



BUAP

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

Uso de ferrochalconas sintéticas como agentes antimicrobianos contra microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli* EPEC (O26), *Escherichia coli* EHEC/STEC (O103, O111, O121) y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Tesis presentada
para obtener el grado de:
Licenciatura en Biotecnología

Presenta:

Gilberto Sánchez Aburto

Directora de tesis: **Dra. Fabiola Avelino Flores**

Asesor de tesis: **Dr. Ricardo Carreño López**

Enero 2021



Índice

I.	INTRODUCCIÓN	4
II.	ANTECEDENTES GENERALES	6
II.1	Enfermedades transmitidas por alimentos	6
II.2	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	7
II.2.1	Propiedades bioquímicas de <i>E. coli</i>	8
II.2.2	<i>E. coli</i> en productos alimenticios	8
II.2.3	Patogenicidad	9
II.2.3.1	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena típica (EPEC)	10
II.2.3.3	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (productora de la toxina Shiga) (STEC/EHEC)	12
II.3	<i>Salmonella typhimurium</i> (<i>S. typhimurium</i>)	13
II.3.1	Propiedades bioquímicas de <i>S. typhimurium</i>	14
II.3.2	<i>Salmonella typhimurium</i> en alimentos	14
II.3.3	Patogenicidad	15
II.4	Resistencia antimicrobiana	16
II.4.1	Resistencia de <i>E. coli</i> a antibióticos	17
II.4.2	Resistencia de <i>S. typhimurium</i> a antibióticos	20
II.5	Chalconas	21
II.5.1	Síntesis de las chalconas	22
II.5.1.1	Método de Claisen-Schmidt	22
II.5.1.1.1	Reacción de Claisen-Schmidt en condiciones básicas	23
II.5.1.1.2	Reacción de Claisen-Schmidt en condiciones ácidas	24
II.5.1.1.3	Reacción de Claisen-Schmidt en condiciones sin solventes	25
II.5.2	Actividad antibacteriana de las chalconas	25
II.5.2.1	Actividad antibacteriana de las chalconas fluoradas	25
II.5.2.2	Actividad antibacteriana de chalconas cloradas	26
II.5.2.3	Actividad antibacteriana de derivados de ferroceno-chalconas	26
II.6	Métodos de evaluación de la capacidad antimicrobiana	27
II.6.1	Métodos en Agar	27
II.6.2	Métodos en medio de cultivo líquido	28
III.	ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	29
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
V.	JUSTIFICACIÓN	39
VI.	OBJETIVO GENERAL	40
VII.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
VIII.	HIPÓTESIS	40
IX.	METODOLOGÍA	41
IX.1	Preparación de las soluciones stock de las ferrochalconas	41
IX.2	Descongelamiento y reactivación de las cepas a evaluar	42
IX.3	Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	43
IX.4	Efecto inhibitorio de ferrochalconas por ensayo de difusión en disco (técnica de Kirby-Bauer)	43
IX.5	Ensayo de microdilución	44
IX.6	Obtención del porcentaje de reducción mediante la técnica de extensión en placa	45
IX.7	Análisis estadístico	46

X.	RESULTADOS	47
X.1	Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	47
X.2	Efecto inhibitorio de ferrochalconas por ensayo de difusión en disco (técnica de Kirby-Bauer)	47
X.3	Efecto inhibitorio de las ferrochalconas en medio líquido (ensayo de microdilución)	51
X.4	Análisis de las poblaciones bacterianas después del tratamiento con ferrochalconas	57
XI.	DISCUSIÓN	63
XII.	CONCLUSIONES	68
XIII.	PERSPECTIVAS	69
XIV.	BIBLIOGRAFÍA	70
XV.	ANEXOS.....	81

I. Introducción

En los últimos años, la resistencia antimicrobiana ha ganado importancia como un problema de salud grave y creciente a nivel mundial, debido al aumento de la mortalidad y morbilidad a causa de bacterias multirresistentes al tratamiento con antibióticos tradicionales; y consecuentemente, un problema económico dada la pérdida de productividad y el costo de los tratamientos.

Existen diversas formas en las que dichas bacterias multirresistentes pueden llegar a enfermar a un hospedero, una de ellas, la cual es la que se contempla en este proyecto, es a través del consumo de alimentos contaminados con los microorganismos mencionados, que da origen a una Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA).

El origen de esta enfermedad puede ser por medio de productos cárnicos contaminados por patógenos resistentes, como es el caso de *Escherichia coli* patógena y *Salmonella* no tifoidea; los cuales pueden causar desde una simple diarrea y vómito, hasta graves complicaciones como es el caso de *Escherichia coli* enterohemorrágica la cual puede llegar a causar diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico urémico; principalmente en niños, ancianos y personas inmunosuprimidas.

Debido a esta problemática, se han buscado nuevos antimicrobianos y desinfectantes que sean capaces de eliminar bacterias resistentes dentro de la industria de los alimentos. Este es el caso de las chalconas, moléculas que han mostrado tener un sinfín de actividades biológicas y farmacológicas, especialmente actividad antibacteriana.

Es por esta razón, que el presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de cuatro ferrochalconas contra microorganismos patógenos, cepas de *E. coli* patogénica y *Salmonella typhimurium*, importantes en el sector alimentario, con el fin de conocer su potencial uso en la industria de los cárnicos.

La primera parte del trabajo fue realizado mediante ensayos de difusión en discos (técnica de Kirby-Bauer) como un acercamiento para conocer la posible actividad

antibacteriana de las cuatro ferrochalconas. Posteriormente, se realizaron ensayos de microdilución en medio líquido para determinar los porcentajes de reducción y los índices de crecimiento de los tratamientos con las ferrochalconas.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren el potencial uso de las ferrochalconas como antimicrobianos en la industria de los alimentos. Además de presentar un área de oportunidad para posteriores estudios, con el fin de conocer a detalle los mecanismos de acción de las ferrochalconas.

II. Antecedentes generales

II.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Cada año a nivel mundial, los alimentos contaminados causan 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos y 420,000 muertes; el 30% de estas muertes pertenecen a niños menores de 5 años. La mayoría de estos casos son causados por enfermedades diarreicas. Sin embargo, otras consecuencias graves incluyen insuficiencia renal y hepática, trastornos cerebrales y neuronales, artritis reactiva, cáncer y muerte (OMS, 2015).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos están estrechamente relacionadas con la pobreza en los países de bajos y medianos ingresos, pero son un problema creciente de salud pública en todo el mundo. El aumento del comercio internacional y las cadenas alimentarias más largas y complejas aumentan el riesgo de contaminación alimentaria y el transporte de productos alimenticios infectados a través de las fronteras nacionales. Las ciudades en crecimiento, el cambio climático, la migración y el crecimiento de los viajes internacionales agravan estos problemas y exponen a las personas a nuevos peligros (OMS, 2015).

Según datos del Banco Mundial, la pérdida total de productividad asociada con las enfermedades transmitidas por alimentos en los países en vías de desarrollo es de 95.2 mil millones de dólares por año y el costo anual del tratamiento de estas enfermedades se estima en 15 mil millones de dólares. Otros costos incluyen la pérdida de ventas en granjas y empresas, la carga ambiental del desperdicio de alimentos, así como, los impedimentos a las exportaciones agroalimentarias debido a problemas de seguridad alimentaria (Banco Mundial, 2018).

Unos de los principales agentes etiológicos de las enfermedades transmitidas por alimentos son *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

Salmonella es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial. Existen una gran variedad de serotipos que se encuentran en algunos huéspedes animales. Sin embargo, los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida de animales a seres humanos son *Salmonella enterica*

serotipo *Enteritidis* y *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium*. Por lo general, estos serotipos causan gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y que no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. La terapia antimicrobiana sistémica no está recomendada para casos leves y moderados en personas sanas debido a que se pueden seleccionar cepas resistentes (OMS, 2018).

Por otro lado, *Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria presente frecuentemente en el intestino distal de los organismos de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, pero algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias, como lo son la *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* productora de la toxina Shiga o *E. coli* enterohemorrágica (STEC/EHEC). Esta última, puede causar graves enfermedades, desde diarrea, diarrea sanguinolenta hasta provocar el síndrome hemolítico urémico (SHU) en donde los tratamientos con antibióticos no son viables debido a que pueden exacerbar la producción de las toxinas. El origen principal de los brotes de STEC/EHEC son los productos de carne picada cruda o poco cocida, la leche cruda y las hortalizas contaminadas por materia fecal (OMS, 2018).

II.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli es el organismo más estudiado por el ser humano. Es una enterobacteria gram negativa que se encuentra generalmente en los intestinos de los animales, y por ende, en las aguas negras. No obstante, se le puede encontrar en todos lados, ya que es un microorganismo ubicuo. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich (Prescott et al., 1999).

E. coli es un organismo benéfico que protege al epitelio de otras bacterias patógenas mediante la producción de un medio ácido a través del metabolismo de nutrientes. Además, le provee una fuente de vitaminas B y K al organismo hospedero, así como la activación constante del sistema inmune. Sin embargo, algunas cepas adquieren elementos genéticos móviles (plásmidos, islas de patogenicidad, transposones, bacteriófagos) que codifican una gran variedad de factores de virulencia, lo que le permite a la bacteria causar diversas enfermedades

como son la diarrea, disentería, sepsis, meningitis, el síndrome hemolítico urémico e infecciones en el tracto urinario (Kaper et al., 2004).

Morfológicamente las colibacterias son bacilos rectos generalmente flagelados peritricos móviles. Pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias y son fácilmente cultivables en medios nutritivos sencillos. *E. coli* se replica cada 20 minutos. Catabolizan glucosa, lactosa y otros carbohidratos, pero no pueden utilizar urea ni citratos. El rango de crecimiento se sitúa entre 4 y 46 °C. Sin embargo, su crecimiento es preferente a 37 °C (mesófilo). Al igual que las restantes enterobacterias, las colibacterias son resistentes a las sustancias tensoactivas (Castro-Alcocer, 2012).

II.2.1 Propiedades bioquímicas de *E.coli*

E. coli es una bacteria móvil fermentadora de glucosa con producción de gas, lactosa, manitol y sorbitol; catalasa, lisina descarboxilasa, indol y rojo de metilo positiva. Además, es citrato, fenilalanina desaminasa, ureasa, oxidasa, Voges-Proskauer y SH₂ negativa (Rodríguez-Angeles, 2002; Castro-Alcocer, 2012).

II 2.2 *E. coli* en productos alimenticios

Las enfermedades transmitidas por *E. coli* han sido reconocidas como uno de los problemas de salud más prevalentes en el mundo, principalmente en países en desarrollo (Galli et al., 2016). Ciertos patogrupos de *E. coli* son transmitidos por agua y alimentos como carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, queso elaborado con leche cruda, yogurt, coles de Bruselas, espinacas, lechuga, entre otros (OMS, 2018).

Estudios realizados en México con diversos productos alimenticios y bebidas indicaron que existe una mayor prevalencia de contaminación en productos lácteos, derivados de carnes y alimentos del mar. En el cual, *E. coli* enteropatógena (EPEC) fue la más predominante con un 78.5%, seguido de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) con un 10.7%, *E. coli* shigatoxigénica (STEC) con un 8.9% y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) con un 1.7% (Canizalez-Roman et al., 2013).

Del mismo modo, otros estudios enfocados en vegetales detectaron la presencia de ETEC en jitomates, brotes de alfalfa, cilantro y perejil con una prevalencia del 4% al 0.3%; STEC fue detectada en jitomates, brotes de alfalfa y espinaca con una prevalencia del 6% al 0.5%; y EPEC fue encontrada en jitomates y brotes de alfalfa con una prevalencia del 4% (Rangel-Vargas et al., 2015). Además, se han encontrado los patogrupos STEC, EPEC y ETEC en muestras de ensaladas de nopales, en donde todas las cepas aisladas exhibieron multirresistencia a antibióticos (Gómez-Aldapa et al., 2016).

Debido al incremento de casos y brotes asociados al consumo de alimentos contaminados con STEC y no-STEAC, actualmente se han presentado protocolos oficiales para encontrar estas cepas en productos cárnicos, incluyendo los serotipos O26, O45, O103, O104, O11, O121, O145 y O157 (USDA MLG 5B.05, 2015; ISO/TS 13136:2012, 2012).

A pesar de estas acciones, son necesarias otras medidas que complementen la reducción de la prevalencia de *E. coli* patógenas en el ganado mediante la implementación de buenas prácticas de higiene durante el procesamiento de la carne, su preparación cuidadosa (Bentacor et al., 2012), la cocción de la carne, especialmente la carne molida (Voetsch et al., 2007), evitar la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos (Signorini & Fizzo, 2009), el acceso al agua potable y la educación pública sobre la importancia de la buena higiene personal y la limpieza de los utensilios de cocina (Rivas et al., 2011).

Es importante reconocer que, aparte de la carne de res; otro tipo carnes, alimentos, agua y fuentes indirectas (contacto con animales, recreación y persona a persona) juegan un papel en la transmisión de este patógeno, por lo que también deben abordarse para reducir su impacto en la salud pública (Duffy et al., 2006).

II.2.3 Patogenicidad

E. coli puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, como son infecciones en el aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, uretritis, mastitis, septicemia y neumonía. Esta bacteria, por sus propiedades

virulentas causa diarrea. Sin embargo, otras cepas pueden causar diarreas hemorrágicas (Castro-Alcocer, 2012).

