y se observaron las muestras bajo un microscopio electrónico de barrido (Oxford, Instruments, JEOL X-max^N, Japón) (Khan y Kang, 2016).

6.2.11.5 Fuga de material intracelular

El experimento se realizó de acuerdo con Tang et al. (2008) con algunas modificaciones. Se inocularon 10 μ L de *Salmonella* C65 y EHEC A por separado, en tubos para centrifuga con 3 mL de Caldo de Soya Tripticaseina y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 5,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se desechó y los sedimentos celulares se lavaron dos veces con 3 mL de solución tampón de fosfato de potasio (PBS, 0.5 Mm, pH 7.4). Las células bacterianas se incubaron con diferentes concentraciones de ácido hibiscus (CMSI, CMI, CMB, CMI 10x y EDTA) y con PBS como control a 35 ± 2 °C durante diferentes tiempos (2,4,6, 8 y 24 h). y transcurrido este tiempo se lavaron se lavaron tres veces usando PBS y luego se centrifugaron a 4,500 rpm durante 25 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 260 nm a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro UV-VIS. Los resultados se expresaron en forma de DO registrada en cada intervalo de tiempo. El experimento se realizó por triplicado.

7. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos tres veces. Los resultados obtenidos de actividad antimicrobiana *in vitro* de los 4 extractos de *H. sabdariffa* (acetona, acetato de etilo, acuoso y metanol), actividad antimicrobiana de colecciones cromatográficas de extracto acetónico y efecto antimicrobiano de ácido hibiscus fueron analizados por el programa estadístico IBM SPSS statistics 20 (USA). Los resultados obtenidos de efecto de ácido hibiscus en la sobrevivencia de cepas patógenas y para el % de captación de cristal violeta y fuga de material intracelular fueron analizados por STATISTICA (USA). Se realizó ANOVA de una sola vía seguido por la prueba de comparación de Tukey. $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Los resultados obtenidos para la expresión genética relativa de los diferentes genes se analizaron por el programa estadístico Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU). Se realizó prueba no pareada t de student de dos colas 95 % de intervalo de confianza.

8. Resultados y discusión

8.1 Obtención de extractos

Se obtuvieron un total de 15, 11, 4.6 y 3 g de extracto acuoso, metanólico, acetónico y de acetato de etilo, respectivamente, por 100 g de cálices de *H. sabdariffa* deshidratados.

8.2. Efecto antimicrobiano *in vitro* de extractos de acetato de etilo, metanol, agua y acetona

Se evaluó el efecto antimicrobiano de extractos de *Hibiscus sabdariffa* con tratamiento térmico (121 °C, 15 min, 15 lb/in²) y sin tratamiento térmico, obtenidos con 4 disolventes: acetato de etilo, metanol, agua y acetona. Los 8 extractos secos de *H. sabdariffa* con y sin tratamiento térmico presentaron efecto antimicrobiano contra las 9 cepas patógenas de *E. coli* y contra las 5 cepas patógenas de *Salmonella* multirresistentes a antibióticos como se muestra en la Tabla 4 y Tabla 5.

El análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) presentó diferencias significativas entre los tratamientos con una $P < 0.05$. Se realizó comparación de medias por la prueba de Tukey para cada uno de los patógenos.

De forma general, en la Tabla 4 se observa que el extracto metanólico sin tratamiento térmico fue el menos efectivo contra las 5 cepas de *Salmonella*. Para *Salmonella* C63 y C14 no hubo diferencia significativa entre el extracto de acetona y acetato de etilo ambos con tratamiento térmico, siendo estos dos extractos los más efectivos para dichas bacterias. Para *Salmonella* C1, C65 y C60, el extracto de acetona con tratamiento térmico fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana.

En la Tabla 5 se muestra el mismo comportamiento para el extracto metanólico, es decir fue el de menor actividad antimicrobiana contra las 9 cepas de *E. coli*, con excepción de la bacteria EC C636 en la cual el extracto metanólico sin tratamiento térmico y de acetato de etilo con tratamiento térmico no mostraron diferencia significativa siendo estos dos los menos efectivos contra esta bacteria.

Para E+TES B y EC C199, el tratamiento más efectivo fue el extracto de acetato de etilo con tratamiento térmico teniendo un halo de inhibición de 13.7 y 11.3 mm de diámetro, respectivamente.

Con respecto a EC C636 y EC C808, el extracto más efectivo fue el de acetona tratado térmicamente mostrando un halo de inhibición de 12.3 y 12.5 mm de diámetro, respectivamente. Este extracto mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Las bacterias EHEC A y EPEC MAC A fueron más sensibles al extracto de acetona y acetato de etilo ambos tratados térmicamente que al resto de los tratamientos.

En cuanto a EC C558 no hubo diferencia significativa entre los extractos de metanol, acetona y acetato de etilo, los tres tratados térmicamente demostrando tener mayor actividad antimicrobiana.

Tabla 4. Diámetros de halos de inhibición de extractos de *Hibiscus sabdariffa* producidos con 4 disolventes contra 5 cepas de *Salmonella*.

Bacteria	Extractos					
	Metano I ¹	Metanol TT ¹	Acetona ¹	Acetona TT ¹	Acetato de etilo ¹	Acetato de etilo TT ¹
<i>Salmonella</i> C14	6.9±0.1 ^a	10.3±0.6 ^{bcd}	10.1±0.1 ^{bc}	11.1±0.5 ^d	9.5±0.4 ^b	10.8±0.1 ^{cd}
<i>Salmonella</i> C1	7.8±0.1 ^a	9.6±0.2 ^b	12.6±0.1 ^d	13.7±0.2 ^e	10.1±0.2 ^b	11.4±0.3 ^c
<i>Salmonella</i> C65	8.7±0.3 ^a	11.0±0.4 ^{bc}	10.8±0.3 ^b	12.6±0.2 ^d	10.8±0.2 ^b	11.7±0.2 ^c
<i>Salmonella</i> C63	8.5±0.3 ^a	9.6±0.2 ^b	10.3±0.3 ^b	11.9±0.2 ^c	10.4±0.2 ^b	11.9±0.4 ^c
<i>Salmonella</i> C60	8.3±0.1 ^a	9.7±0.3 ^b	13.4±0.1 ^d	14.6±0.2 ^e	10.3±0.1 ^b	11.6±0.3 ^c

¹ Media de 3 réplicas del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. ^{a, b, c, d, e} Valores con letras diferentes en la misma fila por patógeno expresan diferencia significativa con $\alpha = 0.05$, prueba de Tukey. TT= tratamiento térmico a 121 °C /15 min. *Salmonella* C14= *S. Gaminara*, *Salmonella* C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65= *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63= *S. Typhimurium* y *Salmonella* C60= *S. Typhi*

No hay diferencia significativa entre el extracto de acetona con tratamiento térmico, acetato de etilo con tratamiento térmico y acetato de etilo sin tratamiento térmico para EIEC MAC B, mostrando los halos más grandes de 12.6, 12.2 y 12.3 mm de diámetro en comparación con los demás tratamientos. Para EPEC MAC B no hubo diferencia significativa entre el extracto de acetona con tratamiento térmico y acetato de etilo sin tratamiento térmico, siendo los dos tratamientos más efectivos para esta bacteria. En conclusión, de este estudio, el extracto de acetona y acetato de etilo ambos tratados térmicamente fueron los dos extractos más efectivos para la mayoría de las bacterias.

En estudios previos se ha demostrado la actividad antimicrobiana de extractos de plantas obtenidos mediante maceración con acetato de etilo, agua, metanol y acetona.

Tabla 5. Diámetros de halos de inhibición de extractos de *Hibiscus sabdariffa* producidos con 4 disolventes contra 9 cepas de *Escherichia coli*.

Bacteria	Extractos					
	Metanol ¹	Metanol TT ¹	Acetona ¹	Acetona TT ¹	Acetato de etilo ¹	Acetato de etilo TT ¹
EHEC A	7.5±0.4 ^a	10.6±0.4 ^b	10.7±0.4 ^b	11.7±0.2 ^c	10.5±0.4 ^b	12.3±0.1 ^c
E+TES B	10.1±0.2 ^a	12.5±0.3 ^c	11.5±0.2 ^b	12.6±0.3 ^c	12.5±0.3 ^c	13.7±0.2 ^d
EC C558	9.4±0.1 ^a	12.2±0.4 ^{cd}	11.8±0.1 ^c	13.0±0.7 ^d	10.6±0.4 ^b	11.9±0.2 ^{cd}
EC C636	8.8±0.2 ^a	10.6±0.3 ^b	10.4±0.5 ^b	12.3±0.2 ^c	11.2±0.3 ^b	8.7±0.3 ^a
EPEC MAC B	8.6±0.3 ^a	11.3±0.1 ^b	11.5±0.3 ^{bc}	12.7±0.6 ^d	12.4±0.2 ^{cd}	11.7±0.4 ^{bc}
EC C808	8.3±0.2 ^a	11.4±0.3 ^b	11.7±0.2 ^b	12.5±0.5 ^c	11.0±0.2 ^b	11.4±0.2 ^b
EIEC MAC B	9.5±0.4 ^a	11.6±0.2 ^{bc}	11.5±0.1 ^b	12.6±0.1 ^d	12.2±0.2 ^{cd}	12.3±0.2 ^d
EPEC MAC A	7.4±0.2 ^a	8.7±0.2 ^b	9.8±0.1 ^c	11.4±0.2 ^d	9.7±0.5 ^c	11.5±0.3 ^d
EC C199	6.8±0.3 ^a	9.5±0.4 ^b	10.0±0.2 ^{bc}	10.2±0.1 ^c	9.7±0.3 ^{bc}	11.3±0.3 ^d

¹ Media de 3 réplicas del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. ^{a, b, c, d} Valores con letras diferentes en la misma fila por patógeno expresan diferencia significativa con $\alpha = 0.05$, prueba de Tukey. TT= tratamiento térmico a 121 °C /15 min. EHEC A = *E. coli* enterohemorrágica, E+TES B= *E. coli* enterotoxigénica, EC C558, EC C636, EC C808, EC C199 = *E. coli* productora de toxina Shiga, EPEC MAC B= *E. coli* enteropatógena, EIEC MAC B = *E. coli* enteroinvasiva, y EPEC MAC A = *E. coli* enteropatógena.

Vivek et al. (2008) realizaron un estudio en el cual se evaluó el efecto inhibitorio de extracto de acetato de etilo de *Nandina domestica* Thunb. Esta planta mostró un halo de inhibición de 9 mm de diámetro para *E. coli* O157:H7 siendo menor en comparación con el extracto de acetato de etilo de *H. sabdariffa* del presente estudio, ya que se obtuvieron valores entre 9.7 y 12.5 mm de diámetro para las cepas de *E. coli*. El extracto de *Nandina domestica* Thunb no exhibió efecto antimicrobiano contra *S. Typhimurium*, mientras que el extracto de acetato de etilo de *H. sabdariffa* mostró actividad antimicrobiana contra las 5 cepas de *Salmonella* estudiadas.

Ahameethunisa y Waheeta (2012) utilizaron extracto de acetato de etilo de *Artemisia parviflora*, este extracto tuvo como resultado un halo de inhibición de 12 mm para *E. coli* O157:H7, lo que indica que esta planta presentó resultados similares a los obtenidos con extracto de acetato de etilo de *H. sabdariffa* para algunas de las cepas de *E. coli*.

Cruz- Gálvez et al. (2013) observaron el efecto de extracto metanólico de *Eucalyptus globulus*, teniendo como resultado halos de inhibición de 12 mm de diámetro para *E. coli* O157:H7, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enterotoxigénica, siendo estos halos mayores a los obtenidos por el extracto metanólico de *H. sabdariffa* para las 9 cepas de *E. coli* del presente estudio. Esta planta no exhibió halos de inhibición para *S. choleraesuis* y *S. Typhimurium*, Por otro lado, estos

autores también usaron extracto metanólico de *Chelidonium majus*, este extracto no mostró efecto antimicrobiano contra las cepas de *E. coli* ni contra cepas de *Salmonella*.

Martins et al. (2013) evaluaron el extracto metanólico de *Larrea tridentat*, el cual no presentó actividad antimicrobiana contra 2 cepas de *E. coli*.

De igual manera hay estudios que reportan el efecto antibacterial del extracto de acetona de otras plantas, Cruz-Gálvez et al (2013) hicieron un estudio para evaluar el efecto antimicrobiano de extracto acetónico de *Eucalyptus globulus*, en el cual encontraron halos de inhibición de 10 mm de diámetro para *S. choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enterotoxigénica, siendo estos halos menores a los obtenidos por el extracto metanólico de *H. sabdariffa* para algunas de las cepas de *E. coli* y *Salmonella* del presente estudio. Utilizando otro extracto de *Artemisia absinthum*, obtuvieron zonas de inhibición de 12 mm de diámetro para *S. choleraesuis*, *S. Typhimurium*, y en cambio para las cepas de *E. coli* de ensayo, esta planta no presentó actividad antimicrobiana.

Maori y Ardo (2009) reportaron efecto antimicrobiano de extracto acetónico obtenido de *Cassia arereh* con halos de inhibición de 8 y 16 mm de diámetro par *E. coli* y *Salmonella*, respectivamente. Comparado con Maori y Ardo en el 2009, el extracto acetónico de *H. sabdariffa* del presente estudio tuvo mayor efectividad contra las 9 cepas de *E. coli*, y menor actividad antimicrobiana contra las 5 cepas de *Salmonella*.

Al-Manhel y Niamah (2015) informaron la actividad antimicrobiana de extracto acuoso de hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, mostrando como resultados halos de inhibición de 10 mm (50 mg/mL) y de 13 mm (100 mg/mL). Por otro lado, Raghavendra, Mohana y Raveesha (2009) evaluaron el efecto antimicrobiano de extracto acuoso de *Anacardium occidentale* obteniendo resultados de 8.3 mm de diámetro de inhibición para *S. Typhimurium*.

La diferencia entre los resultados obtenidos en este estudio y los reportados por otros autores se puede deber a que, al utilizar otras plantas con distintos compuestos o moléculas activas, éstas presenten diferentes polaridades (Mazza, 2000). El efecto inhibitorio contra las bacterias que presentaron los extractos se puede deber a la presencia de compuestos químicos con actividad antimicrobiana como compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001).

El modo de acción de éstos compuestos fenólicos no ha sido determinado, éstos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético y se

ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afecta la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Los componentes activos pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Aligiannis et al., 2001).

El mecanismo de ataque de los antimicrobianos dentro de una célula se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes para la sobrevivencia de la célula. Puede llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética y en la síntesis de su genética. Esto puede causar daños irreparables a una célula. De varios de los antimicrobianos no se conoce aún su modo de acción, pero al actuar de forma diferente, las combinaciones de estos pueden llevar a mejores resultados (Davidson y Branen, 1993).

En estudios previos se ha demostrado la actividad antimicrobiana de extractos de *H. sabdariffa* obtenidos mediante maceración con diferentes disolventes.

EunKyung et al. (2013) hacen referencia a un estudio sobre actividad antibacteriana en microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos, en el cual emplearon dos tipos de extractos, acuoso y etanólico. Estos extractos de *H. sabdariffa* fueron evaluados contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *Escherichia coli*, obteniendo zonas de inhibición de 10.40, 16.90 y 13.63 mm de diámetro para el extracto acuoso, respectivamente. Mientras que para el extracto etanólico de obtuvieron halos de inhibición de 10.70, 18.37 y 11.73 mm de diámetro, respectivamente. El extracto acuoso utilizado por estos autores para *E. coli* tuvo un halo de inhibición de 13.63 mm, siendo un efecto antimicrobiano mayor que el obtenido en el presente estudio con extracto metanólico, metanólico con tratamiento térmico, acetónico, acetato de etilo y se obtuvieron valores similares en este estudio con el extracto acetónico y acetato de etilo, ambos con tratamiento térmico para EC C558 de 13.0 mm de diámetro de inhibición y para E+TES B de 13.7 mm de diámetro, respectivamente.

Otro estudio elaborado por Gutiérrez-Alcántara et al. (2016) demuestran el efecto antimicrobiano de los extractos *H. sabdariffa* contra cepas de *Salmonella* multirresistentes aisladas de zanahorias. Utilizaron extracto acuoso, acetato de etilo, metanol y acetona. Demostraron que todas las cepas de *S. Typhimurium*, *S. Montevideo*, *S. Gaminara*, *S. Typhi* las cuales eran multirresistentes a antibióticos fueron sensibles a los 4 extractos mencionados anteriormente, el mayor efecto inhibitorio fue demostrado por el extracto de acetona y el menor se observó en el extracto acuoso. La actividad antimicrobiana de los cálices de *H. sabdariffa* ha sido atribuida a compuestos tales como el ácido

protocatécico y antocianinas (Liu et al., 2005, Hatil y Moneer 2006, Kang et al., 2007, Olaleye 2007, Wong et al., 2010), pero ninguna investigación publicada ha identificado los compuestos específicos responsables de esta actividad. Los resultados demostrados por Gutiérrez-Alcántara et al. (2016) coinciden con los reportados en el presente estudio y los reportados anteriormente por nuestro grupo de investigación en una evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de diferentes genotipos de *Hibiscus* contra *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis* no resistentes a antibióticos (Morales-Cabrera et al., 2013). Esto sugiere que los compuestos con actividad antimicrobiana en los cálices de *H. sabdariffa* constituyen una alternativa potencial para el control de bacterias resistentes a los antibióticos como *Salmonella* y *E. coli* multirresistentes.

Se necesitarán más investigaciones para identificar los compuestos activos y sus concentraciones efectivas, entre otros factores.

Osei-Djarbeng et al. (2014) desarrollaron un estudio en el cual indican que todos los extractos de *H. sabdariffa* empleados (acuoso, metanol y éter de petróleo) exhibieron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas de ensayo. La actividad antimicrobiana más alta la presentó el extracto acuoso, seguida del metanol y la menor actividad fue dada por el extracto de éter de petróleo. Según estos autores los disolventes polares parecen ser relativamente mejores en la extracción de los principios antimicrobianos de la planta, esto difiere con los resultados obtenidos en el presente estudio debido a que la extracción con disolventes polares como el metanol y agua fueron los que de manera general presentaron menor actividad antimicrobiana, y el efecto se fue incrementando conforme la polaridad fue disminuyendo. De igual forma mencionan que la actividad antimicrobiana es más prominente contra los organismos Gram-positivos (*S. aureus* y *B. subtilis*) que contra los Gram-negativos (*E. coli* y *K. pneumonia*). Se sabe generalmente que la mayoría de los productos químicos usados contra microorganismos ejercen una actividad superior contra los Gram-positivos que contra los Gram-negativos, esto como resultado de diferencias en las estructuras de pared celular entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. La pared celular de los Gram-positivos contiene peptidoglicano que puede unirse covalentemente a otros polímeros celulares tales como ácidos teicoicos, polisacáridos y peptidoglicolípidos. Los Gram-negativos tienen compartimiento celular que es una región entre la superficie externa de la membrana interna (de plasma) y la superficie interna de la membrana externa que contiene enzimas hidrolíticas y proteínas de unión. La presencia de enzimas en la pared celular (que está ausente en bacterias Gram-positivas) es capaz de desintegrar moléculas introducidas desde fuera de la célula. Además, la porina (proteínas

de membrana) en los Gram-negativos proporciona un canal que limita el paso de compuestos hidrófilos a través de la membrana externa; por lo tanto, sirve como una barrera a las moléculas externas (Tegos et al., 2002)

Mohamed (2016) refiere que el efecto antimicrobiano de extracto metanólico de cálices de *H. sabdariffa* obteniendo como resultado halos de inhibición de 14.5 y 17.5 mm de diámetro para *E. coli* y *S. entérica*, respectivamente. En el presente estudio, utilizando extracto metanólico de cálices de *H. sabdariffa* se obtuvieron halos de inhibición que van desde 6.8 hasta 10.1 mm de diámetro en las cepas de *E. coli*, mientras que en las cepas de *Salmonella* se obtuvieron zonas de inhibición desde 6.9 hasta 8.7 mm de diámetro. Los resultados obtenidos son menores a los presentados en el estudio de Mohamed (2016), esto puede deberse a que este autor empleo una concentración de 10 mg/disco, mientras que en el presente estudio la concentración empleada fue de 2 mg/disco.

La actividad antimicrobiana observada en los extractos de *H. sabdariffa* se puede atribuir a la presencia de compuestos con un efecto antimicrobiano en las plantas. Estas sustancias antimicrobianas se pueden localizar en toda la planta o concentrarse en una parte específica de la planta, como la epidermis, el tallo, corteza, flores, hojas o raíces, Se sabe que las moléculas activas presentes en las plantas incluyen terpenos, fenoles, taninos, entre muchos otros (Beuchat et al., 1994; Tajkarimi et al., 2010).

Con respecto al tratamiento térmico que se les aplicó a los extractos metanólico, acuoso, acetónico y acetato de etilo, existe alguna información sobre lo que sucede con la actividad antimicrobiana de extractos o compuestos de plantas al someterlos al calor por esterilización. Este experimento podría ser de mucho de mucho interés para la industria de los alimentos, debido a que los compuestos podrían ser capaz de resistir temperaturas de pasteurización, esterilización o cualquier proceso de tratamiento térmico. La explicación al respecto se limita a especular que la temperatura de esterilización forma nuevas estructuras, ya sea por la formación en una molécula de nuevos enlaces o ruptura de enlaces o por la formación de nuevas moléculas por la interacción de 2 o más moléculas. No obstante, es necesario estudios químicos al respecto para determinar específicamente lo que está ocurriendo.

En el caso de la comparación de extractos de *H. sabdariffa* de metanol con extracto de metanol con tratamiento térmico, se muestra el incremento de la actividad antimicrobiana en las 14 cepas de estudio, para la comparación de acetona con extracto de acetona tratado térmicamente se observa el mismo comportamiento para todas las cepas con excepción de la EC C199, en la cual no hubo diferencia significativa entre estos dos extractos, mientras que para el extracto de acetato de etilo y

acetato de etilo con tratamiento térmico se observa incremento de actividad antimicrobiana al someter el extracto a esterilización, con excepción de EPEC MAC B, EC C808 y EIEC MAC A que no mostraron diferencia significativa entre ambos extractos y EC C636, se presentó una disminución de la actividad antimicrobiana al ser sometido a tratamiento térmico (Tabla 4 y Tabla 5).

Hsieh et al. (2001) evaluaron el efecto de la temperatura en la actividad antimicrobiana de un extracto etanólico combinado de canela y cebollín chino. Para estudiar su estabilidad térmica, el extracto combinado se procesó a 60, 80, 100 o 121°C durante 0, 5, 10, 15 y 20 min. El extracto fue estable al tratamiento térmico y su efecto inhibitorio contra *E. coli* incluso mejoró ligeramente después del tratamiento durante 20 min. Estos autores suponen que la eficacia se debe a la ligera concentración del extracto mixto como resultado de la evaporación.

Hashemi et al. (2008) reportan un estudio donde evaluaron la actividad antimicrobiana de extracto acuoso de *Euphorbia hirta* sin esterilización y con esterilización en autoclave a 121 °C, dichos extractos evaluados contra *S. aureus*. El extracto sin esterilización mostró un halo de inhibición de 19.76 mm de diámetro, mientras que el extracto con esterilización presentó un halo de 12.76 mm de diámetro. Se cree que las altas temperaturas causan daños estructurales graves y, en consecuencia, la pérdida parcial o total de propiedades importantes (Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005).

En un estudio elaborado por Chao y Yin (2009) mostraron que después del tratamiento a 75 y 100 °C, el extracto acuoso de cálices de *H. sabdariffa* disminuyó significativamente la actividad antibacteriana. Para *E. coli* se exhibieron halos de inhibición de 23, 21, 15 y 10 mm de diámetro para 25, 50, 75 y 100 °C. Para *S. Typhimurium* se mostraron halos de 21, 20, 13 y 9 mm de diámetro para las temperaturas mencionadas anteriormente. Sin embargo, los tratamientos térmicos de 50 y 75 °C no afectaron significativamente la actividad antibacteriana del extracto etanólico de cálices de *H. sabdariffa*, como es el caso del tratamiento contra *E. coli*, en el que se mostraron zonas de inhibición de 29, 30, 28 y 21 mm de diámetro para 25, 50, 75 y 100 °C, respectivamente. Mientras que para *S. Typhimurium* se obtuvieron halos de 26, 25, 24 y 19 mm, respectivamente.

Extractos de *H. sabdariffa* fueron empleados como un enjuague para hot dogs, los cuales fueron inoculados con dos cepas de estudio, los autores mencionan que la actividad antibacteriana no se vio afectada por calentamiento a vapor (121 °C, 30 min), y que la actividad puede ser atribuida a la presencia de ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, alcaloides y antocianinas. Destacando la presencia de la gositetina y el ácido protocatéuico (Higginbotham et al., 2014b).

Por consiguiente, se anticipa que esta ventaja de la estabilidad térmica permitirá que los diferentes extractos de *H. sabdariffa* sea un aditivo alimentario potencial para su uso en un procesamiento donde se desee un tratamiento térmico, ya sea en autoclave o en ebullición.

8.3. Obtención de colecciones cromatográficas a partir del extracto acetónico

Como se mencionó a arriba, el rendimiento que se obtuvo de extracto acetónico seco fue de 4.6 %, de tal manera que por 2 kg de cálices deshidratados se obtuvieron 92.5 g de extracto acetónico seco. El extracto acetónico fue separado por cromatografía en columna. Así, se obtuvieron 903 fracciones con distintas mezclas de disolventes de hexano, acetato de etilo y metanol (Tabla 6). Las 903 fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina; las fracciones con igual o semejante cromatograma se agruparon en lo que se le denominó “colección de fracciones”. De los 92.5 g de extracto acetónico obtuvieron en total 25 colecciones de fracciones cromatográficas (Tabla 7). A las 25 colecciones se les determinó su efecto antimicrobiano (Tabla 8 y Tabla 9).

8.4. Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de las colecciones cromatográficas contra bacterias patógenas

De las 25 colecciones de fracciones cromatográficas (I-XXV, Tabla 7) obtenidas del extracto acetónico de *H. sabdariffa*, 17 y 15 colecciones presentaron efecto antimicrobiano contra las cepas de *Salmonella* y *E. coli* multiresistentes a antibióticos, respetivamente (Tabla 8). La colección VI, solo fue efectiva contra *Salmonella* C1 y *Salmonella* C65 y la colección VII, solo contra *Salmonella* C65 (Tabla 8); mientras que las colecciones XIX, XX y XXIII no presentaron efecto antimicrobiano contra EPEC MAC B, la colección XXII no presentó efecto antimicrobiano contra E+TES B, EC C558, EC C636, EPEC MAC B, EC C808, EPEC MAC B (Tabla 9). Finalmente, las colecciones I, II, III, IV, V, VIII, XXIV y XXV no presentaron efecto antimicrobiano contra ninguna bacteria de patógena.

En general, se observan diferencias estadísticamente significativas en el efecto antimicrobiano de las colecciones de fracciones cromatográficas por cepa patógeno (Tabla 8 y Tabla 9).

Es importante resaltar que las 17 colecciones de fracciones con actividad antimicrobiana se obtuvieron con fases móviles (disolventes) de diferentes polaridades obtenidas por las mezclas de los diferentes

disolventes a las distintas proporciones; por tal motivo, es de esperar compuestos químicos con diferentes polaridades en cada una de las colecciones de fracciones cromatográficas. En consecuencia, los resultados sugieren que existen diferentes compuestos químicos con actividad antimicrobiana en las colecciones de fracciones cromatográficas obtenidas a partir del extracto acetónico de *H. sabdariffa* que actúan individualmente o en combinación con otros compuestos químicos presentes en la colección cromatográfica.

Tabla 6. Fracciones obtenidas de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

Fracciones	Relación de disolvente utilizada como fase móvil
1-37	Hexano
38-59	90-10 % Hexano-acetato de etilo
60-131	80-20 % Hexano-acetato de etilo
132-277	70-30 % Hexano-acetato de etilo
278-348	60-40 % Hexano-acetato de etilo
349-396	50-50 % Hexano-acetato de etilo
397-441	40-60 % Hexano-acetato de etilo
442-486	30-70 % Hexano-acetato de etilo
487-535	20-80 % Hexano-acetato de etilo
536-572	10-90 % Hexano-acetato de etilo
573-616	100 % Acetato de etilo
617-660	90-10 % Acetato de etilo-metanol
661-693	80-20 % Acetato de etilo-metanol
694-731	70-30 % Acetato de etilo-metanol
732-771	60-40 % Acetato de etilo-metanol
772-794	50-50 % Acetato de etilo-metanol
795-810	40-60 % Acetato de etilo-metanol
811-842	30-70 % Acetato de etilo-metanol
843-868	20-80 % Acetato de etilo-metanol
869-886	10-90 % Acetato de etilo-metanol
887-903	100 % Metanol

Existen algunos estudios sobre el efecto antimicrobiano de fracciones cromatográficas obtenidas de diversas plantas con mezclas de disolventes de diferentes polaridades.

Ávila et al. (2010) obtuvo y fraccionó el extracto de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer), usando cloroformo y mezclas de cloroformo-acetona (70:30, v/v), cloroformo-acetona (30:70, v/v), acetona-metanol (70:30, v/v) y acetona-metanol (30:70, v/v) como fases móviles.

Posteriormente, evaluaron la actividad antimicrobiana de las colecciones de fracciones cromatográficas contra *E. coli*. Si bien, la mayoría de las colecciones cromatográficas presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, no obstante, se observó que conforme aumenta la polaridad de las colecciones, el efecto antimicrobiano disminuye. De acuerdo con esa observación, las colecciones de polaridad baja e intermedia mostraron el mayor efecto antimicrobiano en el presente estudio (Tabla 6, Tabla 7 y Tabla 8). Por otro lado, Kuete et al. (2011) determinaron que el extracto metanólico de *Ficus polita* (FP) tuvo efecto antimicrobiano con *S. Typhi* (ATCC 6539) y dos cepas de *E. coli* (ATCC 8739 y AG100). Además, los investigadores probaron 5 fracciones cromatográficas de FP (FPR1-FPR5), obtenidas utilizando diferentes fases móviles: hexano (FPR1); 72:25 (v/v) hexano-acetato de etilo (FPR2); 50:50 (v/v) hexano-acetato de etilo (FPR3); acetato de etilo (FPR4); metanol (FPR5). De las 5 fracciones, solo las de baja polaridad (FPR1 Y FPR2) exhibieron actividad antimicrobiana contra las cepas patógenas de estudio.

Recientemente, Do et al. (2016) también investigaron el efecto antimicrobiano de 5 colecciones de fracciones cromatográficas obtenidas del extracto metanólico de *H. sabdariffa* utilizando diferentes mezclas de disolventes como fases móviles: 50 % Hexano y 50 % acetato de etilo (CF1); 30 % Hexano y 70 % acetato de etilo (CF2); 90 % acetato de etilo y 10 % de metanol (CF3); 60 % acetato de etilo y 40% de metanol (CF4) y 70 % acetato de etilo y 30 % de metanol (CF5). De estas colecciones, se encontró que la CF3 mostró efecto antimicrobiano contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* y *B. subtilis* y CF4 y CF5, solo contra *S. aureus* y *B. subtilis*. Además, estos investigadores, encontraron que solo la CF3, que mostró la mayor acción antimicrobiana, contenía el flavonoide quercetina, entre otros compuestos no identificados, por lo que ellos sugirieron que la quercetina podría ser el compuesto responsable del efecto antimicrobiano de la colección CF3. No obstante, cabe señalar que en su estudio ellos no demostraron o comprobaron que efectivamente la quercetina contenida en esa colección CF3 y a la concentración en que estaba presente, fue la responsable del efecto antimicrobiano observado. Además, ellos también encontraron en la colección CF3 otros compuestos químicos que no identificaron y que en total estaban en mayor concentración que la quercetina. Por lo que es posible que los responsables del efecto antimicrobiano de la colección CF3 podrían haber sido los otros compuestos mayormente presentes y no la quercetina, o de un efecto sumario de diferentes

compuestos, incluida la quercetina. En tal caso, sería importante establecer realmente cuales son las moléculas responsables del efecto antimicrobiano nos solo de la colección CF3, también de las otras dos colecciones (CF4 y CF5) y en general del extracto metanólico de *H. sabdariffa* que ellos utilizaron.

Tabla 7. Colecciones de fracciones de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* obtenidas por cromatografía en capa fina.

Colección	Fracción	Colección	Fracción
I	1-42	XIV	285-379
II	43-46	XV	380-407
III	47-59	XVI	408-447
IV	60-62	XVII	448-473
V	63-68	XVIII	474-564
VI	69-107	XIX	565-584
VII	108-116	XX	585-620
VIII	117-132	XXI	621-695
IX	133-155	XXII	696-740
X	156-176	XXIII	741-792
XI	180-200	XXIV	793-867
XII	201-256	XXV	868-903
XIII	257-284		

En nuestro estudio, en general, las colecciones IX, X, XI, XIII y XIV fueron las que mostraron mayor actividad antimicrobiana; estas colecciones de fracciones se obtuvieron en las polaridades obtenidas con las mezclas de 70 % hexano-30 % acetato de etilo, 60 % hexano-40 % acetato de etilo y 50 % hexano-50 % acetato de etilo (Tabla 6 y Tabla 7).

Es importante señalar que en las colecciones de fracciones IX, X, XI (y también en la XII) se formaron cristales definidos. Estas 4 colecciones de fracciones fueron obtenidas con 70 % hexano y 30 % acetato de etilo como fase móvil (Tabla 6 y Tabla 7). Como el análisis preliminar de estos cristales mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), sugirió la presencia del ácido hibiscus (y de otros compuestos), se realizó una segunda separación cromatográfica a partir de otra muestra (230g) de

extracto acetónico seco para obtener una mayor concentración de los cristales con la finalidad de purificarlos. El objetivo fue confirmar la presencia del ácido hibiscus mediante diferentes técnicas de análisis estructural y para determinar el efecto antimicrobiano del ácido hibiscus aislado. Por lo que, la segunda separación en columna del extracto acetónico se enfocó en obtener los cristales de la mezcla como fase móvil de 70 % hexano y 30 % acetato de etilo, para posteriormente aislar el ácido hibiscus puro.