Se han descrito seis patotipos de *E. coli* involucrados en procesos diarreicos, mediante la identificación de factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad, las cuales son *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* shigatoxigénica o enterohemorrágica (STEC/EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* adherente invasora (IAEC) (Nataro & Kaper, 1998).

E. coli enteropatógena es el patotipo más asociado a diarrea en lactantes y algunas veces se asocia a vómito y fiebre (Spears et al., 2006). *E. coli* enteroinvasora es de importancia en niños menores a seis meses de edad, genera diarrea y en ocasiones va acompañada de sangre y moco (Croxen et al., 2013). *E. coli* enterotoxigénica tiene mayor frecuencia en niños menores a 2 años, la diarrea puede acompañarse de fiebre y vómito (Qadri et al., 2005). *E. coli* enteroagregativa suele causar diarrea persistente de un color verde y con presencia de moco. *E. coli* adherente difusa causa diarrea en niños de una a cinco años (Croxen et al., 2013). Y *E. coli* shigatoxigénica causa dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y poca fiebre (Farfán-García et al., 2016). En casos más graves puede causar complicaciones del sistema nervioso central (Pape et al., 2015) y el síndrome hemolítico urémico (Kaper et al., 2004).

II.2.3.1 *Escherichia coli* enteropatógena típica (EPEC)

EPEC es definida como aquellas cepas que tienen la capacidad de causar diarrea, producir una histopatología en el epitelio del intestino delgado conocido como lesiones de adherencia y esfacelamiento o borrado (A/E); un fenotipo que es codificado en la isla de patogenicidad del locus de esfacelamiento del enterocito (LEE), el cual codifica los componentes del sistema de secreción tipo III, moléculas efectoras y la intimina (eae); y la incapacidad de producir toxinas Shiga y las toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) de la *E. coli* enterotoxigénica (Nataro & Kaper, 1998). Cepas EPEC típicas poseen un plásmido de virulencia conocido como el factor de adherencia EPEC (EAF), que codifica los pili formadores de haces

(BFP:bundle-forming pilus) que median la adherencia localizada al epitelio, la autoagregación y la formación de biopelículas, mientras que las EPEC atípicas no poseen este plásmido (Scaletsky & Fagundes-Neto, 2016).

La adherencia de cepas típicas de EPEC, tienen un patrón tridimensional distintivo llamado fenotipo de adherencia localizada (LA), la cual es mediada por las fimbrias de tipo IV transmitidas por plásmidos comúnmente conocido como BFP (Girón et al., 1991). La adherencia de EPEC es inhibida por varias moléculas de carbohidratos, incluyendo la galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilactosamina, y oligosacáridos fucosilados y gangliósidos de la leche (Scaletsky & Fagundes-Neto, 2016).

Como se mencionó antes, EPEC tiene la capacidad de producir lesiones A/E, este fenotipo es caracterizado por el esfacelamiento o la alteración de las microvellosidades de las células epiteliales intestinales y la adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células epiteliales. Asimismo, justo debajo de la bacteria adherente, se observan cambios en el citoesqueleto de la célula epitelial, mediante la formación de una estructura conocida como copa o pedestal rica en actina. Por otro lado, ciertos efectores interrumpen los procesos de la célula hospedera, lo que resulta en la pérdida de la función mitocondrial y la afectación de la localización de acuaporinas, lo que lleva a la pérdida de electrolitos (y por ende la diarrea) y la eventual muerte celular (Scaletsky & Fagundes-Neto, 2016).

La transmisión de EPEC sigue la vía fecal-oral a través de superficies contaminadas, fluidos de destete y portadores humanos (Levine & Edelman, 1984). EPEC típica es asociado con la diarrea en niños menores a dos años, sin embargo, también existen brotes en adultos por la ingesta de alimentos y agua contaminados (Scaletsky & Fagundes-Neto, 2016), principalmente en los meses cálidos. La dosis infectiva en adultos es de 10^8 a 10^{10} microorganismos (Levine et.al, 1978).

EPEC causa diarrea aguda, con una duración de hasta 2 semanas; otros síntomas son vómito, deshidratación y fiebre. Además, la infección puede conducir a una malabsorción severa e incluso provocar intolerancia a la lactosa y alergia alimentaria (Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000). Una infección persistente puede requerir el uso

de antibióticos, sin embargo, la multirresistencia de EPEC es común, principalmente a penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos (Subramanian et al., 2009).

II.2.3.3 *Escherichia coli* enterohemorrágica (productora de la toxina Shiga) (STEC/EHEC)

STEC/EHEC es un patógeno zoonótico transmitido por los alimentos y el agua cuya característica distintiva es la capacidad de producir una o más citotoxinas de la familia de la toxina Shiga (Stx) (Melton-Celsa, 2014). Además, presentan LEE, A/E y una isla de patogenicidad cromosomal (PAI). Estas cepas pertenecen a un gran número de serotipos O:H (más de 400), siendo la cepa O157:H7 la más prevalente (Rivas et al., 2016). Sin embargo, otros serogrupos como O26, O45, O103, O111, O121 y O145, también son los responsables de causar la mayoría de las infecciones (Terajima et al., 2014).

STEC/EHEC puede causar infecciones en humanos que varían desde casos asintomáticos o diarrea leve, hasta colitis hemorrágica (HC) y el síndrome hemolítico urémico (HUS); siendo la principal causa de provocar insuficiencia renal aguda en niños (Rivas et al., 2016). No existe tratamiento específico para HUS, por lo que a los pacientes se les dan cuidados de apoyo para desequilibrio hídrico, anemia, hipertensión e insuficiencia renal; la frecuencia de los pacientes que mueren durante la fase aguda de la enfermedad es de 1-2% (Mele et al., 2014) y casi el 30% de los pacientes desarrollan daño renal a largo plazo (Spinale et al., 2013). En general, las infecciones con STEC/EHEC no deben ser tratadas con antibióticos, debido a un mayor riesgo de desarrollar HUS, ya que algunos tipos de antibióticos inducen la expresión de Stx (Rivas et al., 2016).

En *E. coli* las Stx se clasifican en 2 subfamilias, Stx1 y Stx2, siendo esta última la más patogénica (Scheutz, 2014). La acción de estas toxinas es la generación de un estado prooxidativo que contribuye a la insuficiencia renal, la inhibición de la síntesis de las proteínas y la modulación inmune (Lee et al., 2013), provocando daño al ribosoma mediante la inducción del estrés ribotóxico, el cual es tanto inflamatorio como proapoptótico (Jandhyala et al., 2012). Otros factores de virulencia, como

adhesinas, proteasas y lipopolisacáridos (LPS) son necesarios para el completo desarrollo de HUS (Rivas et al., 2016).

STEC/EHEC se distribuyen en gran medida en el tracto gastrointestinal de una amplia diversidad de animales, normalmente como portadores asintomáticos. Varios animales rumiantes, especialmente el ganado, se consideran el principal reservorio natural, pero también se presentan en mamíferos domésticos y salvajes, aves y peces. Como consecuencia, las rutas de transmisión de STEC/EHEC a los humanos pueden ocurrir por la cadena alimentaria, el contacto directo con animales, por beber o nadar en agua contaminada, o por la propagación persona a persona (Luna- Gierke et al., 2014).

II.3 *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*)

El género *Salmonella* está integrado por bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas y en forma de bastón. Son anaerobias facultativas, su diámetro varía de 0.7 a 1.5 μM , con una longitud de 2 a 5 μM (Fàbrega & Vila, 2013) y se mueven por flagelos peritricos, aunque también existen serotipos inmóviles (Güerri-Santos, 2002).

Este género se ha clasificado según el esquema de Kauffmann-White, el cual consta de 2 especies, *S. enterica* y *S. bongori*; a su vez *S. enterica* se divide en 6 subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *indica* (Grimont & Weill, 2007).

El género *Salmonella* es de particular relevancia clínica tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo, debido a que este patógeno es una de las causas más comunes de enfermedades transmitidas por alimentos. Entre los agentes causales más comunes de este género son *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Enteritidis (Kariuki et al., 2006).

Salmonella enterica subespecie *enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) es el microorganismo principal causante de salmonelosis. Se transmite principalmente

por alimentos y bebidas contaminadas, así como por el contacto con animales infectados como aves de corral, aves silvestres y roedores (Torpdahl et al., 2013).

Típicamente una infección por *Salmonella* causa fiebre, calambres, dolor abdominal, diarrea con o sin sangre asociada con la inflamación del intestino grueso, y en algunos casos, náuseas, vómitos, dolor de cabeza y mialgias (Coburn et al., 2007). La enfermedad ocurre después de la ingesta de más de 50,000 bacterias a partir de alimentos o de agua contaminada, y después de un periodo de incubación de 6 a 72 horas (Wray & Sojka, 1978). Aproximadamente, el 5% de las personas con enfermedades gastrointestinales causadas por *Salmonella* no tifoidea desarrollan bacteriemia, la cual ocurre más comúnmente en niños pequeños, pacientes inmunocomprometidos y pacientes con afecciones médicas comórbidas. Una complicación de la bacteriemia por *Salmonella* en adultos es el desarrollo de la arteritis infecciosa (Fàbrega & Vila, 2013), así como colecistitis, pancreatitis y apendicitis (Eng et al., 2015). La tasa de mortalidad de enfermedades causadas por *Salmonella* no tifoidea es del 24% en países en desarrollo, principalmente en niños (Fàbrega & Vila, 2013).

II.3.1 Propiedades bioquímicas de *S. typhimurium*

S. typhimurium es una bacteria móvil fermentadora de glucosa con producción de gas y manitol; catalasa, citrato, SH₂ y rojo de metilo positiva. Además, no es fermentadora de lactosa y es indol, ureasa, oxidasa y Voges-Proskauer negativa (Chen, 2013).

II.3.2 *Salmonella typhimurium* en alimentos

La principal ruta de transmisión de *Salmonella* es el consumo de alimentos de origen animal contaminados con materia fecal (Swartz, 2002), debido en general, por la introducción de este patógeno en áreas de preparación de alimentos. Existen diversos factores que influyen en este proceso como la inadecuada temperatura de almacenamiento, la insuficiente cocción de los alimentos y la contaminación cruzada (Carrasco et al., 2012).

Por lo regular, las carnes, aves y huevos son los principales alimentos involucrados en las infecciones por *Salmonella* (Wilson, 2002). Sin embargo, la contaminación de este patógeno también incluye productos lácteos, frutas, verduras y productos pesqueros (Carrasco et al., 2012).

Mientras que *S. enteritidis* está implicada mayormente en el consumo de aves y huevos, *S. typhimurium* está relacionada con una variedad de animales como aves, cerdos, ganado vacuno y bovino (Carrasco et al., 2012).

Del mismo modo, la carne molida ha estado implicada en brotes de salmonelosis. A pesar de que *Salmonella* ha disminuido en este alimento debido a la implementación del sistema HACCP (Eblen et al., 2006), aún existe una incidencia de este patógeno en productos cárnicos crudos, ahumados y ligeramente cocidos, mostrando una prevalencia del 1.1% al 6.0% (Carrasco et al., 2012).

Por otro lado, debido a que *Salmonella* tiene la capacidad de sobrevivir in alimentos secos, ésta se ha encontrado en alimentos procesados como leche en polvo, chocolate, mantequilla de cacahuete, alimentos para infantes y productos de panadería (Smith et al., 2004). Al igual que en especias, como clavo, orégano, pimienta y paprika (Moreira et al., 2009).

Asimismo, se ha encontrado *Salmonella* en vegetales, incluyendo al cilantro, brócoli, lechuga, espinacas y jitomates (Quiroz-Santiago, et al., 2009).

II.3.3 Patogenicidad

Los niños menores de 5 años, personas de la tercera edad e inmunosuprimidos son más susceptibles a desarrollar una infección por *Salmonella* (Eng et al., 2015).

Salmonella ingresa al tracto digestivo a través de agua o alimentos contaminados y tienden a penetrar las células epiteliales que recubren la pared del intestino delgado. La isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1) codifican para el sistema de secreción tipo III, las cuales son proteínas multicanal que permiten inyectar efectores a través de la membrana de las células epiteliales intestinales hacia el citoplasma. Estos efectores activan la vía de señalización transduccional y desencadenan la reconstrucción del citoesqueleto de actina, lo que da como

resultado la extensión de la membrana celular para engullir a la bacteria, similar al proceso de fagocitosis (Takaya et al., 2003).

Después de la inmersión de *Salmonella* en la célula huésped, la bacteria es encerrada en un compartimento conocido como la vacuola que contiene a *Salmonella*. Sin embargo, para evitar activar la respuesta inmune y la secreción de enzimas que pueden degradar a la bacteria, *Salmonella* utiliza otro sistema de secreción tipo III, el cual está codificado en SPI2, para inyectar otras proteínas efectoras en la vacuola, lo que provoca la alteración de la estructura del compartimento y, por lo tanto, el bloqueo de la fusión de los lisosomas, permitiéndole sobrevivir y replicarse dentro de la célula hospedera (Monack et al., 2004). Una vez que atravesó el epitelio intestinal, la bacteria es engullida por los macrófagos dentro de la vacuola (Fàbrega & Vila, 2013), permitiéndole transportarse por medio del sistema reticuloendotelial (Monack et al., 2004) y poder diseminarse a otros órganos como el hígado y el bazo (Thompson et al., 2018).

Asimismo, uno de los factores que favorecen la persistencia de *Salmonella* es capacidad de formar biopelículas, las cuales están compuestas por sustancias extracelulares poliméricas incluyendo fimbrias, celulosa, polisacáridos capsulares, entre otros (Barreto et al., 2016).