Tabla 8. Efecto antimicrobiano *in vitro* de colecciones cromatográficas de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* contra 5 cepas patógenas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos

Colección ¹	<i>Salmonella</i> C14 ²	<i>Salmonella</i> C1 ²	<i>Salmonella</i> C65 ²	<i>Salmonella</i> C63 ²	<i>Salmonella</i> C60 ²
VI	- ^a	7.0±0.2 ^a	7.2±0.4 ^a	- ^a	- ^a
VII	- ^a	- ^b	7.5±0.1 ^{ab}	- ^a	- ^a
IX	10.4±0.2 ^e	10.8±0.2 ^g	12.6±0.2 ^{gh}	13.3±0.2 ⁱ	12.5±0.1 ^h
X	12.8±0.2 ^h	13.5±0.4 ^h	11.5±0.4 ^f	13.3±0.2 ⁱ	11.2±0.2 ^g
XI	11.3±0.2 ^{fg}	13.5±0.2 ^h	11.6±0.2 ^{fg}	15.2±0.1 ^j	12.4±0.2 ^h
XII	10.7±0.3 ^{ef}	11.1±0.6 ^g	12.6±0.2 ^{gh}	10.1±0.1 ^{defgh}	11.2±0.4 ^g
XIII	12.1±0.5 ^{gh}	10.5±0.3 ^{fg}	15.2±0.5 ⁱ	11.0±0.1 ^h	11.3±0.3 ^g
XIV	10.4±0.2 ^e	10.9±0.4 ^g	11.9±0.5 ^{fg}	10.7±0.6 ^{gh}	11.6±0.3 ^{gh}
XV	11.4±0.4 ^{fg}	10.8±0.4 ^g	13.5±0.2 ^h	10.5±0.3 ^{fgh}	9.7±0.3 ^{def}
XVI	9.1±0.1 ^d	9.5±0.1 ^{def}	9.7±0.4 ^e	9.8±0.4 ^{defg}	10.2±0.7 ^f
XVII	10.4±0.4 ^e	9.1±0.2 ^{cde}	9.7±0.3 ^e	9.5±0.4 ^{de}	9.8±0.2 ^{ef}
XVIII	8.8±0.1 ^{cd}	9.4±0.6 ^{de}	9.6±0.3 ^e	9.6±0.5 ^{def}	8.9±0.5 ^{cde}
XIX	7.9±0.1 ^{bc}	8.7±0.2 ^{cde}	8.5±0.7 ^{bcd}	9.3±0.3 ^{cd}	8.1±0.1 ^{bc}
XX	8.6±0.2 ^{cd}	8.9±0.4 ^{cde}	9.5±0.01 ^{de}	9.9±0.1 ^{defg}	9.4±0.3 ^{def}
XXI	8.7±0.5 ^{cd}	8.1±0.1 ^c	8.8±0.3 ^{cde}	8.3±0.2 ^b	7.7±0.2 ^b
XXII	7.5±0.5 ^b	8.5±0.4 ^{cd}	8.3±0.2 ^{bc}	8.6±0.2 ^{bc}	8.2±0.3 ^{bc}
XXIII	8.6±0.3 ^{cd}	9.6±0.5 ^{ef}	9.1±0.4 ^{cde}	10.3±0.2 ^{efgh}	8.9±0.1 ^{cd}

¹ Colecciones cromatográficas que no mostraron efecto contra al menos un microorganismo no son mostradas en la tabla. ² Media de 3 réplicas del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. - Sin efecto antimicrobiano. ^{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j} Valores con letras diferentes en la misma columna por patógeno expresan diferencia significativa con $\alpha = 0.05$, prueba de Tukey. *Salmonella* C14= *S. Gaminara*, *Salmonella* C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65= *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63= *S. Typhimurium* y *Salmonella* C60= *S. Typhi*

Tabla 9. Efecto antimicrobiano *in vitro* de colecciones cromatográficas de extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa* contra 9 cepas de *Escherichia coli*

Colección ¹	EHEC A ²	E+TES B ²	EC C558 ²	EC C636 ²	EPEC MAC B ²	EC C808 ²	EIEC MAC B ²	EPEC MAC A ²	EC C199 ²
IX	11.9±0.2 ^{fg}	NE	9.3±0.2 ^{bcd}	10.1±0.5 ^{efg}	NE	11.9±0.5 ⁱ	12.2±0.3 ^h	12.0±0.4 ^h	10.9±0.7 ^{fg}
X	12.3±0.2 ^g	NE	11.5±0.2 ^g	11.6±0.7 ^h	NE	11.3±0.2 ^{ghi}	11.6±0.6 ^{fgh}	12.4±0.2 ^h	11.5±0.3 ^{fg}
XI	14.2±0.2 ^h	NE	11.5±0.3 ^g	13.2±0.3 ⁱ	NE	13.1±0.1 ^j	12.5±0.4 ^h	11.5±0.2 ^{gh}	11.8±0.3 ^g
XII	9.6±0.5 ^{de}	10.4±0.3 ^{ef}	11.8±0.3 ^g	10.2±0.2 ^{efg}	9.6±0.3 ^c	10.3±0.6 ^{efg}	10.5±0.6 ^{cd}	9.6±0.5 ^{bc}	10.8±0.6 ^{efg}
XIII	11.5±0.3 ^f	11.3±0.4 ^f	11.4±0.3 ^{fg}	10.9±0.1 ^g	11.4±0.2 ^e	11.8±0.4 ^{hi}	11.8±0.5 ^e	11.0±0.3 ^d	11.2±0.4 ^{fg}
XIV	10.2±0.3 ^e	10.5±0.1 ^{ef}	11.5±0.4 ^g	9.8±0.4 ^{def}	10.6±0.5 ^{de}	11.7±0.1 ^{hi}	10.5±0.1 ^{cd}	10.3±0.5 ^{cd}	9.7±0.2 ^{cd}
XV	9.6±0.3 ^{de}	10.5±0.2 ^{ef}	9.6±0.5 ^{cde}	10.6±0.4 ^{fg}	10.7±0.4 ^{de}	10.8±0.4 ^{fgh}	11.1±0.5 ^{de}	9.6±0.1 ^{bc}	9.5±0.5 ^{bcd}
XVI	9.9±0.1 ^e	10.4±0.2 ^{ef}	10.4±0.3 ^{ef}	9.6±0.4 ^{de}	10.7±0.3 ^{de}	10.1±0.6 ^{def}	10.1±0.1 ^{bcd}	10.4±0.1 ^{cd}	9.7±0.1 ^{cde}
XVII	10.0±0.4 ^e	9.4±0.4 ^{cd}	9.7±0.1 ^{cde}	9.8±0.4 ^{def}	8.9±0.2 ^{bc}	9.5±0.2 ^{cde}	10.3±0.7 ^{cd}	9.4±0.7 ^{bc}	10.4±0.3 ^{def}
XVIII	9.1±0.2 ^{cd}	8.8±0.2 ^c	10.1±0.7 ^{de}	9.6±0.1 ^{de}	9.7±0.6 ^{cd}	9.0±0.4 ^{bc}	9.9±0.6 ^{bcd}	8.8±0.2 ^{ab}	8.8±0.6 ^{abc}
XIX	8.4±0.3 ^{bc}	9.1±0.2 ^{cd}	9.3±0.2 ^{bcd}	7.4±0.5 ^b	- ^a	9.0±0.2 ^{bc}	9.5±0.4 ^{bc}	7.8±0.1 ^a	8.3±0.2 ^a
XX	9.0±0.2 ^{cd}	9.8±0.6 ^{de}	9.2±0.3 ^{bcd}	8.2±0.1 ^{bc}	- ^a	9.2±0.2 ^{bcd}	9.3±0.1 ^{bc}	8.8±0.1 ^{ab}	8.8±0.3 ^{abc}
XXI	7.8±0.2 ^{ab}	7.5±0.2 ^b	8.3±0.3 ^b	8.6±0.4 ^c	8.4±0.3 ^b	9.6±0.3 ^{cde}	9.1±0.1 ^b	8.9±0.4 ^b	8.9±0.1 ^{abc}
XXII	7.5±0.2 ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	10.0±0.2 ^{cd}	8.5±0.6 ^{ab}
XXIII	8.6±0.1 ^c	8.7±0.4 ^c	8.9±0.5 ^{bc}	9.1±0.1 ^{cd}	- ^a	8.2±0.5 ^b	9.0±0.7 ^b	10.1±0.3 ^{cd}	9.0±0.1 ^{abc}

¹ Colecciones cromatográficas que no mostraron efecto contra al menos un microorganismo no son mostradas en la tabla. ² Media de 3 réplicas del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. - Sin efecto antimicrobiano. NE= No evaluado hasta el momento. ^{a, b, c, d} Valores con letras diferentes en la misma columna por patógeno expresan diferencia significativa con $\alpha = 0.05$, prueba de Tukey. EHEC A = *E. coli* enterohemorrágica, E+TES B = *E. coli* enterotoxigénica, EC C558, EC C636, EC C808, EC C199 = *E. coli* productora de toxina Shiga, EPEC MAC B = *E. coli* enteropatógena, EIEC MAC B = *E. coli* enteroinvasiva y EPEC MAC A = *E. coli* enteropatógena

8.5 Obtención de cristales presuntivos de ácido hibiscus a partir del extracto acetónico de cálices de *H. sabdariffa*

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.2.4 se obtuvieron en total 413 fracciones (Tabla 10) con hexano solo (17 fracciones) mezcla de 90 % hexano y 10 % acetato de etilo (52 fracciones), mezcla de 80 % hexano y 20 % acetato de etilo (61 fracciones) y con mezcla de 70 % hexano y 30 % acetato de etilo (283 fracciones). Estas fracciones cromatográficas se agruparon en 4 colecciones (Tabla 11). Después de la purificación, se obtuvieron 65 g de ácido hibiscus (Colección IV; 113-413) de 230 g de extracto acetónico de cálices *H. sabdariffa* (1.3 % de rendimiento a partir de 5 kg de cálices deshidratados). Adicionalmente estos cristales se caracterizaron por RMN, espectroscopia de infrarrojo y cristalografía de rayos X, como se describe en la sección 8.6, para identificar la estructura del ácido hibiscus.

Tabla 10. Fracciones obtenidas de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

Fracciones	Relación de disolvente utilizada como fase móvil
1-17	Hexano
18-69	90-10 % Hexano-acetato de etilo
70-130	80-20 % Hexano-acetato de etilo
131-413	70-30 % Hexano-acetato de etilo

Tabla 11. Colecciones de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* reunidas por cromatografía en capa fina

Colección	Fracción
I	1-19
II	20-75
III	76-141
IV	142-413

8.6. Identificación estructural

8.6.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Al extracto de acetona y a los cristales presuntivos de ácido hibiscus obtenidos de los cálices de *H. sabdariffa* se les realizó RMN, donde las señales aparecen como desplazamientos químicos respecto a un estándar, la escala está representada en la escala δ (delta), donde un δ equivale a 1 ppm (partes por millón). La escala donde aparecen mayoría de las señales de protones (^1H) varían entre 0 y 12 ppm.

8.6.1.1. Espectro de RMN de ^1H del extracto de acetona de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

En el espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto acetónico de cálices de *H. sabdariffa* (Figura 3) se observa la señal correspondiente al disolvente deuterado (acetona- d_6), la cual, aparece a 2.05 ppm. En la región comprendida de 0 a 1.5 ppm se observan los protones de alcanos. De 1.5 a 2.5 ppm se pueden encontrar compuestos bencílicos o alílicos, vecinos de un carbonilo. En la región de 2.6 a 3.3 ppm se observa un par de señales dobles pertenecientes a hidrógenos cercanos a carbonilos. Por último, la señal que aparecen 5.34 ppm corresponde a un protón ubicado en la posición α al éster en un carbono con oxígeno.

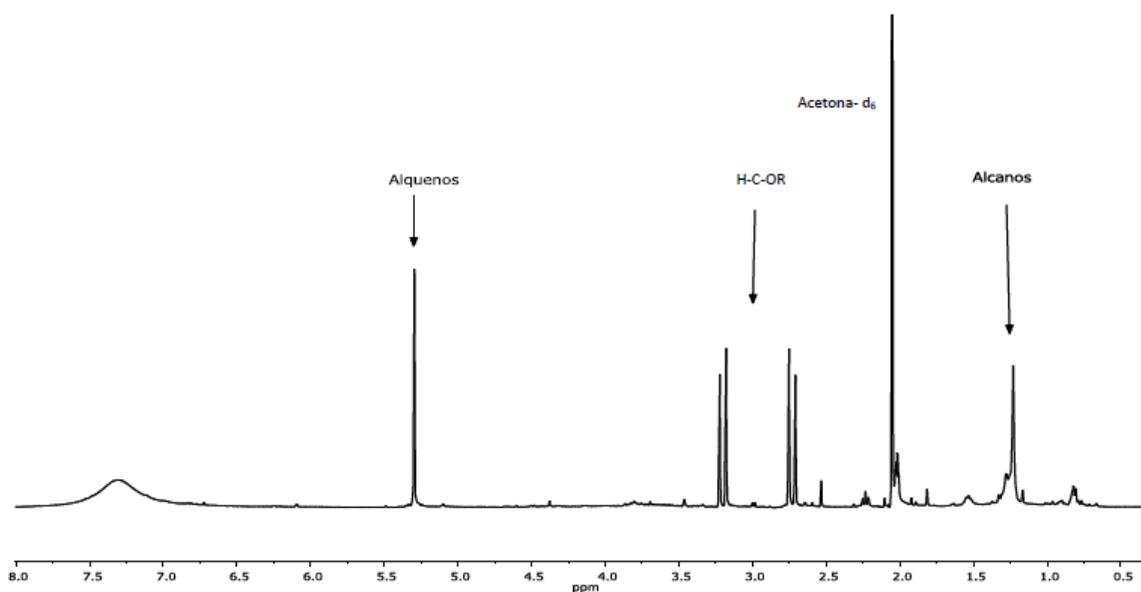


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en acetona- d_6 del extracto de acetona de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

8.6.1.2 Espectro de RMN de ^1H de ácido hibiscus de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

El espectro de RMN de ^1H de los cristales presuntivos de ácido hibiscus aislados y purificados corresponden al de la estructura molecular del ácido hibiscus (Figura 4). La mayoría de las señales de protones (^1H) aparecieron entre 0 y 12 (δ_{H}). La señal observada a δ_{H} 2.05 corresponde a la acetona deuterada (acetona- d_6) utilizada para disolver los cristales presuntivos de ácido hibiscus. Las otras señales δ_{H} fueron: 5.34 (^1H , simple [s], CH-COOH , α), 4.16 (^1H , s, COH-COOH), 3.25 (^1H , doble [d], $j=17.2$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$, α), 2.77 (^1H , d, $j=17.2$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$, β), donde j es la constante de acoplamiento. En consecuencia, las señales del espectrograma que se muestran en la Figura 3 corresponden a la estructura molecular del ácido hibiscus y el disolvente deuterado utilizado como vehículo.

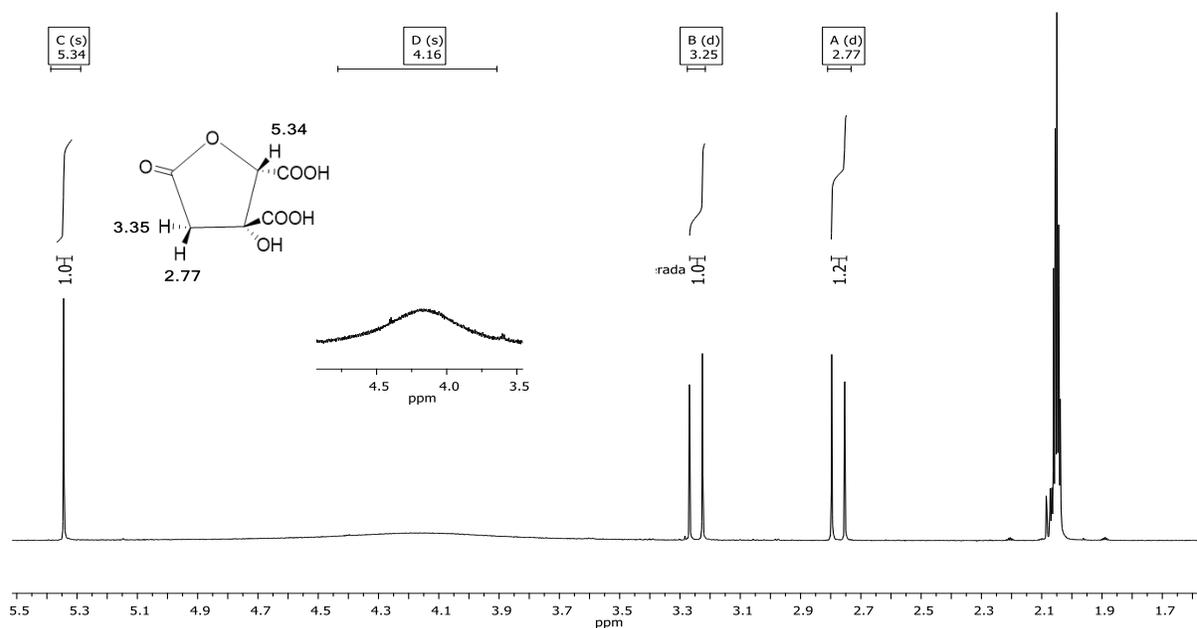


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en acetona- d_6 de cristales purificados obtenidos de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

Ibnusaud et al. (2002), realizaron un análisis de RMN (400 MHz) de la estructura del ácido hibiscus utilizando acetona- d_6 para disolver los cristales, detectando las siguientes señales a δ_{H} 5.38 (^1H , s, CH-COOH), 3.30 (^1H , d, $j=17.1$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$), 2.80 (^1H , d, $j=17.2$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$).

En análisis anteriores de ^1H NMR del ácido hibiscus obtenido a partir de extractos de cálices de *H. sabdariffa*, los cristales se disolvieron en agua deuterada (D_2O) (He y Roller, 2011), dimetilsulfoxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) (Zheoat et al., 2017) y metanol deuterado ($\text{metanol-}d_4$) (Rasheed et al., 2018). Los espectrogramas resultantes mostraron dos dobletes a δ_{H} 2.88 y 3.41, ($J = 18.4$ Hz) (He y Roller, 2011); señales a δ_{H} 5.31 (1H, s), 3.23 (1H, d, $J = 17.19$ Hz) y 2.77 (1H, d, $J = 17,18$ Hz) (Zheoat et al., 2017); y señales a δ_{H} 5.25 (1H, s), 3.20 (1H, d, $J = 17.3$ Hz) y 2.69 (1H, d, $J = 17.3$ Hz) (Rasheed et al., 2018). En este contexto, las señales publicadas por Ibnusaud et al. (2002) y Rasheed et al. (2018) son más similares a los obtenidos en el presente trabajo (Figura 4).

8.6.1.3. Espectro de RMN de ^1H de ácido hibiscus de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* con tratamiento térmico por esterilización

Con la finalidad de observar el efecto que tiene el calor sobre la estructura del ácido hibiscus se realizó un análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en ácido hibiscus tratado térmicamente a 121 °C, 15 min y 15 lb/in² y a 121 °C, 1 h y 15 lb/in².

En la Figura 5, se observa que al someter al ácido hibiscus a tratamiento térmico por 15 min y realizar el análisis de RMN, aparecen las señales características del ácido hibiscus reportadas en la sección 8.6.1.2, y además aparecen dos nuevas señales de protón (^1H), δ_{H} 4.36 y 2.97, lo que indica que con el tratamiento térmico se está generando un nuevo compuesto. Estos resultados podrían justificar el mayor efecto antimicrobiano en algunas cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella*, ya que posiblemente se esté ejerciendo un efecto sinérgico entre el ácido hibiscus y el nuevo compuesto.

El espectro de protón del tratamiento térmico por 1 h se muestra en la Figura 6, en el cual se muestra las señales características del ácido hibiscus y las dos nuevas señales δ_{H} 4.36 y 2.97 ppm, este segundo estudio a 1 h se realizó con la finalidad de observar si al aumentar el tiempo de tratamiento térmico se ocasionaba algún efecto sobre estas dos señales nuevas, sin embargo se puede observar que el efecto es el mismo al tratar térmicamente al ácido hibiscus a 15 min que a 1 h.

Rasheed et al. (2018) realizaron un estudio en el cual realizaron un análisis comparativo de extractos fríos y calientes de *H. sabdariffa* (roselle) con respecto a su potencial para la inhibición de la α -glucosidasa y en este estudio al analizar extracto metanólico de *H. sabdariffa* encontraron las señales características de ácido hidroxycítrico, las cuales son δ_{H} 4.36 y 2.97.

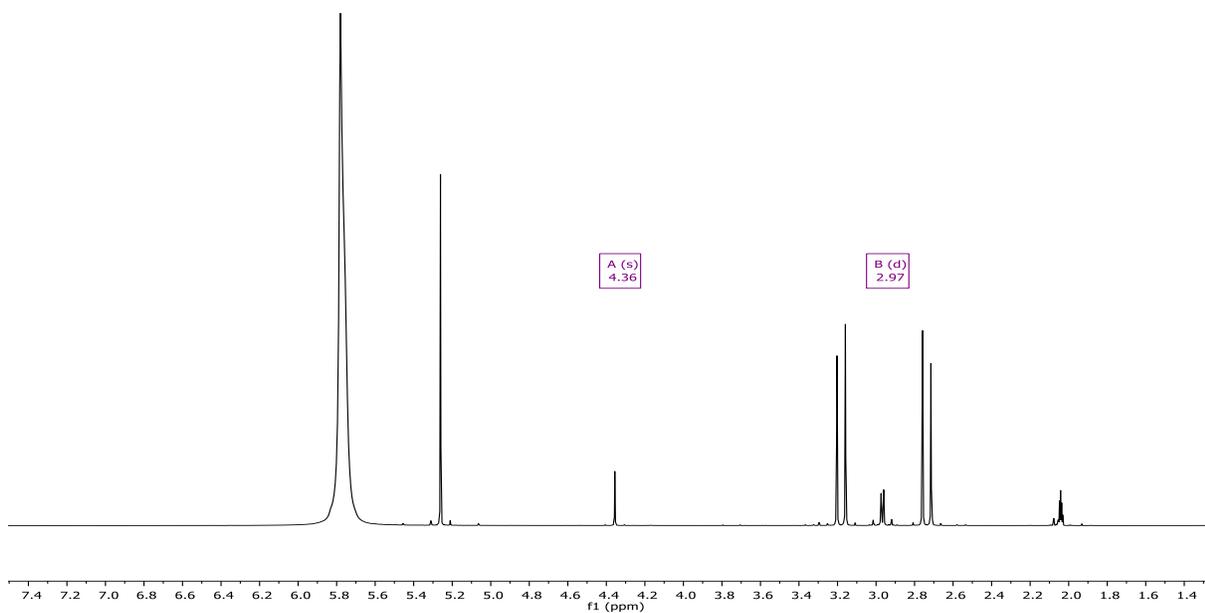


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en acetona- d_6 de ácido hibiscus de cálices de *Hibiscus sabdariffa* con tratamiento a 121 °C, 15 min y 15 lb/in 2 .

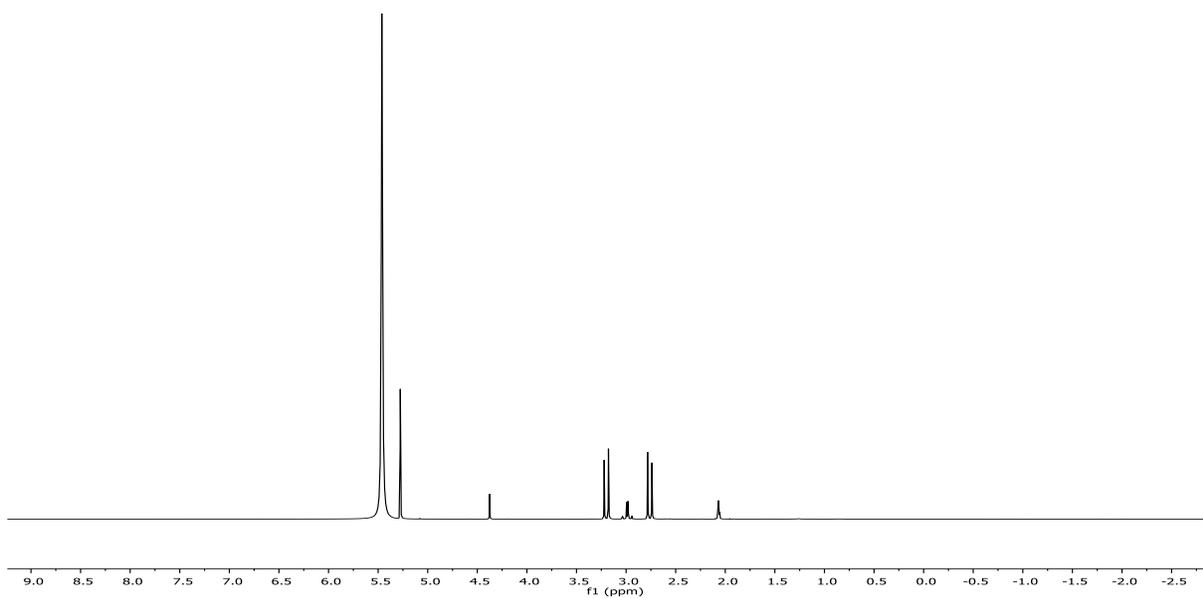


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en acetona- d_6 de ácido hibiscus de cálices de *Hibiscus sabdariffa* con tratamiento a 121 °C, 1 h y 15 lb/in 2 .

Estas señales coinciden con el compuesto que se formó por tratamiento térmico a 15 min y 1 h (Figura 5 y

Figura 6) con lo que se puede concluir es que con tratamiento térmico en autoclave se puede formar ácido hidroxycítrico a partir de ácido hibiscus.

Otro estudio elaborado por Venkateswara et al en el 2010, lograron convertir ácido hibiscus en ácido hidroxycítrico a 80 °C por 4 hrs, esta conversión se detuvo después de alcanzar el equilibrio del 60 % de ácido hidroxycítrico al 40 % de ácido hibiscus que se controló por HPLC.

8.6.2. Espectroscopía de infrarrojo de ácido hibiscus de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

El espectro de infrarrojo (IR) de los cristales del ácido hibiscus que se obtuvieron se muestra en la Figura 7, la señal que aparece a 3410 cm^{-1} con una transmitancia de 0.6427 pertenece al grupo OH. La banda de absorción infrarroja a 1797 cm^{-1} con una transmitancia de 0.2334 corresponde a un grupo éster, mientras que la banda en 1742 cm^{-1} con transmitancia de 0.2555 corresponde al estiramiento de C=O. Ibnusaud et al. (2002) analizaron mediante IR al ácido hibiscus y obtuvieron un espectro con señales a valores de 3400, 1790 y 1735 cm^{-1} , las cuales coinciden con las señales obtenidas en el presente estudio (Figura 7). El espectro de la Figura 8 pertenece al ácido hibiscus tratado térmicamente a 121 °C, 15 min y 15 lb/in².

Aunque la espectroscopia de infrarrojo solo nos indica los grupos funcionales que presenta una molécula, en el espectro mostrado se puede observar que de forma general se están ampliando las señales características lo que nos podría indicar que se está aumentando los grupos funcionales OH y éster, por lo tanto, nos podría indicar la presencia de un nuevo compuesto como el ácido hidroxycítrico. Por otro lado, Ravikumar et al. (2017) hacer referencia en su estudio a un espectro FTIR de ácido hidroxycítrico obtenido de la corteza de *G. cambogia*, el cual mostró un patrón de señales entre 1600 y 1070 cm^{-1} , con las cuales, estos investigadores confirmaron la presencia del ácido hidroxycítrico (Figura 9).

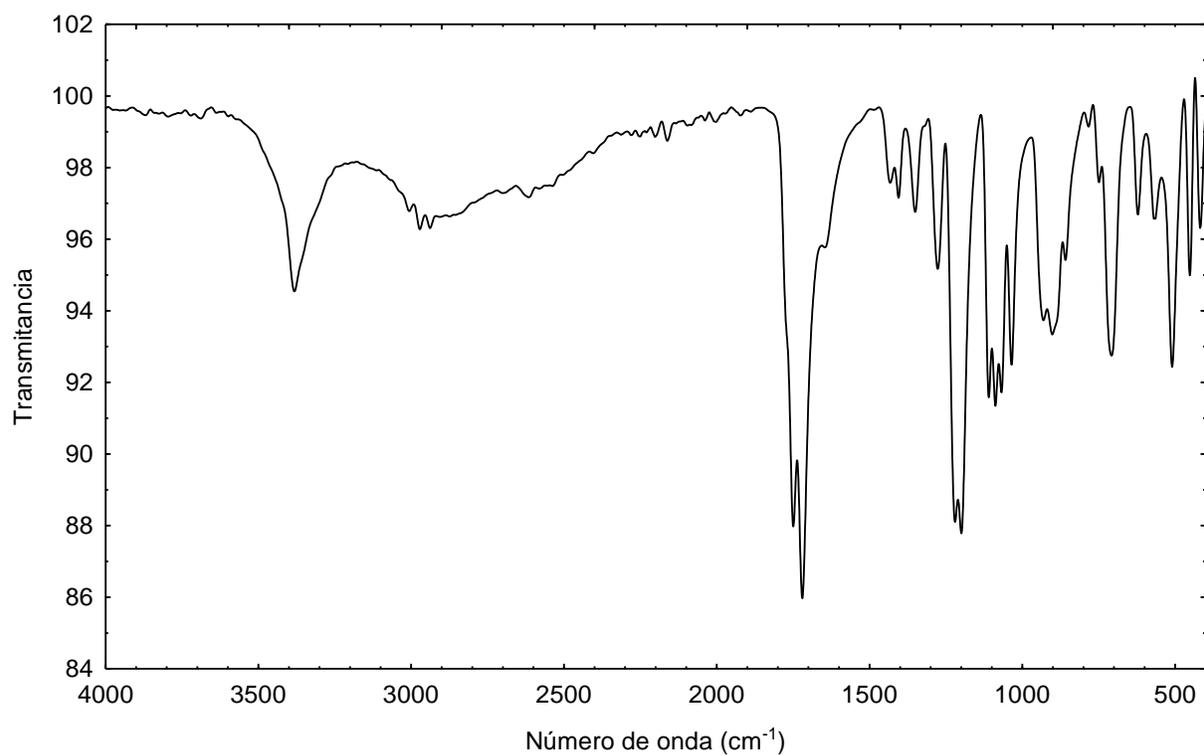


Figura 7. Espectro de infrarrojo de ácido hibiscus de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

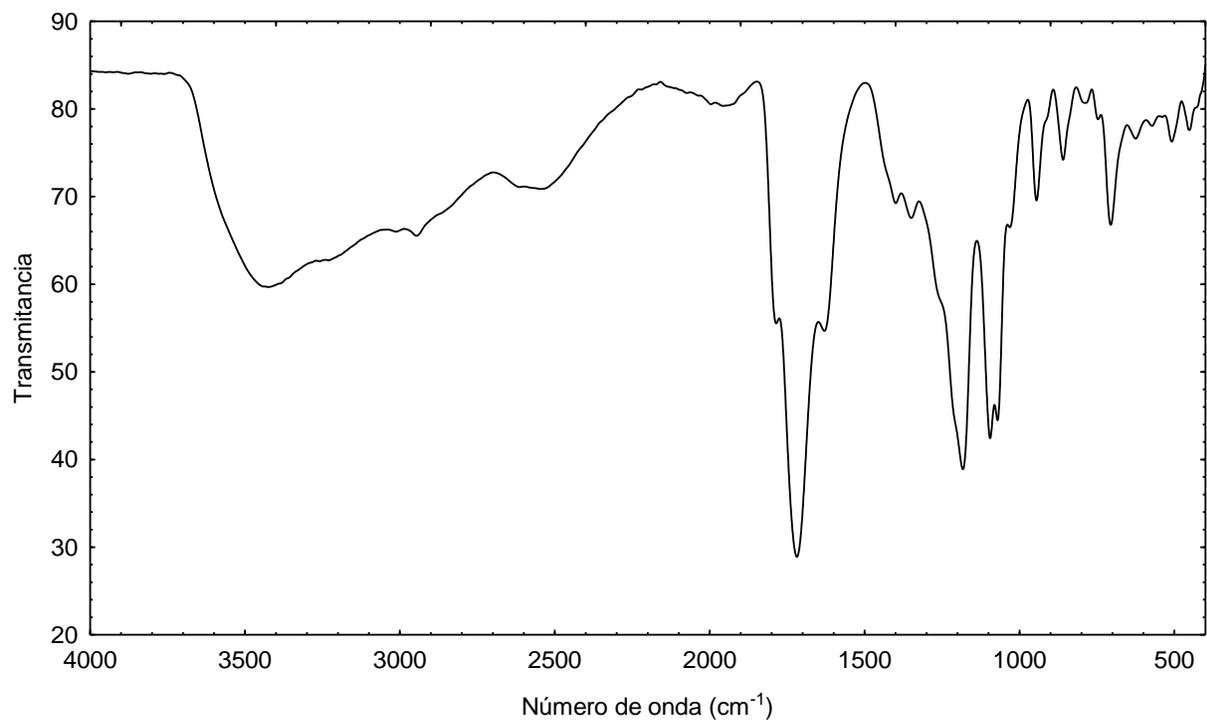


Figura 8. Espectro de infrarrojo de ácido hibiscus tratado térmicamente (121 °C, 15 min) de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

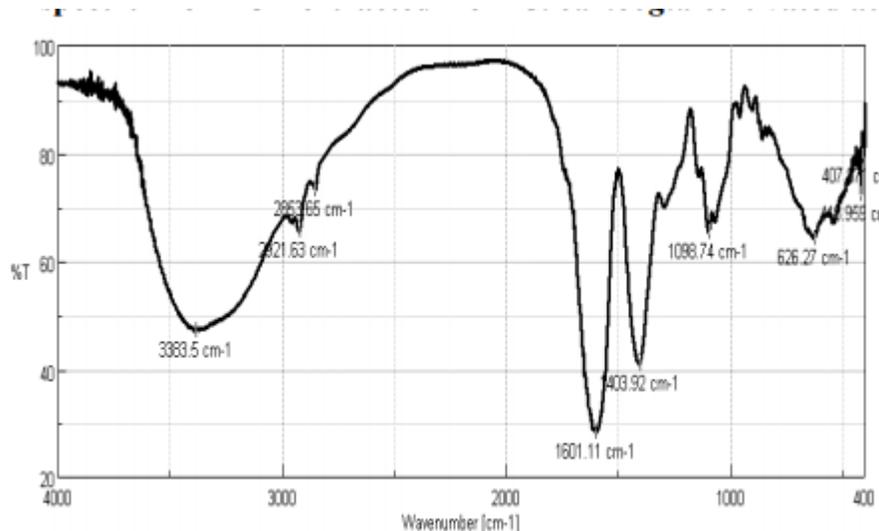


Figura 9. Espectro de infrarrojo de ácido hidroxycítrico obtenido de la corteza de *G. cambogia* (Ravikumar et al., 2017).

8.6.3 Cristalografía de rayos X de ácido hibiscus de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

La estructura molecular de los cristales presuntivos de ácido hibiscus (Figura 10 y Figura 11) se confirmó por difracción de rayos X, el cual se encuentra solvatado a una molécula de agua a través de un enlace de hidrógeno ($O6-H6 \cdots O8$, distancia = 1.841 Å, $\angle O6-H6 \cdots O8 = 162.62^\circ$) (Figura 9). El ácido hibiscus es una lactona con un anillo de cinco miembros, con cuatro átomos de carbono y un átomo de oxígeno. C3 (sp²) tiene un átomo de oxígeno de doble enlace, C1 un grupo OH y un grupo COOH, y C2 un grupo COOH, respectivamente.

Los detalles cristalográficos y el refinamiento de la estructura de los cristales del ácido hibiscus se presentan en la Tabla 12. Zheoat et al. (2017) reportaron el análisis cristalográfico mediante rayos X del ácido hibiscus; sus resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio. No obstante, la molécula que Zheoat et al. (2017) reportan se encuentra unida a una molécula de dimetilsulfoxido (DMSO). En la Figura 11 se muestran los posibles donantes de puentes de hidrogeno de la molécula de ácido hibiscus, en la cual se observa las interacciones que puede establecer con otras moléculas de ácido hibiscus y moléculas de agua.

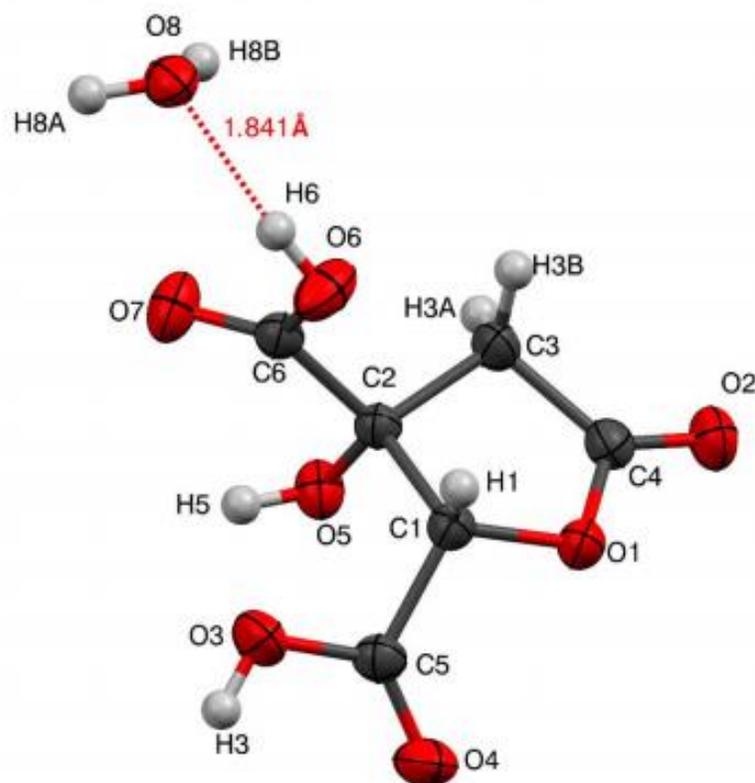


Figura 10. Estructura molecular del ácido hibiscus aislado del extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* determinado por difracción de rayos X. Elipsoides mostrados al 50 % de probabilidad.

8.6.4 Punto de fusión de ácido hibiscus extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

Se determinó el punto de fusión de ácido hibiscus mediante un fusiómetro, teniendo como resultado un punto de fusión de 184-188 °C.

La calorimetría diferencial de barrido de los cristales de ácido hibiscus mostró una temperatura inicial de fusión (T_o) de 186.87 °C, una temperatura de pico (T_p) de 190.61 °C y una temperatura final (T_e) de 194.15°C, mientras que el valor de energía de fusión (entalpía, ΔH) fue de 146.7 J/g.