II.4 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos es reconocida como una amenaza internacional a la salud. El aporte de la atención primaria de la salud es importante ya que es en donde se prescriben casi el 80% de todos los antibióticos utilizados (Majeed & Moser, 1996). Las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos pueden limitar la disponibilidad de las opciones de tratamiento efectivas. Además, este tipo de infecciones tienen el doble de probabilidad de estar asociado a una mayor morbilidad y mortalidad, así como un incremento en el costo de la atención médica (Holmberg et al., 1987).

II.4.1 Resistencia de *E. coli* a antibióticos

En los últimos años ha aumentado el caso de infecciones causados por *E. coli* resistente a antibióticos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a *E. coli* como una de las siete bacterias de interés internacional debido a su resistencia a cefalosporinas de tercera generación, β -lactamasas de amplio espectro y fluoroquinolonas (Sagwal-Chaudhary, 2016).

La resistencia en *E. coli* es generada por una selección positiva a través de mutaciones puntuales, como es el caso de la resistencia a fluoroquinolona, o por la adquisición de elementos genéticos móviles mediante transferencia horizontal (transposones, plásmidos y bacteriófagos), en el caso de la resistencia a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación (Ochoa & Gómez-Duarte, 2016).

Los principales mecanismos de resistencia antimicrobiana son (Ochoa & Gómez-Duarte, 2016):

- 1) Impedimento del acceso: mediante la reducción de la permeabilidad o el incremento del eflujo. Por ejemplo, en *Enterobacteriaceae*, la reducción de la expresión de porinas contribuye a la resistencia a nuevos antibióticos como carbapenémicos y cefalosporinas. Por el otro lado, las bombas de eflujo transportan activamente a los antibióticos fuera de la membrana, siendo las mayores contribuidoras de la resistencia intrínseca de las bacterias Gram negativas en muchos fármacos.
- 2) Cambios en las moléculas objetivo de los antibióticos: cambios estructurales en la molécula objetivo evitan la unión eficaz de los antibióticos, pudiendo llevar su función normal y, por lo tanto, conferirle resistencia.
- 3) Modificación directa de los antibióticos: las bacterias pueden destruir o modificar a los antibióticos mediante diversas reacciones químicas, como la hidrólisis del antibiótico, la transferencia de un grupo químico o la adición de un grupo químico en un sitio vulnerable del antibiótico.

En la siguiente tabla, se muestra un resumen de los principales mecanismos de resistencia de *E. coli*.

Tabla 1. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos de *E. coli*

Familia de antibióticos	Mecanismo de resistencia	Genes involucrados
β-lactámicos	β-lactamasas: enzimas que hidrolizan el enlace amida del antibiótico.	Genes que codifican β-lactamasas: <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CARB} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{CTX-M} y <i>bla</i> _{GES}
	β-lactamasas de amplio espectro (ESBLs): enzimas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación	-
Quinolonas	Mutaciones puntuales que alteran la enzima objetivo del antibiótico	Mutaciones en <i>gyrA</i> (gen que codifica una subunidad de la ADN girasa) y <i>parC</i> (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV)
	Alteración en los mecanismos de permeabilidad (bombas de eflujo y canales de difusión)	Genes tipo AcrAB
	Genes de resistencia transportados por plásmidos	Familia de genes <i>qnr</i> (A, B, C, D, S) que codifican proteínas Qnr que interfieren en la unión del antibiótico con su objetivo
		Genes que codifican una enzima capaz de inactivar fluoroquinolonas: variantes de <i>cr</i> de la acetiltransferasa 6' (<i>acc(6')-Ib-cr</i>)
Tetraciclina	Bombas específicas de eflujo	<i>tetA</i> y <i>tetB</i>
Cloranfenicol	Inactivación enzimática mediada por acetilación	Gen <i>cat</i> codifica la cloranfenicol acetiltransferasa
	Reducción de la permeabilidad de la membrana	Genes <i>florR</i> y <i>cmIA</i>
Trimetoprima-Sulfametoxazol	Mutación de enzimas objetivo	Genes <i>sul1</i> y <i>sul2</i> confieren resistencia a sulfametoxazol, genes <i>dfp</i> confieren resistencia trimetoprima

Fuente: Modificado de Mosquito et al. (2011) y Ochoa & Gómez-Duarte (2016).

El incremento del nivel de resistencia fue demostrado cuando se compararon cepas de *E. coli* aisladas en 1950 con cepas aisladas en 2000 y su resistencia a 15 antibióticos, en este estudio, se mostró un incremento de la multirresistencia de un 7.2% en 1950 a un 63.6% en 2000 (Tadesse et al., 2012).

Estudios llevados a cabo por Bryce et al. en países miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) mostraron una prevalencia de la resistencia de *E. coli* aislada de tractos urinarios de un 53.4% a ampicilina, 23.6% a trimetoprima, 8.2% a co-amoxiclav, 2.1% a ciprofloxacina y 1.3% a nitrofurantoína. Sin embargo, estudios en países no pertenecientes a la OCDE muestran una resistencia mayor, presentando un 79.8% a ampicilina, 60.3% a co-amoxiclav, 26.8% a ciprofloxacina y 17% a nitrofurantoína (Bryce et al., 2016).

Del mismo modo, estudios realizados por la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) en 14 países indicaron que el rango general reportado de la resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación es del 0-48% y a las fluoroquinolonas del 8-58% (OMS, 2014).

Además, otro estudio realizó un ensayo de vigilancia de susceptibilidad a los antimicrobianos en bacterias gram negativas en 12 países de América Latina entre el 2004 y el 2010. Las cepas de *E. coli* se aislaron de sangre, el tracto respiratorio, orina, piel, heridas y fluidos; las cuales un 24.3% fueron identificadas como productoras de betalactamasas de amplio espectro (ESBL). De entre las cepas de *E. coli* no productoras de ESBL, un 1.7% fue resistente a amikacina, 69.9% a ampicilina, 3.6% a cefepima, 15.6% a ceftriaxona, 36.2% a levofloxacina, 1.0% a meropenem y 6.0% a piperacilina/tazobactam, por otro lado, las cepas de *E. coli* productoras de ESBL mostraron resistencia a amikacina en un 5.3%, a levofloxacina en un 85.1%, a meropenem en un 2.3% y a piperacilina/tazobactam en un 10.0% (Fernández-Canigia & Dowzicky, 2012).

Específicamente, en México, cepas STEC O157 y no-O157 obtenidas de animales de granja mostraron resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas, cefalosporinas y penicilinas (Amézquita-López et al., 2016).

II.4.2 Resistencia de *S. typhimurium* a antibióticos

Debido a que generalmente la salmonelosis se presenta como una gastroenteritis autolimitada, los antibióticos se recomiendan principalmente en cuadros extraintestinales invasores y para pacientes con factores de riesgo (Barreto et al., 2016). En estos casos, la ampicilina, cloranfenicol y trimetoprima-sulfametoxazol son usados como los tratamientos de primera línea (Eng et al., 2015), así como, fluoroquinolonas o cefalosporinas de amplio espectro (Fàbrega & Vila, 2013).

El surgimiento de la resistencia antimicrobiana de *Salmonella* se debe principalmente al uso de antibióticos en la alimentación animal para promover su crecimiento y en la medicina veterinaria para tratar infecciones en los animales (Hyeon et al., 2011). Esto genera un alto riesgo de enfermedades zoonóticas con cepas de *Salmonella* multirresistentes debido a la ingesta de alimentos o agua contaminada con heces de animales infectados (Holmberg et al., 1984).

Generalmente, el fenotipo de multirresistencia está codificado en plásmidos, esto les permite tener menos susceptibilidad contra ciertos antibióticos, como el cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina, estreptomina y trimetoprima-sulfametoxazol (Guerra et al., 2002). Y en los últimos años se ha visto un aumento en la resistencia de espectinomicina, tetraciclina y ácido nalidíxico (Fàbrega & Vila, 2013).

Existe cierta emergencia de serotipos de *Salmonella* con una susceptibilidad reducida a ciprofloxacina, esto se debe por una mutación cromosómica en las regiones determinantes de la resistencia a la quinolona del gen *gyrA* (Chiu et al., 2002). Además, algunos serotipos de *Salmonella* han desarrollado resistencia a un amplio espectro de cefalosporinas como resultado de genes mutados que codifican una gran variedad de β -lactamasas (Carattoli et al., 2002).

Del mismo modo, otros tipos de β -lactamasas plasmídicas incluyen las penicilinasas tipo TEM, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas, las más comunes son las codificadas por los genes *bla*_{TEM-1A} y *bla*_{TEM-1B}; las penicilinasas de tipo SHV-1, las β -lactamasas tipo OXA que le confieren resistencia a las amino y ureidopenicilinas, y la β -lactamasa tipo PSE-1 que puede conferir

resistencia al ácido clavulónico así como perfiles de resistencia similares a TEM (Güerri-Santos, 2002).

Por otro lado, se ha observado la resistencia de *Salmonella* a inhibidores de β -lactamasas, principalmente por la hiperproducción de β -lactamasas tradicionales (TEM) y tipo PSE-1 provocando que el inhibidor no tenga un gran efecto por la gran cantidad de sustrato (Güerri-Santos, 2002).

Según datos del Sistema Nacional del Monitoreo de la Resistencia Antimicrobiana (NARMS), el 84% de las cepas de *Salmonella* no tifoideas mostraron un fenotipo multiresistente y el 4.1% de las cepas aisladas tuvieron una susceptibilidad reducida a las cefalosporinas en Estados Unidos de América del 2005 al 2006 (Eng et al., 2015). Y específicamente con *S. typhimurium*, se ha visto un 55% de cepas multiresistentes (Erdem et al., 2005).

II.5 Chalconas

Las chalconas son compuestos naturales que presentan una estructura química simple y tienen una amplia distribución en verduras, frutas, tés y otras plantas. La palabra chalcona viene del griego "chalcos" que significa bronce, debido a los colores de la mayoría de las chalconas (Sahu et al., 2012).

Estos compuestos tienen una estructura química común, la 1,3-diarilprop-2-en-1-ona, también conocido como chalconoide, los cuales existen como isómeros cis y trans, siendo este último el más estable termodinámicamente (Cadena-Cruz, 2018).

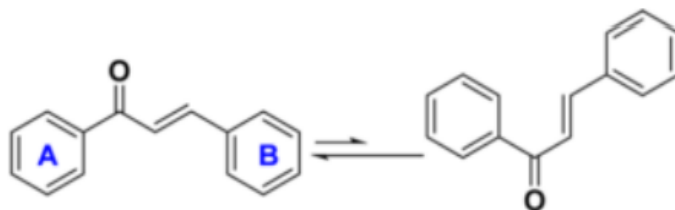


Figura 1. Estructura base de las chalconas

Las trans-1,3-diaril-2-propenonas (chalconas), representan una familia de compuestos que tienen diferentes actividades biológicas y farmacológicas, dependiendo de los sustituyentes en los anillos aromáticos; tales como actividad

antiviral (Hu et al., 2012), antimalárica (Wu et al., 2002), antibacteriana, antioxidante, antiparasitaria, anticancerígena (Rocchi et al., 2014), antiinflamatoria (Talukdar et al., 2013), antipigmentante (Seo et al., 2010), antimitótica (Ducki et al., 1998), antileishmania (Boeck et al., 2006), antiplaquetaria (Zhao et al., 2005), antihipertensiva (Ducki et al., 1998), antiprotozoaria (Carvalho et al., 2012), anti-VIH (Sharma et al., 2011) y antiulcerosa (Sashidhara et al., 2015).

Por otro lado, las chalconas también son utilizadas como sintones junto a especies dinucleófilas en la síntesis de heterociclos de cinco y seis miembros (Basnet et al., 2007) gracias a la presencia del sistema carbonílico α,β -insaturado de la chalcona (Pascual & González, 2018). Además, son intermediarios en la biosíntesis de otras moléculas como los flavonoides e isoflavonoides (Zhuang et al., 2017).

II.5.1 Síntesis de las chalconas

Una de las formas más utilizadas para la síntesis de las chalconas es a través de la reacción de Claisen- Schmidt, la cual consta de la condensación de un aldehído con una cetona (Shelke et al., 2007).

Sin embargo, en la actualidad se han reportado modificaciones de esta reacción con el fin de optimizar el proceso; incluyendo métodos de sustitución (Deshmukh et al., 2003), isomerización (Yang et al., 2010) y ciclación oxidante (Kumar & Makrandy, 2005), así como la implementación de fuentes de energías alternativas que aceleren la reacción como el reactor de microondas o el ultrasonido (Nyati et al., 2006).

II.5.1.1 Método de Claisen-Schmidt

La reacción de Claisen-Schmidt es llamada así debido a dos investigadores pioneros, R.L. Claisen (Claisen & Claparède, 1881) y J.G. Schmidt (Schmidt, 1881), en la cual un benzaldehído y una metilcetona son condensados en presencia de un catalizador (Zhuang et al., 2017).

Esta condensación se puede realizar tanto en medio ácido como en medio básico. En presencia de catalizadores ácidos se forma un complejo entre el catalizador con el compuesto metilénico. Los agentes ácidos más usados son el trifloruro de boro en ácido acético, el cloróxido de fósforo y el ácido sulfúrico (Laos & Gonzalez, 1995).

Por otro lado, en presencia de agentes alcalinos ocurre la ruptura del protón del compuesto metilénico (acetofenona) formándose el carbanión que se une al grupo carbonilo del aldehído. Entre los agentes condensadores de carácter básico que más se utilizan son el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y los alcoholatos de sodio y la piperidina (Laos & Gonzalez, 1995) en metanol o etanol (Zhuang et al., 2017).

En la reacción de Claisen-Schmidt, la concentración de medio básico puede variar entre 10-60% y se lleva a cabo a 50°C durante 12-15 horas o a temperatura ambiente durante una semana (Cadena-Cruz, 2018). Generalmente, en la síntesis de chalconas es más común el uso de catalizadores básicos (Zhuang et al., 2017).

El principal inconveniente de esta reacción es la velocidad de reacción lenta, ya que generalmente se necesitan varias horas o días para que se complete. Además, el producto de la reacción puede estar formado por una mezcla compleja, incluyendo el producto deseado, subproductos y en algunos casos los reactivos iniciales (Zhuang et al., 2017).

El rendimiento puede variar dramáticamente, dependiendo de los reactivos y los catalizadores, desde menos del 10% hasta llegar casi al 100% (Nielsen & Houlihan, 2011).

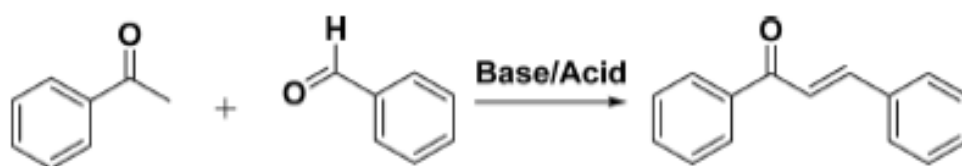


Figura 2. Reacción Claisen-Schmidt

II.5.1.1.1 Reacción de Claisen-Schmidt en condiciones básicas

Como se mencionó anteriormente la reacción puede llevarse mediante catalizadores básicos como tert-butóxido de potasio, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio en metanol o etanol. Esta reacción es ampliamente usada para la síntesis de chalconas sustituidas con grupos hidroxilo, ya que se obtienen buenos

rendimientos, variando de un 60 a 90%. Del mismo modo, se han sintetizado ferrocenilchalconas en medio básico (hidróxido de sodio) (Zhuang et al., 2017).

Sin embargo, en algunos casos se realizan modificaciones en los catalizadores o en el sistema de solventes (Zhuang et al., 2017) para aumentar el rendimiento. Por ejemplo, la chalcona β -trifluorometilada puede ser producida con hidróxidos de metales alcalinotérreos de calcio, bario o estroncio en solventes apróticos para facilitar la remoción de agua (Patel & Lee, 2012), ya que se favorece la reacción. Así mismo, el sistema NaNO_3 o LiNO_3 /fosfato natural/metanol es otro catalizador básico extremadamente eficiente para el proceso de condensación de Claisen-Schmidt en donde se obtienen altos rendimientos a temperatura ambiente (Sebti et al., 2002).

II.5.1.1.2 Reacción de Claisen-Schmidt en condiciones ácidas

Los agentes ácidos más usados para la síntesis de chalconas son el trifloruro de boro en ácido acético, el cloróxido de fósforo y el ácido sulfúrico (Laos & Gonzalez, 1995), como se citó antes. No obstante, también se han utilizado una gran variedad de ácidos de Bronsted (Golay, 1964), ácidos de Lewis (Mazza & Guarna, 1980) y ácidos sólidos (Tan et al., 2012).

En general, en condiciones ácidas se obtienen rendimientos más bajos que en condiciones básicas. Por ejemplo, el uso de ácido clorhídrico en etanol saturado solo genera de un 10 a un 40% de rendimiento en la síntesis de chalconas (Molitor et al., 2016). Debido a esto se ha utilizado otras variantes, como el gas de ácido clorhídrico seco con el fin de favorecer la reacción (Golay, 1964).

Debido a estos bajos rendimientos, se han experimentado con diversas modificaciones para mejorar la producción de chalconas. Como es el caso del uso de cloruro de aluminio (AlCl_3) como ácido de Lewis, en donde dos moles de acetofenona por mol de AlCl_3 aumentan el rendimiento a un 73% (Calloway & Green, 1937). De la misma manera, la aplicación de trifloruro de eterato de boro ($\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$) mejora el rendimiento a un 75-96% con un tiempo de reacción menor a 3 horas (Narender & Reddy, 2007). Las chalconas también han sido obtenidas con ácidos

como el ácido p-toluenosulfónico (Tan et al., 2012), Zn(bpy)(OAc)₂ (Iranpoor & Kazemi, 1998), TiCl₄ (Mazza & Guarna, 1980), Cp₂ZrH₂/NiCl₂ (Hasaninejad et al., 2010) y RuCl₃ (Nakano et al., 1987).

II.5.1.1.3 Reacción de Claisen-Shmidt en condiciones sin solventes

Para la síntesis de chalconas también se han aplicado condiciones libres de solventes como la molienda o la irradiación de microondas (Kulkarni, 2015). Rateb y colaboradores reportaron un método usando hidróxido de sodio molido con un aldehído y una cetona para obtener una chalcona con 80% de rendimiento (Rateb et al., 2009). De igual manera, una nitrochalcona fue sintetizada bajo condiciones de molienda con un catalizador básico KF-Al₂O₃ obteniendo un 94% de rendimiento en cinco minutos (Liu & Shi, 2009).

La irradiación de microondas se ha utilizado como un método amigable con el ambiente para la producción de chalconas (Liu et al., 2007). Verbigracia, un sistema catalítico de ácido sulfónico sólido a partir de bambú fue descubierto por Xu et al., en el cual usando microondas obtuvieron rendimientos del 60 al 82% (Xu et al., 2008). Este tipo de metodología ofrece grandes ventajas como son la eliminación de la influencia de los solventes y la reducción de subproductos, permitir una mayor flexibilidad en la temperatura de reacción ya que no está restringido por el punto de ebullición y la volatilidad de los solventes, la reducción del tiempo de la reacción y el mejoramiento del rendimiento (Zhuang et al., 2017).

II.5.2 Actividad antibacteriana de las chalconas

Se ha reportado en la literatura la actividad antimicrobiana de las chalconas, debido a la existencia de una función cetona α,β -insaturada reactiva en las chalconas que reacciona con grupos nucleófilos de proteínas esenciales. Se pueden hacer modificaciones dependiendo del tipo y la posición de los sustituyentes presentes en los anillos aromáticos (Cadena-Cruz, 2018).

II.5.2.1 Actividad antibacteriana de las chalconas fluoradas

El flúor ha llegado a ser una herramienta importante en los medicamentos, ya que la incorporación de un átomo de flúor o un grupo fluorado en los medicamentos

permite la modulación simultánea de parámetros electrónicos, lipofílicos y estéricos que influyen tanto en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (Reddy et al., 2015).

Considerando lo anterior, una nueva serie de híbridos fluorados de chalcona-1,2,3-triazol fueron evaluados *in vitro* contra *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Yadav et al., 2018). El compuesto con un grupo 4-nitro mostró una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.0032 $\mu\text{mol/mL}$ contra *E. coli* y *S. epidermis*, el cual fue mejor que el antibiótico estándar, ciprofloxacina (MIC: 0.0047 $\mu\text{mol/mL}$). La relación estructura-actividad (SAR) mostró que la actividad antibacteriana fue influenciada por los triazoles fluorados dando mejores resultados que los compuestos no fluorados (Purser et al., 2008).

II.5.2.2 Actividad antibacteriana de chalconas cloradas

La relación estructura-actividad del 2-((5E)-5-(4-((E)-3-(2,4-diclorofenil)-3-oxoprop-1-enil) bencilideno)-4-oxo-2-thioxothiazolidina-3-il) híbrido de ácido acético tiene una actividad antibacteriana más potente contra *S. aureus* con un valor MIC de 2 $\mu\text{mol/mL}$, el cual es mejor que el antibiótico estándar (norfloxacina). Esto se debe a la introducción de dos grupos de cloro en la posición 2 y 4 del anillo fenilo, permitiendo la actividad antibacteriana (Xu et al., 2019).

Del mismo modo, las chalconas β -cloro vinil son sensibles contra *E.coli* (NCIM 2065), *S. aureus* (NCIM 2120) y *Klebsiella pneumoniae* (NCIM 5082) (Bandgar et al., 2010). Por otro lado, con el fin de reducir la toxicidad e incrementar la actividad antibacteriana se han sintetizado chalconas β -clorovinil y evaluado contra *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *B. subtilis* usando el método de difusión en agar, los cuales mostraron un rango de MIC entre 10-18 $\mu\text{g/mL}$ (Falrbrother & Martyn, 1951; Gould & Bowie, 1952).

II.5.2.3 Actividad antibacteriana de derivados de ferroceno-chalconas

En las últimas décadas la química organometálica ha crecido debido a las amplias aplicaciones biológicas y médicas. Estas aplicaciones llevaron a la creación de la química bioorganometálica (Xu et al., 2019).

El ferroceno es usado en la química bioorganometálica debido a su estabilidad, actividad biológica y su aplicación en la preparación de nuevos compuestos. Además, muchos compuestos ferroceno muestran actividades antibacterianas (Kazemizadeha et al., 2016), antifúngicas (Dou et al., 2008), antimalaria (Itoh et al., 2000), antitumoral (Hafez et al., 2013), antioxidante (Hussain et al., 2013) y citotóxica (Hassan et al., 2015).

Compuestos de chalconas a base de ferroceno unidos a organosilatrano y a triazol han mostrado actividad antimicrobiana contra *E. coli* (MIC: 125 μ M) y *Enterococcus faecalis* (MIC: 125 μ M) (Singha et al., 2019). La relación actividad-estructura indica que las modificaciones estructurales como la introducción de nuevos sustituyentes en la chalcona o en el anillo de ferroceno pueden mejorar altamente la actividad antibacteriana (Xu et al., 2019). Otros autores como Muškinja et al. desarrollaron ferrocenil chalconas con análogos de vainillinas O-alquiladas, las cuales mostraron actividad contra *E. coli* (ATCC 25922) con un MIC de 1.25 mg/mL (Muškinja et al., 2016).

II.6 Métodos de evaluación de la capacidad antimicrobiana

Los métodos más comúnmente utilizados por su sencillez y rapidez son la técnica de difusión por discos en agar, la cual es utilizada para generar datos cualitativos, y los métodos de dilución en medio líquido y en agar para conocer los datos cuantitativos (Hammer et al., 1999).

II.6.1 Métodos en Agar

Entre los métodos mayormente empleados por su facilidad y rapidez en la lectura de los resultados es el método de difusión por discos basados en la metodología descrita por Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). El principio del método consiste en la aplicación de una cantidad determinada de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato, generalmente discos de papel, en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo de interés. Se formará así, por difusión un gradiente de concentración del antimicrobiano alrededor del disco y la

sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Shiva-Ramayoni, 2007).

El diámetro obtenido no solo depende de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, del pH y la composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del antimicrobiano en el medio empleado, de la temperatura, la atmósfera de incubación, la velocidad de duplicación bacteriana y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria (INPPAZ, 2000).

Para la evaluación de antibióticos el medio más empleado es el agar Mueller Hinton, pero también se han utilizado el agar Triptona Soja, agar Nutritivo y el agar Infusión Cerebro Corazón (Calvo et al., 2006).

Otro método de evaluación en agar es la dilución en agar, la cual consiste en la incorporación del antibiótico a un medio con agar cuando este último aún está líquido. Con el fin de lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración del antibiótico. Las placas se inoculan con un replicador una vez que el agar se haya solidificado (Hammer et al., 1999). Los medios de cultivo más utilizados son el agar Muller Hinton, TSA, agar nutritivo y el agar BH (Shiva-Ramayoni, 2007).

Los resultados de las pruebas de dilución en agar se expresan como Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) (Shiva-Ramayoni, 2007).

II.6.2 Métodos en medio de cultivo líquido

Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico a evaluar, que se encuentra diluido en el medio de cultivo líquido (Shiva-Ramayoni, 2007).

Las determinaciones se pueden realizar en baterías de tubos con caldos de cultivo (macrodilución). Sin embargo, esta metodología es muy pesada por la cantidad de material a utilizar (Shiva-Ramayoni, 2007). Por lo que la técnica de microdilución es una alternativa más viable para desarrollar. Esta técnica se basa en la actividad inhibitoria y se realiza en una placa de poliestireno de 96 pocillos. Una placa puede

contener de 6 a 7 diluciones de 12 diferentes agentes antibacterianos, usando un pocillo como control positivo (caldo + inóculo) y otro como control negativo (solo caldo). La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1 ml en cada pocillo (Llamas-García, 2018), en el cual el inóculo no debe sobrepasar el 10% del volumen final.

El medio de cultivo estándar utilizado para la evaluación de antibióticos por el método de dilución en caldo es el caldo Mueller Hinton, aunque también se puede utilizar caldo nutritivo, caldo Triptona Soja y caldo LB (Shiva-Ramayoni, 2007).

III. Antecedentes específicos

Las enfermedades transmitidas por alimentos, como se mencionó anteriormente, son un problema de importancia global debido al impacto que tienen en la salud pública, así como en la economía por la consecuente pérdida de productividad, el costo de los tratamientos médicos y sanciones comerciales. Estas enfermedades son causadas por microorganismos, de los cuales los tres más importantes son *Salmonella* no tifoidea, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* enteropatógena (Fegan & Jenson, 2018). Estos patógenos pueden estar presentes en diversos alimentos a causa de la contaminación cruzada, sin embargo, una de las áreas más afectadas es la industria de los cárnicos dado el rol que presentan en la salud en los humanos y la seguridad microbiológica (Fegan & Jenson, 2018).