Ibnusaud et al. (2002) reportan un punto de fusión de 182 °C para el ácido hibiscus, por otro lado Jena et al. (2002) refieren que el ácido garcínico obtenido de *G. cambogia* (isómero del ácido hibiscus) presenta un punto de fusión de 178 °C, mientras que el ácido hibiscus obtenido de *H. sabdariffa* presenta un punto de fusión de 183 °C, Estos valores difiere al reportado en el presente estudio, esto podría deberse al equipo o técnica utilizada por estos investigadores.

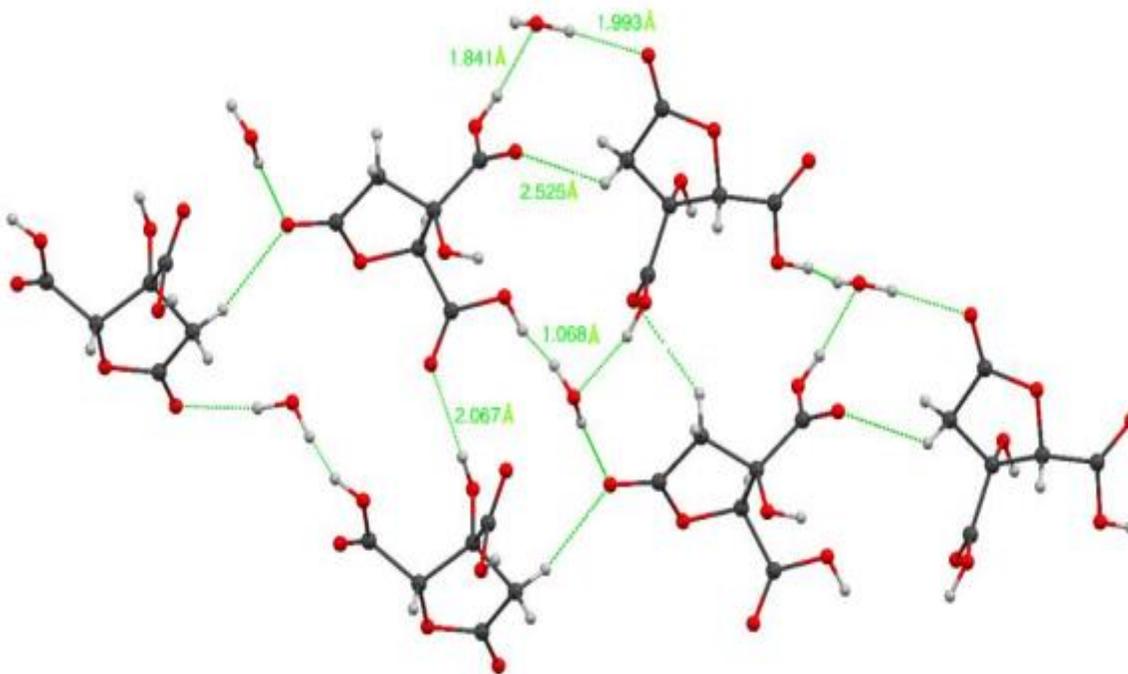


Figura 11. Puentes de hidrogeno de ácido hibiscus aislado de cálices de extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa*.

8.7. Efecto antimicrobiano en medio de cultivo de ácido hibiscus extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*

El ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización demostró efecto antimicrobiano contra todas las cepas patógenas de *Salmonella* y *E. coli* multiresistentes a antibióticos (Tabla 13 y Tabla 14). El análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) presentó diferencias significativas entre los tratamientos con una $P < 0.05$. Se realizó comparación de medias por la prueba de Tukey para cada uno de los patógenos.

En la mayoría de los patógenos hubo diferencia significativa entre los dos tratamientos siendo el ácido hibiscus tratado térmicamente el que presentó mayor actividad antimicrobiana, con excepción de *Salmonella* C63, *Salmonella* C60 y EC C808, en las cuales, el ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico no presentaron diferencias significativas. *Salmonella* C1 fue la bacteria más sensible tanto al ácido hibiscus tratado térmicamente como sin tratar. Con respecto a las cepas de *E. coli*, EIEC MAC

B fue la bacteria más sensible al ácido hibiscus, mientras que E+TES B fue las más sensible al ácido hibiscus con tratamiento térmico.

Tabla 12. Detalles de espectroscopia de rayos X de datos de cristal y parámetros de refinamiento de estructura de ácido hibiscus aislado de extracto acetónico de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

Datos experimentales	
Formula empírica	C ₆ H ₆ O ₇ • H ₂ O
Peso molecular	208.12
Temperatura (K)	293(2)
Sistema cristalino	Ortorrómico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda unitaria (Å, °)	
<i>a</i>	8.2069(2)
<i>b</i>	9.9228(2)
<i>c</i>	10.1747(2)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Volumen (Å ³)	828.58(3)
Z	5
Tipo de radiación	Cu Kα (λ = 1.54184)
μ (mm ⁻¹)	1.797
ρ _{calc} (g/cm ³)	2.096
F(000)	545.00
2θ rango para recolección de datos	12.46-155.038
Índices de rango	-10 ≤ h ≤ 10, -11 ≤ k ≤ 12, -11 ≤ l ≤ 12
Corrección de absorción	Multi-scan
Reflexiones colectadas	11147
Reflexiones independientes, R _{int}	1754(R _{int} = 0.0293)
Datos/restricciones/parámetros	1754/0/133
Goodness of fit on F ²	1.077
R1, wR ₂ [I ≥ σ 2s (I)]	0.0309, 0.0859
R1, wR ₂ [all data]	0.0314, 0.0864
Mayor diferencia de pico/cavidad (e Å ⁻³)	0.25 y -0.21
Parámetros de Flack	0.05(6) y 0.07(5)
Parámetros invertidos de Flack y Hooft	0.95(6) and 0.93(5)

Estudios anteriores han atribuido la actividad antimicrobiana de los cálices de *H. sabdariffa* a diferentes compuestos presentes en la planta tales como, el ácido protocatéuico y antocianinas (Liu et al., 2005, Hatil y Moneer 2006, Kang et al., 2007, Olaleye 2007, Wong et al., 2010), sin embargo, hasta ahora no se ha publicado información sobre el aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos obtenidos directamente de cálices de *H. sabdariffa*.

En el estudio elaborado por Chao y Yin (2009) descubrieron que el ácido protocatéuico exhibía una actividad antibacteriana resistente al calor y que inhibía eficazmente el crecimiento de cinco bacterias

deterioradoras de los alimentos en medio de cultivo, carne picada y jugo de manzana. La actividad antibacteriana del ácido protocatéuico no se vio afectada por los tratamientos térmicos de 25 °C a 100 °C. Para *S. Typhimurium* se obtuvieron halos de inhibición de 33, 35, 34 y 3 mm de diámetro para 25, 50, 75 y 100 °C respectivamente, mientras que para *E. coli* los resultados fueron de 37, 34, 35 y 33 mm de diámetro para 25, 50, 75 y 100 °C respectivamente, datos que demuestran que el ácido protocatéuico presentó actividad antimicrobiana resistente al tratamiento térmico. Estos hallazgos respaldan que este compuesto es un agente potente para sistemas alimentarios para prevenir la contaminación bacteriana. Por otro lado, en este estudio encontraron que el extracto etanólico de cálices de *H. sabdariffa* contenía más ácido protocatéuico que el extracto acuoso. Este descubrimiento explica parcialmente la mayor actividad antibacteriana del extracto etanólico que la observada en el extracto acuoso. El ácido protocatéuico es un compuesto naturalmente presente en los cálices de *H. sabdariffa*. Varios estudios *in vitro* han indicado que este compuesto es capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* u hongos (Fernández et al., 1996; Aziz et al., 1998).

Extracto acuoso y el ácido protocatéuico (5 mg / mL) inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a meticilina, además, el ácido protocatéuico (de una manera dependiente de la dosis) mostró una mayor actividad antimicrobiana contra estos patógenos en el caldo que en el plasma humano. El estudio también reveló que el efecto antibacteriano era independiente de la temperatura (25, 60 y 100 °C) como lo demuestra el tratamiento térmico (Liu et al., 2005). Cabe mencionar que el ácido protocateuico es un compuesto que se ha reportado que se encuentra en los cálices de *H. sabdariffa* y al cual se le se ha atribuido el efecto antimicrobiano de los cálices de jamaica. No obstante, no existe información disponible en la literatura científica sobre la concentración en la que se encuentra este ácido en los cálices de *H. sabdariffa* ni tampoco se encuentra disponible el procedimiento para su aislamiento y caracterización a partir de los cálices de *H. sabdariffa*. Además, se ha reportado que el ácido protocatéuico se encuentra ampliamente distribuido en una diversidad de plantas (Kakkar and Bais, 2014), por lo que es posible obtenerlo de manera comercial.

Por otro lado, comparando el efecto antimicrobiano del ácido hibiscus con los extractos obtenidos de *H. sabdariffa* con diferentes disolventes, en general, el efecto antimicrobiano del ácido hibiscus tratado térmicamente fue mayor que los extractos tratados térmicamente.

Tabla 13. Diámetros inhibición de ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización contra 5 cepas patógenas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos.

Bacteria	Tratamiento	
	Ácido hibiscus ¹	Ácido hibiscus TT ¹
<i>Salmonella</i> C14	10.9±0.1 ^a	12.6±0.6 ^b
<i>Salmonella</i> C1	16.0±0.4 ^a	16.7±0.3 ^b
<i>Salmonella</i> C65	14.5±0.1 ^a	16.5±0.4 ^b
<i>Salmonella</i> C63	11.6±0.2 ^a	12.0±0.3 ^a
<i>Salmonella</i> C60	14.2±0.4 ^a	14.7±0.2 ^a

¹ Media de 3 réplicas del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. ^{a, b} Valores con letras diferentes en la misma columna por patógeno expresan diferencia significativa con $\alpha = 0.05$, prueba de Tukey. TT= tratamiento térmico 121 °C / 15 min. *Salmonella* 14= *S. Gaminara*, *Salmonella* C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65= *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63= *S. Typhimurium* y *Salmonella* C60= *S. Typhi*

Tabla 14. Diámetros inhibición de ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización contra 9 cepas patógenas de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos.

Bacteria	Tratamiento	
	Ácido hibiscus ¹	Ácido hibiscus TT ¹
EHEC A	10.0±0.3 ^a	13.5±0.2 ^b
E+TES B	10.7±0.1 ^a	16.6±0.4 ^b
EC C558	11.6±0.4 ^a	13.5±0.6 ^b
EC C636	11.1±0.2 ^a	14.0±0.6 ^b
EPEC MAC B	10.6±0.3 ^a	14.2±0.3 ^b
EC C808	11.3±0.4 ^a	12.0±0.3 ^a
EIEC MAC B	13.4±0.6 ^a	15.5±0.3 ^b
EPEC MAC A	10.5±0.3 ^a	12.6±0.5 ^b
EC C199	9.1±0.4 ^a	10.3±0.4 ^b

¹ Media de 3 réplicas del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. ^{a, b} Valores con letras diferentes en la misma columna por patógeno expresan diferencia significativa con $\alpha = 0.05$, prueba de Tukey. TT= tratamiento térmico 121 °C / 15 min. EHEC A = *E. coli* enterohemorrágica, E+TES B= *E. coli* enterotoxigénica, EC C558, EC C636, EC C808, EC C199 = *E. coli* productora de toxina Shiga, EPEC MAC B= *E. coli* enteropatógena, EIEC MAC B = *E. coli* enteroinvasiva, y EPEC MAC A = *E. coli* enteropatógena.

Por otro lado, cabe señalar que se han reportado varias publicaciones en las que describe el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de *H. sabdariffa* obtenidos con disolventes de diferentes polaridades (incluidos extractos metanólico, acuoso, acetato de etilo y acetónico) y se han evaluado contra diferentes bacterias patógenas. Sin embargo, en ningún artículo publicado se describe o sugiere que el ácido hibiscus o sus derivados sean la causa de la actividad antimicrobiana, y mucho menos que dicho compuesto y / o sus derivados hayan demostrado su eficacia en la eliminación y control de bacterias resistentes a los antibióticos.

En otras palabras, el presente documento constituye el primer reporte de la actividad antimicrobiana del ácido de hibiscus, incluso contra bacterias multiresistentes antibióticos. Finalmente, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del ácido hibiscus como una forma de determinar su potencial uso como antimicrobiano en la industria de alimentos o en la industria farmacéutica.

8.7 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de extracto acetónico, extracto acuoso y ácido hibiscus

Se obtuvieron las CMI's y las CMB's de extracto acetónico, extracto acuoso y ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización obtenidos de cálices de *H. sabdariffa* sobre 14 cepas patógenas multiresistentes antibióticos (Tabla 15 y Tabla 16).

En la Tabla 15 se muestran las CMI's de extracto acetónico las cuales fueron de 7 mg/mL para las 14 cepas patógenas. Con respecto a las CMB's de extracto acetónico fueron de 10 mg/mL para la mayoría de las bacterias patógenas con excepción de *Salmonella* 14, *Salmonella* C65 y *Salmonella* C60 que fueron de 7 mg/mL. En cuanto a las CMI's de extracto con tratamiento térmico de acetona la mayoría de las bacterias presentaron 5 mg/mL con excepción de EPEC MAC A que tuvo una CMI de 4 mg/mL, mientras que las CMB's fueron de 7 mg/mL con excepción de *Salmonella* C1 que mostró un CMB de 10 mg/mL. En relación a los tratamientos con extracto acuoso con y sin tratamiento térmico, los resultados fueron los siguientes: las CMI's del extracto acuoso sin tratamiento térmico fueron de 20 mg/mL para todas las cepas patógenas, mientras que para el extracto acuoso con tratamiento térmico fueron de 10-20 mg/mL. Las CMB's para extracto acuoso con y sin tratamiento térmico fueron de 20-50 mg/mL.

Existen algunos reportes sobre CMI's y CMB's de diferentes extractos de *H. sabdariffa*, como el elaborado por Hassan et al. (2016) en el cual mostraron resultados de CMI's para un extracto acuoso de *H. sabdariffa* con valores que varían de 9.18 a 16.68 µg/mL para 7 cepas de *Helicobacter pylori* (Una cepa estándar y 6 aislados clínicos de *H. pylori*). Estos resultados son menores a los obtenidos en el presente estudio con extracto de acetona de *H. sabdariffa*, lo que indica que se necesita más concentración (7 mg/mL) de extracto acetónico y acuoso para inhibir las 14 bacterias de estudio.

Abdallah (2016), determinó la CMI y CMB del extracto metanólico de cálices de *H. sabdariffa* mediante el método de dilución en caldo de cultivo sobre 5 cepas de *Acinetobacter baumannii*; éste

investigador obtuvo valores de CMI y CMB de 25 a 50 y de 50 a 100 mg / mL, respectivamente. Estos valores de CMI y CMB son mayores a los que nosotros obtuvimos con el extracto acetónico y acuoso de *H. sabdariffa* (Tabla 15).

Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima bactericida (CMB) y relación de CMB/CMI de extracto acetónico y extracto acuoso con y sin tratamiento térmico por esterilización de *Hibiscus sabdariffa*.

Bacteria	CMI(mg/mL)				CMB (mg/mL)				CMB/CMI			
	EA	EA TT	EAC	EAC TT	EA	EA TT	EAC	EAC TT	EA	EA TT	EAC	EAC TT
EHEC A	7	5	20	20	10	7	50	20	1.4	1.4	2.5	1.0
E+TES B	7	5	20	10	10	7	20	20	1.4	1.4	1.0	2.0
EC C558	7	5	20	10	10	7	20	20	1.4	1.4	1.0	2.0
EC C636	7	5	20	20	10	7	20	50	1.4	1.4	1.0	2.5
EPEC MAC B	7	5	20	20	10	7	20	20	1.4	1.4	1.0	1.0
EC C808	7	5	20	10	10	7	20	20	1.4	1.4	1.0	2.0
EIEC MAC B	7	5	20	10	10	7	50	20	1.4	1.4	2.5	2.0
EPEC MAC A	7	4	20	10	10	7	20	20	1.4	1.8	1.0	2.0
EC C199	7	5	20	10	10	7	50	50	1.4	1.4	2.5	5.0
<i>Salmonella</i> C14	7	5	20	10	7	7	50	20	1.0	1.4	2.5	2.0
<i>Salmonella</i> C1	7	5	20	10	10	10	20	50	1.4	2.0	1.0	5.0
<i>Salmonella</i> C65	7	5	20	20	7	7	50	20	1.0	1.4	2.5	1.0
<i>Salmonella</i> C63	7	5	20	20	10	7	20	20	1.4	1.4	1.0	1.0
<i>Salmonella</i> C60	7	5	20	10	7	7	50	50	1.0	1.4	2.5	5.0

EA= Extracto acetona, EA TT= Extracto acetona con tratamiento térmico 121 °C/15 min, EAC= Extracto acuoso, EAC TT= Extracto acuoso con tratamiento térmico 121 °C/15 min. EHEC A = *E. coli* enterohemorrágica, E+TES B= *E. coli* enterotoxigénica, EC C558, EC C636, EC C808, EC C199 = *E. coli* productora de toxina Shiga, EPEC MAC B= *E. coli* enteropatógena, EIEC MAC B = *E. coli* enteroinvasiva, y EPEC MAC A = *E. coli* enteropatógena. *Salmonella* C14= *S. Gaminara*, *Salmonella* C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65= *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63= *S. Typhimurium* y *Salmonella* C60= *S. Typhi*.

Por otro lado, Yin y Chao (2009) a partir de extractos acuosos y etanólicos de cálices de *H. sabdariffa* obtuvieron valores de CMI's de 0.112 a 0.144 y 0.072 a 0.096 mg/mL, respectivamente para *S. Typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. cereus* (Chao y Yin, 2009). La CMI de extracto acuoso de cálices de *H. sabdariffa* contra cepas de *Campylobacter* susceptibles a antibióticos vario entre 0,096 a 0.152 mg/mL (Yin y Chao, 2008).

De igual forma en la literatura se reportan algunos estudios sobre CMI's y CMB's de extractos acetónicos de otras plantas. El extracto de acetona de hojas de *Aloe vera* mostró una CMI superior a 50 µg/mL para dos cepas: *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, excepto *S. aureus*, que presenta una CMI menor de 6.25 µg / mL (Hagir et al., 2017). Este extracto presentó menores CMI's comparadas con las del presente estudio.

La Tabla 16 muestra que las CMI's de ácido hibiscus observados varían de 4 a 7 mg/mL, teniendo una CMI de 4 mg/mL para EPEC MAC A, *Salmonella* C1 y *Salmonella* C60, de 5 mg/mL para EHEC A, EC C558, EC C636, EPEC MAC B, EC C808, EIEC MAC B, EC C199, *Salmonella* C14 y *Salmonella* C63 y una CMI de 7 mg/mL para ETES+B y *Salmonella* 65. Por otro lado, las CMB's de ácido hibiscus fueron de 7 mg/mL para la mayoría de las cepas patógenas, con excepción de EC C636, EPEC MAC B y *Salmonella* C1 que fueron de 5 mg/mL. El ácido hibiscus con tratamiento térmico presentó CMI's y CMB's de 4 mg/mL y 5 mg/mL, respectivamente para las 14 cepas patógenas de estudio.

El ácido hibiscus con tratamiento térmico exhibió más bajas CMI's y CMB's contra las 14 bacterias patógenas en comparación con el ácido hibiscus sin esterilizar.

Como se ha mencionado, el ácido protocatéuico es un compuesto que se ha reportado que se encuentra presente en los cálices de *H. sabdariffa* y al cual se ha atribuido el efecto antimicrobiano de los cálices de jamaica. No obstante, no existe información disponible en la literatura científica sobre la concentración en la que se encuentra este ácido en los cálices de *H. sabdariffa* ni tampoco se encuentra disponible el procedimiento para su aislamiento y caracterización a partir de los cálices de *H. sabdariffa*. Además, se ha reportado que el ácido protocatéuico se encuentra ampliamente distribuido en una diversidad de plantas (Kakkar and Bais, 2014), por lo que es posible obtenerlo de manera comercial. El ácido protocatéuico comercial ha mostrado actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias. Liu et al. (2005), determinaron la CMI del ácido protocatéuico comercial contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Ellos obtuvieron valores de CMI de 8, 16, 24 y 16 mg/mL, respectivamente. No obstante, en otro estudio Chao y Yin (2009) determinaron también la CMI del ácido protocatéuico comercial y obtuvieron valores mucho menores de CMI: de entre 24 a 44 µg/mL contra *S. Typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. cereus*. Debido a que en ambos estudios se trabajó con un compuesto puro comercial se esperaba que no existiera tanta diferencia en los valores de CMI entre los dos estudios, más aun, cuando se incluyó en ambos una cepa bacteriana del mismo género y especie (*S. aureus*). En nuestro caso, el ácido hibiscus presentó valores de CMI's (Tabla 16) que se encuentran dentro de los límites de los valores de CMI que se han reportado para el ácido protocatéuico (Chao y Yin, 2009; Kakkar and Bais, 2014).

Por último, se determinó si el efecto antimicrobiano del extracto acetónico y acuoso de los cálices de jamaica y del ácido hibiscus eran bactericidas o bacteriostáticos. Un compuesto se considera bactericida cuando la relación de CMB/CMI ≤ 4 y bacteriostático cuando la relación CMB/CMI >4

(Djeussi et al., 2013). Tanto el extracto de acetona, acuoso y ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico presentaron una actividad bactericida contra la mayoría de las cepas patógenas multiresistentes a antibióticos, (Tabla 15 y Tabla 16). Abdallah (2016) reportó también actividad bactericida del extracto metanólico de cálices de *H. sabdariffa* (CMB/CMI de 1 a 2 mg/mL) contra cepas de *A. baumannii*.

La presente investigación demostró que el ácido hibiscus es uno de los compuestos responsables del efecto antimicrobiano de los cálices de *H. sabdariffa*. Además, en los cálices secos de *H. sabdariffa* utilizados, el ácido hibiscus estuvo presente en una concentración de 1.3 % (13 g por Kilogramo) y en el extracto acetónico seco obtenido de los cálices de jamaica el ácido hibiscus estuvo en una concentración de 28.3 %. Debido a su relativa alta concentración, es posible que el ácido hibiscus sea uno de los principales agentes bactericidas presentes en los cálices de jamaica. Sin embargo, es posible también la presencia simultánea en los cálices de jamaica y en sus extractos de otros compuestos con actividad antimicrobiana que aún no han sido reportado.

Tanto el ácido hibiscus como el extracto acetónico y acuoso de los cálices de jamaica, constituyen una alternativa potencial para su uso en el control de bacterias resistentes a los antibióticos como *Salmonella* y *E. coli*. Además, debido a la relativa abundancia el ácido hibiscus en los cálices de jamaica y a la relativa facilidad para obtenerlo, este compuesto tiene potencial para su uso en la industria farmacéutica o de alimentos o en la veterinaria.

Es necesario mayor investigación para identificar otros compuestos con actividad antimicrobiana presentes en *H. sabdariffa*, así como de los mecanismos de acción tanto del ácido hibiscus como de los demás compuestos antimicrobianos.

8.8 Efecto de ácido hibiscus en la sobrevivencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella Typhimurium*

En este ensayo, el ácido hibiscus exhibió un efecto perjudicial severo sobre el crecimiento de EHEC A y *Salmonella* C65 (Figura 12 y Figura 13). Los recuentos de células viables de EHEC A y *Salmonella* C65 disminuyeron significativamente de manera dependiente del tiempo después de la exposición al ácido hibiscus. Como se muestra en la Figura 12, el Log UFC/mL disminuyó drásticamente a 0 Log UFC/ mL después de 0 min de incubación utilizando CMI 10x y EDTA.

Mientras que para la CMI de ácido hibiscus y CMB, de igual forma se obtuvieron reducciones significativas, esto comprado con el control. En la Figura 13 se observa que tanto la CMI y CMB utilizados reducen las UFC/mL al tiempo 1 h de tratamiento, mientras que CMI 10x y EDTA desde el tiempo 0. La CMSI presenta un comportamiento similar al control.

Tabla 16. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB) y relación de CMB/CMI de ácido hibiscus con y sin tratamiento térmico por esterilización de extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa*

Bacteria	CMI(mg/mL)		CMB (mg/mL)		CMB/CMI	CMB/CMI
	Ácido hibiscus	Ácido hibiscus TT	Ácido hibiscus	Ácido hibiscus TT	Ácido hibiscus	Ácido hibiscus TT
EHEC A	5	4	7	5	1.4	1.3
E+TES B	7	4	7	5	1.0	0.7
EC C558	5	4	7	5	1.4	1.3
EC C636	5	4	5	5	1.0	1.3
EPEC MAC B	5	4	5	5	1.0	1.3
EC C808	5	4	7	5	1.4	1.3
EIEC MAC B	5	4	7	5	1.4	1.3
EPEC MAC A	4	4	7	5	1.8	1.3
EC C199	5	4	7	5	1.4	1.3
<i>Salmonella</i> C14	5	4	7	5	1.4	1.3
<i>Salmonella</i> C1	4	4	5	5	1.3	1.3
<i>Salmonella</i> C65	7	4	7	5	1.0	1.3
<i>Salmonella</i> C63	5	4	7	5	1.4	1.3
<i>Salmonella</i> C60	4	4	7	5	1.8	1.3

TT= tratamiento térmico 121 °C/15 min. EHEC A = *E. coli* enterohemorrágica, E+TES B= *E. coli* enterotoxigénica, EC C558, EC C636, EC C808, EC C199 = *E. coli* productora de toxina Shiga, EPEC MAC B= *E. coli* enteropatógena, EIEC MAC B = *E. coli* enteroinvasiva, y EPEC MAC A = *E. coli* enteropatógena. *Salmonella* C14= *S. Gaminara*, *Salmonella* C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65= *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63= *S. Typhimurium* y *Salmonella* C60= *S. Typhi*.

Esto prueba que el ácido hibiscus tiene un efecto tóxico severo en el recuento viable de EHEC A y *Salmonella* C65, mientras que, las células de control no tratadas no mostraron disminución en el número de UFC e incluso aumentaron ligeramente.

Khan et al. (2017) refieren en su estudio que el carvacrol (CMI: 450 mg/mL) obtenido comercialmente y evaluado en el crecimiento de *E. coli* muestra una disminución de este patógeno, significativamente de manera independiente del tiempo después de la exposición al carvacrol, donde el log UFC / ml disminuyó drásticamente a menos de log 2 UFC / mL después de 60 min.

Por otro lado, Appiah et al. (2017) estudiaron el extracto de *Trametes gibbosa* contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* a las concentraciones de prueba (6,12 y 18 mg/mL), las cuales mostraron una reducción en el número de células viables durante las primeras 5, 6 y 48 horas, respectivamente, seguido de un aumento gradual hasta las 24 h para *E. coli* y *S. aureus* y 72 h para *C. albicans* en comparación con el control (organismos sin agente antimicrobiano).

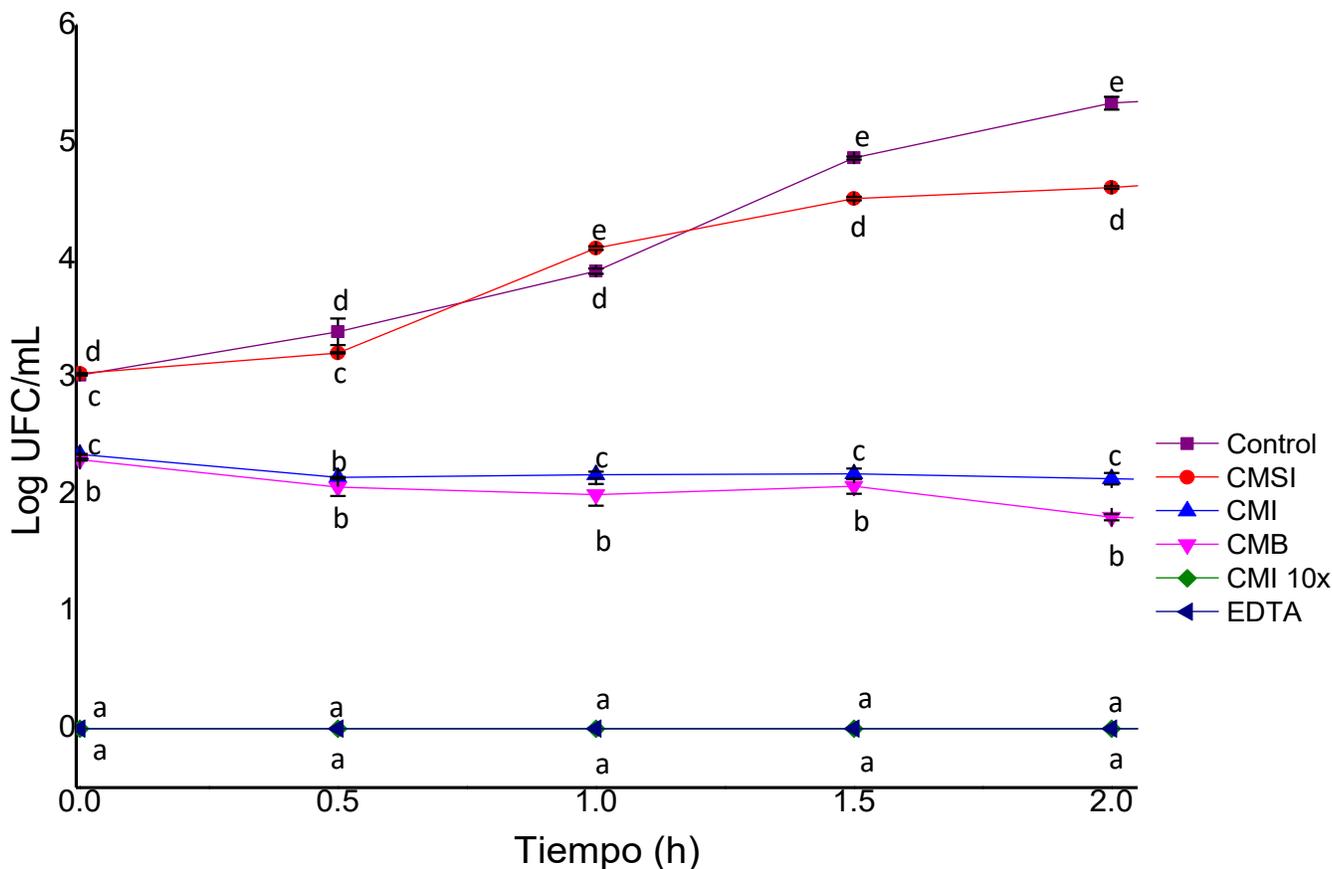


Figura 12. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre recuentos de células viables de EHEC A en varios intervalos de tiempo. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Chauhan y Kang (2014) evaluaron el efecto del timol el crecimiento de *S. Typhimurium* después del tratamiento con CMI (750 mg / L). Los recuentos de células viables de *S. Typhimurium* registrados a intervalos de tiempo regulares disminuyeron varias veces dentro de los 20 minutos posteriores a la exposición al timol. Se produjo una reducción aguda de 4 veces en el log UFC / mL después de 20

min, seguido de una inhibición completa a los 120 min. Por otro lado, las células de control no tratadas no mostraron disminución en el número de UFC.

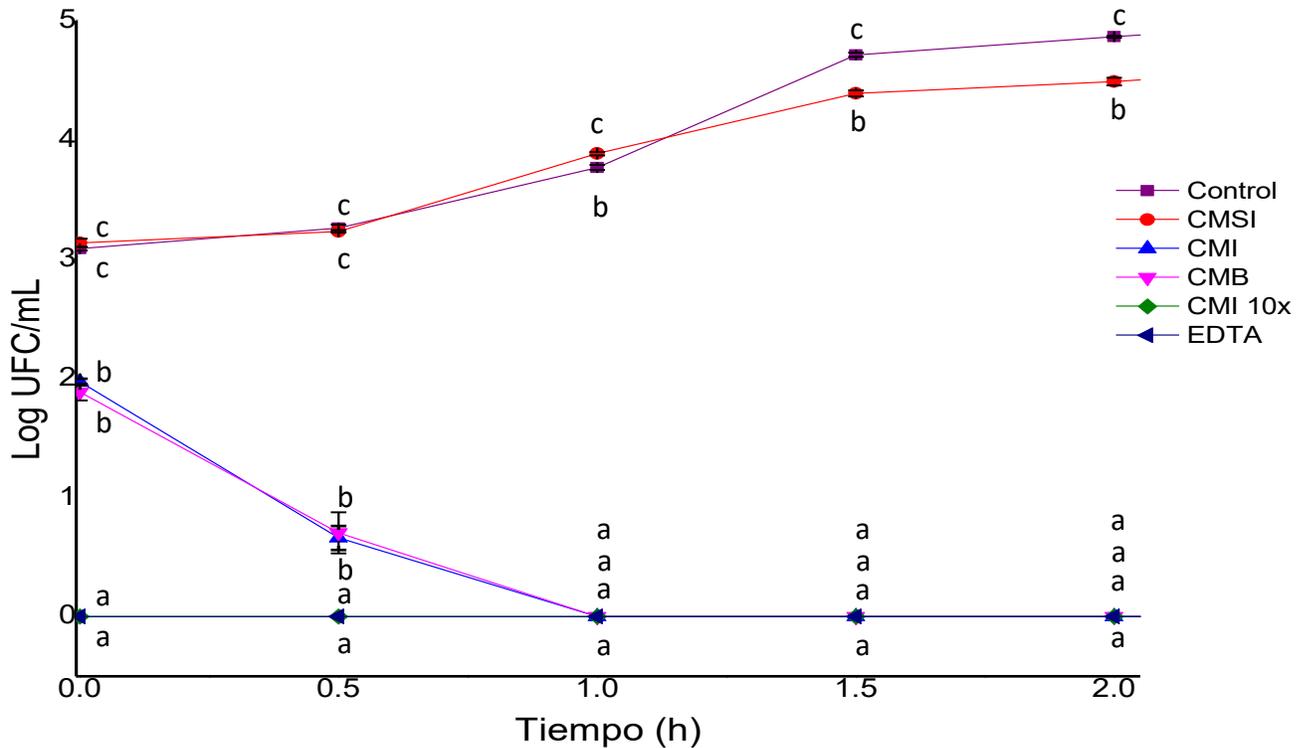


Figura 13. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre recuentos de células viables de *Salmonella* C65 en varios intervalos de tiempo. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Chen et al. (2018) evaluaron la cinética bactericida del ácido mirístico en leche pasteurizada que contenía $1/4 \times \text{MIC}$ ($16 \mu\text{g} / \text{mL}$), $1/2 \times \text{MIC}$ ($32 \mu\text{g} / \text{mL}$) y $1 \times \text{MIC}$ ($64 \mu\text{g} / \text{mL}$) de ácido mirístico, con un inóculo bacteriano inicial de $1 \times 10^5 \text{ UFC} / \text{mL}$. Los resultados de las curvas de tiempo muerte indican que el ácido mirístico inhibió significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada. La bacteria creció rápidamente de $3.5 \log_{10}$ a $5.6 \log_{10}$ en la leche durante el almacenamiento bajo refrigeración sin ácido mirístico y cuando las bacterias se expusieron al ácido mirístico con $1/4 \times \text{MIC}$ ($16 \mu\text{g} / \text{mL}$), la amplitud del crecimiento de *L. monocytogenes* disminuyó. Además, cuando la bacteria fue tratada con ácido mirístico con $32 \mu\text{g} / \text{mL}$, el número de especies bacterianas permaneció en $\sim 3.4 \log_{10}$ durante 21 días, lo que demostró que el ácido mirístico inhibía efectivamente el crecimiento de *L. monocytogenes*. Finalmente, cuando la concentración de ácido

mirístico se incrementó a 64 µg / mL, el número de bacterias disminuyó a 1.4 log₁₀ después de 15 días, lo que indica que el ácido mirístico efectivamente mató a *L. monocytogenes*.

8.9 Efecto antimicrobiano de extracto acuoso y ácido hibiscus de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y cloranfenicol en ratones CD-1 infectados con *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella Typhimurium* multirresistentes a antibióticos

Mercado-Monroy et al. (2018) refiere en su estudio que el cloranfenicol presentó zonas de inhibición de 14.3 y 10.7 mm para *S. Typhimurium* C65 y EHEC A, respectivamente. De acuerdo a CLSI (2012), nos indica que EHEC A presenta resistencia al cloranfenicol (zona de inhibición ≤ 12 mm), mientras que *S. Typhimurium* C65, presenta resistencia intermedia a este antibiótico (zona de inhibición de 13-17 mm). De igual forma estos investigadores realizaron mezclas donde se evaluó la actividad antimicrobiana de estas mezclas mostrando un mayor halo de inhibición de 14.9 mm al utilizar 80% de ácido hibiscus y 20% de cloranfenicol para EHEC A, caso contrario a *S. Typhimurium* C65 en donde la mayor zona de inhibición se presentó al mezclar 20% ácido hibiscus con 80 % de cloranfenicol teniendo un diámetro de 14.43 mm.