Después de la matanza de los animales, en las líneas de producción, la carne está expuesta a condiciones ambientales, equipos y herramientas que facilitan la contaminación cruzada con microorganismos patógenos, los cuales son potenciales vectores de enfermedades en productos cárnicos (Papuc et al., 2017). Además, las operaciones realizadas durante la manipulación en la producción de estos alimentos afectan la calidad microbiológica y la vida útil de la carne (Voloski et al., 2016).

Los productos cárnicos; debido a su alta actividad de agua, alto contenido de nutrientes y un pH=5.5-6.5; forman un buen ambiente para el crecimiento de microorganismos, especialmente bacterias (Efenberger-Szmechtyk et al., 2020). Las principales bacterias que causan la descomposición de la carne son *Brochothrix*

thermosphacta, *Carnobacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudomonas* spp. y *Shewanella putrefaciens* (Borch et al., 1996). Por otro lado; *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni* son los principales patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos en cárnicos (Barbosa et al., 2009).

La descomposición de productos cárnicos y las enfermedades transmitidas por alimentos causan serias pérdidas económicas, por lo que el control del desarrollo de bacterias en las cadenas de producción es importante. La solución más empleada para este problema es el uso de agentes antimicrobianos, los cuales pueden ser sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas que matan o retrasan el crecimiento de microorganismos en diferentes tipos de carnes (Papuc et al., 2017).

Actualmente, los conservadores químicos son los más ampliamente utilizados en la industria de los cárnicos, siendo el nitrato de potasio y el nitrato de sodio los más empleados. No obstante, existen una gran variedad de éstos, que incluyen el ácido acético, acetato de potasio, acetato de sodio, acetato de calcio, sorbatos, benzoatos, p-hidroxibenzoatos, natamicina y ácido láctico (Efenberger-Szmechtyk et al., 2020).

Por otro lado, los antimicrobianos naturales pueden ser de origen animal como la lactoferrina, defensinas o el quitosano; de origen microbiano como la reuterina, pediocina o la nisina; y de origen vegetal como ciertos aceites esenciales, jugos fermentados ricos en nitritos o polifenoles (Sultanbawa 2011). Estos últimos, grupo en donde se encuentran las chalconas, han demostrado tener gran potencial antibacteriana en estudios *in vitro* contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Papuc et al., 2017). Sin embargo, aún no existen estudios que evalúen su actividad antimicrobiana en productos cárnicos.

A pesar de esto, se han realizado estudios con diversos polifenoles o extractos ricos en polifenoles en los últimos años, en donde se evalúa su capacidad antimicrobiana en productos cárnicos (tabla 2).

Tabla 2. Polifenoles como antimicrobianos en productos cárnicos

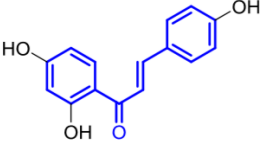
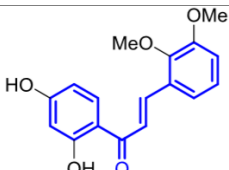
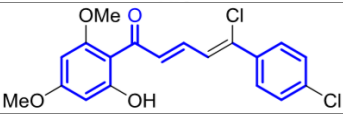
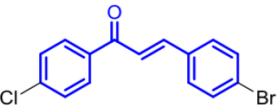
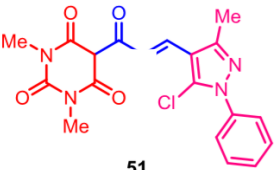
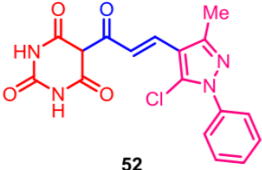
Polifenoles/ Extracto rico en polifenoles	Sistema de modelo cárnico	Actividad antimicrobiana	Referencia
Ácido tánico	Carne molida almacenada por 15 días a 4°C en empaque atmosférico modificado	Efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias psicrófilas	Maqsood & Benjakul (2010)
Extracto de polifenoles de vegetales que se consumen en el este de Asia	Empanadas de carne crudas almacenadas por 12 días a 4°C	Disminución del número de microorganismos	Kim SJ et al. (2013)
Extracto etanólico de Ziziphus	Salchichas de carne crudas almacenadas en fría	Inhibió el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus faecalis</i>	Abdulla et al. (2016)
Extracto de hojas de <i>Rumex tingitanus</i>	Carne de res picada	La fracción de acetato de etilo erradica la población de <i>Listeria monocytogenes</i>	Mhalla et al. (2017)
Extracto etanólico de canela	Carne de cerdo cruda almacenada aeróbicamente por 9 días a 20°C	Actividad antibacteriana contra <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>S. aureus</i>	Shan et al. (2009)
Extracto etanol/agua de <i>Myrtus communis</i>	Carne molida almacenada por 5 días a 4°C	Disminución de <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , bacterias ácido-lácticas y <i>Enterobacteriaceae</i>	Casaburi et al. (2015)

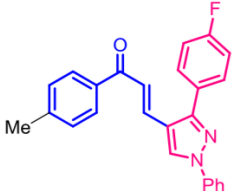
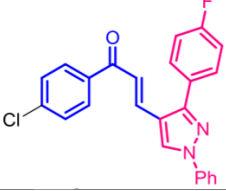
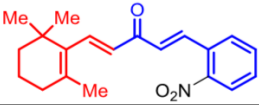

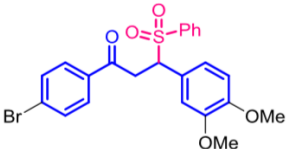
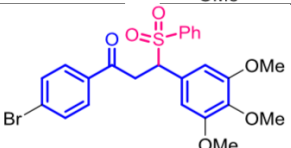
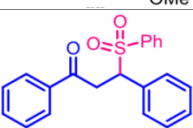
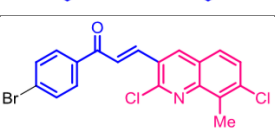
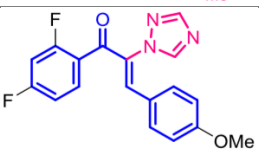
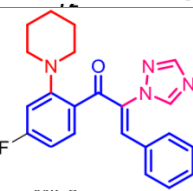
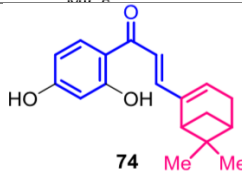
Extracto de té verde y semillas de uva	Tocino seco empacado al vacío y almacenado por 3 semanas a 4°C	Disminución de <i>Enterobacteriaceae</i> y recuento viable total	Wang et al. (2015)
--	--	--	--------------------

Fuente: Modificado de Papuc et al. (2017) y Efenberger-Szmechtyk et al. (2020)

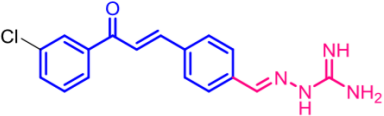
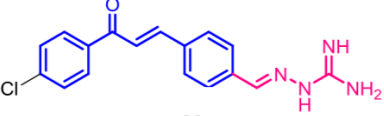
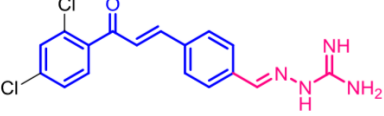
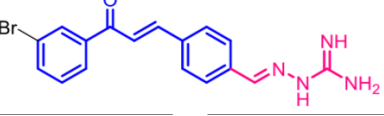
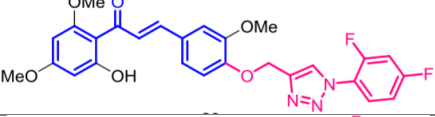
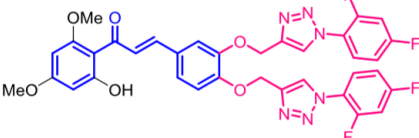
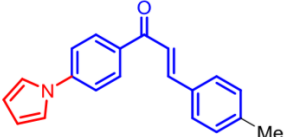
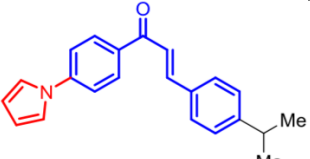
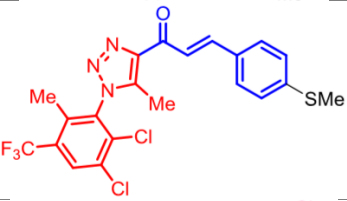
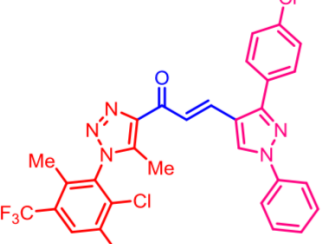
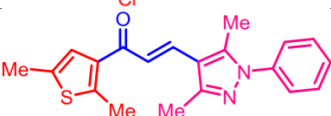
Aun cuando no existen estudios que evalúen el potencial antimicrobiano de las chalconas en productos cárnicos, estas sustancias han presentado actividad antibacteriana contra diversos microorganismos, incluyendo a *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* de manera *in vitro* (tabla 3). Por lo que en los últimos años ha aumentado su investigación, con el fin de generar una vía alterna con respecto a los antibióticos tradicionales que últimamente han perdido su eficacia debido al creciente número de bacterias resistentes.

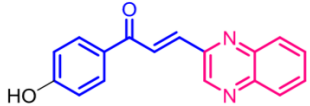
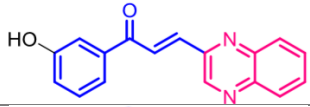
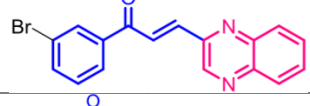
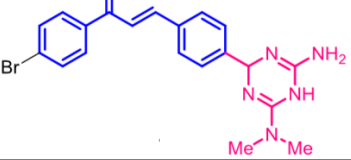
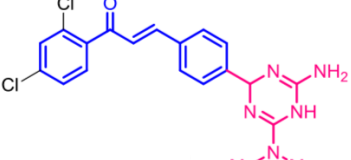
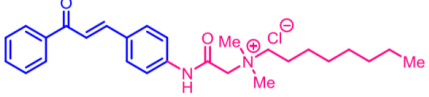
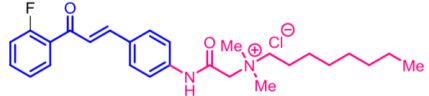
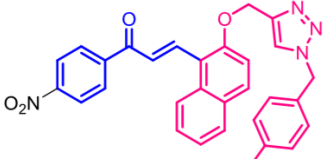
Tabla 3. Actividad antibacteriana de diferentes chalconas evaluadas contra cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*

Chalcona	Naturaleza	CMI*/ Microorganismo
	Natural	31.3 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Natural	62.5 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética simple	50 mg/mL contra <i>E.coli</i>
	Sintética simple	1000 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	25 µg/mL contra <i>E. coli</i> ATCC 25922
	Sintética híbrida	12.5 µg/mL contra <i>E. coli</i> ATCC 25922

	Sintética híbrida	12.5 µg/mL contra <i>E. coli</i> MTCC 443
	Sintética híbrida	6.25 µg/mL contra <i>E. coli</i> MTCC 443
	Sintética híbrida	12.5 µg/mL contra <i>E. coli</i> MTCC 82
	Sintética híbrida	1.56 µg/mL contra <i>E. coli</i> MTCC 82
	Sintética híbrida	1.95 µg/mL contra <i>S. typhimurium</i>
	Sintética híbrida	1.95 µg/mL contra <i>S. typhimurium</i>
	Sintética híbrida	1.95 µg/mL contra <i>S. typhimurium</i>
	Sintética híbrida	125 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	16 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	16 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	1.56 µg/mL contra <i>E. coli</i>

74 Me Me

	Sintética híbrida	4 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1924 8 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1356 2 µg/mL contra <i>S. typhimurium</i> 1926
	Sintética híbrida	2 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1924 8 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1356 4 µg/mL contra <i>S. typhimurium</i> 1926
	Sintética híbrida	2 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1924 8 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1356 1 µg/mL contra <i>S. typhimurium</i> 1926
	Sintética híbrida	2 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1924 8 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1356 1 µg/mL contra <i>S. typhimurium</i> 1926
	Sintética híbrida	6.25 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	6.25 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	12.5 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	12.5 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	3.12 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	3.12 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	16 µg/mL contra <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>

	Sintética híbrida	5 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	5 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	5 µg/mL contra <i>E. coli</i>
	Sintética híbrida	16 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1924
	Sintética híbrida	8 µg/mL contra <i>E. coli</i> 1924
	Sintética híbrida	2 µg/mL <i>E. coli</i> ATCC 25922 4 µg/mL contra <i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076
	Sintética híbrida	2 µg/mL <i>E. coli</i> ATCC 25922 4 µg/mL contra <i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076
	Sintética híbrida	3.2 µM contra <i>E. coli</i>

Fuente: Modificado de Dan & Dai (2020), *CMI=Concentración Mínima Inhibitoria.

Aunque aún no se conocen con profundidad todos los mecanismos por los cuales las chalconas ejercen su actividad antibacteriana, se han elucidado algunos como son (Dan & Dai, 2020):

- Actividad inhibitoria de las bombas de eflujo
- Inhibición de la vía biosintética de los ácidos grasos tipo II, actuando sobre enzimas como la enoil-ACP reductasa (Desai et al., 2017)
- Interferencia de la replicación del ADN, actuando sobre la enzima ADN girasa (Abdullah et al., 2014; Yadav et al., 2018) y la ADN topoisomerasa IV (Feng et al., 2014), así como agente intercalante del ADN (Yin et al., 2014)

- Actividad inhibitoria de la proteína filamentosa sensible a temperatura Z (FtsZ), la cual tiene un importante rol en la división celular (Li et al., 2015)
- Actividad inhibitoria de las proteínas tirosina fosfatasas, como la tirosina fosfatasa A (Mascarello et al., 2010) y B (Chiaradia et al., 2012)
- Inhibición de factores de virulencia como las proteínas externas de *Yersenia* (Martins et al., 2013) y la fosfoetanolamina transferasa, la cual está presente en diversos patógenos como *E. coli* (Ayman et al., 2019)
- Alteración de la membrana celular bacteriana (Sivakumar et al., 2009)

IV. Planteamiento del problema

Las enfermedades infecciosas aún siguen siendo una de las causas más importantes de muerte en el mundo (Lozano et al., 2012), a pesar de que han disminuido desde el siglo XIX (Alós, 2015). Sin embargo, en los últimos años la resistencia a los antibióticos ha aumentado en todo el mundo a niveles peligrosos. Actualmente, es común que nuevos mecanismos de resistencia surjan y que un creciente número de infecciones como las enfermedades de transmisión alimentaria sean cada vez más difíciles de tratar a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia (OMS, 2018).

Específicamente, los alimentos insalubres causan 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y 420,000 muertes anualmente, donde el 30% de estas muertes corresponden a niños menores de 5 años (OMS, 2015); siendo la industria de los cárnicos una de las áreas más afectadas dado al rol que presentan en la salud en los humanos y la seguridad microbiológica (Fegan & Jenson, 2018). Además, en países en vías de desarrollo, las enfermedades transmitidas por alimentos generan una pérdida de productividad que asciende a los 95.2 mil millones de dólares por año, así como un costo anual del tratamiento de 15 mil millones de dólares (Banco Mundial, 2018).

Concretamente en México, las enfermedades diarreicas son la segunda causa de morbilidad en niños menores de cinco años y presentan una tasa de mortalidad en menores de un año de 27.78 y en niños de uno a cuatro años de 3.47 por cada 100,000 niños. Además, cada año se presentaron alrededor de 5 millones de casos de enfermedades diarreicas agudas causadas por ETA (Jiménez-Corona, 2018), siendo *Escherichia coli* patogénico el agente causal más frecuente con un 30.9% y *Salmonella enterica* con un 11.4% (Ríos-Muñiz et al., 2019).

De acuerdo con Hugo Fragoso-Sánchez, director general de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera en Senasica, en México mueren 16,000 personas cada año por ETA y el impacto económico por no contar con las medidas adecuadas para mitigar los riesgos de inocuidad se estima en 1,100 millones de dólares en el mercado mexicano (Celis, 2017).

Por estos motivos, es de suma importancia que se tomen medidas urgentes y contar con alternativas para aumentar la inocuidad en la industria de alimentos, y así evitar que infecciones comunes vuelvan a ser potencialmente mortales.

V. Justificación

El aumento de la resistencia a los antibióticos debido a diversos factores ha alentado la búsqueda de nuevos compuestos que sean eficaces contra patógenos resistentes a múltiples agentes antimicrobianos. Por lo que hay una necesidad urgente en el desarrollo de nuevos antibióticos que sean capaces de combatir dichas infecciones, de bajo costo y más eficaces.

Debido a que este problema es de índole internacional, se tiene especial interés en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, principales patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos en cárnicos, ya que en las últimas décadas se han presentado cepas multirresistentes a antibióticos que son casi imposibles de combatir; lo que genera un aumento en la mortalidad y morbilidad, así como en los costos totales tanto en la industria de alimentos como en el tratamiento terapéutico.

En este contexto, las chalconas han mostrado tener una gran variedad de propiedades farmacológicas, particularmente actividades antibacterianas con mayor eficacia que los agentes antimicrobianos tradicionales, y sus derivados poseen un alto grado de diversidad estructural, siendo útiles para el descubrimiento de nuevas opciones.

Finalmente, este proyecto puede ser considerado como innovador debido a que hasta la actualidad no se han publicado estudios que evalúen el potencial antibacteriano de ferrochalconas sintéticas contra diferentes cepas de *E. coli* y *S. typhimurium* de interés alimentario.

VI. Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de cuatro ferrochalconas sintéticas en cepas de microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli* O26, *E. coli* O103, *E. coli* O111, *E. coli* O121 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

VII. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antimicrobiana de las cuatro ferrochalconas en *E. coli* O26
2. Determinar la actividad antimicrobiana de las cuatro ferrochalconas en *E. coli* O103
3. Determinar la actividad antimicrobiana de las cuatro ferrochalconas en *E. coli* O111
4. Determinar la actividad antimicrobiana de las cuatro ferrochalconas en *E. coli* O121
5. Determinar la actividad antimicrobiana de las cuatro ferrochalconas en *S. typhimurium* ATCC 14028

VIII. Hipótesis

1. Las ferrochalconas evaluadas en este estudio (F01, F02, F03 y F04) tendrán efecto antibacteriano contra las cepas de *E. coli* O26, O103, O111, O121
2. Las ferrochalconas evaluadas en este estudio (F01, F02, F03 y F04) no tendrán efecto antibacteriano contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

IX. Metodología

A continuación, se presenta el diagrama general de trabajo.

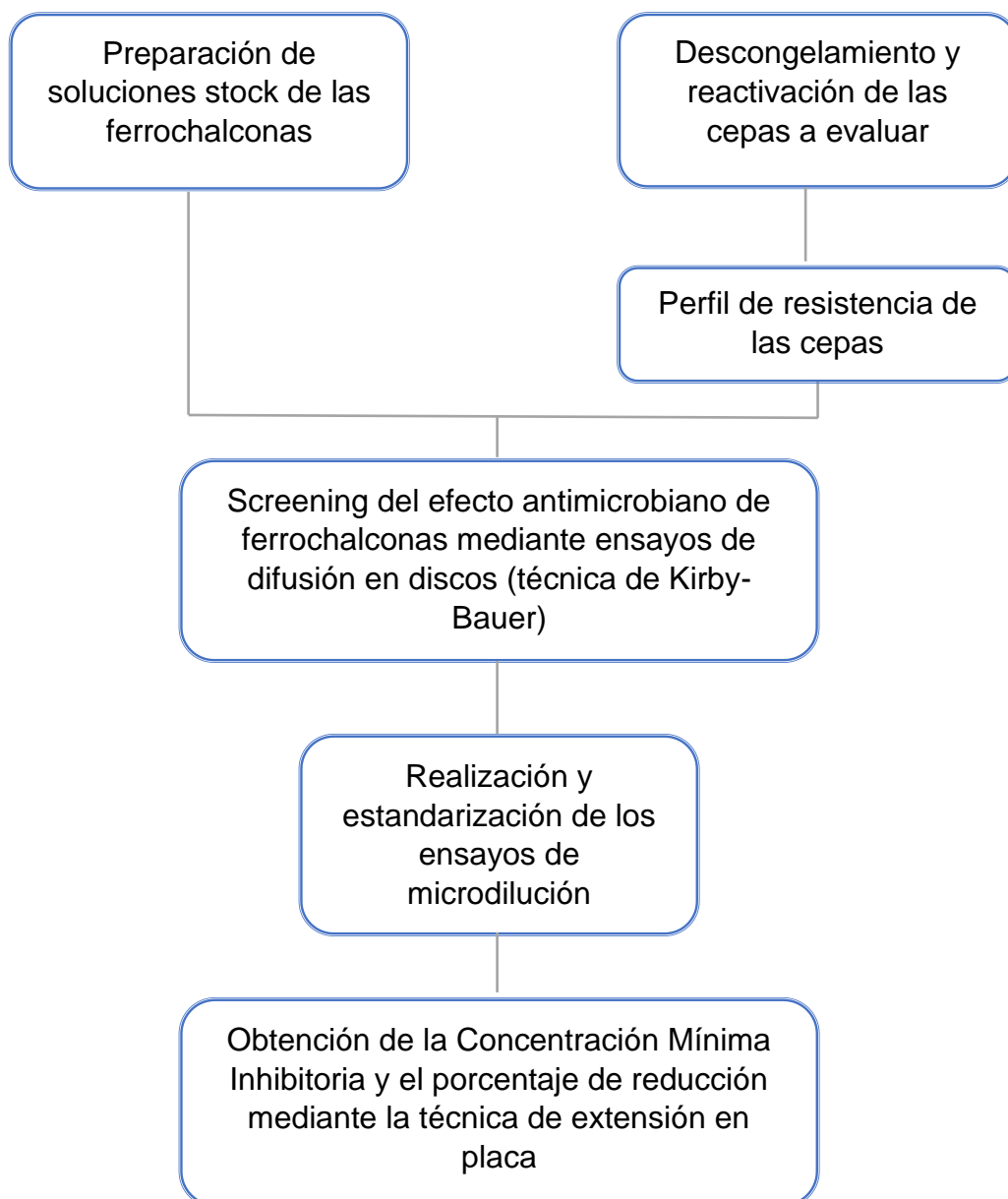


Diagrama 1. Diagrama general de trabajo

IX.1 Preparación de las soluciones stock de las ferrochalconas

Las ferrochalconas F01, F02, F03 y F04 fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología Microbiana BUAP-CA-244 del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP.

Las soluciones de las ferrochalconas para los ensayos se prepararon de la siguiente manera:

- 1) Para el ensayo de difusión en discos (técnica de Kirby-Bauer): se preparó una solución stock de cada ferrochalcona, en la cual se diluyó 1 mg de la ferrochalcona en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de estos stocks se realizaron cuatro soluciones a diferente concentración, siendo las siguientes:
 - 100 µg/mL (1 µL stock + 999 µL dH₂O)
 - 200 µg/mL (2 µL stock + 998 µL dH₂O)
 - 400 µg/mL (4 µL stock + 996 µL dH₂O)
 - 800 µg/mL (8 µL stock + 992 µL dH₂O)

- 2) Para el ensayo de microdilución: se preparó una solución stock de cada ferrochalcona, en la cual se diluyeron 10 mg de la ferrochalcona en 1 mL de DMSO, para obtener una concentración de 10 mg/mL.

IX.2 Descongelamiento y reactivación de las cepas a evaluar

Las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos fueron obtenidas del cepario del laboratorio de Patogenicidad Microbiana BUAP-CA-309 del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP, las cuales son:

- 1) *Escherichia coli* O26
- 2) *Escherichia coli* O103
- 3) *Escherichia coli* O111
- 4) *Escherichia coli* O121
- 5) *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Estas cepas se mantienen congeladas a -70°C y conservadas en caldo LB con glicerol al 30%. En el caso de las cepas de *E. coli*, éstas se resembraron en agar Mac Conkey por estría cruzada y se incubaron a 37 °C por 18-24 h. Por otro lado, *S. typhimurium* se resembró en agar TSA por estría cruzada y se incubaron a 37°C

por 18-24 h. Posteriormente, se corroboró la pureza de las cepas y se resguardaron en refrigeración.

IX.3 Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*

Para conocer si las cepas evaluadas en el proyecto eran resistentes a antibióticos, se sembraron en medio LB con el antimicrobiano y se incubaron a 37°C por 18-24 h. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

- Ampicilina (Ap): 200 µg/ml
- Tetraciclina (Tet): 25 µg/ml
- Cloranfenicol (Cm): 30 µg/ml
- Kanamicina (Km): 50 µg/ml
- Ácido nalidíxico (Nal): 25 µg/ml

IX.4 Efecto inhibitorio de ferrochalconas por ensayo de difusión en disco (técnica de Kirby-Bauer)

Para la realización de los antibiogramas se seleccionó una colonia de la respectiva cepa, la cual estaba previamente aislada y se resembró en caldo Mueller-Hinton o LB, de 18-24 h a 37°C y 150 rpm. Pasado el tiempo, se tomaron 100 µL del caldo y se volvieron a inocular en caldo Mueller-Hinton o LB hasta obtener una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de McFarland, lo cual corresponde aproximadamente a 10⁸ microorganismos viables por mL, a 37°C y 150 rpm.

Posteriormente, con un hisopo estéril se tomó una muestra de cada cepa y se resembraron masivamente en cuatro direcciones cada 45° en agar Mueller-Hinton o TSA y se dejaron secar. En seguida, se colocaron los discos, cada uno con 10 µL de las respectivas concentraciones de las ferrochalconas, así como el control positivo (solución stock de cada ferrochalcona) y el control negativo (DMSO 1%), sobre el agar y se incubaron a 37°C por 18-24h; como se muestra en la figura 3.

Finalmente, se midió el diámetro del halo de inhibición de cada una de las cepas con cada concentración de ferrochalcona, así como de los controles positivos y negativos. Cada ensayo se realizó por duplicado.