La actividad antibacteriana *in vivo* de extracto acuso, ácido hibiscus, cloranfenicol y sus combinaciones se examinó utilizando un modelo de infección por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC A R⁺) y *S. Typhimurium* (*Salmonella* C65) en ratón CD-1. Brevemente, los ratones se infectaron con 1 x 10⁵ UFC/mL. 6 h después, a los ratones se les administró por vía oral cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente en la metodología (Sección 6.2.9.3). Se colectaron las muestras de heces diariamente, se realizó conteo de microorganismos por vaciado en placa. Como se muestra en la Tabla 17, se encontró que al día 0 del experimento, no se detectaron UFC de EHEC A R⁺ de ni de *S. Typhimurium* C65 R⁺ en los 16 grupos, debido a que aún no se realizaba la inoculación de los patógenos en los ratones. El grupo I (blanco, sin infectar y sin tratamiento) no mostró presencia de carga microbiana a lo largo de los 7 días de tratamiento debido a que este grupo no fue infectado con bacteria patógena. Como se muestra en la Tabla 17, al día 0, no se detectaron UFC de EHEC A R⁺ de ni de *S. Typhimurium* C65 R⁺ en ningún grupo debido a que aún no se realizaba la inoculación de los patógenos en los ratones. Los grupos II, III y IV (Controles, no infectados y tratados con cloranfenicol, ácido hibiscus y extracto acuoso, respectivamente) tampoco se detectaron patógenos. A diferencia, en los grupos V y VI (Controles negativos, infectados con *S. Typhimurium* C65 R⁺ o EHEC A R⁺,

respectivamente y no tratados) ambos patógenos se detectaron en concentraciones de 3.7×10^2 y 6×10^1 UFC/g en el primer día de tratamiento y de 8×10^5 y 1×10^7 UFC/g al séptimo día de tratamiento. Estos resultados muestran cómo se van multiplicando las bacterias en los ratones de estos grupos al no estar recibiendo ningún tratamiento en el transcurso del experimento. En el grupo VII y VIII (grupo infectado con *S. Typhimurium* C65 R⁺ o EHEC A R⁺, respectivamente y tratados con cloranfenicol) el primer día de tratamiento se cuantificaron 3×10^1 y 1×10^2 UFC/g UFC/g, respectivamente, mientras que el séptimo día de tratamiento se detectaron 1×10^5 y 1×10^6 UFC/g, respectivamente. Estos resultados obtenidos en el grupo VII y VIII son debido a la resistencia al cloranfenicol que presentan tanto EHEC A R⁺ como *S. Typhimurium* C65 R⁺. Con respecto a los grupos IX y X (grupo infectado *S. Typhimurium* C65 R⁺ o EHEC A R⁺, y tratados con ácido hibiscus) presentaron una carga microbiana de 2×10^1 y 4×10^1 UFC/g de en el primer día de tratamiento y en los siguientes días ya no se detectaron a ambos patógenos en las heces de los ratones. Estos resultados obtenidos con los grupos XI y X, sugieren fuertemente que el ácido hibiscus tiene un efecto antimicrobiano notorio ya que logra eliminar a *S. Typhimurium* y EHEC del intestino de los ratones. En los grupos XI y XII (grupos infectados con *S. Typhimurium* C65 R⁺ o EHEC A R⁺, respectivamente, y tratados con mezcla de ácido hibiscus y cloranfenicol), se muestran un comportamiento similar, en el día 1 de tratamiento se cuantificó una concentración de 1.5×10^4 y 2.8×10^3 UFC/g de heces, respectivamente; y para el día 3 de tratamiento ya no se detectó a ambos patógenos de las heces de los ratones.

Con referencia a los grupos XIII y XVI (grupos infectados con *S. Typhimurium* C65 R⁺ o EHEC A R⁺, respectivamente, y tratados con extracto acuoso), muestran una carga microbiana en las heces de 4.5×10^3 y 3.9×10^3 UFC/g, respectivamente, esto para el primer día de tratamiento mientras que para el día 2 y día 3 no se detectaron microorganismos presentes en las heces de los ratones. Por último, en los grupos XV y XVI (grupos infectados con *S. Typhimurium* C65 R⁺ o EHEC A R⁺, respectivamente, y tratados con mezcla de extracto acuoso y cloranfenicol), se logró eliminar la carga microbiana de *S. Typhimurium* hasta el día 4 de tratamiento y en el caso de EHEC al segundo día de tratamiento no hubo carga microbiana presente (0 UFC/g).

Tabla 17. Efecto de tratamientos en ratones CD-1 sobre la excreción fecal de *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella* Typhimurium (UFC/g).

Grupo	Tratamiento	Días de tratamiento							
		D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
I (Ratón)	Ninguno	0	0	0	0	0	0	0	0
II (Ratón)	Cloranfenicol	0	0	0	0	0	0	0	0
III (Ratón)	Ácido hibiscus	0	0	0	0	0	0	0	0
IV (Ratón)	Extracto acuoso	0	0	0	0	0	0	0	0
V (Ratón, <i>S.</i> Typhimurium)	Ninguno	0	3.7x10 ²	1x10 ³	7x10 ³	1x10 ⁴	6x10 ⁴	1x10 ⁵	8x10 ⁵
VI (Ratón, <i>E. coli</i>)	Ninguno	0	6x10 ¹	5x10 ²	1.3x10 ⁴	5x10 ⁴	1x10 ⁵	9x10 ⁵	1x10 ⁷
VII (Ratón, <i>S.</i> Typhimurium)	Cloranfenicol	0	3x10 ¹	1.6x10 ²	6x10 ³	7x10 ³	1x10 ⁴	5x10 ⁴	1x10 ⁵
VIII (Ratón, <i>E. coli</i>)	Cloranfenicol	0	1x10 ²	5.8x10 ²	6x10 ³	8x10 ³	1.1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶
IX (Ratón, <i>S.</i> Typhimurium)	Ácido hibiscus	0	2x10 ¹	0	0	0	0	0	0
X (Ratón, <i>E. coli</i>)	Ácido hibiscus	0	4x10 ¹	1.7x10 ⁴	0	0	0	0	0
XI (Ratón, <i>S.</i> Typhimurium)	Ácido hibiscus y cloranfenicol	0	1.5x10 ⁴	4.9x10 ⁴	0	0	0	0	0
XII (Ratón, <i>E. coli</i>)	Ácido hibiscus y cloranfenicol	0	2.8x10 ³	3.9x10 ⁴	0	0	0	0	0
XIII (Ratón, <i>S.</i> Typhimurium)	Extracto acuoso	0	4.5x10 ³	1.3x10 ⁴	0	0	0	0	0
XIV (Ratón, <i>E. coli</i>)	Extracto acuoso	0	3.9x10 ³	0	0	0	0	0	0
XV (Ratón, <i>S.</i> Typhimurium)	Extracto acuoso y cloranfenicol	0	6.1x10 ⁴	4.9x10 ⁴	2x10 ¹	0	0	0	0
XVI (Ratón, <i>E. coli</i>)	Extracto acuoso y cloranfenicol	0	4x10 ¹	0	0	0	0	0	0

Los resultados en la Tabla 18 muestran la tasa de mortalidad y las manifestaciones patológicas observadas en los diferentes grupos de ratones. En relación a las tasas de mortalidad, los grupos VI (Control negativo, infectado con EHEC A R⁺ y no tratado) y VIII (grupo infectado EHEC A R⁺ y tratado con cloranfenicol) presentaron tasas de 33 y 17 %, respectivamente. Cabe mencionar que a pesar del tratamiento con antibiótico en el grupo VIII, se presentó la muerte de 1 ratón y 2 de los ratones de este grupo se encontraban en situación de enfermedad, esto debido a la resistencia que presenta EHEC al cloranfenicol. Las tasas de mortalidad para los demás grupos experimentales fueron del 0 %.

Con respecto a las manifestaciones patológicas (Tabla 18), los grupos del I al IV (blanco, sin infectar y sin tratamiento; controles, no infectados y tratados con cloranfenicol, ácido hibiscus y extracto acuoso, respectivamente) no mostraron síntomas de pérdida de peso, apetito ni debilidad. El grupo V (Control negativo, infectado con *S. Typhimurium* C65 R⁺ y no tratado) no presentó manifestaciones clínicas, y no hubo decesos en este grupo, a pesar de que este grupo no recibió tratamiento de ningún tipo, se podría decir que *S. Typhimurium* si se multiplico en los ratones al final de los 7 días de tratamiento, pero esta cepa empleada en este estudio no fue capaz de provocar enfermedad en los ratones. En grupo VI (Control negativo, infectado con EHEC A R⁺ y no tratado), 5 de 6 ratones mostraron pérdida de apetito, pérdida de peso y por lo tanto debilidad o movimiento lento, teniendo como tasa de estas manifestaciones un 83%. Se puede decir que EHEC A R⁺ tuvo la capacidad de causar enfermedad en los ratones utilizados. Con relación al grupo VII (grupo infectado con *S. Typhimurium* C65 R⁺ y tratado con cloranfenicol), los ratones de este grupo tampoco mostraron síntomas clínicos. Con respecto al grupo VIII (grupo infectado con EHEC A R⁺ y tratado con cloranfenicol) 3 de 6 ratones mostraron pérdida de peso, apetito y debilidad/movimiento lento, presentando una tasa para estos parámetros del 50%.

En referencia al grupo IX (grupo infectado con *S. Typhimurium* C65 R⁺ y tratado con ácido hibiscus), ningún ratón mostró pérdida de peso, apetito ni debilidad o movimiento lento, teniendo una tasa de estos parámetros del 0%. Cabe mencionar que, aunque *S. Typhimurium* C65 R⁺ no ocasiono enfermedad en los ratones (no presentó síntomas visibles de enfermedad) se puede decir que el ácido hibiscus si logro reducir la carga microbiana (Tabla 17). En relación con los grupos X-XIV (grupo infectado con EHEC A R⁺ y tratado con ácido hibiscus; grupo infectado con *S. Typhimurium* C65 R⁺ y tratado con mezcla de ácido hibiscus y cloranfenicol; grupo infectado con EHEC A R⁺ y tratado con mezcla de ácido hibiscus y cloranfenicol; grupo infectado con *S. Typhimurium* C65 R⁺ y tratado con

extracto acuoso; grupo infectado con EHEC A R⁺ y tratado con extracto acuoso) 1 ratón de un total de 6 ratones presentaron pérdida de peso, apetito, debilidad/movimiento lento, representándose en una tasa del 17 %. Por último, para los grupos XV y XVI (grupos infectados con *S. Typhimurium* C65 R⁺ o EHEC A R⁺ respectivamente, y tratados con mezcla de extracto acuoso y cloranfenicol) los ratones no presentaron síntomas clínicos.

De forma general se puede decir que los grupos de interés a los cuales se les administro tanto ácido hibiscus como extracto acuoso de *H. sabdariffa*, no mostraron pérdida de peso, pérdida de apetito ni debilidad o movimiento lento y no hubo muertes de ratones en esos grupos, a diferencia de los otros grupos experimentales infectados. En resumen, el ácido hibiscus y extracto acuoso el ácido hibiscus logró eliminar a ambas bacterias patógenas multiresistentes a antibióticos de los ratones infectados, lo que provocó que los síntomas de enfermedad y muerte no se presentara en los ratones tratados tanto con el ácido como con extracto acuoso.

Se han realizado muchos trabajos que tienen como objetivo conocer los diferentes componentes antimicrobianos y fitoquímicos de las plantas medicinales y utilizarlos para el tratamiento de infecciones microbianas (aplicaciones tópicas y sistémicas) como posibles alternativas a los antibióticos químicamente sintéticas a las que muchos microorganismos infecciosos se han vuelto resistentes El desarrollo de resistencia farmacológica en patógenos humanos contra los antibióticos de uso común ha requerido una búsqueda para nuevas sustancias antimicrobianas de otras fuentes, incluidas las plantas, las cuales tienen la capacidad de combatir el patógeno como antimicrobiano y como agentes antidiarreicos.

Recientemente, Itelima y Agina (2014) reportaron la actividad antimicrobiana *in vivo* de 5 especies de plantas (*Allium sativum*, *Mangifera indica*, *Psidium guajava*, *Vernonia amygdalina* y *Zingiber officinale*) sobre *E. coli* O157: H7 inoculada en ratas albinas, esto en un tiempo de 14 días de tratamiento. Este estudio reveló que los extractos etanólicos de las especies de plantas utilizadas no solo impidieron el desarrollo de diarrea en ratas tratadas, sino que también inhibieron el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en ellas.

Tabla 18. Síntomas clínicos y mortalidad observadas en grupos de ratones durante el curso del experimento

Grupos	Tratamiento	Síntomas clínicos / Mortalidad			
		Pérdida de peso	Pérdida de apetito	Debilidad/Movimiento lento	Mortalidad
I (Ratón)	Ninguno	0/6(0)*	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
II (Ratón)	Cloranfenicol	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
III (Ratón)	Ácido hibiscus	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
IV (Ratón)	Extracto acuoso	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
V (Ratón, <i>S. Typhimurium</i>)	Ninguno	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
VI (Ratón, <i>E. coli</i>)	Ninguno	5/6(83)	5/6(83)	5/6(83)	2/6(33)
VII (Ratón, <i>S. Typhimurium</i>)	Cloranfenicol	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
VIII (Ratón, <i>E. coli</i>)	Cloranfenicol	3/6(50)	3/6(50)	3/6(50)	1/6(17)
IX (Ratón, <i>S. Typhimurium</i>)	Ácido hibiscus	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
X (Ratón, <i>E. coli</i>)	Ácido hibiscus	1/6(17)	1/6(17)	1/6(17)	0/6(0)
XI (Ratón, <i>S. Typhimurium</i>)	Ácido hibiscus y cloranfenicol	1/6(17)	1/6(17)	1/6(17)	0/6(0)
XII (Ratón, <i>E. coli</i>)	Ácido hibiscus y cloranfenicol	1/6(17)	1/6(17)	1/6(17)	0/6(0)
XIII (Ratón, <i>S. Typhimurium</i>)	Extracto acuoso	1/6(17)	1/6(17)	1/6(17)	0/6(0)
XIV	Extracto acuoso	1/6(17)	1/6(17)	1/6(17)	0/6(0)
XV (Ratón, <i>S. Typhimurium</i>)	Extracto acuoso y cloranfenicol	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
XVI (Ratón, <i>E. coli</i>)	Extracto acuoso y cloranfenicol	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)

*Número de ratones afectados/número total de ratones en cada grupo,
las cifras dentro del paréntesis representan el porcentaje de ratones afectados en cada grupo durante el experimento.

En comparación con el presente estudio, estos autores utilizaron una suspensión bacteriana (1×10^9 UFC/mL de *E. coli* O157:H7) más elevada a la utilizada en este estudio y además administraron simultáneamente (sin esperar tiempo después de la inoculación) una única dosis de cada extracto de 3.0 mg/kg de peso corporal de la rata, obteniendo que al día 5, 7, 8, 9 y 10, lograron la reducción de la carga microbiana a 0 UFC/g de heces de las ratas con extracto de *P. guajava*, *A. sativum*, *Z. officinale*, *V. amygdalina* y *M. indica*, respectivamente. Estos resultados muestran que a pesar de reducir la carga microbiana a 0 UFC/g, lo hacen en un tiempo mayor al reportado en el actual estudio ya que como se mencionó anteriormente el ácido hibiscus eliminó *S. Typhimurium* y EHEC A R⁺ al día 2 y día 3, respectivamente.

De igual forma, Tala et al. (2015) evaluaron el efecto de extracto acuoso de *Euphorbia prostrata* Aiton sobre *S. Typhimurium* en ratas Wistar. Las ratas se administraron con 1×10^8 UFC de *Salmonella*. Se administraron dosis graduadas (es decir, 26.34, 44.00, 73.48, 122.71 mg/kg) del extracto acuoso de *E. prostrata*. Se encontró que la administración de este extracto induce disminuciones marcadas en el número viable de *S. Typhimurium* recuperado de las heces. Los animales (hembra y macho) tratados con diferentes dosis del extracto no arrojaron ninguna *S. Typhimurium* en heces entre los días octavo y décimo del período de tratamiento. En este estudio se logra eliminar la carga microbiana de *S. Typhimurium* de las ratas, sin embargo, lo hace en un tiempo de 10 días, comparado con el presente estudio, tanto extracto acuoso como ácido hibiscus eliminaron *S. Typhimurium* y EHEC A R⁺ al día 2 y día 3, respectivamente. Por otro lado, Choi et al. (2011) realizaron un estudio en el cual determinaron el efecto *in vivo* de extracto etanólico de cascara de *Punica granatum* contra *S. Typhimurium*, esto sobre ratones Balb/c. Los ratones se infectaron inicialmente de 1×10^5 UFC/mL de *S. Typhimurium* y después se trataron con extracto de *P. granatum*. Los ratones se dividieron en los siguientes grupos: control (CON), infectados con *Salmonella* (SI), e infectados con *Salmonella* + extracto de *P. granatum* (SIPG). Una hora después de la infección, a los animales en el grupo SIPG se les administró oralmente 5 mg (usando una aguja de sonda) de extracto de *P. granatum* diariamente. Se encontró que el extracto tenía efectos significativos sobre la mortalidad y número de *S. Typhimurium* viable recuperado de las heces. En el día 1 posterior a la infección, diez ratones en el grupo SI y SIPG arrojaron *S. Typhimurium* viable en las heces, encontrándose que las heces de los ratones en el grupo SI, contenían bacterias en una concentración de 3×10^3 a 4×10^5 UFC/g. Se descubrió que las heces de ratones en el grupo SIPG contenían bacterias en una concentración de $2 \times$

10^2 a 2×10^3 UFC/g. Además, en el día 6 posterior a la inyección, ninguno de los ratones en el grupo SIPG había muerto, mientras que los cinco ratones en el grupo SI habían muerto.

Muchos autores han descartado el uso de antibióticos y han favorecido el uso de compuestos fitoquímicos, ya que mostraron una fuerte actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y negativas sin mutagenicidad (Choi et al., 2011). Por lo tanto, existe un interés creciente en el uso de plantas y hierbas, tanto en la producción animal como en el tratamiento de diversas enfermedades del hombre y los animales. Está claro que el aislamiento de EHECA R⁺ y *S. Typhimurium* C65 de las heces de los ratones tratados con ácido hibiscus y extracto acuoso fue del 0 % al final del experimento. Esto puede deberse a la potencia medicinal de *H. sabdariffa*. También es evidente que la dosis utilizada en este estudio tanto de ácido hibiscus como de extracto acuoso fue eficaz para prevenir el desarrollo de los síntomas de la infección por las cepas patógenas utilizadas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el ácido hibiscus y extracto acuoso obtenido de los cálices de la flor de Jamaica (*H. sabdariffa*) podría ser una alternativa en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias patógenas resistentes o multiresistentes a los antibióticos. En consecuencia, el ácido hibiscus y el extracto acuoso tiene potencial para poder usarse como antimicrobiano en la medicina humana y veterinaria y/o en la industria de los alimentos.

8.10. Efecto de extracto acuoso, acetónico y ácido hibiscus en la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella Typhimurium*

Una vez aislado el RNA de cada uno de los tratamientos se realizó un gel de agarosa al 1 % adicionado con hipoclorito de sodio (condiciones desnaturalizantes) para observar integridad del RNA. El RNA de los 8 tratamientos presentó una calidad adecuada ya que después de la electroforesis se pudieron observar en forma nítida las bandas correspondientes al rRNA 23 s y rRNA 16 s (Figura 14).

Se realizó síntesis de cDNA y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). La influencia de los extractos y ácido hibiscus a CMI's y CMSI's (Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Concentraciones Mínimas Subs-Inhibitorias) en la expresión de siete genes de virulencia se analizó en cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC A y EDL933). En los gráficos 3-5 se muestran los resultados pertenecientes a la cepa *E. coli* enterohemorrágica EDL93 utilizando las CMI's de extracto acuoso, extracto de acetona y ácido hibiscus (20, 7 y 5 mg/mL, respectivamente). Se demostró un

aumento en la expresión de los genes *STXB2* y *exhA* en los 3 tratamientos (extracto acuoso, extracto acetónico y ácido hibiscus) en comparación con el control, teniendo un aumento de 2, 3 y 4 veces más para el gen *STXB2* y un aumento de 40, 53 y 59 veces más para el gen *exhA*, para extracto acuoso, acetona y ácido hibiscus, respectivamente, habiendo diferencia significativa de los tratamientos en comparación con el control (Figura 15). La expresión del gen *grlA* aumentó 5, 5 y 8 veces más para acuoso, acetona y ácido hibiscus, respectivamente, esto comparado con el control, como resultado de los tratamientos de extractos y compuesto de *H. sabdariffa*. La expresión del gen *espA* aumento 2 y 3 veces más al utilizar extracto acetónico y ácido hibiscus, respectivamente, pero no hubo diferencia significativa entre el extracto acuoso y el control. Mientras que la expresión de *nleA* se vio aumentada en 4, 3 y 5 veces más para los tratamientos ya mencionados (Figura 16). La expresión de los genes de virulencia *fliC* y *flhD* se incrementó con extracto acuoso, acetona y ácido hibiscus (Figura 17). En los gráficos 6-8 se muestran los resultados de *E. coli* enterohemorrágica EDL933 utilizando las CMSI's de los extractos y ácido hibiscus (5, 1.75 y 1.25 mg/mL, respectivamente). Para el gen *STXB2*, se observa que la expresión de este gen aumentó 6, 4 y 6 veces más, para el extracto acuoso, extracto de acetona y ácido hibiscus, respectivamente, con respecto al control, mostrando diferencias significativas. La expresión de *exhA* aumentó considerablemente, teniendo una expresión genética relativa de 30, 8 y 14 veces más con respecto al control (Figura 18) Al utilizar concentraciones menores a las CMI's se puede observar que para el gen *STXB2* hubo mayor expresión de este gen al utilizar la CMSI's y en el caso del gen *exhA*, sucedió lo contrario, disminuyendo la expresión al utilizar las CMSI's.

La expresión del gen *grlA* se vio aumentada al utilizar los 3 tratamientos (extracto acuoso, extracto de acetona y ácido hibiscus) en 4, 3 y 3.5 veces más, respectivamente, comparado con el control. La expresión del gen *espA* se incrementó con extracto acuoso y ácido hibiscus, 2 y 3 veces más, pero no hubo diferencia significativa en la expresión de este gen al utilizar extracto acetónico. Para el gen *nleA*, no hubo diferencia significativa en la expresión genética relativa entre los 3 tratamientos en comparación con el control (Figura 19).

Con respecto a la expresión del gen *flhD*, no hubo diferencia significativa en la expresión entre los 3 tratamientos en comparación con el control, mientras que el gen *fliC* aumento su expresión 5, 13 y 4 veces más para extracto acuoso, extracto acetónico y ácido hibiscus, respectivamente (Figura 20).

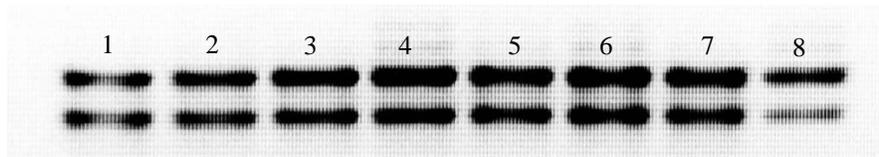
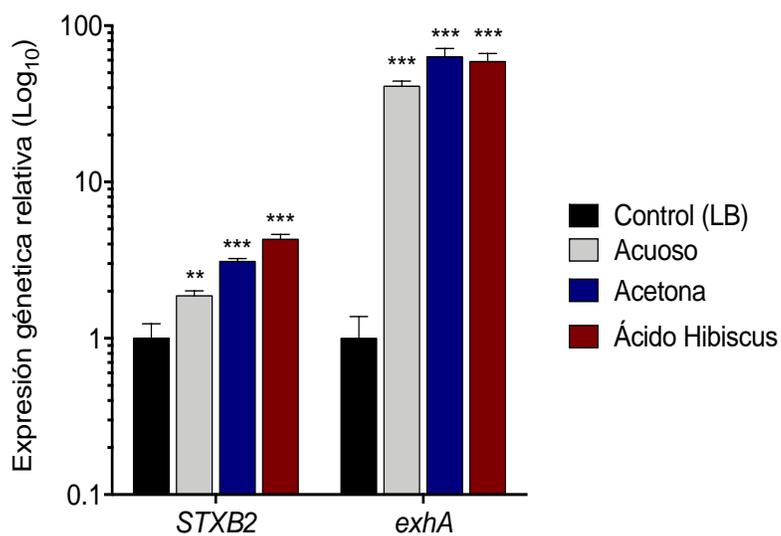


Figura 14. Electroforesis del RNA total de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

El RNA fue obtenido a partir de cultivos en medio LB. El RNA obtenido de cada cepa se indica a continuación. **Carril 1:** Control *E. coli* enterohemorrágica EDL933, **Carril 2:** Extracto acuoso + *E. coli* enterohemorrágica EDL933, **Carril 3:** Extracto acetónico *E. coli* enterohemorrágica EDL933, **Carril 4:** Ácido hibiscus + *E. coli* enterohemorrágica EDL933, **Carril 5:** Control *E. coli* enterohemorrágica EHEC A, **Carril 6:** Extracto acuoso + *E. coli* enterohemorrágica EHEC A, **Carril 7:** Extracto acetónico *E. coli* enterohemorrágica EHEC A, **Carril 8:** Ácido hibiscus + *E. coli* enterohemorrágica EDL933.



CMI= Concentración Mínima Inhibitoria, Acuos (20 mg/mL), acetona (7 mg/mL), y ácido hibiscus (5 mg/mL)

** $p < 0.01$
 *** $p < 0.001$

Figura 15. Expresión genética relativa de los genes *STXB2* y *exhA* de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EDL933).

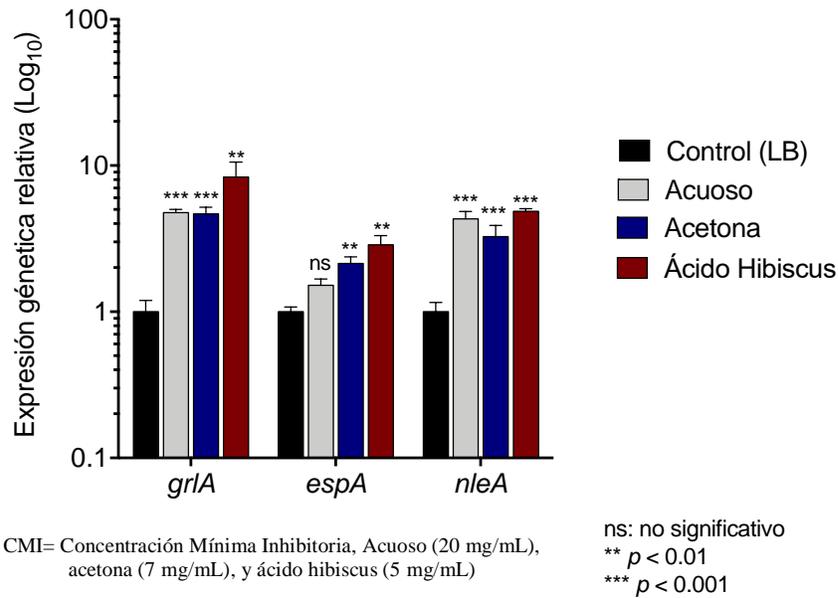


Figura 16. Expresión genética relativa de los genes *grlA*, *espA* y *nleA* de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EDL933).

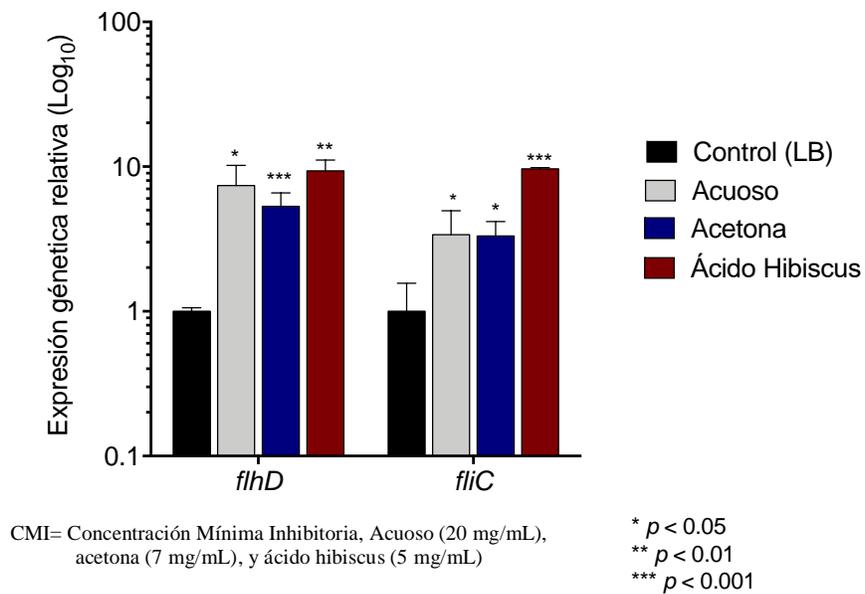


Figura 17. Expresión genética relativa de los genes *flhD* y *fliC* de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EDL933).

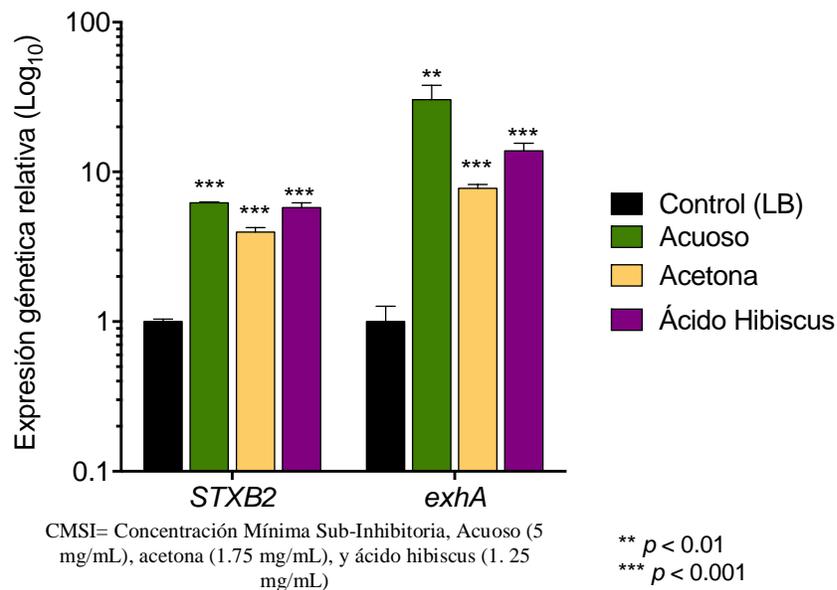


Figura 18. Expresión genética relativa de los genes *STXB2* y *exhA* de la CMSE de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EDL933).

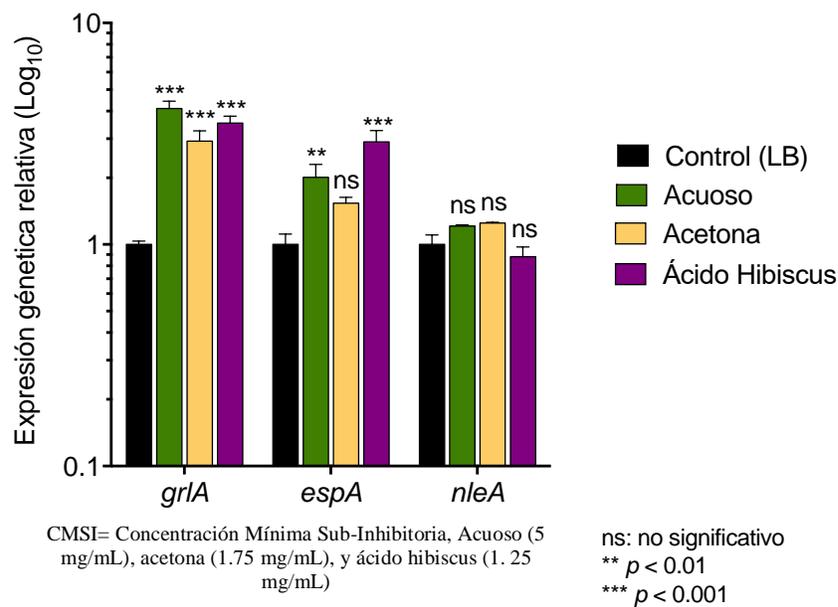


Figura 19. Expresión genética relativa de los genes *grlA*, *espA* y *nleA* de la CSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EDL933).

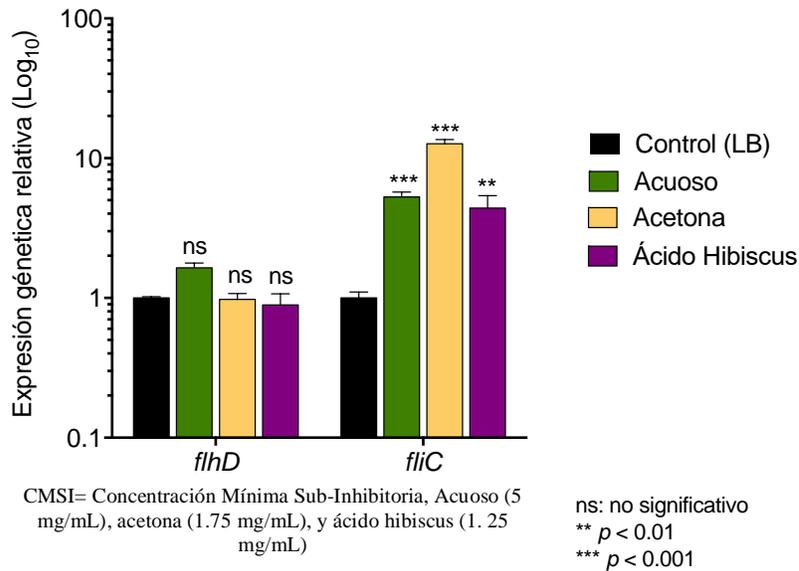


Figura 20. Expresión genética relativa de los genes *flhD* y *fliC* de la CMSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EDL933).

En las Figura 21 y Figura 22 se muestran los resultados pertenecientes a la cepa *E. coli* enterohemorrágica EHEC A, utilizando las CMI's de extracto acuoso, extracto de acetona y ácido hibiscus (20, 7 y 5 mg/mL, respectivamente).

La expresión de *grlA* se incrementó con extracto acuoso en aproximadamente 7 veces más con respecto al control, pero no se mostró diferencia significativa en la expresión genética relativa al utilizar extracto acetónico y ácido hibiscus. Con respecto al gen *espA*, el extracto acuoso aumento la expresión de este gen 4 veces más respecto al control, no hubo diferencia significativa al usar extracto acetónico y el ácido hibiscus redujo la expresión genética dos veces menos. En relación al gen *nleA* de igual forma, el extracto acuoso aumento la expresión 6 veces, todo esto comparado con el control (Figura 21). Para el gen *flhD* hubo un aumento de la expresión al utilizar los 3 tratamientos de estudio, esto 10, 15 y 11 veces más (extracto acuoso, extracto acetona y ácido hibiscus, respectivamente) comparado con el control (Figura 22).