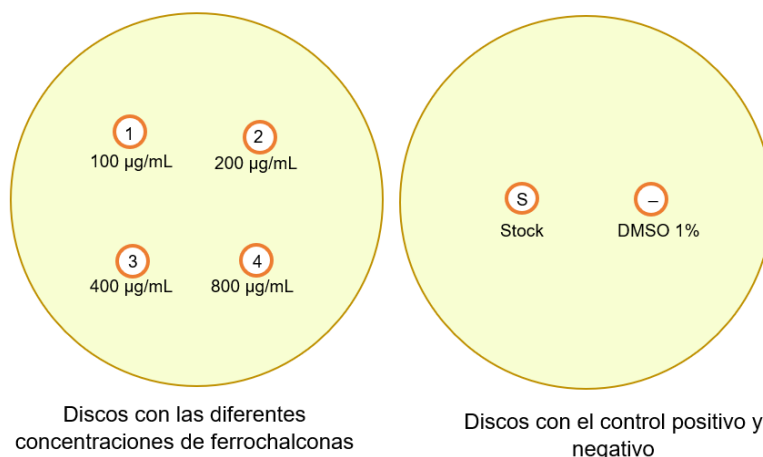


Figura 3. Esquema del ensayo de difusión en disco (técnica de Kirby-Bauer) donde se muestra la posición de cada disco con su respectiva concentración de ferrochalcona, y los controles positivo y negativo.

IX.5 Ensayo de microdilución

Para el ensayo de microdilución, se inocularon las respectivas cepas en caldo Mueller-Hinton para *E. coli* y en caldo LB para *S. typhimurium*, y se incubaron a 37°C, 150 rpm por 18-24 h. Pasado el tiempo, se tomaron 100 µL del caldo y se volvieron a inocular en caldo Mueller-Hinton o LB por aproximadamente 1-1.5 h, hasta alcanzar una $OD_{600}=0.16$, para tener aproximadamente 4×10^6 UFC/mL de cada cepa.

Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, las cepas se mantuvieron en frío y se procedió a inocular los pocillos de la placa ELISA, con las siguientes soluciones y en el siguiente orden (figura 5 y figura 12-anexo 1):

- 1) Pocillos que contienen las ferrochalconas: para evaluar la actividad antimicrobiana de cada ferrochalcona se inocularon 4 µL y 8 µL de las soluciones stock de las ferrochalconas (10 mg/mL) en diferentes pocillos, los cuales contenían 100 µL de caldo LB, para obtener una concentración final de 400 µg/mL y 800 µg/mL, respectivamente. Además, se inocularon 10 µL de cada cepa en su respectivo pocillo.
- 2) Pocillos del cultivo basal: para obtener el recuento bacteriano basal de cada cepa, se inocularon 10 µL de éstas en un pocillo que contenía 100 µL de

medio LB con DMSO al 1%. Del mismo modo, estos pocillos se emplearon como control negativo.

- 3) Pocillos para el control de contaminación: con el fin asegurarse de que el medio LB y la soluciones de ferrochalconas no estuvieran contaminadas, se agregó a un pocillo medio LB con la respectiva ferrochalcona y las diferentes concentraciones, sin inóculo de las cepas a evaluar.
- 4) Pocillos del control positivo: a estos pocillos se les agregó 100 μ L medio LB con un antibiótico seleccionado dependiendo la cepa a evaluar, así como 10 μ L de la respectiva cepa. Los antibióticos usados fueron ampicilina, ácido nalidíxico, kanamicina y tetraciclina.
- 5) Pocillos sin DMSO: con el fin de conocer si el DMSO tenía algún efecto sobre el crecimiento de las cepas, se agregaron pocillos que contenían 100 μ L de medio LB y 10 μ L de la respectiva cepa.

Una vez que se terminó de inocular la placa ELISA, ésta se incubó a 37°C por 18-24 h. Cada ensayo se realizó por triplicado en dos tiempos diferentes.

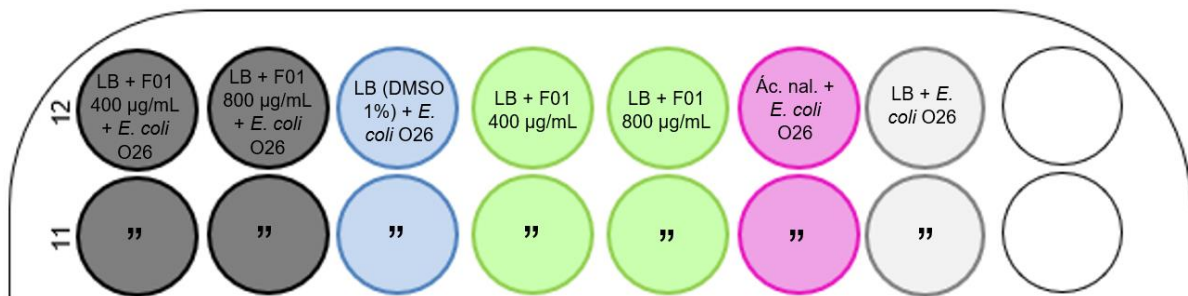


Figura 4. Ejemplo a detalle de un ensayo de microdilución donde se muestra un ensayo con *E. coli* O26 y la ferrochalcona F01. Las comillas representan el ensayo duplicado.

IX.6 Obtención del porcentaje de reducción mediante la técnica de extensión en placa

Para realizar la técnica de extensión en placa, primero se hicieron diluciones seriadas en buffer de sales de fosfato (PBS). Para los cultivos que se retaron con la ferrochalcona y el antibiótico que sirvió como control de reducción bacteriana seleccionado, se realizaron diluciones hasta 10^{-3} . Y se inocularon 100 μ L de las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} en agar TSA por triplicado.

Por otro lado, para el cultivo basal, el control de contaminación y el pocillo sin DMSO, se realizaron diluciones hasta 10^{-5} . Y se inocularon 100 μL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} en agar TSA por triplicado.

Una vez inoculadas las placas, se realizó la extensión en placa con un asa de vidrio previamente esterilizada hasta que estuvieron completamente secas. Y se incubaron a 37°C por 18-24 h.

Posteriormente, se realizó el conteo de las colonias de cada placa y se obtuvo el promedio de los datos que provinieron del mismo ensayo. En dado caso de que las placas no fueran contables se hizo una dilución más. Cada ensayo se hizo por triplicado.

Finalmente, con los datos obtenidos, se obtuvo el porcentaje de reducción de cada ferrochalcona con la respectiva cepa evaluada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción} = 100 - \frac{\varphi_{\text{sobrevivientes}} \times 100}{C_{vi}}$$

Donde $\varphi_{\text{sobrevivientes}}$ son el número de colonias del cultivo de las cepas con las ferrochalconas y C_{vi} son el número de colonias del cultivo basal.

XI.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el recuento microbiano de los ensayos de microdilución fueron convertidos en términos logarítmicos y analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un post hoc de Tukey con $p < 0.05$, por medio del programa IBM SPSS Statistics 25 de IBM Corporation.

Además, se obtuvieron los índices de crecimiento de los recuentos microbianos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de crecimiento} = \frac{\log(\varphi_{\text{sobrevivientes}})}{\log(C_{vi})}$$

Donde $\varphi_{\text{sobrevivientes}}$ son el número de colonias del cultivo de las cepas con las ferrochalconas y C_{vi} son el número de colonias del cultivo basal. Y del mismo modo, se realizó un ANOVA con un post hoc de Tukey con $p < 0.05$.

X. Resultados

X.1 Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*

Las cepas evaluadas contra los antibióticos seleccionados mostraron ser resistentes; interesantemente *E. coli* O26 y *E. coli* O103 presentaron multirresistencia a 4 antimicrobianos, mientras que *E. coli* O111 y *E. coli* O121 solo indicaron ser resistentes a un antibiótico. Por otro lado, *S. typhimurium* ATCC 14028 fue sensible a todos los antimicrobianos (tabla 4). Los perfiles de resistencia se muestran a continuación:

- 1) *Escherichia coli* O26 (EPEC): [Ap^R, Tet^R, Cm^R, Km^R]
- 2) *Escherichia coli* O103 (STEC/EHEC): [Ap^R, Tet^R, Cm^R, NaI^R]
- 3) *Escherichia coli* O111 (STEC/EHEC): [Tet^R]
- 4) *Escherichia coli* O121 (STEC/EHEC): [Ap^R]
- 5) *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Tabla 4. Perfil de crecimiento de cepas bacterianas en presencia de antibióticos

CEPAS	Ampicilina (200 µg/ml)	Tetraciclina (25 µg/ml)	Cloranfenicol (30 µg/ml)	Kanamicina (50 µg/ml)	Ácido nalidíxico (25 µg/ml)
<i>E. coli</i> O26	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i> O103	+	+	+	-	+
<i>E. coli</i> O111	-	+	-	-	-
<i>E. coli</i> O121	+	-	-	-	-
ATCC 14028*	-	-	-	-	-

Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas evaluadas en el estudio. El signo + indica que hubo crecimiento de la cepa y por lo tanto es resistente, el signo - indica que no hubo crecimiento de la cepa y por lo tanto es sensible. **S. typhimurium* ATCC 14028. Fuente: Elaboración propia

X.2 Efecto inhibitorio de ferrochalconas por ensayo de difusión en disco (técnica de Kirby-Bauer)

Como un primer acercamiento para analizar el efecto inhibitorio de las ferrochalconas sobre diferentes cepas bacterianas, se realizó un screening mediante la difusión en discos (técnica de Kirby-Bauer). En general, el efecto inhibitorio no fue muy evidente, ya que en la mayoría de los casos, con la ferrochalcona F03 y F04, solo se observó un halo de inhibición en promedio de 7.5

mm en las concentraciones mayores de las ferrochalconas (400 µg/ml, 800 µg/ml y el stock (control positivo)).

Del mismo modo, este ensayo no mostró efecto antibacteriano contras las cepas *E. coli* O103 y *S. typhimurium* ATCC 14028. Y la cepa que mostró más susceptibilidad fue *E. coli* O26.

Sin embargo, con ayuda de estos resultados se logró establecer las concentraciones de las ferrochalconas con las que se iba a evaluar su capacidad antibacteriana mediante el ensayo de microdilución, las cuales fueron a 400 µg/ml y 800 µg/ml, puesto que fueron las que mostraron mayor inhibición.

A continuación, se muestran los resultados a detalle de cada ferrochalcona evaluada contra las cepas utilizadas en el presente estudio:

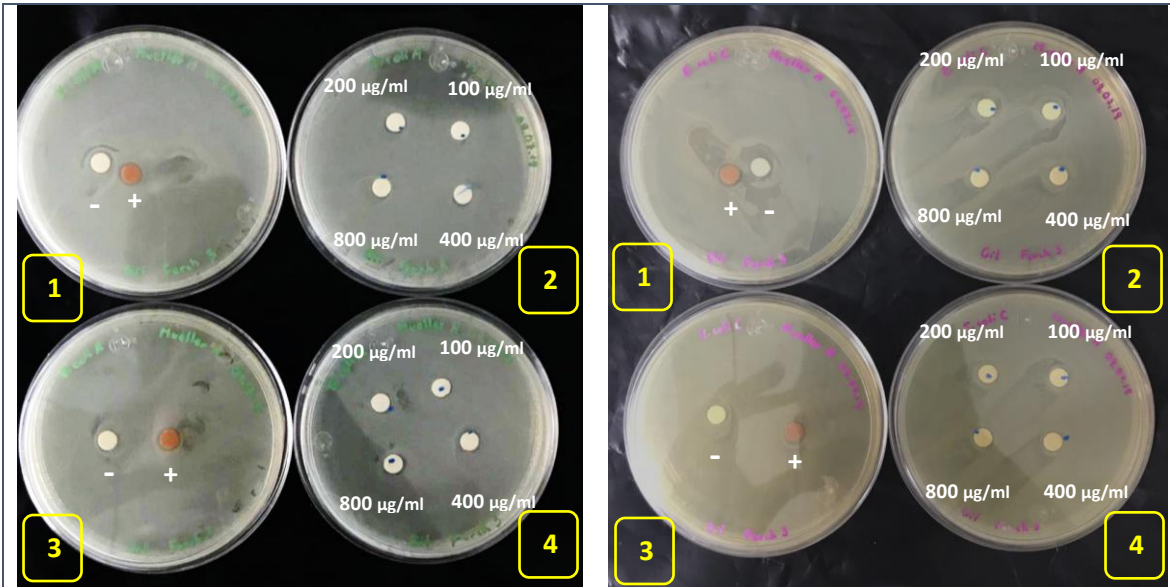
- a) Ferrochalcona F01: el screening de esta ferrochalcona no mostró ningún efecto antibacteriano contra ninguna de las cepas evaluadas (figura 14-anexo 3).
- b) Ferrochalcona F02: el screening de esta ferrochalcona tampoco mostró tener efecto antibacteriano contra ninguna de las cepas evaluadas (figura 15-anexo 4).
- c) Ferrochalcona F03: el screening de esta ferrochalcona mostró un halo de inhibición promedio de 7 a 8 mm en las cepas de *E. coli* O26 y *E. coli* O111 principalmente en las concentraciones de 400 µg/ml y 800 µg/ml; así como en el stock (control positivo). En *E. coli* O121 se muestra únicamente un halo de inhibición promedio de 4 mm en la concentración de 100 µg/ml (tabla 5, figura 5).