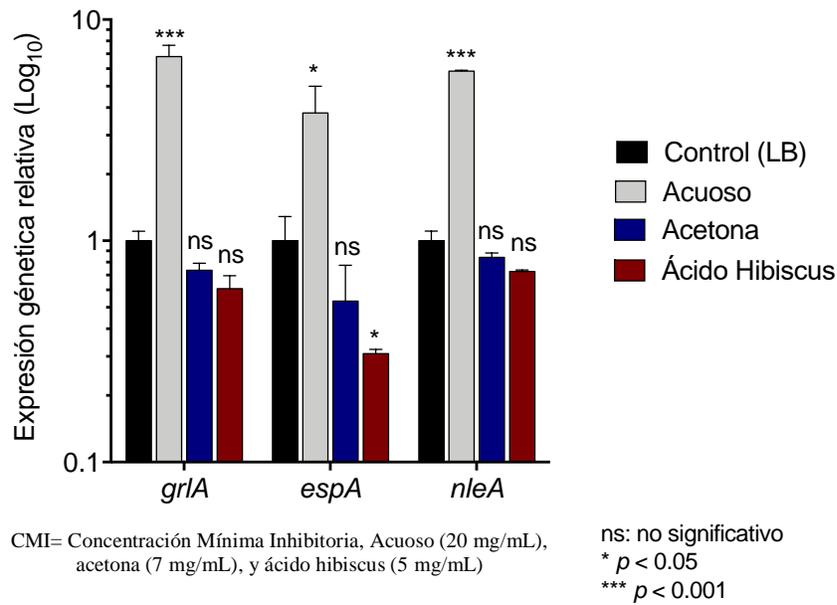


Figura 21. Expresión genética relativa de los genes *grlA*, *espA* y *nleA* de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A).

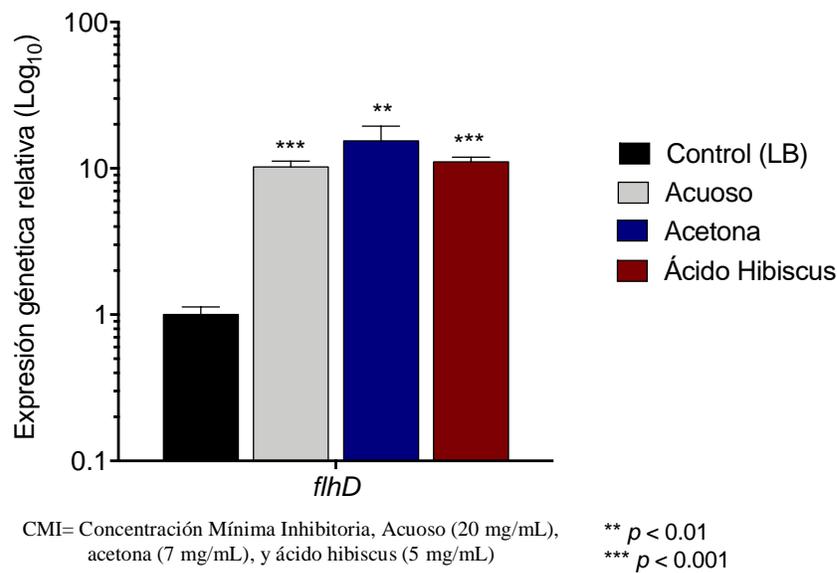


Figura 22. Expresión genética relativa del gen *flhD* de la CMI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A).

En las Figura 23 y Figura 24, se muestran los resultados de *E. coli* enterohemorrágica EHEC A, utilizando las CMSI's de los extractos y ácido hibiscus (5, 1.75 y 1.25 mg/mL, respectivamente). La expresión de *glaA* no se vio modificada al utilizar extractos de *H. sabdariffa* y ácido hibiscus, es decir no hubo diferencias significativas con respecto al control. La expresión del gen de virulencia *espA* disminuyó 3 veces menos al usar extracto acetónico y ácido hibiscus y no hubo diferencia significativa al utilizar extracto acuoso. El gen *nleA* aumento su expresión 2 veces más al utilizar extracto acuoso, mientras que la expresión genética no se vio modifica al emplear extracto de acetona y ácido hibiscus (Figura 23). Por último, para la expresión de *flhD*, no hubo diferencias significativas al utilizar cualquiera de los 3 tratamientos en comparación con el control (Figura 24).

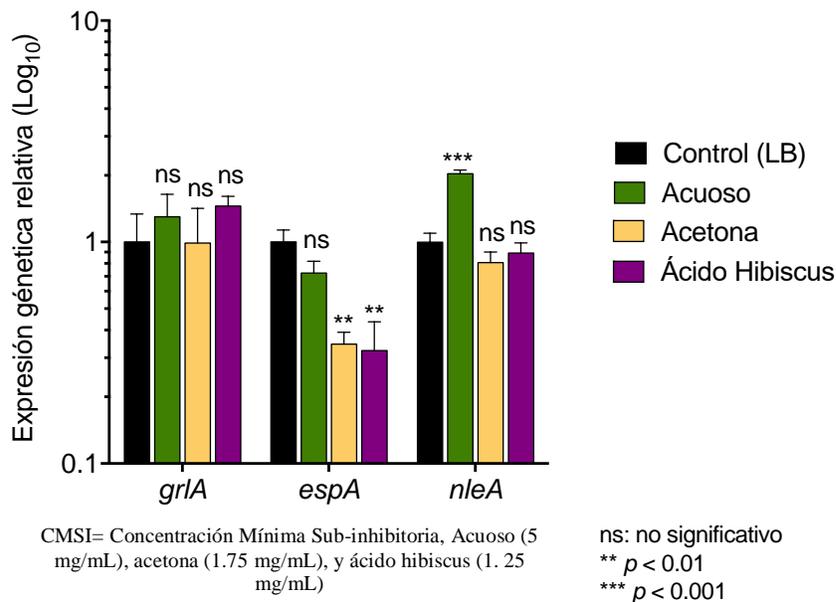


Figura 23. Expresión genética relativa de los genes *glrA*, *espA* y *nleA* de la CMSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A).

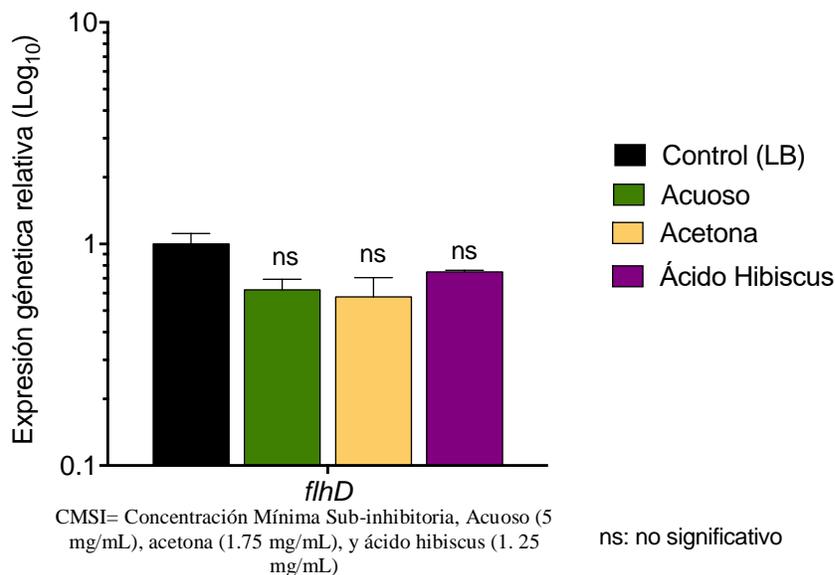


Figura 24. Expresión genética relativa del gen *flhD* de la CMSI de los diferentes tratamientos con respecto al control en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A).

Carey et al. (2008) evaluaron el efecto de probióticos y ácidos orgánicos en la expresión del gen toxina Shiga 2 (*stx2A*) en *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica. De forma general, estos autores reportan que, la expresión del gen *stx2A* disminuyó a medida que aumentaba la concentración de ácido orgánico. De igual forma mencionan que la adición de ácidos orgánicos (ácido acético y ácido láctico) produjo una mayor disminución en la expresión del gen *stx2A*, luego ácido inorgánico (HCl). La mayoría de los compuestos disminuyeron la expresión del gen *stx2A* tanto en EHEC O157: H7 como en EAEC O104: H4.

Medellín-Peña et al. (2017) evaluaron la expresión de la virulencia de EHEC O157 en respuesta a las fracciones seleccionadas cromatográficamente de *Lactobacillus acidophilus* La-5. Las toxinas de Shiga estaban entre los factores de virulencia investigados. Según lo medido por la densitometría de productos de PCR de transcripción inversa, la expresión *stx2A* y *stx2B* no fueron significativamente diferentes de las muestras de control.

García-Heredia et al (2016) observaron la influencia de extracto etanólico de orégano, extracto etanólico de corteza de palo de Brasil, solución de agua destilada de carvacrol, solución de agua destilada de citral, solución de agua destilada de brazilin y solución 96 % etanol de rifaximina en la expresión de tres genes de virulencia en cepas de *E. coli*. Se utilizaron los extractos / compuestos al

75 % de CMB. La expresión del gen *stx2*, que está presente en EHEC O157: H7 y EAEC O104: H4, disminuyó del 34 % al 96 %, en comparación con el control, como resultado de los tratamientos de extractos / compuestos. Las excepciones fueron brazilin, que aumentó la expresión de *stx2* en ambas cepas y carvacrol que aumentó la expresión de *stx2* en EAEC O104: H4 solamente. Estos aumentos fueron entre 30 y 40 %. La mayoría de los extractos aumentaron la expresión del gen *aggR* en EAEC O104: H4, con la excepción de orégano y citral, que redujeron la expresión en aproximadamente 40 y 60 %. A la inversa, *aggR* se sobreexpresó en un 10 % y 55 %, en comparación con el control, por todos los extractos / compuestos en la cepa EAEC 042. El gen *pic*, que es un autotransportador de serina de *Enterobacteriaceae* (SPATE) y media la colonización bacteriana, está presente en EAEC O104: H4 y EAEC 042. Sorprendentemente, *pic* se expresó en exceso en un 20 y 110%, en comparación con el control, con todos los extractos / compuestos en EAEC O104: H4, excepto orégano y citral, que disminuyeron la expresión en un 30 y 60 %. Por otro lado, la expresión del gen *pic* se redujo en un 50 y 97 % en EAEC 042 en todos los tratamientos. La expresión de *rpoS* se incrementó con orégano, carvacrol y rifaximina, pero se redujo con palo de Brasil y citral. Brazilin aumentó la expresión de *rpoS* en EHEC O157: H7, pero la redujo en EAEC O104: H4. Curiosamente, todos los compuestos redujeron la expresión de *rpoS* en EAEC 042 en un 20 y 60 %, en comparación con el control.

Existen algunas investigaciones que demuestran que cuando una sustancia, por ejemplo, un antibiótico se utiliza por debajo de la CMI, puede aumentar la expresión de los genes asociados a la virulencia, Los ejemplos de tales efectos incluyen el aumento de los niveles de algunas exoproteínas en respuesta bajas dosis de clindamicina en el estreptococo del grupo A (Herbert et al., 2001). Otro estudio reportado por Kastbjerg et al. (2010) muestra la Influencia de concentraciones sub-letales de desinfectantes comunes en la expresión de factores de virulencia de *L. monocytogenes*. Las concentraciones sub-letales de desinfectantes utilizados habitualmente en la industria alimentaria afectan la expresión del gen de virulencia en el patógeno humano *L. monocytogenes*, y el efecto depende de los componentes activos del desinfectante. Desde una perspectiva práctica, el estudio subraya que los desinfectantes deben usarse a las concentraciones letales recomendadas por los fabricantes. Se necesitan más estudios para dilucidar si los cambios en la expresión del gen de virulencia inducidos por los desinfectantes tienen un impacto en la virulencia u otras propiedades biológicas, como la resistencia a los antibióticos. Hormesis es un término utilizado por toxicólogos para referirse a una respuesta de dosis bifásica a un agente ambiental caracterizado por una

estimulación de dosis baja o efecto beneficioso y un efecto inhibitor o tóxico de dosis alta. En los campos de la biología y la medicina, la hormesis se define como una respuesta adaptativa de células y organismos a un estrés moderado (generalmente intermitente). Los ejemplos incluyen preacondicionamiento isquémico, ejercicio, restricción energética de la dieta y exposiciones a bajas dosis de ciertos antibióticos.

8.11 Determinación del efecto sobre la célula bacteriana de ácido hibiscus de extracto acetónico de *Hibiscus sabdariffa*

8.11.1 Medición de permeabilidad de membrana con cristal violeta

Se sabe que el cristal violeta hidrofóbico muestra una penetración débil de la membrana externa, pero, por el contrario, se encuentra que penetra en las células con membranas celulares deterioradas, por lo tanto, el ensayo de cristal violeta puede emplearse para la detección de daños en la membrana (Devi et al., 2010; Tsuchido et al., 1985). La absorción de violeta cristal por *E. coli* EHEC A enterohemorrágica fue del 9 % en ausencia de ácido hibiscus, pero aumentó al 40 %, 57 % y 90 % después de los tratamientos de CMI, CMB, 10x CMI de ácido hibiscus, respectivamente (Figura 25). La absorción de cristal violeta por *Salmonella* C65 fue del 8 % en ausencia de ácido hibiscus, pero aumentó a 66 %, 68 % y 82 % después de los tratamientos con CMI, CMB, 10 × CMI de ácido hibiscus, respectivamente (Figura 26). La Concentración Mínima Subinhibitoria (CMSI) de ácido hibiscus no mostró ningún efecto, lo que revela que no alteró la permeabilidad de la membrana en ambas bacterias patógenas (Figura 25 y Figura 26).

Los resultados del ensayo de absorción de cristal violeta indican que el ácido hibiscus altera la permeabilidad de la membrana de EHEC A y *Salmonella* C65. El efecto del ácido hibiscus sobre la permeabilidad de la membrana externa se demostró por la absorción del colorante cristal violeta. El cristal violeta penetra débilmente la membrana externa, pero entra fácilmente cuando la membrana está dañada. Se observó una mejora significativa en la absorción de cristal violeta de EHEC A y *Salmonella* C65 tratadas con ácido hibiscus en comparación con el control.

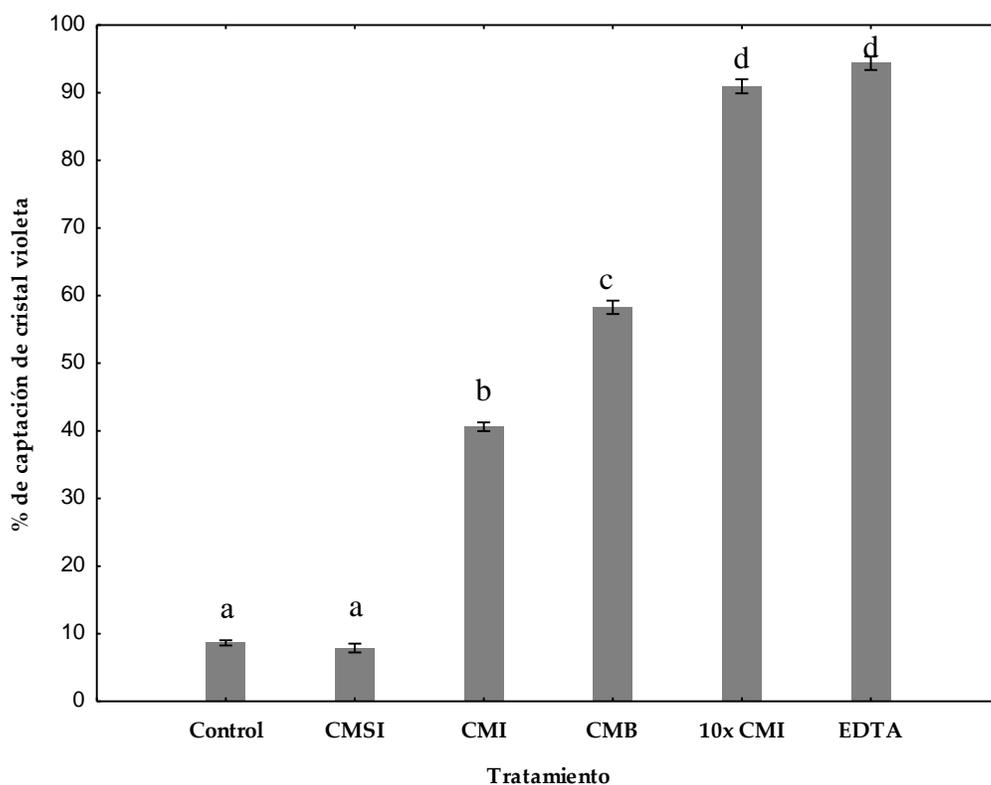


Figura 25. Cambio en la permeabilidad de la membrana bacteriana de EHEC A (analizado por la absorción de violeta cristal) en presencia de diferentes concentraciones de ácido hibiscus y EDTA.

El porcentaje de absorción de cristal violeta se trazó frente a la concentración del tratamiento. Se ilustra la media \pm desviación estándar para tres réplicas. Los valores con letras diferentes expresan diferencias significativas en $\alpha = 0.05$ por la prueba de Tukey. CMSI: Concentración Mínima Sub-Inhibitoria, CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, CMB: Concentración Mínima Bactericida, 10x CMI: Concentración Mínima Inhibitoria 10x, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Esto muestra que el ácido hibiscus altera la permeabilidad de la membrana y hace que las células sean permeables a los solutos. Además, el EDTA también aumentó significativamente la absorción de cristal violeta en las células (Gráficos 13 y 14). En las bacterias Gram negativas, el EDTA induce la permeabilización de la membrana externa y la lisis celular (Haque y Russel, 1974).

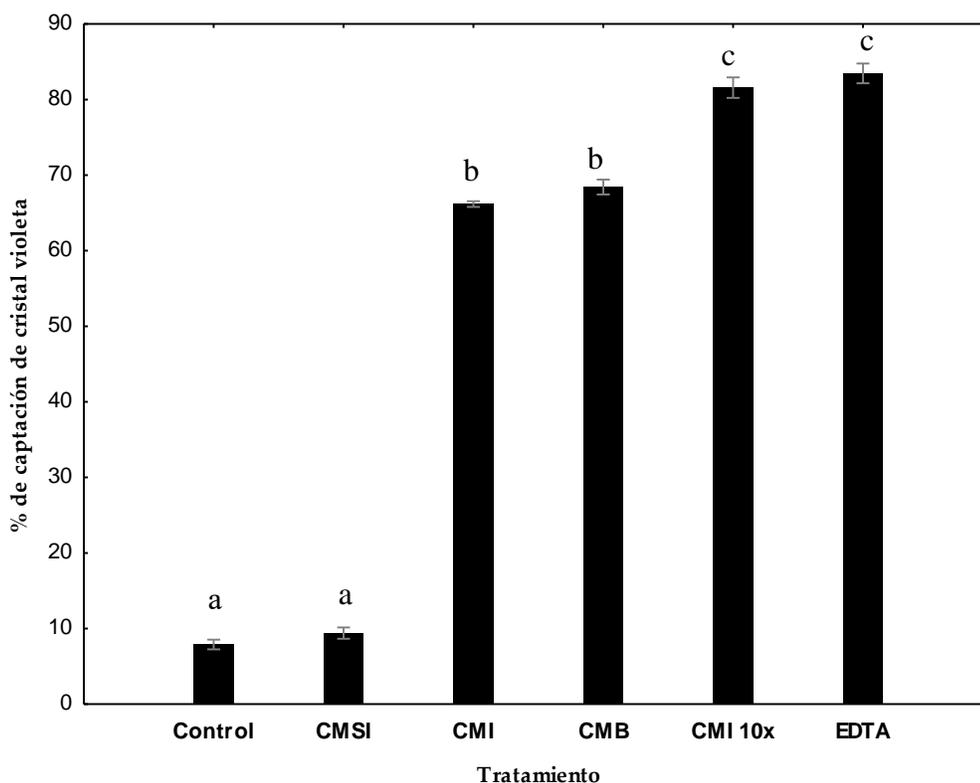


Figura 26. Cambio en la permeabilidad de la membrana bacteriana de *Salmonella* C65 (analizado por la absorción de violeta cristal) en presencia de diferentes concentraciones de ácido hibiscus y EDTA.

El porcentaje de absorción de cristal violeta se trazó frente a la concentración del tratamiento. Se ilustra la media \pm desviación estándar para tres réplicas. Los valores con letras diferentes expresan diferencias significativas en $\alpha = 0.05$ por la prueba de Tukey. CMSI: Concentración Mínima Sub-Inhibitoria, CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, CMB: Concentración Mínima Bactericida, 10 \times CMI: Concentración Mínima Inhibitoria 10 \times , EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

8.11.2 Cambios en la movilidad celular

Se observó la movilidad celular de EHEC A y *Salmonella* C65 a diferentes concentraciones de ácido hibiscus (CMSI, CMI, CMB y CMI 10x) en un microscopio de contraste de fases. Se utilizaron las 2 cepas patógenas sin tratamiento como control. Se encontró que el ácido hibiscus a concentraciones de CMI, CMB y CMI 10x inhibían la movilidad de EHEC A y *Salmonella* C65 en Caldo de Soya Tripticaseína con Extracto de Levadura (CST + EL) diluido en solución tampón 0.5 mM pH 7.4.

El tratamiento de EHEC A y *Salmonella* 65 con ácido hibiscus en diferentes concentraciones (CMI, CMB y CMI 10x) dio como resultado una reducción inmediata del comportamiento móvil. La inhibición de la movilidad persistió durante los 10 minutos de observación.

El tratamiento con CMSI de ácido hibiscus, no tuvo un efecto notable sobre la movilidad de ninguno de los organismos. Los experimentos se repitieron dos veces. El EDTA utilizado como control positivo presentó una reducción inmediata del comportamiento móvil. Gill y Holley (2006) observaron los cambios en la movilidad de *E. coli* y *L. monocytogenes* al ser tratadas con eugenol, carvacrol o cinamaldehído. El eugenol y carvacrol 10 mM dieron como resultado una disminución inmediata del comportamiento móvil. De igual forma, el tratamiento con 5 mM o 10 mM de cinamaldehído dio como resultado mmovilidad reducida para ambos organismos, que pareció aumentar en severidad durante el período de observación de 10 minutos. El tratamiento con 1 mM de eugenol, cinamaldehído o carvacrol no tuvo un efecto notable en la movilidad de ninguno de los dos microorganismos. Los efectos observados del ácido hibiscus en la movilidad de EHEC A y *Salmonella* C65 proporcionan evidencia adicional para apoyar la alteración de la membrana como el evento letal principal. La movilidad de las células planctónicas de EHEC A depende de los flagelos, que están integrados estructuralmente en la membrana y que reciben energía del gradiente protónico de la membrana en lugar de intermedios fosforilados como el ATP (Silverman, 1980).

Se ha demostrado que la velocidad del motor flagelar de *E. coli* está relacionado linealmente con la fuerza motriz del protón (Gabel y Berg, 2003). La inhibición de la movilidad observada en presencia de ácido hibiscus (CMI, CMB y CMI 10x) probablemente se deba a la inhibición directa del motor de flagelos por la disipación del gradiente de protones de la membrana. Sin embargo, no se puede descartar la pérdida de movilidad debido a cambios estructurales como la pérdida de flagelos. Por último, de acuerdo con Gill y Holley (2006) las bacterias patógenas con CMB y CMI 10x se clasificaron como no móviles al igual que el EDTA, las bacterias con CMI de ácido hibiscus como movilidad reducida y las bacterias con CMSI y control (batería sin tratamiento de ácido hibiscus) como móviles positivos.

8.11.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido se realizó para observar directamente los cambios morfológicos celulares sobre EHEC A después del tratamiento con ácido hibiscus (CMI y CMI 10x). El ácido hibiscus tanto a CMI como a CMI 10x causó lisis de la membrana celular, como lo demuestra el daño de la membrana y la morfología celular alterada, esto al compararlas con la micrografía de EHEC A control (células no tratadas), se puede notar fácilmente las diferencias en la morfología de la bacteria,

se puede decir que el control las células se observaron intactas (Figura 27 a, b y c). Se podría decir que, el análisis SEM reveló que el ácido hibiscus podría estar interactuando con la bicapa lipídica de las células bacterianas e inducir a ruptura celular.

Khan et al. (2017) realizaron análisis de micrografía electrónica de barrido en *E. coli* tratada con carvacrol (450 µg / mL), estos autores mencionan que el carvacrol provoca lisis de la membrana celular, esto comparado con el control.

Lv et al. (2014) observaron células de *E. coli* tratadas por 60 min con diversos péptidos PMAP-36, GI24 y melitina a CMI 1x. Las micrografías mostraron que el tratamiento con todos los péptidos indujo la alteración de la superficie de la membrana en comparación con el control, que exhibió una superficie brillante y lisa. Las células bacterianas tratadas con PMAP-36 y GI24 se volvieron rugosas y onduladas en la superficie, de forma similar a las células tratadas con melitina.

Devi et al. (2010) visualizaron las células no tratadas de *Salmonella typhi* teniendo una membrana celular normal, mientras que las tratadas con eugenol (1 %, v / v) mostraron deformación en su superficie. También se menciona que es evidente que la membrana bacteriana se rompió y una pérdida completa de la integridad de la membrana.

Por otro lado, Di-Pasqua et al. (2007) evaluaron el efecto de cinamaldehído, limoneno, carvacrol y timol, sobre la superficie de *S. Typhimurium*, en donde las micrografías muestran cambios en la apariencia de las células como resultado del tratamiento, muy probablemente ejercido a través de un efecto sobre la envoltura celular exterior.

El examen de SEM reveló que la morfología de la superficie rugosa y la contracción de la célula era evidente en las células tratadas con ácido hibiscus, en comparación con la no tratada. La pérdida de la integridad de la membrana y la superficie celular dañada respaldan aún más la evidencia de que el modo de acción bactericida del ácido hibiscus, en este caso contra EHEC A es a través de la alteración de la membrana celular.

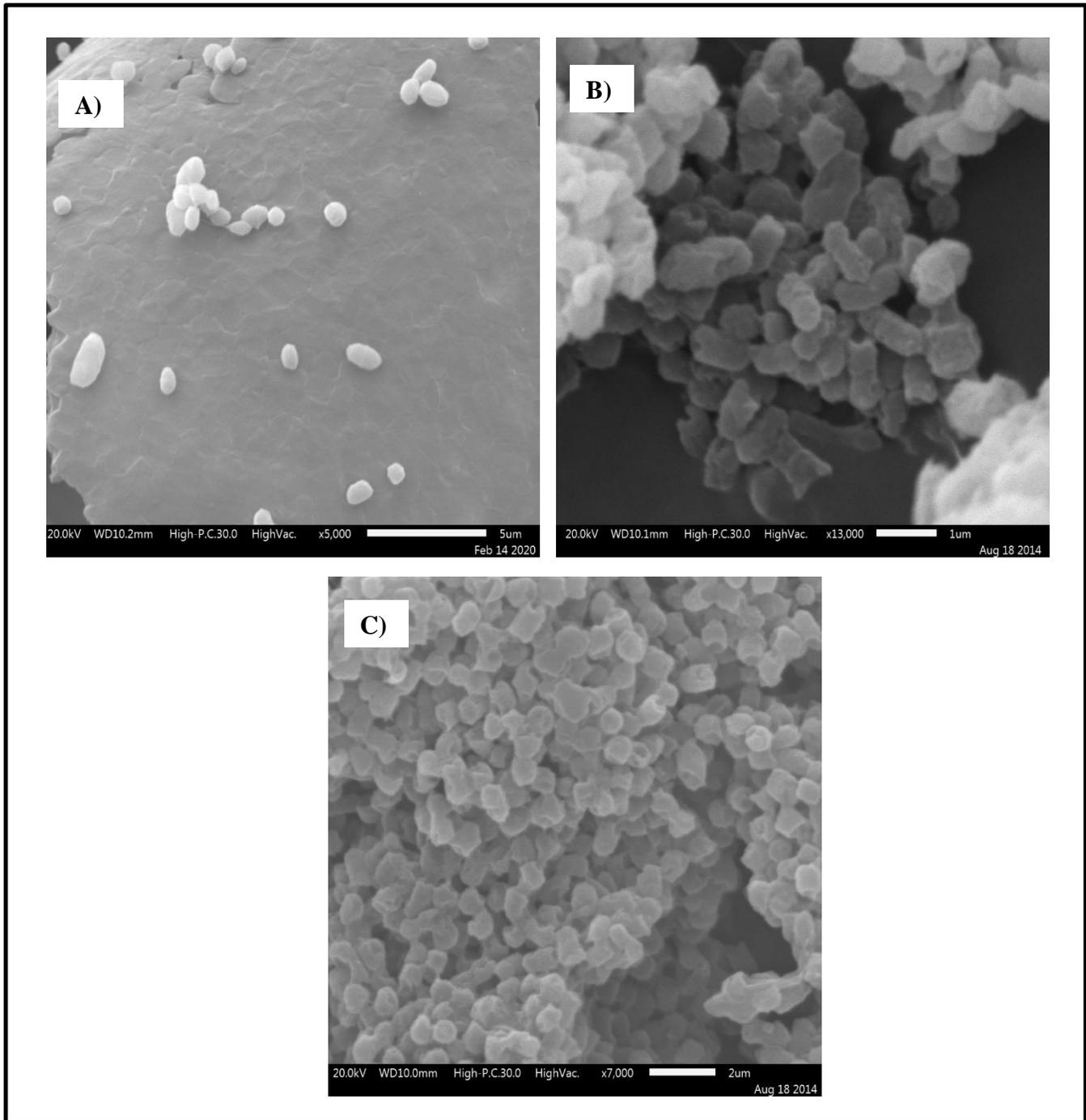


Figura 27. Análisis de microscopía electrónica de barrido de EHEC A. A) Células sin tratamiento mostrando morfología intacta y regular. B) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI (5 mg/mL) y C) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI 10x (50 mg/mL).

8.11.4 Tinción de microscopía de fluorescencia

Las células bacterianas vivas y muertas se evaluaron mediante tinción NA / BE (Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio). Sin embargo, en la tinción NA / BE, NA tiñe células vivas; BE impregna solo las células que han perdido la integridad de la membrana. Las células teñidas con NA dan fluorescencia verde que representa células vivas, mientras que EB da fluorescencia roja que denota células muertas. La mayoría de las células no tratadas mostraron una fluorescencia verde debido a las células viables o vivas, lo que indica la estructura intacta de la pared celular, mientras que solo un pequeño porcentaje de las células no tratadas mostraron fluorescencia roja que indica células muertas. En contraste, se encontró una alta fluorescencia de color rojo en las células tratadas con ácido hibiscus CMI y CMI 10X) y de igual forma se ven más células muertas al incrementar la concentración de ácido hibiscus, respecto al control (lo que indica su toxicidad para EHEC A (Figura 28).

Estos resultados sugieren que el tratamiento de la cepa de EHEC A con ácido hibiscus conduce a la muerte celular y / o al efecto bacteriostático, que coincide con los resultados determinados por CMI. Hameed et al. (2010) estudió el efecto de las nano partículas de ZnO dopadas con Nd sobre la viabilidad de las cepas de *E. coli* mediante microscopía laser confocal en presencia de tinción con naranja de acridina / bromuro de etidio. Los resultados de la tinción dual sugieren que las células tratadas con ZnO NP dopadas con Nd están muertas en comparación con las células *E. coli* y *K. pneumoniae* no tratadas.

8.11.5 Fuga de material intracelular

Otra estrategia para determinar el modo de acción de ácido hibiscus contra cepas patógenas se realizó sobre la base de la liberación de materiales absorbentes de 260 nm de las células tratadas de EHEC A.

En este ensayo, el ácido hibiscus (CMSI, CMI, CMB, CMI 10x) mostró potencial para alterar la integridad de la membrana celular de EHEC A y *Salmonella* C65, lo que condujo a la liberación de materiales celulares. Como se muestra en las Figura 29 y Figura 30, el ácido hibiscus condujo a la liberación de materiales intracelulares basados en la absorbancia a 260 nm, mientras que los controles no mostraron liberación de contenido celular. El ácido hibiscus a las diferentes concentraciones indujo

la alteración de la membrana citoplasmática después de 2 h de tiempo, ya que la liberación de nucleótidos comenzó a aumentar después de este tiempo.

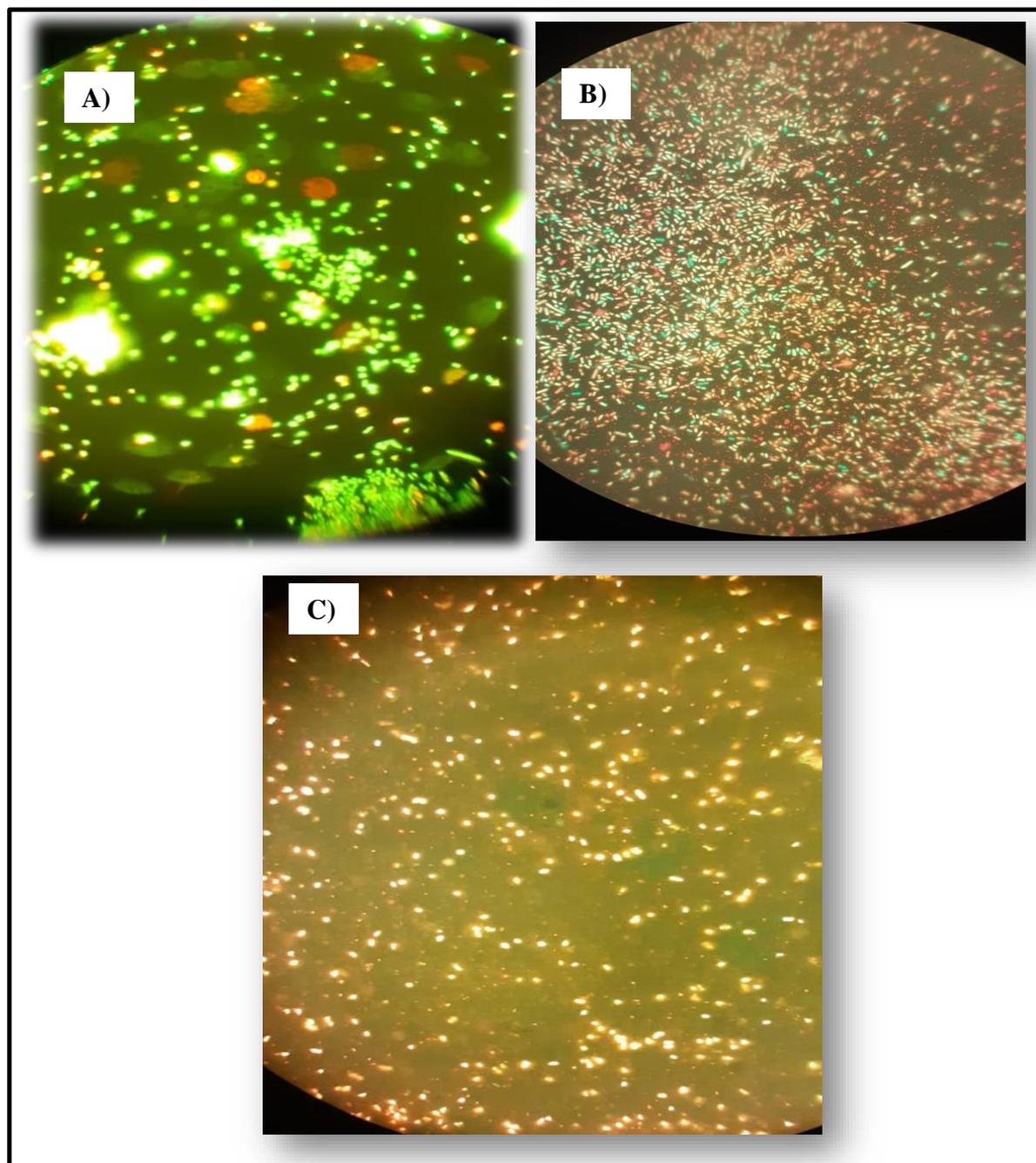


Figura 28. Evaluación microscopía de EHEC A. La muerte celular bacteriana se examinó mediante tinción NA / BE y microscopía de fluorescencia. Las bacterias vivas emiten fluorescencia verde y las bacterias muertas fluorescencia roja
A) Células sin tratamiento. B) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI (5 mg/mL) y C) Células tratadas con ácido hibiscus a CMI 10x (50 mg/mL).

Khan et al. (2017) realizaron un estudio donde el carvacrol mostró potencial para alterar la integridad de la membrana celular de *E. coli*, mediante la liberación de material intracelular. A medida que el ADN y el ARN se liberan después de la ruptura de la membrana, estos nucleótidos se cuantificaron monitoreando la absorbancia a 260 nm. Pinto et al. (2017) evaluaron el efecto de extracto de *Annona muricata* L. sobre la fuga de material intracelular de *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *E. faecalis*, refiriendo que se provocó un aumento del 19 %, 41 % y 30 % para las bacterias mencionadas, respectivamente, esto en comparación con los controles. El flujo de salida de nucleótidos del compartimento intracelular fue más significativo para las bacterias Gram negativas que las Gram positivas.

Bajpai et al. (2013) evaluó la densidad óptica (DO 260nm) de los filtrados de cultivo de *B. cereus* ATCC 13061 y *E. coli* O157: H7 ATCC 43889. Las células expuestas a aceite esencial de *Cudrania tricuspidata* a concentración CMI revelaron una liberación creciente de materiales absorbentes de 260 nm con respecto al tiempo. Sin embargo, no hay cambios en la densidad óptica de las células no tratadas (control) de *B. cereus* ATCC 13061 y *E. coli* O157: H7 ATCC 43889. Después de 60 minutos de tratamiento, se observó un aumento de aproximadamente más de 2 veces en la densidad óptica de los filtrados de cultivo celular bacteriano tratados con *C. tricuspidata*.

Cualquier compuesto antimicrobiano eficaz debe penetrar o alterar la membrana plasmática bacteriana. En el presente estudio, el ácido hibiscus modificó la membrana de *E. coli*, lo que condujo a la liberación de contenido celular según lo confirmado en función de los valores de absorbancia medidos a 260 nm.

De hecho, el ácido hibiscus puede alterar la membrana, permitiendo la fuga de constituyentes intracelulares, mientras que otros compuestos causan solo una alteración estructural de la envoltura externa.

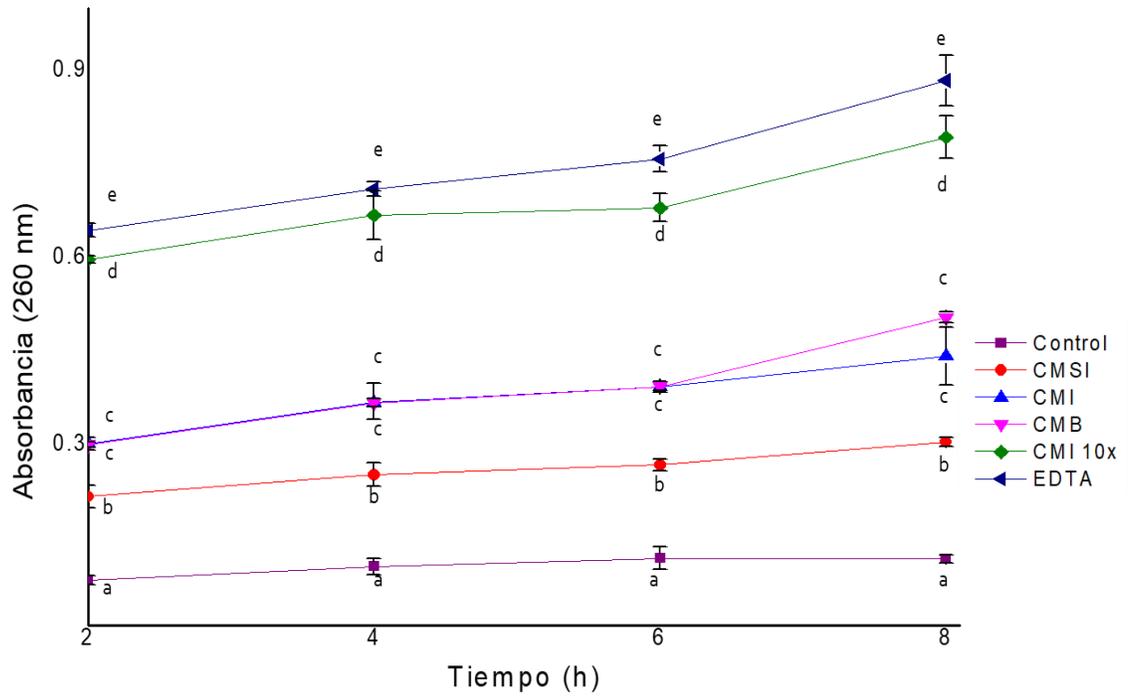


Figura 29. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre la velocidad de liberación de material intracelular (260nm) de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC A).

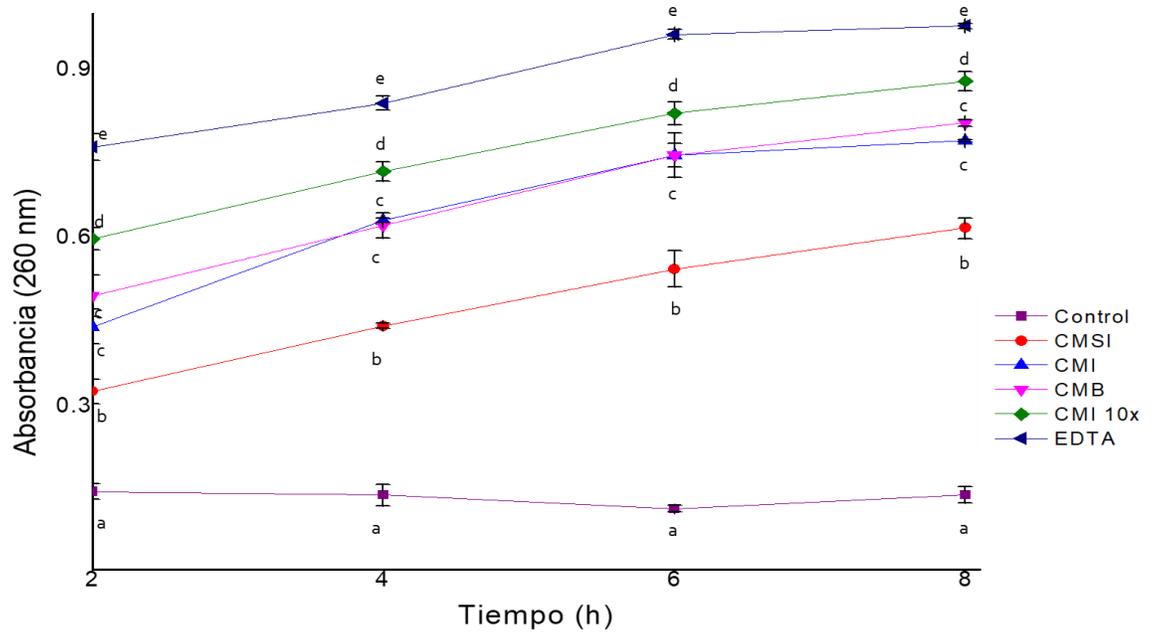


Figura 30. Efecto de ácido hibiscus (1.25 mg/mL a 50 mg/mL) sobre la velocidad de liberación de material intracelular (260nm) de *Salmonella Typhimurium* (*Salmonella* C65).

9. Conclusiones

- Los extractos y el ácido hibiscus de *H. sabdariffa* (con y sin tratamiento térmico), constituyen una alternativa potencial en el control de bacterias patógenas como *Salmonella* y patotipos de *E. coli*, resistentes a múltiples antibióticos.
- El ácido hibiscus y el ácido hidroxycítrico son dos de los compuestos responsables del efecto antimicrobiano de los cálices de *H. sabdariffa*.
- Debido a su relativa alta concentración, es posible que el ácido hibiscus sea uno de los principales agentes bactericidas presentes en los cálices de jamaica. Sin embargo, es posible también la presencia simultánea de otros compuestos con actividad antimicrobiana en los cálices de jamaica y en sus extractos.
- La abundancia relativa de ácido de hibiscus en los cálices de *H. sabdariffa* y la relativa facilidad para obtenerlo, hacen que este compuesto pueda ser potencialmente útil en la industria alimentaria.
- El ácido hibiscus y extracto acuoso obtenido de los cálices de *H. sabdariffa* podría ser una alternativa en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias patógenas resistentes o multiresistentes a los antibióticos.
- El efecto antimicrobiano del ácido hibiscus podría deberse a la alteración de la permeabilidad a la membrana de *E. coli* enterohemorrágica y *S. Typhimurium* esto comprobado por las técnicas de cristal violeta, SEM, doble tinción de (NA/BE), movilidad y fuga de material intracelular.

10. Referencias bibliográficas.

Abd, K.S., Suliman, S.I., Zakria, I.A y Hassan, N.E. (2015). Antimicrobial potential of methanolic extracts of *Hibiscus sabdariffa* and *Ricinus communis*. *Adv. Med. Plant. Res.* (3),18-22.

Abdallah, E.M. (2016). Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Ac. Dis.* (6), 512-516.

Adachi, J.A.; Mathewson, J.J., Jiang, Z.D., Ericsson, C.D., DuPont, H.L. (2002). Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Ann. Intern. Med.* (136), 884–887.

Adams, M.R. y Moss, M.O. (2005). *Food Microbiology*. Ed. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K. 479 pp.

Afolabi, O. C., Ogunsola, F. T. y Coker, A. O. (2008). Susceptibility of cariogenic *Streptococcus mutans* to extracts of *Garcinia kola*, *Hibiscus sabdariffa*, and *Solanum americanum*. *West Afr. J. Med.* (4), 230–233.

Ahameethunisa, A.R. y Waheeta, H. (2012). *In vitro* antimicrobial activity on clinical microbial strains and antioxidant properties of *Artemisia parviflora*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* (24),11-30.

Alaa, G. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *Afr. J. Food Sci.* (21), 506-511.

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. y Chinou. I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food. Chem.* (49), 4168-4170.

Al-Manhel, A, J. y Niamah A, K. .2015). Effect of Aqueous and Alcoholic Plant Extracts on Inhibition of Some Types of Microbes and Causing Spoilage of Food. *J. Nutr. Food Sci.* S5: 006. doi:10.4172/2155-9600.S5-006.

Appiah, T., Yaw, D.B. y Agyare, C. (2017). Antimicrobial Activities and Time-Kill Kinetics of Extracts of Selected Ghanaian Mushrooms. *Evid. Based. Compl. Alt. Med.* (2017), 1-15.

Ávila, S.R., Gastélum, M.G, Camacho, D.A, Torres, M.J y Nevárez, M.V. (2010). Extracts of Mexican Orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) with Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess. Technol.* (3), 434–440.

Aziz, N.H., Farag, S.E. y Mousa, L.A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* (93), 43–54.

Bajpai, V.J., Sharma, A. Baek, K (2013). Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control.* (32), 582-590.

Beltrame, P., Beltrame, P.L., Carniti, P., Guardione, D. y Lanzetta, C. (1988). Inhibiting action of chlorophenols on biodegradation of phenol and its correlation with structural properties of inhibitors. *Biotechnol. Bioeng.* (31), 821–828.

Beltran-Debon, R., Alonso-Villaverde, C., Aragonés, G., Rodríguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., et al. (2010). The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine.* (17), 186–191.

Beltran-Debon, R., Alonso-Villaverde, C., Aragonés, G.; Rodríguez-Medina, I.; Rull, A., Micol, V. (2010). The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine.* (17), 186–191.

Besser, R.E, Lett, S.M, Weber, J.T, Doyle, M., Barrett, T.J. y Wells, J.G. (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. *JAMA* (124), 31-36.

Beuchat, L. (1994). Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit, World Health Organization. Series: Report WHO/FSF/FOS/98.2.

Beuchat, L.R. (2001). Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. *Microbial. Food. Contamination.* (2), 149-169.

Bhunja, A.K. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens*. Ed. Springer Science: New York, U.S.A. 276 pp.

Bibek, R. (2005). *Fundamental food microbiology*. CRC Press: Florida, U.S.A. 608 pp.

Boll, P. M., Sørensen, E. y Balieu, E. (1969). Naturally occurring lactones and lactames. III. The absolute configuration of the hydroxycitric acid lactones: Hibiscus acid and garcinia acid. *Acta Chemica Scandinavica.* (23), 286–293.

Borneman, W.S., Akin, D.E. y Vaneseltine, W.P. (1986). Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* (52), 1331–1339.

Buogo, G. y Picchinenna, D. (1937). Chemical characteristics of Roselle hemp. *Annali Di Chimica Applicata.* (27), 577–582.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food. Microbiol.* (94), 223-253.

Capita, R. y Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci Nut.* (53), 11-48.

Castro-Rosas, J. and Escartín, E.F. (2000). Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. *J. Food Sci.* 65 (1): 162-165.

Castro-Rosas, J. y Gómez-Aldapa, C.A. (2013a). Desinfectantes fitoquímicos para lechuga (*Lactuca sativa*). Solicitud de Patente con número de expediente: MX/a/2013/014626. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

Castro-Rosas, J. y Gómez-Aldapa, C.A. (2013b). Desinfectantes para manzana (*Malus domestica*) a base de plantas. Solicitud de Patente con número de expediente: MX/a/2013/014627. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

Castro-Rosas, J. y Gómez-Aldapa, C.A. (2013c). Soluciones fitoquímicos útiles como desinfectantes de tomates (*Solanum lycopersicum*). Solicitud de Patente con número de expediente: MX/a/2013/014628. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

Castro-Rosas, J. y Gómez-Aldapa, C.A. (2013d). Soluciones a base de extractos de plantas para desinfectar cilantro (*Coriandrum sativum*). Solicitud de Patente con número de expediente: MX/a/2013/014629. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C.A. y Godínez Oviedo, A. (2013). Composiciones fitoquímicas para desinfectar chiles (*Capsicum annuum*). Solicitud de Patente con número de expediente: MX/a/2013/014625. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). (2011). Preliminary foodnet data on the incidence of foodborne illnesses selected sites, United States. *Morbid. Mortal. Weekly. Rep.* (48), 582-585.

Cerna-Cortés, J.F., Vega-Negrete, W., Ortega-Villegas, M.A., Zaidi, M.B., Estrada-García, T. (2012). Consumption of street-vended beverage a potential exposure risk for non-O157

enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection: The importance of testing for virulence loci. *Clin. Infect. Dis.* (54), 154–155.

Chao, C. y M. Yin. (2009). Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathog. Dis.* (6), 201–206.

Chauhan, A. K., and Kang, S. C. (2014). Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Res. Microbiol.* (165), 559–565.

Chen, X., Zhao, X., Deng, Y., Bu, X., Ye, H., Guo, N. (2018). Antimicrobial potential of myristic acid against *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Ant.* (5), 40-49.

Chewonarin, T., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnuen, U. y Ohnishi Y. (1999). Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella Typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens Azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine in F344 rats. *Food. Chem. Toxicol.* (6), 591-601.

Choi, J. G., Kang, O. H., Lee, Y. S., Chae, H. S., Oh, Y. C., Brice, O. O., Kim, M. S., Sohn, D. H., Kim, H. S., Park, H., Shin, D. W., Rho, J. R., y Kwon, D. Y. (2011). *In Vitro* and *In Vivo* Antibacterial Activity of Punica granatum Peel Ethanol Extract against *Salmonella*. *Evid. based Compl. and alt. Med.* (2011), 690518.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2009). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-First Editions.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinic. Microbiol. Review.* (12), 564–582.

Crump, J.A., Luby, S.P. y Mintz, E.D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull. World. Health. Organ.* (82), 346-353.

Cruz, A. (2001). *Antibióticos naturales*. Selector: México. 223 pp.

Cruz-Gálvez, A.M., Gómez-Aldapa, C.A., Villagómez, Ibarra. J.R, Chavarria-Hernández, N. Rodríguez-Baños. J., Rangel-Vargas. E. y Castro-Rosas, J. (2013). Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies *in vitro* and in raw beef. *Food Control.* (32), 289-295.

Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. y Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.–A phytochemical and pharmacological review. *Food chem.* (165), 424-443.

Davidson, P.M. (2001). *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*, In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC, pp. 593–627.

Davidson, P.M. y Branen, A.L. (1993). *The use of natural antimicrobials. in: Food Preservation Techniques*. Ed. Zeuthen P, L Bogh-Sorensen: Washington. 5-29 pp.

Dawis, M.A., Isenberg, H.D., France, K.A., Jenkins, S.G. (2003). *In vitro* activity of gatifloxacin alone and in combination with cefepime, meropenem, piperacillin and gentamicin against multidrug-resistant organisms. *J. Antimicrob. Chemother.* (51), 1203-1211.

Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., and Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* (130), 107–115.

Di-Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. Y Mauriello, G. (2007). Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* (55), 4863-4870.

Djeussi, D. E., Noumedem, J. A., Seukep, J. A., Fankam, A. G., Voukeng, I. K., Tankeo, S. B. y Kuete, V. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC complemen. Alter. Med.* (1), 164.

Do, T.H.A. Le, H.H.Kitsamone, S. Nguyen, T.U. Nguyen, Q.H. (2016). *In vitro* antibacterial activity of quercetin containing extract from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *VNU J. Sci. Nat. Sci. Technol.* (32), 147–152

Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J.; Howard, J.A.K., Puschmann, H. (2009). OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* (42), 339–341.

Doyle, M.P. y Schoeni, J.L. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* (48), 855-856.

EASAC (European Academies Science Advisory). (2007). Tackling antibacterial resistance in Europe. European Academies Science Advisory Council, June 2007. Accessible en: <http://www.leopoldina-halle.de/easac-report07.pdf>.

EFSA (European Food Safety Authority). (2008). Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. Scientific opinion of the panel on biological hazards. *EFSA J.* (765), 1–87.

Eggensperger, H. y Wilker, M. (1996). *Hibiscus*-Extrakt – Ein hautvertraglicher Wirkstoffkomplex aus AHA 'a und polysacchariden. *Parfumerie und Kosmetik.* (9), 540–543.

El Manama, A.A., Alyazji, A.A., Abu Gheneima., N.A. (2011). Antibacterial, antifungal and synergistic effect of *Lawsonia inermis*, *Punica grantum* and *Hibiscus sabdariffa*. *Ann. Alquds. Med.* (7), 33-41.

El-Kamali, H.H. y Mohammed, M.F. (2006). Antibacterial activity *Hibiscus sabdariffa*, *Acacia seyal* var. *seyal* and *Sphaeranthus suaveolens* var. *suavealens* against upper respiratory tract pathogens. *Sudan. J. MS.* (1), 121-126.

Eman, M.A. y Hoda, M.Z. (2008). Studies on the effect of garlic preparation on *Escherichia coli* O157:H7 causing enteritis in lambs. *Egy. J. Clinical Pathol.* 21(4):102-129.

Estrada-García, T., Cerna, J.F., Thompson, M.R.; López-Saucedo, C. (2002). Faecal contamination and enterotoxigenic *Escherichia coli* in street-vended chili sauces in Mexico and its public health relevance. *Epidemiol. Infect.* (129), 223–226.

EunKyung, J., YoungJun, K., y Nami, J. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Soc. Chem. Ind.* (93),3769–3776.

FAO y OMS (Food and Agriculture Organization of the United Nations y Organization Mundial de la Salud). (2005). Memoria de la Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de Alimentos para las Américas y el Caribe / San José, Costa Rica. CEDOC. FAO/ Nicaragua. Managua.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, P.M. y El-Baroty, G. S. A. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Protec.* (52), 665–667.

FDA (Food and Drug Administration). (2001). Center for Food Safety and Applied Nutrition. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Los Diez Patógenos de Alimentos Menos Apreciados.

Fengs P., Stephen, D., Weagant, M.A. y Grant, A. (1998). *Bacteriological Analytical Manual*. 8th Edition, Revision A, Chapter 4. Revised: 2002.

Fernández- Escartín. E. (2008). Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Fernández, M.A., Jarcia, M.D. y Saenz M.T. (1996). Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *J Ethnopharmacol* (26),11–14.

Fey, P., Wickert, R., Rupp, M., Safranek, T. Hinrichss. (2000). Prevalence of non - O157:H7 Shiga toxin - producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. *Emerg. Infect. Dis.* (6), 530- 533.

Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A. y Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J. App. Microbiol.* (97), 104–113.

Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E. y Mandrell, R.E. (2004). Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J. Agric. Food Chem.*(19), 6042-6048.

Fullerton, M., Khatiwada, J., Johnson, J., Davis, S. y Williams, L. (2011). Determination of Antimicrobial Activity of Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Esherichia coli* O157:H7 Isolated from Food, Veterinary, and Clinical Samples. *J. food med.* (9), 250-256.

Gabel, C.V. y Berg, H.C. (2003). The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with proton motive force. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (PNAS)*. (100), 8748–8751.

Gill, A. O., y Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Enviro. Microbiol.* (10), 5750-5755.

Gill, A. O., y Holley, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology.* (1), 1-9.

Gliguem, H. y Birlouez-Aragon, I. (2005). Effects of Sterilization, packaging and storage on vitamin C degradation protein denaturarion and glycation in fortified milks. *J. Dairy Sci.* (88), 891-899.

Gómez-Aldapa, A.C.A., Torres-Vitela, M.D., Villarruel-López, A., Castro-Rosas, J. *The role of foods in Salmonella infections*. In *Salmonella. A Dangerous Foodborne Pathogen*; Mahmoud, B.S.M., Ed.; Intech: Rijeka, Croatia, 2012; Volume 2, pp. 21–46.

Gómez-Aldapa, C.A., Cerna-Cortés, J.F., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, M.D., Villarruel López, A., Gutiérrez-Alcántara, E.J., Castro-Rosas, J. (2016). Presence of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli*, on raw nopalitos (*Opuntia ficus-indica* L.) and in nopalitos salads from local retail markets in Mexico. *Foodborne Pathog. Dis.*(13), 269–274.

Griebel, C. y Lebensm, Z. (1939). *Hibiscus* “flowers”, a drug used in the preparation of food and drinks, its principal component a new acid of fruit and character (hibiscus acid). *Untersuch Lebensm.* (77), 561–571.

Griebel, C. y Lebensm, Z. (1942). The constitution and detection of hibiscus acid ((+)-allohydroxycitric acid lactone). *Untersuch Lebensm.* (83), 481–486.

Gunzer, F., Bohm, H. y Rusman, H. (1992). Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* (30), 1807-1810.

Gutiérrez-Alcántara, E., Gómez-Aldapa, C., Román-Gutiérrez, A., Rangel-Vargas, E., González, Olivares, L., y Castro-Rosas, J. (2016). Antimicrobial activity of roselle *Hibiscus sabdariffa* calyx extracts on culture media and carrots against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from raw carrots. *J. food saf.* (00), 1-9.

Gutiérrez-Alcántara, E.J., Rangel-Vargas, E.; Gómez-Aldapa, C.A., Falfán-Cortés, R.N., Rodríguez-Marín, M.L., Godínez-Oviedo, A., Cortés-López, H., Castro-Rosas, J. (2015). Antibacterial effect of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa*), sodium hypochlorite and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from tomatoes. *Lett. Appl. Microbiol.* (62), 177–184.

Hagir, O.M., Shami E. A. y Ragaa S.M. (2017). Antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of *Aloe vera* sap and leaves using different extracts. *J. Pharm. Phytochem.* (3), 298-303.

Hameed, A. S. H., Karthikeyan, C., Ahamed, A. P., Thajuddin, N., Alharbi, N. S., Alharbi, S. A., et al. (2016). In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* (6),24312.

Hansawasdi, C., Kawabata, J., Kasai, T. (2001). Hibiscus Acid as an Inhibitor of Starch Digestion in the Caco-2 Cell Model System. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (64), 1041–1043.

Haque, H. y Russel, A.D. (1974). Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and related chelating agents on whole cells of gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* (5), 447–452.

Hashemi, S.R., Zulkifli, I., Zunita, Z. y Somchit, M.N. (2008). The Effect of Selected Sterilization Methods on Antibacterial Activity of Aqueous Extract of Herbal Plants. *J. Biol Sci.* (8), 1072-1076.

Hashimoto, T., Kumazawa, S., Nanjo, F., Hara, Y. y Nakayama, T. (1999). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* (63), 2252–2255.

Haslam, E. (1998). Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hassan, S.T., Berchova, K., Pokorná, M y Švajdlenka, E. (2016). *In vitro* synergistic effect of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract in combination with standard antibiotics against *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Pharm. Biol.* (54), 1736-1740.

Hatil, H.E.K y Moneer, F.M. (2006). Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Acacia seyal* var. *seyal* and *Sphaeranthus suaveolens* var. *suaveolens* against upper respiratory tract pathogens. *Sudan J. Med. Sci.* (1), 10-18.

He, K y Roller, M. (2011). The use of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of biomarkers for quality control of plant extracts. *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products.* (19), 361-385.

Heipieper, H.J., Keweloh, H. y Rehm, H.J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *App. Environ. Microbiol.* (57), 1213–1217.

Herranz-Lopez, M., Fernández-Arroyo, S., Pérez-Sánchez, A., Barrajon-Catalan, E., Beltran-Debon, R., Menéndez, J. A., et al. (2012). Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine.* (19), 253–261.

Hida, H., Yamada, T. y Yamada, Y. (2007). Genome shuffling of *Streptomyces* sp. U121 for improved production of hydroxycitric acid. *App. Microbiol. Biotechnol.* (6), 1387–1393.

Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M., y Stewart Jr, C. N. (2014a). Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extracts against *Escherichia coli*

O157: H7 and *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and milk of various fat concentrations. *J. Food Prot.* (2), 262-268.

Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M., y Stewart Jr, C. N. (2014b). Aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces as an antimicrobial rinse on hot dogs against *Listeria monocytogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Food control.* (40), 270-277.

Hsieh, P.C., Leun, M. J y Huang, S.H. (2001). Antimicrobial effect of various combinations of plant extract. *Food Microbiology.* (18), 35-43.

Ibezim, E.C., Esimone C.O., Nnamani P.O., Onyishi I.V., Brown S.A y Obodo C.E. *In vitro* study of the interaction between some flouroquinolones and extracts of Kola nitida seed. *Afr. J. Biotechnol.* (5), 1781-1784.

Ibnusaud, I., Thomas, P. T., Rani, R. N., Sasi, P. V., Beena, T., y Hisham, A. (2002). Chiral γ -butyrolactones related to optically active 2-hydroxycitric acids. *Tetrahedron.* (24), 4887-4892.

Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. y Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochem. Biophys. Acta.* (1147), 132–136.

Indovina, R., y Capotummino, G. (1938). Chemical analysis of karkade, the extract derived from *Hibiscus sabdariffa* L. cultivated in Sicily (Palermo). *Annali Di Chimica Applicata.* (28), 413–418.

Isaacson, M., Cantor, P., Effler, P., Arntzen, L., Bomans, P. y Heenan, R. (1993). *Haemorrhagic colitis epidemic in Africa*. Ed. Lancet: Africa. 341:361 pp.

Ismail, A., Ikram, E. H. y Nazri, H. S. (2008). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds nutritional composition protein quality and health benefits. *Food.* (1), 1–16.

Itelima, J.U y Agina, S.E. (2014). *In vivo* antimicrobial activity of plants especies on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into albino rats. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (1), 002-009.

Jane, D., Siegel, M.D., Rhinehart, E., Jackson, M., y Chiarello, L. (2007). Management of multiridrug-resistant organisms in health care settings. *Admin J Infect Control.* (35), 165-193.

Jaroni, D., y S. Ravishankar. (2012). Bactericidal effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) against foodborne pathogens *in vitro* and on romaine lettuce and alfalfa sprouts. *QAS.* (4), 33–40.

Jay, M.J., Loessner, J.M y Golden, A.D. (2009). *Microbiología moderna de los alimentos.* (5ta ed.). Zaragoza: Acribia.

Jena, B.S., Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., y Sakariah, K.k. (2002). Chemistry and Biochemistry of (-)-Hydroxycitric Acid from Garcinia. *J. Agric.Food.Chem.* (50),10-22.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. y Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl Bacter.* (76), 626–631.

Kakkar, S. y Bais, S. (2004). A review on protocatechuic acid and Its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.* (95), 29–43.

Kalpna, R. y Sumitra, C. (2012). *In vitro* interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. *Asian Pacific J. Trop. Biomedicine.* S1466-S1470.

Kamatou, G.P., van Zyl R.L., van Vuuren S.F y Viljoen A.M. (2006). Chemical composition, leaf trichome types and biological activities of the essential oils of four related salvia species indigenous to Southern Africa. *J. Ess. Oil. Res.* (18), 72-79.

Kang, P.S., Seok, J.H., Kim, Y.M. Eun, J.S. y Oh, S.H. (2007). Antimicrobial and antioxidative effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower extract and its fractions on skin microorganisms and oxidation. *Food Sci. Biotechnol.* (16), 409–414.

Kararli, H., Weyrauch, G. y Rehm, H.J. (1995). Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *App. Microbiol. Biotechnol.* (33), 66–71.

Keweloh, H., Weyrauch, G. y Rehm, H.N. (1990). Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *App. Microbiol. Biotech.* (33), 66–71.

Khafaga, S.R. y Koch, H. (1980). Stage of maturity and quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*). 1. Organic acids. *Angew Bot* 54: 287–293; *Chem. Abstr.* (94), 171129.

Khan, I. y Kang, S. C. (2016). Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi-a traditional Korean fermented food. *Food Control.* (60), 88–94.

Kim, J., Marshall, M.R. y Wei, C. (1995). Antimicrobial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agricul Food Chem.* (43), 2839–2845.

Kitano, K., Nam, K.Y., Kimura, S., Fujiki, H. e Imanishi, Y. (1997). Sealing effects of (-)-epigallocatechin gallate on protein kinase C and protein phosphatase 2A. *Biophys. Chem.* (65), 157–164.

Kuete, V., Kamga, J., Sandio, L., Bathelemy, N. Herve, M. y Poumale, P. (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae). *BMC. Compl. Alter. Med.* (11), 6-13.

Kumate, J. e Isibasi, A. (1986). Pediatric diarrheal diseases: A global perspective. *Pediatr. Infect. Dis.* (5), 21-27.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. app. microbiol.* (3), 453-462.

Lee, M.-H., Kwon, H. A y Kwon, D.Y. (2006). Antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* (111), 270–275.

Lessoy, T.Z, Micael, E.B, Jean, T.G, Betty, M.F y Sebastien, L.N. (2012). Two novel non-conventional seed oil extracts with antioxidant and antimicrobial activities. *Trop. J. Pharmaceut. Res.* (11), 469-475.

Liu, K. S., Tsao, S. M. y Yin, M. C. (2005). *In vitro* antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phyto. Res.* (11), 942–945.

López, M. A. (2000). La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavius*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.

López-Saucedo, C. Cerna, C.J.F. Estrada-García, T. (2010). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is the most prevalent diarrheagenic *E. coli* pathotype in street-vended taco dressings in México City. *Clin. Infect. Dis.* (50), 450–451.

Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, et al. (2014) Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential α -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36. *PLoS ONE*. 9(1), e86364.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Brook, J.P. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Ed. Pearson: Madrid, España. 1096 pp.

Mahadevan, N. Kamboj, P. (2009). *Hibiscus sabdariffa* Linn—An overview. *Nat. Prod. Radiance.* (8), 77–83.

Maori, N.D y Ardo, H. (2009). A study on antimicrobial effect of extracts of *Cassia arereh* (Del.) on some clinical isolates. *J. med. Plant. Res.* (3), 116-119.

Martins, S., Amorim, E.L., Peixoto, T.J., Saraiva, A.M., Pisciotanoc, M.N., Aguilard, C.N. Teixeira, J.A. y Mussatto, S. A. (2013). Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Ind. Crops and Prod.* (41), 306-311.

Matlar, S., Visbal, S. y Arrieta, G. (2001). *E. coli* O157: H7 Enterohemorrágica: Un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado- Parte 1. *MVZ.* (6), 77-81.

Mazza G., (2000). *Health aspects of natural colors*. Natural Food Colorants. Ed. Marcel Decker: New York. 289-314 pp.

McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L. y Wilson, R. K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella* entérica serovar Typhimurium LT2. *Nature.* (413), 852-856.

McKay, D. (2009). Can hibiscus tea lower blood pressure? *Afro. Food Industry Hi-Tech.* (6), 40-42.

Medellín-Peña, M.J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S, Griffiths, M.W. (2017). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(13):4259-4267.

Mercado-Monroy, J., Castro-Rosas, J. (2018). Efecto de los extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y ácido hibiscus en combinación con antibióticos, sobre cepas resistentes a antibióticos. Tesis de maestría en ciencias de los alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.70-80.

Ministerio de Salud (MINSA). (2005). Boletín Epidemiológico. Situación epidemiológica de la enfermedad diarreica aguda en Nicaragua. CEDOC, Complejo Concepción Palacios. Managua.

Mohamed, E. A. (2016). Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. *J. Inter. Ethno.* (5), 186-190.

Molina, L.J., Manjarrez, Z.M. y Tay, Z.J. (2010). *Microbiología: Bacteriología y virología.* (1ra ed.). D.F: Méndez Editores.

Morales-Cabrera, M., Hernández-Morales, J., Leyva-Rúelas, G., Salinas-Moreno, Y., Soto-Rojas, L. y Castro-Rosas, J. (2013). Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *J. Med. Plan. Res.* (7), 2319-2322.

Morton, J. F. (1987). *Fruits of warm climates*. Florida Flair Books.

Mossel, A.A. y Moreno, G.B. (2003). *Microbiología de los alimentos; fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Zaragoza: Acribia. p. 10-39.

Mounnissamy, V., S. Kavimani, y R. Gunasegaran. (2002). Antibacterial activity of gossypetin isolated from *Hibiscus sabdariffa*. *Antiseptic*. (99),81–82.

Müller, V.B. y Franz, G. (1990). Hibiscusblüten – eine Schleimdroge. *Deutsche Apotheker Zeitung*. (7), 299–333.

Munita, J.M. y Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. (4), 1-37.

Nataro, J.P y Kaper, J.B (1998). Diarrheagenic *Escherichica coli*. *Clin Microbiol Rev*. (1), 142-201.

Navarro-García, V., Rojas, G., Zepeda, L.G., Avilés, M., Fuentes, M., Herrera, A. y Jiménez, E. (2006). Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*. (44), 297–300.

Nizar, S., Elhadi, M.A., Algalili, M.A. y Hozeifa, M.H. (2013). Antibacterial Activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) Calyx Extract. *Int. J. Ind. Med. Plants*. (46),1487-1491.

Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N. y Tassou, C.C. (2003). *Antimicrobials from herbs and spices*. In: Roller, S. (Ed.), *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. CRC Press, Washington DC, pp. 177–199.

Olaleye, M. T. (2007). Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *J. Med. Plants Res*. (1) 9–13.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2005). *Enfermedades diarreicas: prevención y tratamiento*. Washington: OPS-OMS; 995:9. CEDOC, Complejo Concepción Palacios, MINSA, Managua.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2015). *Resistencia a los antimicrobianos*. Nota descriptiva N°194.

OPS (Organización Panamericana de la Salud). (2001). *Guía Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. Ed. OPS/INPPAZ, 2ª Ed., Buenos Aires. CEDOC, Complejo Concepción Palacios, MINSA, Managua.

OPS y OMS (Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. (2005). Enfermedades diarreicas: prevención y tratamiento. Washington: OPS-OMS; 995:9. CEDOC, Complejo Concepción Palacios, MINSA, Managua.

Osei-Djarbeng, S.N., Amonoo-Neizer, J. y Portia, P.N. (2014) Comparative antimicrobial activities of different solvent extracts and a refreshing drink (Sobolo) made from *Hibiscus sabdariffa* Linn. *Int. J. Herb. Med.* (3), 01-04.

Oussalah, M., Caillet, S. y Lacroix, M. (2006). Mechanism of action Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membrane and walls of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protec.* (69), 1046–1055.

Palaniappan, K. y Holley R. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* (140), 164-168.

Paredes-Paredes, M., Okhuysen, P.C., Flores, J.; Mohamed, J.A., Padda, R.S., González-Estrada, A.; Haley, C.A., Carlin, L.G., Nair, P., DuPont, H.L. (2011). Seasonality of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in the US students acquiring diarrhea in Mexico. *J. Travel Med.* (18), 121–125.

Peng, C. H., Chyau, C. C., Chan, K. C., Chan, T. H., Wang, C. J. y Huang, C. N. (2011). *Hibiscus sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. *J. Agricul. Food Chem.* (18), 9901–9909.

Pérez, E., Aguilar, P., Salvatella, R., Ribetto, A. y Castro, A. (2004). Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): su importancia en la caracterización de riesgos. Asociación Argentina de Microbiología.

Phillips, I.; Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R.; Nightingale, C., Preston, R. Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* (53), 28–52.

Pinto, N., Campos, L., Evangelista, A.C., Lemos, A.S., Silva, T.P., Melo, R. et al. (2017). Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Ind. Crops Prod.* (107), 332-340.

Portillo-Torres, L.A. (2015). Desarrollo de una solución desinfectante para fresa (*Fragaria x ananassa*) a partir de fitocompuestos. Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Prescott, L. M., Harley, J.P. y Klein D. A. (2002). *Microbiology*. Ed. McGraw-Hill: Madrid, España. 1240 pp.

Raghavendra, M.P., Mohana, D.C., Raveesha, A. (2009). Efficacy of some plant extracts against *Salmonella*: An *in vitro* study. *Asian Jr. Microbiol. Biotech. Env. Sc.* (11), 19-24.

Ramírez, M. M., Plaza, M. L., Azedero, A., Balaban, M. O. y Marshall., M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Food Sci.* (76), C428–C435.

Rangel-Vargas, E., Gutiérrez-Alcántara, E.J., Gómez-Aldapa, C.A., Falfán-Cortés, R.N., Segovia-Cruz, J.A., Salas-Rangel, L.P., Castro-Rosas, J. (2017). Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* serotypes isolated from coriander. *J. Food Saf.* (37), 1–10.

Rasheed, D.M., Porzelb, A., Frolovb, A y Hesham, R. (2018). Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α -glucosidase inhibition. *Food Chem.* (250). 236–244.

Ravikumar, R., Ranganathan, B.V., Vinothkumarm,S.R., Yamuma, P., Yasoha, P.,Priyanka, P., Rasikaa, R.V. y Sownisha, Y. (2017). Extraction and characterization of Hydroxy Citric Acid from *Garcinia combogia* cultivated at two different locations of Malabar and Srilanka. *Int. J. Pharm. Chem.* (7), 100-102.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R. y Martin-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Compr. Rev. food Sci. Food Saf.* (8), 157–180.

Reaubourg, G., y Monceaux, R. H. (1940). The chemical, botanical and pharmacological characteristics of the karkade (rosella) *Hibiscus sabdariffa* (gossypifolius). *J. Pharm. Chim.* (1), 292–305.

Rodríguez, A. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública: Mexica.* 44: 464-475.

Rodríguez-Ángeles G. (2002). *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli*. *Salud Pública Mex;* 44: 464-475.

Rodriguez-Medina, I. C., Beltran-Debon, R., Molina, V. M., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Menéndez, J. A., et al. (2009). Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa*

using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *J. Separ. Sci.* (20), 3441–3448.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2016). *Conoce más sobre la flor de jamaica*.

SAGARPA-CONACyT. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). (2010). Fondo sectorial de investigación en materia agrícola, pecuaria, acuicultura, agrobiotecnología y recursos filogenéticos. Anexo B. Demandas del sector 2010-7, demanda única: jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) con alta concentración de compuestos bioactivos, de alto rendimiento y tolerantes a enfermedades para una producción sustentable en México.

Sang, E. M., Hye, Y. K. y Jeong-D. C. (2011). Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Scienc. Direct.* (56), 907-916.

Schilcher, H. (1976). *Deutsch Apoth. Ztg.* (116), 1155 In: Franz, M. and Regensburg, G. Franz. 1988. *Hibiscus sabdariffa. Hibiscusblüten. Zeitschrift fur Phytotherapie.* (1159), 1163–1166.

Sheldrick, G.M. (2015a). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr.* (71), 3–8.

Sheldrick, G.M.(2015b) SHELXT–Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr.*(71), 3–8.

Sierra- Álvarez, R. y Lettinga, G., (1991). The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *App. Microbiol. Biotechnol.* (34), 544–550.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M. y Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol.Rev.* (59), 201–222.4

Silverman, M., (1980). Building bacterial flagella. *Q. Rev. Biol.* (55), 395– 408.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim S. A. y Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food. Control.* (21), 1199-1218.

Tala, S.D., Gatising, D., Fodouop, S.P., Fokunang, S., Kengnic, F., Dejemeli, N.M. (2015). *In vivo anti-Salmonella* activity of aqueous extract of *Euphorbia prostrata* Aiton (*Euphorbiaceae*) and its toxicological evaluation. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* (4), 310-318.

Tang, Y.L., Shi, Y.H., Zhao, W., Hao, G., Le, G.W., 2008. Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible

larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (48), 1187–1194.

Tegos, G., Stermitz, F.R, Lomovskaya, O. y Lewis, K. (2002). Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chem.* (46), 3133-41.

Terao, J., Piskula, M. y Yao, Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* (308), 278–284.

Thompson, J.S., Hodge, D.S y Borezyk, A.A. (1990). Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* (28), 2165-2168.

Tiwari, B.K., Valdramidi, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. y Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agricul. Food Chem.* (57), 5987–6000.

Tsai, P.J., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden, y Jordan, B. R. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Res. Int.* (35), 351–356.

Tsuchido, T., Katsui, N., Takeuchi, A., Takano, M., Shibasaki, I. (1985). Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* (50), 298–303.

Ultee, A., Bennink, M.H.J. y Moezelaar, R. (2002b). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *App Environ. Microbiol.* (68), 1561–1568.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A. and Smid, E.J. (2002a). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol.* (174), 233–238.

Vaara, M., (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* (56), 395–411.

Vanden D.A. y Vlietinck A.J. (1991). *Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants*. In: Dey P.M., Harborne J.B. and Hostettman K. (eds), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity* (47–69). London: Academic Press.

Vivek, K.B., Atiqur, R., Sun C.K. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. Elsevier. International. *J. Food. Microbiol.* (125) 117-122.

Wendakoon, C.N. y Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Protec.* (58), 280–283.

WHO (World Health Organization). (2009). Related WHO publications and links on antimicrobial resistance. Accesible en: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/publications/en/index.html.

Williams, A.C. y Barry, B.W. (1991). Terpenes and the lipid protein partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm. Res.* (8), 17–24.

Williamson, E. M., Driver, S. B. Y Baxter, K. (2013). Stockley's herbal medicines interactions: a guide to the interactions of herbal medicines, dietary supplements and nutraceuticals with conventional medicines. London: Pharmaceutical Press.

Wong, M.H., Zeng, L., Liu, J.H. y Chen, S. (2013). Characterization of *Salmonella* food isolates with concurrent Resistance to ceftriaxone and ciprofloxacin. *Foodborne Pathog. Dis.* (10), 42–46.

Yin, M. C. y Chao, C. Y. (2008). Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. *Inter. J. of Food Microbiol.* (127), 73–77.

Zheoat, M.A., Gray, A.I., Igoli, J.O., Kennedyb, A.R y Ferroa, V.A. (2017). Crystal structures of hibiscus acid and hibiscus acid dimethyl ester isolated from *Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*). *Acta Cryst.* (73), 1368–1371.

ANEXOS

Anexo 1. Artículo científico publicado



Article

Hibiscus Acid and Chromatographic Fractions from *Hibiscus Sabdariffa* Calyces: Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria

Lizbeth Anahí Portillo-Torres ^{1,2}, Aurea Bernardino-Nicanor ¹ , Carlos Alberto Gómez-Aldapa ² , Simplicio González-Montiel ², Esmeralda Rangel-Vargas ², José Roberto Villagómez-Ibarra ², Leopoldo González-Cruz ¹ , Humberto Cortés-López ² and Javier Castro-Rosas ^{2,*}

¹ Instituto Tecnológico de Celaya, Campus I, Antonio García Cubas Pte. #600 esq. Av. Tecnológico, Celaya C. 3810, Mexico; lizbeth_portillo07@hotmail.com (L.A.P.-T.); aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx (A.B.-N.); leopoldo.gonzalez@itcelaya.edu.mx (L.G.-C.)

² Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Ciudad del Conocimiento, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Mineral de la Reforma C.P 42183, Mexico; cgomez@uaeh.edu.mx (C.A.G.-A.); gmontiel@uaeh.edu.mx (S.G.-M.); esme_ran70@hotmail.com (E.R.-V.); jrvi@uaeh.edu.mx (J.R.V.-I.); b_et_ocl@hotmail.com (H.C.-L.)

* Correspondence: jcastro@uaeh.edu.mx; Tel.: +52-771-717-2000 (ext. 6501)

Received: 11 October 2019; Accepted: 4 November 2019; Published: 11 November 2019



Abstract: The anti-microbial properties of acetone extracts from *Hibiscus sabdariffa* calyces, fractions isolated by silica gel chromatography and hibiscus acid purified from some of these fractions and additionally identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy, mid-infrared spectroscopy and X-ray diffraction, were studied against both multidrug-resistant *Salmonella* strains and pathogenic *Escherichia coli* bacteria. Gel diffusion was used to determine the anti-microbial effects. The mode of action of hibiscus acid was determined by crystal violet assay. Hibiscus acid and 17 of the 25 chromatographic fractions obtained, displayed an anti-microbial effect against all bacterial strains tested. Hibiscus acid showed a greater anti-microbial effect than the acetone extract against most of the bacteria strains, while chromatographic fractions IX–XIV exerted the greatest anti-microbial effect against all bacteria. The minimum inhibitory concentration of the acetone extract was 7 mg/mL, and the minimum bactericidal concentration was 10 mg/mL, while the corresponding values for hibiscus acid were 4–7 and 7 mg/mL, respectively. The results of the crystal violet assay indicate that hibiscus acid alters membrane permeability. Hibiscus acid is a potential alternative to control multidrug-resistant bacteria. Due to its ready availability and easy extraction from *H. sabdariffa*, hibiscus acid is potentially useful in the food industries.

Keywords: anti-microbial; Hibiscus acid; *Hibiscus sabdariffa*; multidrug-resistant; antibiotic

1. Introduction

Salmonella is one of the leading causes of foodborne diseases, and its infection (salmonellosis) is spread worldwide. Due to its prevalence, salmonellosis has become a public health burden, representing significant costs in many countries. A range of fresh fruit and vegetables, especially those eaten raw (lettuce, sprouts, melon and tomatoes), are implicated in *Salmonella* infection [1]. *S. enterica* subspecies *enterica* is composed of more than 1500 serotypes with some of great importance, such as *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. *S. enterica* subsp. *enterica* is responsible for more than 99% of human salmonellosis and therefore it is widely studied [2].

Another relevant group of foodborne bacteria is the diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes, including enterotoxigenic, enteroinvasive, enteroaggregative, diffuse adherent and Shiga toxin-producing strains [3]. Some studies documented the importance of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes as agents associated with acute and persistent diarrhoea in Mexican children [4–7]. These *E. coli* strains circulating in Mexico were identified in various food and beverages and diarrheic faecal stool samples [5,8–11].

The emergence of multidrug-resistant *Salmonella* strains and *E. coli* pathotypes are related to the use of antibiotics in animals. Resistant bacteria can be transmitted to humans through foods, especially those consumed raw or of animal origin [12]. The presence of multidrug-resistant pathogenic bacteria in food is an important public health issue [13].

The increased resistance of pathogenic bacteria to antibiotics has intensified the demand for safe and natural alternative anti-microbial agents in food products. Plant species used for medicinal purpose and human consumption are currently being studied since they may constitute a source of anti-bacterial compounds. It was reported that extracts obtained from calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) have an anti-microbial effect on antibiotic-resistant and non-resistant pathogenic microorganisms [14–24]. The extracts from *H. sabdariffa* calyces are a possible alternative to control antibiotic-resistant pathogenic bacteria.

Calyces of *H. sabdariffa* are known to contain chemical compounds, such as organic acids, phytosterols, polyphenols and anthocyanins [25]. It was suggested that different compounds such as anthocyanins, polyphenol or protocatechuic acid are responsible for the anti-microbial activity of *H. sabdariffa* [21,25–27]. However, no prior studies fully demonstrated the anti-microbial effect of the specific chemical compounds in *H. sabdariffa* or reported the isolation of specific anti-microbial constituents from its calyces, which are used in many regions of the world in hot and cold beverages. It is possible that in the *H. sabdariffa* calyces there are other compounds other than those suggested and that they are primarily responsible for the anti-microbial activity.

Hydroxycitric acid, hibiscus acid and its derivatives as the major organic acids in the leaves and calyces extracts of *H. sabdariffa* [28].

Hibiscus acid was demonstrated to have an inhibitory effect on pancreatic α -amylase and intestinal α -glucosidase, resulting in reduction of carbohydrate metabolism and blood insulin levels [29]. Furthermore, hibiscus acid was demonstrated to have a vasorelaxant effect on the rat's aorta [30].

Hibiscus acid is not commercially available; however, it is a chiral compound and its diastereomer, garcinia acid from (*Garcinia cambogia*) is commercially available.

The present study sought to isolate and identify at least one chemical compound with anti-microbial activity from *H. sabdariffa* calyces and evaluate its anti-microbial activity against multidrug-resistant foodborne bacteria.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Hibiscus Sabdariffa Extract

Ten kilograms of dehydrated calyces of *H. sabdariffa* ("Criolla de Oaxaca" variety) grown in Oaxaca, Mexico were used in the study. The calyces were stored in a closed polyethylene container at room temperature until use. The acetonic extract from calyces of *H. sabdariffa* was obtained exactly as we previously described. Briefly, samples (100 g) of dehydrated calyces were placed in glass flasks and 900 mL of acetone were added (Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico). The flasks were hermetically sealed and stored at room temperature for 7 days with manual shaking for 1 min once a day. After, the liquid phase was filtered through filter paper (Whatman Grade 4). The filtered extracts were concentrated in a rotary evaporator (V-800, Vacuum Controller, BÜCHI, Switzerland). The acetone was completely removed from the rotaevaporated concentrate by placing it in an air recirculation oven (Ambi-Hi-Low Chamber, Lab-Line, Jefferson, MO, USA) at 45 °C for 24 h [22,31].

2.2. Chromatographic Fractionation of Acetone Extract

Two hundred and thirty grams of dry acetone extract of *H. sabdariffa* calyces was separated by column chromatography. The dried extract was mixed with silica gel (Sigma-Aldrich, Toluca, México), previously activated at 120 °C for 1 h in a drying recirculation oven (Ambi-Hi-Low Chamber, Lab-Line, Jefferson, USA), at a ratio of 1:2. A glass chromatography column was filled with the silica gel–acetonic extract mixture. Different solvents (hexane, hexane–ethyl acetate, ethyl acetate, ethyl acetate–methanol and methanol) were used as the mobile phase to recover consecutive 100 mL fractions from the packed column. The fractions were concentrated on a rotary evaporator, placed in glass vials and analysed by thin-layer chromatography. The fractions whose components showed the same level of displacement in the plate were pooled and placed in an air recirculation oven at 40 °C to evaporate solvent residues. The anti-microbial activity of the chromatographic collections against multidrug-resistant pathogenic bacteria was determined.

2.3. Extraction of Hibiscus Acid

Two hundred and thirty grams of dry acetone extract of *H. sabdariffa* calyces was packed with silica gel in a chromatographic column, as described in Section 2.2. Hexane was used as the mobile phase to separate the oils in the extract, and 600 mL fractions were recovered in glass flasks. All the chromatographic fractions obtained were rotary-evaporated to remove the solvents and concentrate the separated compounds. After discarding most of the oils from the extract, the solvent mixture hexane–ethyl acetate (9:1 *v/v*) was used as the mobile phase to remove all residual oils. The mobile phase (8:2 *v/v*) passed through the packed column until some small crystals were observed in the rotary-evaporated fractions and it was then used at a ratio of 7:3 (*v/v*) to obtain well-defined crystals in the rotary-evaporated fractions. The crystals were analysed by thin-layer chromatography to determine their purity, re-crystallised using 7:3 (*v/v*) acetone–ethyl acetate in a separatory funnel and then stored for 24 h. Once the formation of crystals on the wall of the separation funnel was observed, the liquid was decanted, and the crystals were recovered. Finally, the residual acetone was removed in an air recirculation oven at 45 °C for 2 h.

2.4. Structural Identification of Hibiscus Acid

2.4.1. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

The crystals (Section 2.3) were examined by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy, using deuterated acetone (acetone-*d*₆; Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico) to solubilize the crystals, in a 400 MHz NMR spectrometer (Jeol, Tokyo, Japan). The acquired spectra were analysed using MestReNova 2009 software (version 6.0.2-5475; Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain).

2.4.2. Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection

The crystals (Section 2.3) were ground in a mortar to reduce the particle size and analysed using a diamond-accessorised attenuated total reflection infrared spectrometer (Frontier, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) at 25 ± 2 °C. Infrared spectra were recorded between 4000 and 400 cm⁻¹ at a resolution of 4 cm⁻¹, and 64 spectra per sample were co-added to improve the sample-to-noise ratio.

2.4.3. X-ray Crystallography

The crystals were grown in aqueous acetone by slow evaporation. Diffraction data were measured on a Gemini CCD diffractometer (Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, England) at room temperature using graphite-monochromated CuK α radiation ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$) and processed using the CrysAlis program (version 1.171.33.31, 2009; Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, UK). The structure was solved using Olex2 [32]) and SHELXT [33] structure solution program using intrinsic phasing

or direct methods and refined with the crystal structure refinement program SHELXL [34] using least-squares minimization.

2.4.4. Differential Scanning Calorimetry

The melting point of hibiscus acid was measured using a differential scanning calorimeter (Q2000, TA Instruments, New Castle, NJ, USA), previously calibrated with indium (onset temperature $T_o = 156.6$ °C, transition enthalpy $\Delta H = 28.4$ J/g, respectively). Five milligrams of hibiscus acid crystals were placed in an aluminum crucible, which was then sealed and heated from 25 to 250 °C at a rate of 5 °C/min. The transition temperatures and ΔH values were obtained directly using Universal Analysis software version 4.4A (TA Instruments).

2.5. Determination of the Anti-microbial Effect of Acetone Extract, Chromatographic Collections and Hibiscus Acid

2.5.1. Preparation of Test Solutions

Solutions of acetone extract, chromatographic collections and hibiscus acid were prepared at final concentrations of 100 mg/mL. Only distilled water was used to prepare the solutions of acetone extract and hibiscus acid. To obtain the solutions from the fraction collections, a mixture of distilled water and 20% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico) was used.

2.5.2. Bacterial Strains

Eight multidrug-resistant bacteria strains were isolated from food as follows: *Salmonella* Montevideo C1 and *S. Typhimurium* C65 from cilantro [24], *S. Typhimurium* C63 from carrots [18], enteroinvasive *E. coli* MAC B from nopalitas [16], enteropathogenic *E. coli* MAC A from coriander [35], and enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A and two strains of Shiga toxin-producing *E. coli* C558 and C636 from raw beef, in our laboratory. All bacteria were resistant to the same 10 antibiotics (kanamycin, neomycin, streptomycin, amikacin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, ceftriaxone, nalidixic acid and trimethoprim/sulphamethoxazole) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criterion [36].

2.5.3. Preparation of Bacterial Strains

The eight antibiotic-resistant strains were inoculated in 3 mL of tryptic soy broth (TSB; Bioxon, Becton Dickinson, Ciudad de México, Mexico) and incubated at 35 ± 2 °C for 18 h. The cultures were washed twice in sterile isotonic saline (0.85% NaCl; ISS) by centrifugation at 3500 rpm for 20 min, and the pellet was resuspended in ISS at approximately 10^9 colony forming units/mL (CFU/mL). Finally, a decimal dilution of these washed cultures was done with ISS to produce a final approximate concentration of 8 log CFU/mL [22,31].

2.5.4. Anti-microbial Activity of Acetone Extract, Chromatographic Collections and Hibiscus Acid

The gel diffusion technique with paper discs was used as follows: 100 μ L washed bacterial cultures, from a concentration of 1×10^8 CFU/mL, were inoculated onto trypticase soy agar plates (Bioxon, Becton Dickinson) and distributed over the agar by the streak plate method. Sterilized paper discs (Whatman Grade 5, 6-mm diameter) were placed on the surface of the inoculated agar. Then, 20 μ L aliquots containing acetonetic extract, chromatographic collections and hibiscus acid, respectively, were placed on the paper disks (final dose per disk: 2 mg extract, chromatographic collection or hibiscus acid). ISS was used as a negative control. Treatments were performed in triplicate. The plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. For each treatment, the diameters (mm) of the resulting inhibition zones were measured and expressed as the average [31].

2.6. Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration

The broth macrodilution method [37] was used to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Tubes were prepared with TSB containing acetonic extract or hibiscus acid at concentrations of 1–100 mg/mL. The tubes were inoculated with a final suspension of microorganisms at 1×10^5 CFU/mL (from the culture washed in ISS at a concentration of 1×10^9 CFU/mL, 2 decimal dilutions were made in TSB, and from the last dilution 10 μ L were taken and inoculated in a tube containing 990 μ L to have a final concentration of 1×10^5 CFU/mL) and incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was the lowest concentration of acetone extract or hibiscus acid to inhibit bacterial growth without turbidity in the tubes. To assess the MBC, TSB tubes containing the lowest concentration of extract or hibiscus acid and no turbidity were inoculated into trypticase soy agar using the pour plate technique and incubated at 35 °C for 24–48 h. The MBC was defined as the lowest concentration of acetone extract or hibiscus acid that showed no colony growth in TSB.

2.7. Measurement of Permeability with Crystal Violet

Alteration of membrane permeability was detected by crystal violet assay exactly as described by Devil et al. 2010 [38]. Briefly, one hundred μ L of *S. Typhimurium* C65 and enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A were inoculated in TSB and incubated at 37 °C for 6 h. The bacterial suspensions were centrifuged at 10,000 rpm for 20 min. The supernatant was discarded and the cell pellets were washed twice with 0.5 mM potassium phosphate buffer solution (PBS). The bacterial cell suspension was prepared by re-suspending the cell pellet in PBS. The washed bacterial cell suspensions were incubated with different concentration of hibiscus acid at minimum sub-inhibitory concentration (MSIC; 1.25 mg/mL and 1.75 mg/mL for enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A and *S. Typhimurium* C65, respectively), MIC (5 mg/mL and 7 mg/mL for enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A and *S. Typhimurium* C65, respectively), 10 \times MIC (50 mg/mL and 70 mg/mL, for enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A and *S. Typhimurium* C65, respectively), MBC (7 mg/mL) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, positive control, 0.25 M) at 37 °C for 60 min. Control samples were prepared similarly without treatment and EDTA (0.25 M) was used as a positive control. The cells were harvested (10,000 rpm for 5 min) and suspended in PBS containing crystal violet (10 μ g/mL). The cell suspension was then incubated (10 min at 37 °C) and centrifuged (10,000 rpm for 5 min). The optical density (OD) 590 of the supernatant was measured using a UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific, Nanodrop, Verona, Wisconsin, USA). The OD value of crystal violet solution was considered to be 100% excluded. The OD of the supernatant of the normal untreated cell was used as blank. The percentage of crystal violet uptake for all samples was calculated using the following formula:

$$\% \text{ uptake of crystal violet} = (\text{OD Value of sample}) / (\text{OD Value of CV solution}) \times 100 \quad (1)$$

2.8. Statistical Analysis

Significant differences ($p < 0.05$) between treatments were calculated by analysis of variance and Tukey's test using SPSS Statistics 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Anti-microbial Activity of Acetonic Extract of *Hibiscus Sabdariffa*

A total of 4.6 g of dry acetonic extract was obtained per 100 g of dehydrated *H. sabdariffa* calyces. The dry extract had anti-microbial activity against the eight multidrug-resistant *Salmonella* and pathogenic *E. coli* strains, while the radial inhibition zone on the culture medium varied from 9.8 to 12.6 mm. These results agree with those previously reported on the anti-microbial effect of extracts obtained from *H. sabdariffa* calyces [18].

3.2. Anti-microbial Activity of Chromatographic Collections against Pathogenic Bacteria

The acetone extract was separated by column chromatography into 903 fractions using different solvent mixtures (Table 1). Fractions displaying the same or similar thin-layer chromatogram were pooled together. Among these 25 collections (I–XXV; Table 2), 14 were anti-microbial against all multidrug-resistant *Salmonella* and pathogenic *E. coli* strains tested (Table 3), while three showed an effect against some of the *Salmonella* and pathogenic *E. coli* strains (Table 3). Collection VI was only effective against *Salmonella* C1 and C65, and collection VII, only against *Salmonella* C65, respectively. In contrast, collection XXII was not anti-microbial against *E. coli* C558, *E. coli* C636 and enteroinvasive *E. coli* MAC B (Table 3). Finally, collections I, II, III, IV, V, VIII, XXIV and XXV had no anti-microbial effect against any pathogenic bacteria. In general, statistically significant differences were observed between the effects produced by some collections and within collections against different pathogenic strains (Table 3).

Table 1. Chromatography fractions obtained from *Hibiscus sabdariffa* calyx acetonic extract.

Fraction Number	Solvent Ratio Used in Chromatography Column as Mobile Phase
1–37	Hexane
38–59	90–10% Hexane–ethyl acetate
60–131	80–20% Hexane–ethyl acetate
132–277	70–30% Hexane–ethyl acetate
278–348	60–40% Hexane–ethyl acetate
349–396	50–50% Hexane–ethyl acetate
397–441	40–60% Hexane–ethyl acetate
442–486	30–70% Hexane–ethyl acetate
487–535	20–80% Hexane–ethyl acetate
536–572	10–90% Hexane–ethyl acetate
573–616	Ethyl acetate
617–660	90–10% Ethyl acetate–methanol
661–693	80–20% Ethyl acetate–methanol
694–731	70–30% Ethyl acetate–methanol
732–771	60–40% Ethyl acetate–methanol
772–794	50–50% Ethyl acetate–methanol
795–810	40–60% Ethyl acetate–methanol
811–842	30–70% Ethyl acetate–methanol
843–868	20–80% ethyl acetate–methanol
869–886	10–90% ethyl acetate–methanol
887–903	Methanol

Table 2. Fraction collections from *Hibiscus sabdariffa* calyx acetonic extract classified according to thin-layer chromatography.

Collection	Fraction	Collection	Fraction
I	1–42	XIV	285–379
II	43–46	XV	380–407
III	47–59	XVI	408–447
IV	60–62	XVII	448–473
V	63–68	XVIII	474–564
VI	69–107	XIX	565–584
VII	108–116	XX	585–620
VIII	117–132	XXI	621–695
IX	133–155	XXII	696–740
X	156–176	XXIII	741–792
XI	180–200	XXIV	793–867
XII	201–256	XXV	868–903
XIII	257–284		

Table 3. Anti-microbial effect of chromatographic fraction collections from *Hibiscus sabdariffa* calyx acetonc extract against eight multidrug-resistant *Salmonella* and pathogenic *Escherichia coli* bacteria.

Collection	<i>Salmonella</i> C1	<i>Salmonella</i> C65	<i>Salmonella</i> C63	EHEC A	EIEC MAC B	<i>E. coli</i> C558	<i>E. coli</i> C636	EPEC MAC A
VI ¹	7.0 ± 0.2 ^{b,2}	7.2 ± 0.4 ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
VII	- ^a	7.5 ± 0.1 ^{ab}	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
IX	10.8 ± 0.2 ^g	12.6 ± 0.2 ^{gh}	13.3 ± 0.2 ⁱ	11.9 ± 0.2 ^{gh}	12.2 ± 0.3 ^h	9.3 ± 0.2 ^{bcd}	10.1 ± 0.5 ^{efg}	12.0 ± 0.4 ^h
X	13.5 ± 0.4 ^h	11.5 ± 0.4 ^f	13.3 ± 0.2 ⁱ	12.3 ± 0.2 ^h	11.6 ± 0.6 ^{fgh}	11.5 ± 0.2 ^g	11.6 ± 0.7 ^h	12.4 ± 0.2 ^h
XI	13.5 ± 0.2 ^h	11.6 ± 0.2 ^{fg}	15.2 ± 0.1 ^j	14.2 ± 0.2 ⁱ	12.5 ± 0.4 ^h	11.5 ± 0.3 ^g	13.2 ± 0.3 ⁱ	11.5 ± 0.2 ^{gh}
XII	11.1 ± 0.6 ^g	12.6 ± 0.2 ^{gh}	10.1 ± 0.1 ^{defgh}	9.6 ± 0.5 ^{ef}	10.5 ± 0.6 ^{de}	11.8 ± 0.3 ^g	10.2 ± 0.2 ^{efg}	9.5 ± 0.5 ^{cde}
XIII	10.5 ± 0.3 ^{fg}	15.2 ± 0.5 ⁱ	11.0 ± 0.1 ^h	11.5 ± 0.3 ^g	11.8 ± 0.5 ^{gh}	11.4 ± 0.3 ^{fg}	10.9 ± 0.1 ^{gh}	11.0 ± 0.3 ^{fg}
XIV	10.9 ± 0.4 ^g	11.9 ± 0.5 ^{fg}	10.7 ± 0.6 ^{gh}	10.2 ± 0.3 ^f	10.5 ± 0.1 ^{def}	11.5 ± 0.4 ^g	9.8 ± 0.4 ^{def}	10.3 ± 0.5 ^{def}
XV	10.8 ± 0.4 ^g	13.5 ± 0.2 ^h	10.5 ± 0.3 ^{fgh}	9.5 ± 0.3 ^{ef}	11.1 ± 0.5 ^{efg}	9.6 ± 0.5 ^{cde}	10.6 ± 0.4 ^{fg}	9.6 ± 0.1 ^{cde}
XVI	9.5 ± 0.1 ^{def}	9.7 ± 0.4 ^e	9.8 ± 0.4 ^{defg}	9.9 ± 0.1 ^f	10.1 ± 0.1 ^{bcde}	10.4 ± 0.3 ^{ef}	9.6 ± 0.4 ^{de}	10.4 ± 0.1 ^{ef}
XVII	9.1 ± 0.2 ^{cde}	9.7 ± 0.3 ^e	9.5 ± 0.4 ^{de}	10.0 ± 0.4 ^f	10.3 ± 0.7 ^{cde}	9.7 ± 0.1 ^{cde}	9.8 ± 0.4 ^{def}	9.4 ± 0.7 ^{cd}
XVIII	9.4 ± 0.6 ^{de}	9.6 ± 0.3 ^e	9.6 ± 0.5 ^{def}	9.1 ± 0.2 ^{de}	9.9 ± 0.6 ^{bcd}	10.1 ± 0.7 ^{de}	9.5 ± 0.1 ^{de}	8.8 ± 0.2 ^c
XIX	8.7 ± 0.2 ^{cde}	8.5 ± 0.7 ^{bcd}	9.3 ± 0.3 ^{cd}	8.4 ± 0.3 ^{cd}	9.5 ± 0.4 ^{bcd}	9.3 ± 0.2 ^{bcd}	7.4 ± 0.5 ^b	7.8 ± 0.1 ^b
XX	8.9 ± 0.4 ^{cde}	9.5 ± 0.0 ^{de}	9.9 ± 0.1 ^{defg}	9.0 ± 0.2 ^{de}	9.3 ± 0.1 ^{bc}	9.2 ± 0.3 ^{bcd}	8.2 ± 0.1 ^{bc}	8.7 ± 0.1 ^{bc}
XXI	8.1 ± 0.1 ^c	8.8 ± 0.3 ^{cde}	8.3 ± 0.2 ^b	7.8 ± 0.2 ^{bc}	9.0 ± 0.1 ^b	8.3 ± 0.3 ^b	8.5 ± 0.4 ^c	8.9 ± 0.4 ^c
XXII	8.5 ± 0.4 ^{cd}	8.3 ± 0.2 ^{bc}	8.6 ± 0.2 ^{bc}	7.5 ± 0.2 ^b	- ^a	- ^a	- ^a	10.0 ± 0.2 ^{de}
XXIII	9.6 ± 0.5 ^{ef}	9.1 ± 0.4 ^{cde}	10.3 ± 0.2 ^{efgh}	8.6 ± 0.1 ^d	9.0 ± 0.7 ^b	8.9 ± 0.5 ^{bc}	9.1 ± 0.1 ^{cd}	10.1 ± 0.3 ^{def}

¹ Chromatographic collections showing no effect against any microorganism are not in the table. ² Mean ± standard deviation of three replicas of zone of inhibition diameter (mm). - No anti-microbial effect, values with different letters in the same column per pathogen express significant difference at $\alpha = 0.05$ by Tukey's test. *Salmonella* C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65 = *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63 = *S. Typhimurium*, EHEC A = enterohemorrhagic *E. coli*, EIEC MAC B = enteroinvasive *E. coli*, *E. coli* C558 and C636 = Shiga toxin-producing *E. coli*, EPEC MAC A = enteropathogenic *E. coli*.

In a study on anti-microbial chromatographic collections from plants with solvents of different polarities, Avila-Sosa et al. [39] obtained and fractionated the chloroform extract from Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) using chloroform and mixtures of chloroform–acetone (70:30, *v/v*), chloroform–acetone (30:70, *v/v*), acetone–methanol (70:30, *v/v*) and acetone–methanol (30:70, *v/v*) as mobile phases. Afterwards, they evaluated the anti-microbial activity of the chromatographic fraction collections obtained against *E. coli*. While most of the chromatographic collections showed anti-microbial activity against *E. coli*, the collections higher in polarity were less potent. Consistent with that observation, the low and intermediate polarity collections displayed the greatest anti-microbial effect in the current work (Tables 1–3). Furthermore, Kuete et al. [40] determined the methanolic extract of *Ficus polita* (FP) was anti-microbial against *S. Typhi* (ATCC 6539) and two strains of *E. coli* (ATCC 8739 and AG100). In addition, the researchers tested five chromatographic fractions from FP (FPR1–FPR5), obtained using different mobile phases: hexane (FPR1); 75:25 (*v/v*) hexane–ethyl acetate (FPR2); 50:50 (*v/v*) hexane–ethyl acetate (FPR3); ethyl acetate (FPR4); methanol (FPR5). Of the five fractions, only those of low polarity (FPR1 and FPR2) exhibited anti-microbial activity against the studied strains.

Do et al. [41] also investigated the anti-microbial effect of five chromatographic fraction collections obtained from the methanolic extract of *H. sabdariffa*, using different solvent mixtures as mobile phases: 50% hexane–50% ethyl acetate (CF1); 30% hexane–70% ethyl acetate (CF2); 90% ethyl acetate–10% methanol (CF3); 60% ethyl acetate–40% methanol (CF4); 70% ethyl acetate–30% methanol (CF5). Among them, only CF3, which was active against *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *B. subtilis*, and CF4 and CF5, which were active against *S. aureus* and *B. subtilis*, possessed anti-microbial properties. Moreover, only CF3, which showed the greatest anti-microbial action, contained the flavonoid quercetin, among other unidentified compounds. However, further studies would be required to conclusively identify the anti-microbial molecules in CF3–CF5 and the methanolic extract, and any interactions responsible for the activity.

In the current study, collections IX, X, XI, XIII and XIV showed greater anti-microbial activity than the rest. These collections were obtained with the polarities of the following mixtures: 70% hexane–30% ethyl acetate, 60% hexane–40% ethyl acetate and 50% hexane–50% ethyl acetate (Tables 1 and 2). It is important to note that defined crystals were formed in the pooled fractions IX, X and XI, which were collected using 70% hexane–30% ethyl acetate as the mobile phase (Tables 1 and 2).

Since the preliminary NMR analysis of the crystals suggested the presence of hibiscus acid and other compounds, a second chromatographic separation was completed using another sample of dry acetonic extract (230 g) from *H. sabdariffa* to obtain a higher concentration of crystals for purification. The aim was to confirm the presence and anti-microbial activity of hibiscus acid by different structural analysis techniques. The second column chromatography separating the acetonic extract yielded presumptive crystals of hibiscus acid.

3.3. Obtaining Presumptive Crystals of Hibiscus Acid from the Acetonic Extract

Following the procedure described in Section 2.3, a total of 413 fractions were grouped into four collections, according to the mobile phase used: hexane (17 fractions), 90% hexane–10% ethyl acetate (52 fractions), 80% hexane–20% ethyl acetate (61 fractions) and 70% hexane–30% ethyl acetate (283 fractions). After purification, 65 g presumptive crystals of hibiscus acid (collection IV, fractions 113–413) were obtained from 230 g acetonic extract of *H. sabdariffa* (1.3% crystals from 5 kg dehydrated calyces) and, additionally, characterized by NMR, infrared spectroscopy and X-ray crystallography, as described in Sections 3.4.1–3.4.3, respectively, to identify the structure of hibiscus acid.

3.4. Structural Identification of Hibiscus Acid

3.4.1. ^1H NMR Spectrum

The ^1H NMR spectrum of presumptive crystals of hibiscus acid corresponded to that of the molecular structure of hibiscus acid (Figure 1). Most of the proton signals (^1H) appeared between δ_{H} 0 and 12. The signal observed at δ_{H} 2.05 corresponds to the acetone- d_6 used to dissolve the presumptive crystals of hibiscus acid. The other signals were δ_{H} : 5.34 (^1H , singlet [s], CH-COOH), 4.16 (^1H , s, COH-COOH), 3.25 (^1H , doublet [d], $J = 17.2$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$), 2.77 (^1H , d, $J = 17.2$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$), where J is the coupling constant. Accordingly, the signals of the spectrogram shown in Figure 1 correspond to the molecular structure of hibiscus acid and the deuterated solvent used as the vehicle.

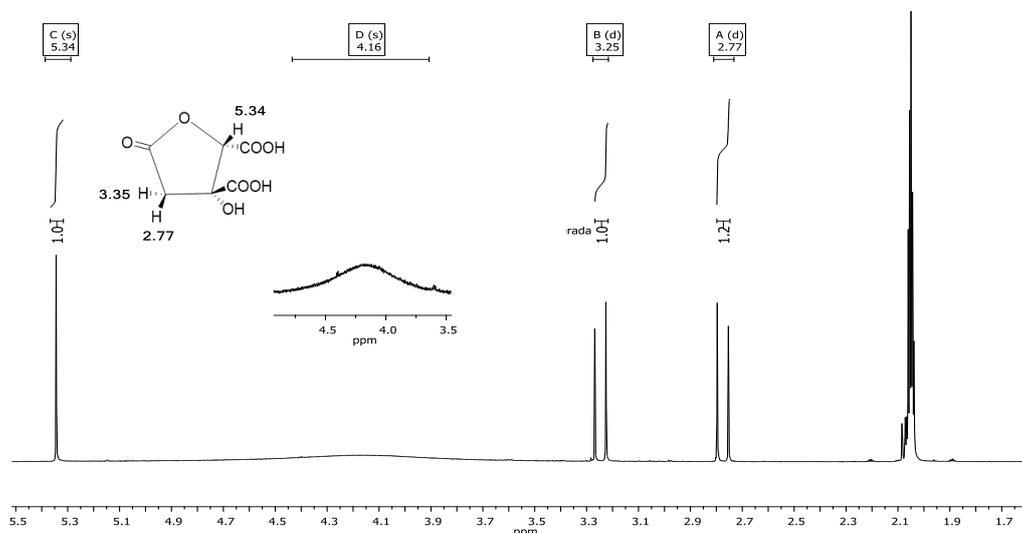


Figure 1. ^1H NMR spectrum at 400 MHz in acetone- d_6 of purified crystals obtained from *Hibiscus sabdariffa* calyces acetonic extract.

In an NMR (400 MHz) analysis of the structure of hibiscus acid determined using acetone- d_6 to dissolve the crystals, Ibnusaud et al. [42] detected signals at δ_{H} 5.38 (^1H , s, CH-COOH), 3.30 (^1H , d, $J = 17.1$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$) and 2.80 (^1H , d, $J = 17.1$ Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$). In previous ^1H NMR analysis of hibiscus acid prepared from *H. sabdariffa* calyces extracts, the crystals were dissolved in deuterated water [43], deuterated dimethylsulphoxide [39] and deuterated methanol [40]. The resulting spectrograms showed two doublets at δ_{H} 2.88 and 3.41, respectively ($J = 18.4$ Hz) [38] signals at δ_{H} 5.31 (^1H , s), 3.23 (^1H , d, $J = 17.19$ Hz) and 2.77 (^1H , d, $J = 17.18$ Hz) [43]; and signals at δ_{H} 5.25 (^1H , s), 3.20 (^1H , d, $J = 17.3$ Hz) and 2.69 (^1H , d, $J = 17.3$ Hz) [44]. In this context, the parameters published by Ibnusaud et al. [42] and Rasheed et al. [45] are most similar to those obtained in the present work (Figure 1).

3.4.2. Infrared Spectroscopy

The infrared spectrum of the crystals prepared from the *H. sabdariffa* acetone extract contained signals at 3410 cm^{-1} (OH groups), 1797 cm^{-1} (ester groups) and 1742 cm^{-1} (C=O stretching) (Figure 2). These values corresponded strongly to those reported by Ibnusaud et al. [42], which were 3400 , 1790 and 1735 cm^{-1} .

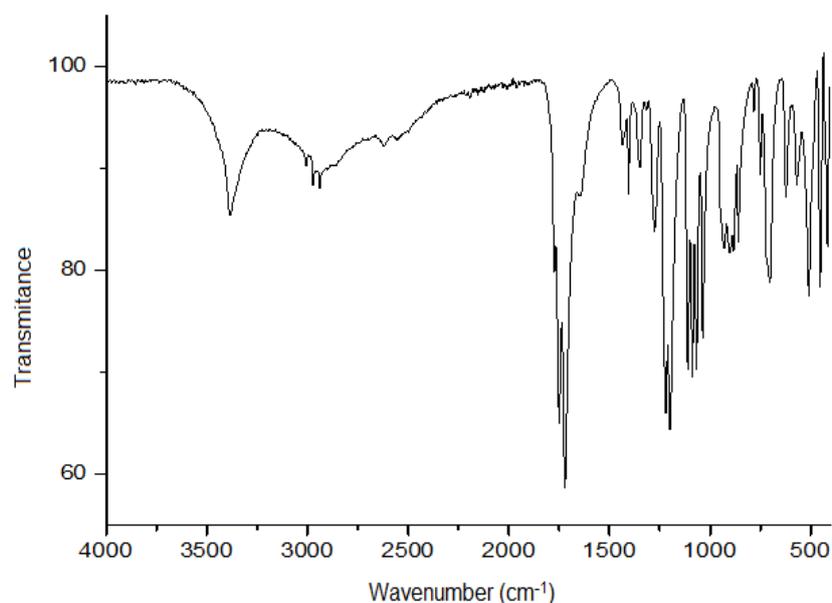


Figure 2. Infrared spectrum of purified crystals obtained from *Hibiscus sabdariffa* calyces acetonetic extract.

3.4.3. X-ray Crystallography

The molecular structure of hibiscus acid (Figure 3), was confirmed by X-ray diffraction which was solvated with a water molecule through a hydrogen bond (O6-H6...O8, distance = 1.841 Å, \angle O6-H6...O8 = 162.62°) (Figure 3). Hibiscus acid is a five-membered lactone ring, with four carbon atoms and one oxygen atom. C3 (sp²) has a double-bonded oxygen atom, C1 an OH group and a COOH group, and C2 a COOH group, respectively.

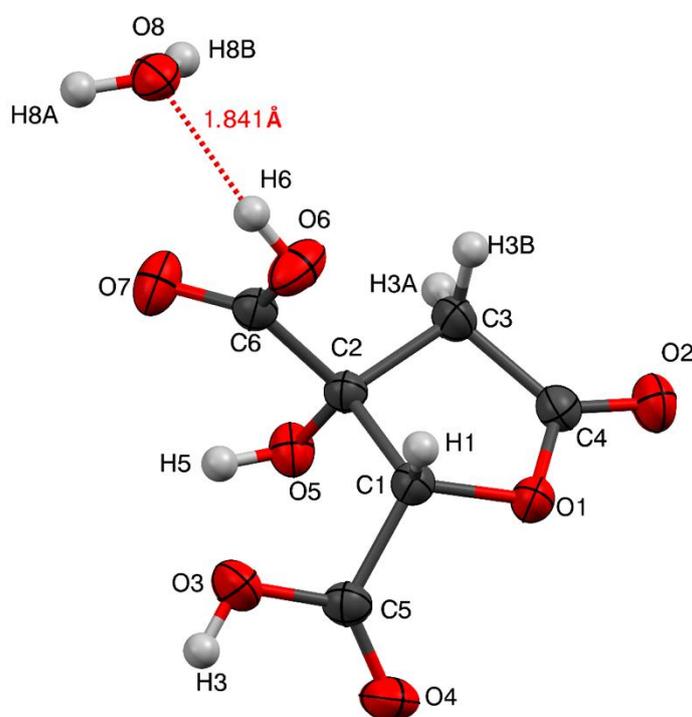


Figure 3. Molecular structure of hibiscus acid isolated from *Hibiscus sabdariffa* calyces acetonetic extract determined by X-ray diffraction. Ellipsoids shown at 50% of probability.

The crystallographic details and refined structure of hibiscus acid are provided in Table 4 and Tables S1–S5. Analogous X-ray crystallographic data of hibiscus acid, albeit attached to a dimethylsulphoxide molecule, were presented by Zheoat et al. [44]. Figure 4 shows the possible hydrogen bond donors of the hibiscus acid molecule, in which the interactions that can be established with other molecules of hibiscus acid and water molecules are observed.

Table 4. X-ray spectroscopy details of crystal data and structure refinement parameters of hibiscus acid isolated from *Hibiscus sabdariffa* calyx acetonic extract.

Experimental Data	
Empirical Formula	C ₆ H ₆ O ₇ • H ₂ O
Molecular weight	208.12
Temperature (K)	293(2)
Crystal system, space group	orthorhombic, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions (Å, °)	
<i>a</i>	8.2069(2)
<i>b</i>	9.9228(2)
<i>c</i>	10.1747(2)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Volume (Å ³)	828.58(3)
<i>Z</i>	5
Radiation type	CuK α (λ = 1.54184 Å)
μ (mm ⁻¹)	1.797
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	2.096
<i>F</i> (000)	545.00
2 θ range for data collection	12.46–155.038
Index Ranges	−10 ≤ <i>h</i> ≤ 10, −11 ≤ <i>k</i> ≤ 12, −11 ≤ <i>l</i> ≤ 12
Absorption Correction	Multi-scan
Collected Reflections	11147
Independent Reflections	1754 (<i>R</i> _{int} = 0.0293)
Data/Restraints/Parameters	1754/0/133
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.077
<i>R</i> ₁ , <i>wR</i> ₂ [<i>I</i> ≥ σ 2 <i>s</i> (<i>I</i>)]	0.0309, 0.0859
<i>R</i> ₁ , <i>wR</i> ₂ [all data]	0.0314, 0.0864
Largest Difference Peak/Hole (e Å ⁻³)	0.25 and −0.21
Flack and Hooft Parameters	0.05(6) and 0.07(5)
Inverted Flack and Hooft Parameters	0.95(6) and 0.93(5)

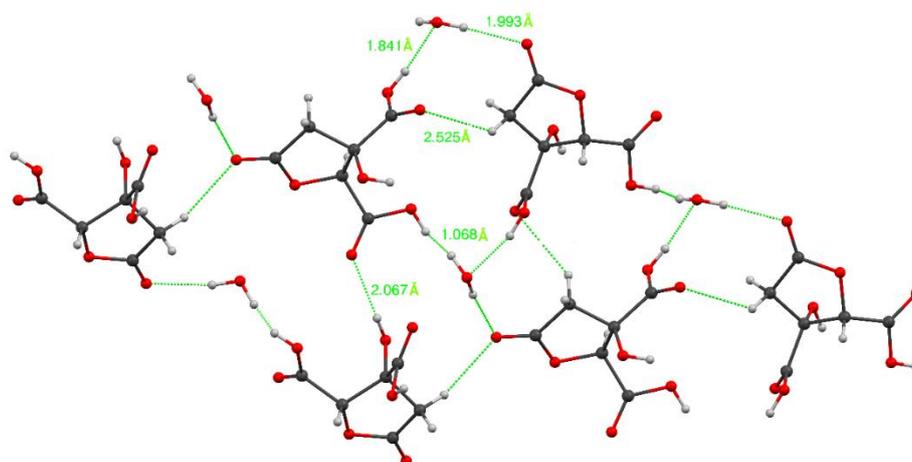


Figure 4. Hydrogen bond contacts of hibiscus acid isolated from *Hibiscus sabdariffa*.

3.4.4. Hibiscus Acid Melting Point by Differential Scanning Calorimetry

The differential scanning calorimetry of the crystals of hibiscus acid showed a T_o of 186.87 °C, peak temperature of 190.61 °C and a final temperature of 194.15 °C, while the fusion enthalpy (ΔH) was 146.7 J/g. Contrastingly, Ibnusaud et al. [37] reported a melting point of 182 °C for hibiscus acid, which differs from the current results, possibly because of either the equipment or the technique used by the authors.

3.5. Anti-microbial Effect of Hibiscus Acid

Hibiscus acid demonstrated an anti-microbial effect against all multidrug-resistant *Salmonella* and pathogenic *E. coli* strains (Table 5). In general, the anti-microbial effect of hibiscus acid was higher ($p < 0.05$) than that of the acetonic extract (Table 5). Previous reports attributed the anti-microbial activity of *H. sabdariffa* calyces to compounds, such as protocatechuic acid and anthocyanins, in the plant [14,21,23,46]. However, no information regarding the isolation and identification of anti-microbial compounds obtained directly from *H. sabdariffa* calyces has been published until now.

Table 5. Zone of inhibition diameter of *Hibiscus sabdariffa* calyx acetonic extract and hibiscus acid against multidrug-resistant *Salmonella* and pathogenic *Escherichia coli* strains.

Bacteria	Treatment	
	Acetone extract	Hibiscus Acid
<i>Salmonella</i> C1 ¹	12.6 ± 0.1 ^a	16.0 ± 0.4 ^b
<i>Salmonella</i> C65	10.8 ± 0.3 ^a	14.5 ± 0.1 ^b
<i>Salmonella</i> C63	10.3 ± 0.3 ^a	11.6 ± 0.2 ^b
EHEC A	10.7 ± 0.4 ^a	10.0 ± 0.3 ^a
EIEC MAC B	11.5 ± 0.1 ^a	13.4 ± 0.6 ^b
<i>E. coli</i> C558	11.8 ± 0.1 ^a	11.6 ± 0.4 ^a
<i>E. coli</i> C636	10.4 ± 0.5 ^a	11.1 ± 0.2 ^a
EPEC MAC A	9.8 ± 0.1 ^a	10.5 ± 0.3 ^b

¹ Mean ± standard deviation of three replicas of zone of inhibition diameter (mm). Values with different letters in the same row per pathogen express significant difference at $\alpha = 0.05$ by Tukey's test. *Salmonella* C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65 = *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63 = *S. Typhimurium*, EHEC A = enterohemorrhagic *E. coli*, EIEC MAC B = enteroinvasive *E. coli*, *E. coli* C558 and C636 = Shiga toxin-producing *E. coli*, EPEC MAC A = enteropathogenic *E. coli*. Final dose per disk: 2 mg.

It should be noted that while several publications described the anti-microbial effect of *H. sabdariffa* calyx extracts obtained with solvents of varying polarities (including acetonic extract) when tested against different pathogenic bacteria, no published article describes or suggests that hibiscus acid or its derivatives are anti-microbial. Furthermore, there is no proof of their efficacy in the control and elimination of multidrug-resistant pathogenic bacteria. In other words, this document constitutes the first report on the anti-microbial activity of hibiscus acid, even against multidrug-resistant pathogenic bacteria. The MIC and the MBC of hibiscus acid were determined to assess its potential use as an anti-microbial agent in the industry.

3.6. Determination of the MIC and MBC of the Acetone Extract and Hibiscus Acid

The MICs and MBCs of the acetonic extract and hibiscus acid obtained from *H. sabdariffa* calyces were determined using the eight multidrug-resistant pathogenic strains. For hibiscus acid, the MIC values were 4–7 mg/mL, while the MBC range was 5–7 mg/mL (Table 6). The MIC of the acetonic extract was 7 mg/mL for all the pathogenic strains, while the MBC was 10 mg/mL for most of the pathogenic bacteria (Table 6). Abdallah [42] evaluated the MIC and MBC of the *H. sabdariffa* calyces methanolic extract by broth dilution using five multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains and obtained MIC and MBC values of 25–50 and 50–100 mg/mL, respectively. These MIC and MBC values are higher than those obtained with the acetonic extract of *H. sabdariffa* (Table 6).

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and MBC/MIC ratio of *Hibiscus sabdariffa* calyx acetone extract and hibiscus acid on multidrug-resistant *Salmonella* and pathogenic *Escherichia coli* strains.

Bacteria	Acetone Extract			Hibiscus Acid		
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC/MBC	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
<i>Salmonella</i> C1	7	10	1.4	4	5	1.3
<i>Salmonella</i> C65	7	7	1.0	7	7	1.0
<i>Salmonella</i> C63	7	10	1.4	5	7	1.4
EHEC A	7	10	1.4	5	7	1.4
EIEC MAC B	7	10	1.4	5	7	1.4
<i>E. coli</i> C558	7	10	1.4	5	7	1.4
<i>E. coli</i> C636	7	10	1.4	5	5	1.0
EPEC MAC A	7	10	1.4	4	7	1.8

Salmonella C1 = *S. Montevideo*, *Salmonella* C65 = *S. Typhimurium*, *Salmonella* C63 = *S. Typhimurium*, EHEC A = enterohemorrhagic *E. coli*, EIEC MAC B = enteroinvasive *E. coli*, *E. coli* C558 and C636 = Shiga toxin-producing *E. coli*, EPEC MAC A = enteropathogenic *E. coli*.

Yin and Chao [26] tested aqueous and ethanolic extracts of *H. sabdariffa* calyces, obtaining MIC values of 0.112–0.144 and 0.072–0.096 mg/mL, respectively, for *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* and *B. cereus*. The MIC of the aqueous extract against *Campylobacter* strains susceptible to antibiotics varied between 0.096 and 0.152 mg/mL [27].

As mentioned above, protocatechuic acid is a compound that was reported to be present in the calyces of *H. sabdariffa* and is likely to be anti-microbial [21,26,27]. However, there is no information available in the literature regarding the isolation, characterization or concentration of the protocatechuic acid in *H. sabdariffa* calyces. Protocatechuic acid is widely distributed in a variety of plants [46]. Commercial protocatechuic acid showed anti-microbial activity against *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *A. baumannii*, with MIC values of 8, 16, 24 and 16 mg/mL, respectively [21]. In comparison, however, Chao and Yin [26] recorded much lower MIC values (24–44 µg/mL) for the protocatechuic acid against *S. Typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *B. cereus*. Since both studies used a pure commercial compound, the difference in MIC values was expected to be small, especially because they included a bacterial strain of the same genus and species (*S. aureus*). In this study, hibiscus acid showed MIC values (Table 6) within the limits of those reported for protocatechuic acid [26,47]).

Finally, the anti-microbial effect of the acetone extract and hibiscus acid from *H. sabdariffa* calyces was determined as bactericidal or bacteriostatic. A compound is considered bactericidal when the MBC/MIC ratio is ≤ 4 and bacteriostatic when this ratio is >4 [48]. Both the acetone extract and the hibiscus acid were bactericidal against all eight multidrug-resistant pathogenic strains (Table 6). Abdallah [49] also reported the bactericidal activity of methanolic extract from *H. sabdariffa* calyces (MBC/MIC 1–2 mg/mL) against *A. baumannii* strains.

3.7. Measurement of Permeability with Crystal Violet

Hydrophobic crystal violet is known to display weak penetration of the outer membrane but on the contrary, it is found to penetrate cells with impaired cell membranes thus, crystal violet assay may be employed for the detection of membrane damage [38,50].

The uptake of crystal violet by enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A was 9% in the absence of hibiscus acid, but increased to 40%, 57% and 90% after MIC, MBC, 10× MIC hibiscus acid treatments, respectively (Figure 5). The uptake of crystal violet by *Salmonella* C65 was 8% in the absence of hibiscus acid, but increased to 66%, 68% and 82% after MIC, MBC, 10× MIC hibiscus acid treatments, respectively (Figure 6). Minimum sub-inhibitory concentration (MSIC) of hibiscus acid showed no effect, which reveals that it did not alter the membrane permeability in both pathogenic bacteria (Figures 5 and 6).

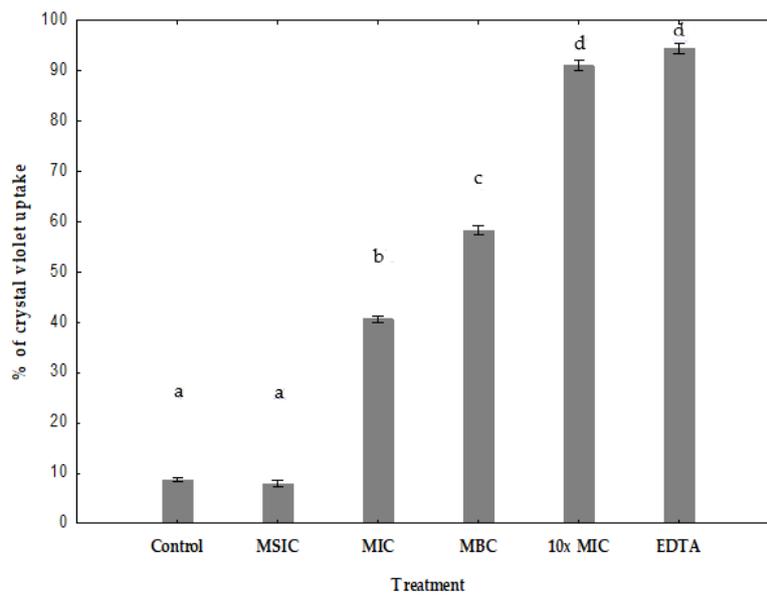


Figure 5. Change in bacterial membrane permeability of EHEC A (assayed by crystal violet uptake) in presence of different concentrations of hibiscus acid and EDTA. Percentage of crystal violet uptake was plotted against the concentration of the treatment. The mean \pm standard deviation for three replicates are illustrated. Values with different letters express significant difference at $\alpha = 0.05$ by Tukey's test. MSIC: minimum sub-inhibitory concentration, MIC: minimum inhibitory concentration, MBC: minimum bactericidal concentration, 10 \times MIC: 10 \times minimum inhibitory concentration, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

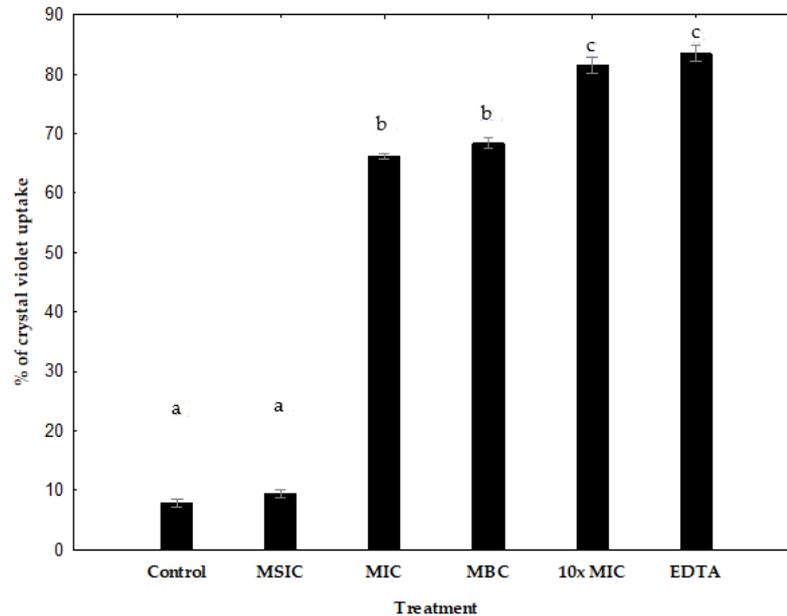


Figure 6. Change in bacterial membrane permeability of *Salmonella* C65 (assayed by crystal violet uptake) in presence of different concentrations of hibiscus acid and EDTA. Percentage of crystal violet uptake was plotted against the concentration of the treatment. The mean \pm standard deviation for three replicates are illustrated. Values with different letters express significant difference at $\alpha = 0.05$ by Tukey's test. MSIC: minimum sub-inhibitory concentration, MIC: minimum inhibitory concentration, MBC: minimum bactericidal concentration, 10 \times MIC: 10 \times minimum inhibitory concentration, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

The results of the crystal violet absorption assay indicate that hibiscus acid alters membrane permeability of enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A and *Salmonella* C65.

The effect of hibiscus acid on outer membrane permeability was shown by the uptake of the dye crystal violet. Crystal violet penetrates the outer membrane poorly, but it easily enters when the membrane is damaged. A significant enhancement in the uptake of crystal violet was observed in enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A and *Salmonella* C65 treated with hibiscus acid when compared to control cells. This shows that hibiscus acid alters membrane permeability and makes the cells permeable to solutes. Furthermore, EDTA also significantly increased the uptake of crystal violet into the cells (Figures 5 and 6). In Gram-negative bacteria, EDTA induces outer membrane permeabilization and cell lysis [51].

4. Conclusions

The present work showed that hibiscus acid is one of the compounds responsible for the anti-microbial effect of *H. sabdariffa* calyces. It was found at a level of 1.3% (13 g/kg) in dried *H. sabdariffa* calyces, and 28.3% in the dry acetonic extract from *H. sabdariffa* calyces, respectively. Due to its relatively high concentration, hibiscus acid is likely one of the main bactericidal compounds in *H. sabdariffa* calyces, although other anti-microbial compounds yet to be reported may also contribute to this effect. Both the hibiscus acid and the acetonic extract from *H. sabdariffa* constitute a potential alternative in the control of multidrug-resistant pathogenic bacteria, such as *Salmonella* and *E. coli* pathotypes. In addition, the hibiscus acid from *H. sabdariffa* calyces is potentially useful in the food industries given its relative abundance and availability. Finally, further research is needed to identify other anti-microbial compounds in *H. sabdariffa* and their mechanisms of action against bacteria. In addition, hibiscus acid affected membrane permeability of enterohemorrhagic *E. coli* EHEC A and *Salmonella* C65.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-6382/8/4/218/s1>, Table S1: Fractional Atomic Coordinates ($\times 10^4$) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for hibiscus acid, Table S2: Anisotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for hibiscus acid, Table S3: Bond Lengths for hibiscus acid, Table S4: Bond Angles for hibiscus acid, Table S5: Hydrogen Atom Coordinates ($\text{\AA} \times 10^4$) and Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for hibiscus acid.

Author Contributions: Conceptualization, L.A.P.-T. and J.C.-R.; Methodology, L.A.P.-T. and E.R.-V.; investigation, L.A.P.-T., A.B.-N., C.A.G.-A., S.G.-M., E.R.-V., J.R.V.-I., L.G.-C., H.C.-L.; resources, writing—original draft preparation, Funding acquisition and Supervision, J.C.-R.; writing—review and editing, A.B.-N., C.A.G.-A.; Formal analysis, S.G.-M. and J.R.V.-I.

Funding: This study was financially supported through the project “Development of innovative strategies and products that contribute to the prevention and control of emerging diseases of national importance”, as part of the Program for Higher-Education Teacher Development (Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior, PRODEP), funded by the Secretary of Public Education of Mexico.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Gómez-Aldapa, A.C.A.; Torres-Vitela, M.D.; Villarruel-López, A.; Castro-Rosas, J. The role of foods in *Salmonella* infections. In *Salmonella. A Dangerous Foodborne Pathogen*; Mahmoud, B.S.M., Ed.; Intech: Rijeka, Croatia, 2012; Volume 2, pp. 21–46.
2. Lamas, J.A.; Miranda, J.M.; Regal, P.; Vazquez, B.; Franco, C.M.; Cepeda, A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol. Res.* **2008**, *206*, 60–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cravioto, A.; Tello, A.; Navarro, A.; Ruiz, J.; Villafán, H.; Uribe, F.; Eslava, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* **1991**, *337*, 262–264. [[CrossRef](#)]

5. Estrada-García, T.; Cerna, J.F.; Thompson, M.R.; López-Saucedo, C. Faecal contamination and enterotoxigenic *Escherichia coli* in street-vended chili sauces in Mexico and its public health relevance. *Epidemiol. Infect.* **2002**, *129*, 223–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Estrada-García, T.; López-Saucedo, C.; Thompson, B.R.; Abonce, M.; Lopez-Hernández, D.; Santos, J.I.; Rosado, J.L.; Dupont, H.L.; Long, K.Z. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 93–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Paniagua, G.L.; Monroy, E.; García-González, O.; Alonso, J.; Negrete, E.; Vaca, S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2006**, *6*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Adachi, J.A.; Mathewson, J.J.; Jiang, Z.D.; Ericsson, C.D.; DuPont, H.L. Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Ann. Intern. Med.* **2002**, *136*, 884–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Cerna-Cortés, J.F.; Vega-Negrete, W.; Ortega-Villegas, M.A.; Zaidi, M.B.; Estrada-García, T. Consumption of street-vended beverage a potential exposure risk for non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection: The importance of testing for virulence loci. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, 154–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. López-Saucedo, C.; Cerna, C.J.F.; Estrada-García, T. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is the most prevalent diarrheagenic *E. coli* pathotype in street-vended taco dressings in Mexico City. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 450–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Paredes-Paredes, M.; Okhuysen, P.C.; Flores, J.; Mohamed, J.A.; Padda, R.S.; González-Estrada, A.; Haley, C.A.; Carlin, L.G.; Nair, P.; DuPont, H.L. Seasonality of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in the US students acquiring diarrhea in Mexico. *J. Travel Med.* **2011**, *18*, 121–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Phillips, I.; Casewell, M.; Cox, T.; De Groot, B.; Friis, C.; Jones, R.; Nightingale, C.; Preston, R.; Waddell, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 28–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. EFSA (European Food Safety Authority). Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. Scientific opinion of the panel on biological hazards. *EFSA J.* **2008**, *765*, 1–87. [[CrossRef](#)]
14. El Kamali, H.H.; Mohammed, M.F. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Acacia seyal* var. *seyal* and *Sphaeranthus suaveolens* var. *suaveolens* against upper respiratory tract pathogens. *Sudan J. Med. Sci.* **2006**, *1*, 121–126. [[CrossRef](#)]
15. Fullerton, M.; Khatiwada, J.; Johnson, J.U.; Davis, S.; Williams, L.L. Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Escherichia coli* O157:H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples. *J. Med. Food* **2011**, *14*, 950–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gómez-Aldapa, C.A.; Cerna-Cortés, J.F.; Rangel-Vargas, E.; Torres-Vitela, M.D.; Villarruel López, A.; Gutiérrez-Alcántara, E.J.; Castro-Rosas, J. Presence of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli*, on raw nopalitos (*Opuntia ficus-indica* L.) and in nopalitos salads from local retail markets in Mexico. *Foodborne Pathog. Dis.* **2016**, *13*, 269–274. [[CrossRef](#)]
17. Gómez-Aldapa, C.A.; Portillo-Torres, L.A.; Villagómez-Ibarra, J.R.; Rangel-Vargas, E.; Téllez-Jurado, A.; Cruz-Gálvez, A.M.; Castro-Rosas, J. Survival of foodborne bacteria on strawberries and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* extracts and chemical sanitizers on strawberries. *J. Food Saf.* **2018**, *38*, 1–8. [[CrossRef](#)]
18. Gutiérrez-Alcántara, E.J.; Gómez-Aldapa, C.A.; Román-Gutiérrez, A.D.; Rangel-Vargas, E.; González-Olivares, L.G.; Castro-Rosas, J. Antimicrobial activity of roselle *Hibiscus sabdariffa* calyx extracts on culture media and carrots against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from raw carrots. *J. Food Saf.* **2016**, *36*, 450–458. [[CrossRef](#)]
19. Gutiérrez-Alcántara, E.J.; Rangel-Vargas, E.; Gómez-Aldapa, C.A.; Falfán-Cortés, R.N.; Rodríguez-Marín, M.L.; Godínez-Oviedo, A.; Cortés-López, H.; Castro-Rosas, J. Antibacterial effect of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa*), sodium hypochlorite and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from tomatoes. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *62*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kang, P.S.; Seok, J.H.; Kim, Y.H.; Eun, J.S.; Oh, S.H. Antimicrobial and antioxidative effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower extract and its fractions on skin microorganisms and oxidation. *Food Sci. Biotechnol.* **2007**, *16*, 409–414.
21. Liu, K.S.; Tsao, S.M.; Yin, M.C. *In vitro* antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 942–945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Morales-Cabrera, M.; Hernández-Morales, J.; Leyva-Ruelas, G.; Salinas-Moreno, Y.; Soto-Rojas, L.; Castro-Rosas, J. Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *J. Med. Plant Res.* **2013**, *7*, 2319–2322. [[CrossRef](#)]
23. Olaleye, M.T. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *J. Med. Plant Res.* **2007**, *1*, 9–13.
24. Rangel-Vargas, E.; Gutiérrez-Alcántara, E.J.; Gómez-Aldapa, C.A.; Falfán-Cortés, R.N.; Segovia-Cruz, J.A.; Salas-Rangel, L.P.; Castro-Rosas, J. Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* serotypes isolated from coriander. *J. Food Saf.* **2017**, *37*, 1–10. [[CrossRef](#)]
25. Mahadevan, N.; Kamboj, P. *Hibiscus sabdariffa* Linn—An overview. *Nat. Prod. Radiance* **2009**, *8*, 77–83.
26. Chao, C.Y.; Yin, M.C. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathog. Dis.* **2009**, *6*, 201–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yin, M.C.; Chao, C.Y. Anti-*Campylobacter*, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *127*, 73–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Beltran-Debon, R.; Alonso-Villaverde, C.; Aragones, G.; Rodriguez-Medina, I.; Rull, A.; Micol, V. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 186–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hansawasdi, C.; Kawabata, J.; Kasai, T. Hibiscus Acid as an Inhibitor of Starch Digestion in the Caco-2 Cell Model System. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *64*, 1041–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zheoat, A.M.; Gray, A.I.; Ogbaji, J.I.; Ferro, A.B.; Drummond, R.B. Hibiscus acid from *Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*) has a vasorelaxant effect on the rat aorta. *Fitoterapia* **2019**, *134*, 5–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Cruz-Gálvez, A.M.; Gómez-Aldapa, C.A.; Villagómez-Ibarra, J.R.; Chavarría-Hernández, N.; Rodríguez-Baños, J.; Rangel-Vargas, E.; Castro-Rosas, J. Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies *in vitro* and in raw beef. *Food Control.* **2013**, *32*, 289–295. [[CrossRef](#)]
32. Dolomanov, O.V.; Bourhis, L.J.; Gildea, R.J.; Howard, J.A.K.; Puschmann, H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339–341. [[CrossRef](#)]
33. Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr.* **2015**, *71*, 3–8. [[CrossRef](#)]
34. Sheldrick, G.M. SHELXT—Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr.* **2015**, *71*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gómez-Aldapa, C.A.; Segovia-Cruz, J.A.; Cerna-Cortés, J.F.; Rangel-Vargas, E.; Salas-Rangel, L.P.; Gutiérrez-Alcántara, E.J.; Castro-Rosas, J. Prevalence and behavior of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. *Food Microbiol.* **2016**, *59*, 97–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. *CLSI* **2005**, *35*, 1–249.
37. Vanden, B.D.A.; Vlietinck, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In *Methods in Plant Biochemistry*; Dey, P.M., Harborne, J.B., Eds.; Academic Press: London, UK, 1991; Volume 2, pp. 47–69.
38. Devil, K.P.; Nisha, S.A.; Sakthivel, R.; Karutha, S.P. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 107–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ávila-Sosa, R.; Gastélum-Franco, M.G.; Camacho-Davila, A.; Torres-Muñoz, J.; Nevárez-Morrillón, G.V. Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technol.* **2010**, *3*, 434–440. [[CrossRef](#)]
40. Kuete, V.; Kamga, J.; Sandjo, L.P.; Ngameni, B.; Poumale, H.M.P.; Ambassa, P.; Ngadjui, B.T. Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae). *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Do, T.H.A.; Le, H.H.; Kitsamone, S.; Nguyen, T.U.; Nguyen, Q.H. *In vitro* antibacterial activity of quercetin containing extract from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *VNU J. Sci. Nat. Sci. Technol.* **2016**, *32*, 147–152.
42. Ibnusaud, I.; Thomas, P.T.; Rani, R.N.; Sasi, P.V.; Beena, T.; Hisham, A. Chiral γ -butyrolactones related to optically active 2-hydroxycitric acids. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4887–4892. [[CrossRef](#)]

43. He, K.; Roller, M. The use of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of biomarkers for quality control of plant extracts. In *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products*; Dayan, N., Kromidas, L., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; Volume 19, pp. 361–385.
44. Zheoat, A.M.; Gray, A.I.; Igoli, J.O.; Kennedy, A.R.; Ferro, V.A. Crystal structures of hibiscus acid and hibiscus acid dimethyl ester isolated from *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae). *Acta Crystallogr.* **2017**, *73*, 1368–1371. [[CrossRef](#)]
45. Rasheed, D.M.; Porzel, A.; Frolov, A.; El Seedi, H.R.; Wessjohann, L.A.; Farag, M.A. Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α -glucosidase inhibition. *Food Chem.* **2018**, *250*, 236–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wong, M.H.Y.; Zeng, L.; Liu, J.H.; Chen, S. Characterization of *Salmonella* food isolates with concurrent resistance to ceftriaxone and ciprofloxacin. *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 42–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kakkar, S.; Bais, S. A review on protocatechuic acid and Its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.* **2014**, *95*, 29–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Djeussi, D.E.; Noumedem, J.A.; Seukep, J.A.; Fankam, A.G.; Voukeng, I.K.; Tankeo, S.B.; Nkuete, A.H.; Kuete, V. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Abdallah, E.M. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Acute Dis.* **2016**, *5*, 512–516. [[CrossRef](#)]
50. Tsuchido, T.; Katsui, N.; Takeuchi, A.; Takano, M.; Shibasaki, I. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *50*, 298–303. [[PubMed](#)]
51. Haque, H.; Russel, A.D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and related chelating agents on whole cells of gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *5*, 447–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).