Tabla 5. Resultados de los antibiogramas de la ferrochalcona F03

Ferrochalcona F03 Concentración (µg/mL)	Cepa / Promedio del diámetro de halo de inhibición (mm)		
	<i>E. coli</i> O26	<i>E. coli</i> O111	<i>E. coli</i> O121
100	-	-	4
200	3.5	-	-
400	8	7	-
800	7.5	7.5	-

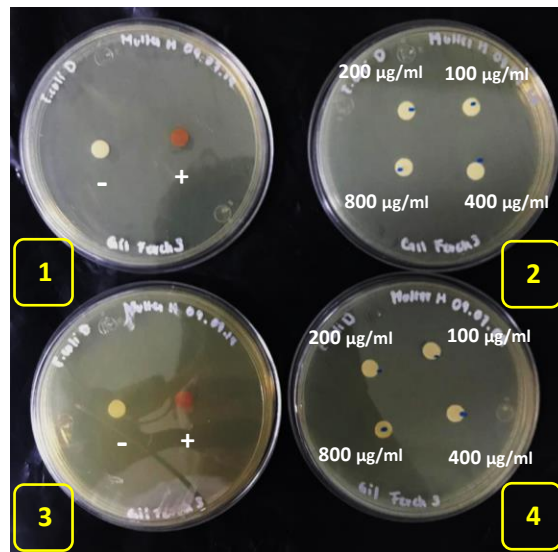
Stock (+)*	7.5	8	-
DMSO (-)**	-	-	-

Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el presente estudio retadas contra la ferrochalcona F03. *Stock: control positivo (1mg/mL F03), **DMSO: control negativo (DMSO 1%). Fuente: Elaboración propia



E. coli O26. En las placas 2 y 4 se observan halos de inhibición de 7 a 8 mm en las concentraciones de F03 de 200, 400 y 800 µg/ml. En las placas 1 y 3 se observan halos de inhibición de 7 a 8 mm en los controles positivos.

E. coli O111. En las placas 2 y 4 se observan halos de inhibición de 7 a 8 mm en las concentraciones de F03 de 400 y 800 µg/ml. En las placas 1 y 3 se observan halos de inhibición de 8 mm en los controles positivos.



E. coli O121. En la placa 4 se observa el único halo de inhibición de 8 mm. En los controles positivos no se observaron halos de inhibición.

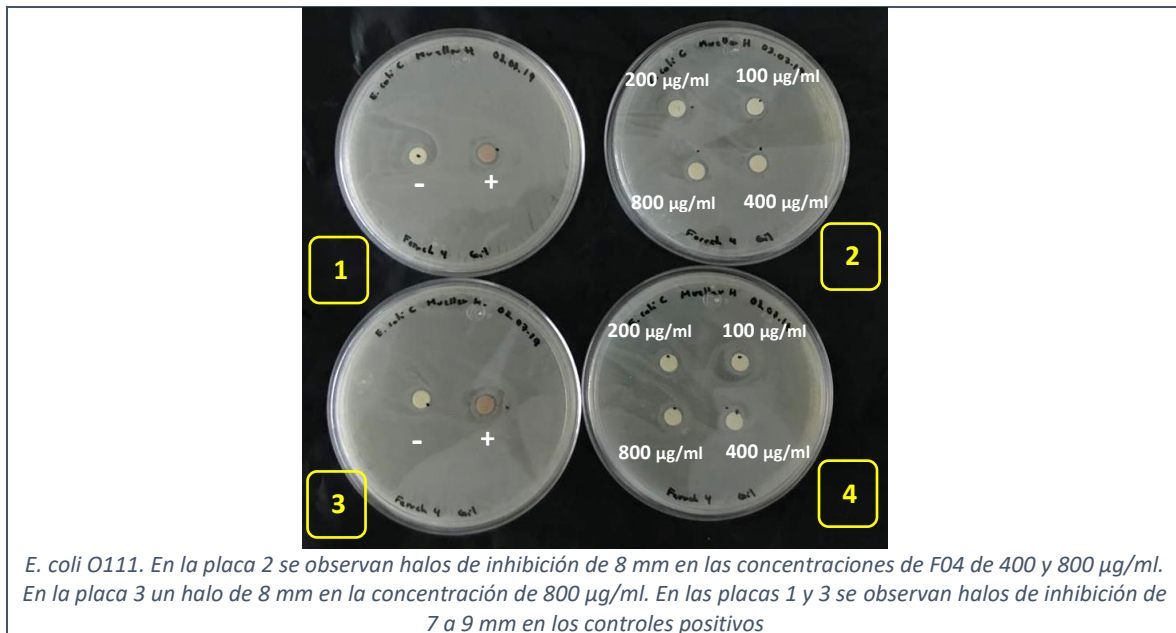
Figura 5. Antibiogramas de la ferrochalcona F03 evaluada contra las cepas *E. coli* O26, *E. coli* O 111 y *E. coli* O121. Las placas 2 y 4 de cada imagen muestran las diferentes concentraciones de F03 y las placas 1 y 3 de cada imagen muestran los controles negativos (-) y positivos (+). Control negativo=DMSO 1%, Control positivo= 1mg/mL F02. Fuente: Elaboración propia

d) Ferrochalcona F04: el screening de esta ferrochalcona solo mostró actividad antibacteriana contra *E. coli* O111, en la cual se observaron halos de inhibición promedio de 4 a 8 mm en promedio en las concentraciones de 400 µg/ml y 800 µg/ml; así como en el stock (control positivo) (tabla 6 y figura 6).

Tabla 6. Resultados de los antibiogramas de la ferrochalcona F04

Ferrochalcona F04	Cepa / Promedio del diámetro de halo de inhibición (mm)
Concentración (µg/mL)	<i>E. coli</i> O111
100	-
200	-
400	4
800	8
Stock (+)*	8
DMSO (-)**	-

Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el presente estudio retadas contra la ferrochalcona F04. *Stock: control positivo (1mg/mL F04), **DMSO: control negativo (DMSO 1%). Fuente: Elaboración propia



E. coli O111. En la placa 2 se observan halos de inhibición de 8 mm en las concentraciones de F04 de 400 y 800 µg/ml. En la placa 3 un halo de 8 mm en la concentración de 800 µg/ml. En las placas 1 y 3 se observan halos de inhibición de 7 a 9 mm en los controles positivos

Figura 6. Antibiogramas de la ferrochalcona F04 evaluada contra la cepa *E. coli* O 111. Las placas 2 y 4 de cada imagen muestran las diferentes concentraciones de F04 y las placas 1 y 3 de cada imagen muestran los controles negativos (-) y positivos (+). Control negativo=DMSO 1%, Control positivo= 1mg/mL F02. Fuente: Elaboración propia.

X.3 Efecto inhibitorio de las ferrochalconas en medio líquido (ensayo de microdilución)

Para poder obtener el porcentaje de reducción de cada bacteria evaluada contra las cuatro ferrochalconas, a las concentraciones de 400 µg/ml y 800 µg/ml, se realizó el ensayo en placa multipozos (figura 13- anexo 2) y la consecuente extensión en placa.

De acuerdo con los datos obtenidos, se calcularon los porcentajes de reducción del crecimiento bacteriano (tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de reducción de cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*

Cepa	Porcentaje de reducción								Control positivo
	Ferrochalcona 01		Ferrochalcona 02		Ferrochalcona 03		Ferrochalcona 04		
	400 $\frac{\mu g}{ml}$	800 $\frac{\mu g}{ml}$	400 $\frac{\mu g}{ml}$	800 $\frac{\mu g}{ml}$	400 $\frac{\mu g}{ml}$	800 $\frac{\mu g}{ml}$	400 $\frac{\mu g}{ml}$	800 $\frac{\mu g}{ml}$	
<i>E. coli</i> O26	-43.80%	-4.13%	-123.42%	-57.36%	86.81%	88.88%	54.65%	-4.52%	Nal ^{**} : 100%
<i>E. coli</i> O103	75.77%	72.85%	78.43%	81.70%	71.89%	87.37%	81.20%	82.21%	Km ^{***} : 100%
<i>E. coli</i> O111	76.86%	82.40%	69.26%	75.66%	74.16%	81.32%	74.34%	85.62%	Ap ^{****} : 100%
<i>E. coli</i> O121	94.10%	99.37%	93.88%	92.95%	85.16%	24.68%	87.78%	93.15%	Tet ^{*****} : 100%
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-23.59%	25.34%	6.58%	54.74%	11.41%	41.20%	6.20%	39.65%	Ap: 99.30%

Porcentajes de reducción de cepas de *E. coli* y *S. typhimurium* al ser evaluados contra las ferrochalconas F01, F02, F03 y F04; y el antibiótico seleccionado (control positivo). Los números negativos y en naranja indican un aumento del crecimiento de la cepa en comparación con el recuento basal de la respectiva cepa. Las resistencias de las cepas fueron obtenidas en el laboratorio. *Cm: cloranfenicol (30 µg/ml), **Nal: ácido nalidíxico (25 µg/ml), ***Km: kanamicina (50 µg/ml), ****Ap: ampicilina (200 µg/ml), *****Tet: tetraciclina (25 µg/ml). Fuente: Elaboración propia.

Escherichia coli O26 disminuyó su crecimiento con las ferrochalconas F03 y F04, en donde la primera tuvo un porcentaje de reducción de hasta el 88.88% en la concentración de 800 µg/ml, y con la F04 solo se presentó una reducción del 54.65% con la concentración de 400 µg/ml, ya que a 800 µg/ml se observó un aumento en el crecimiento de la cepa comparándolo con el crecimiento del cultivo basal. Este mismo efecto se observó con las ferrochalconas F01 y F02, debido a que *E. coli*

O26 aumentó su crecimiento desde un 4.13% hasta un 123.42% con respecto al recuento basal. Además, interesantemente este efecto se repitió al evaluar la cepa contra un antibiótico de primera línea, la ampicilina, al presentar un 26.81% de crecimiento más alto que el cultivo basal (figura 7).

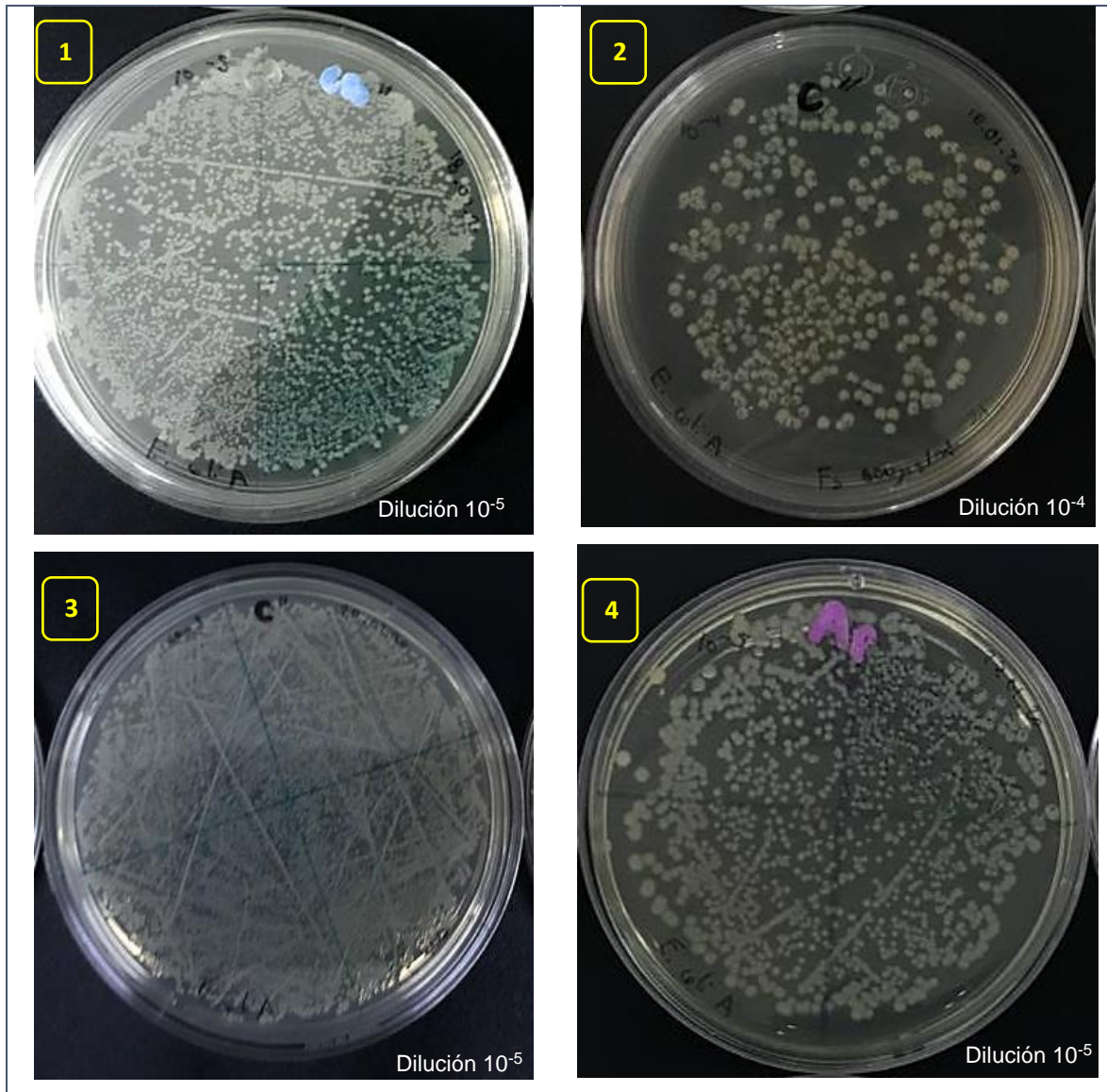


Figura 7. Comparación de los conteos de colonias de *E. coli* O26. En la placa 1 se muestra el cultivo basal de *E. coli* O26, en la placa 2 se observa la reducción de *E. coli* O26 en presencia de F03 a 800 µg/ml en la dilución 10⁻⁴, en la placa 3 se observa un aumento del crecimiento de *E. coli* O26 con respecto al cultivo basal en presencia de F02 a 400 µg/ml, en la placa 4 se muestra un crecimiento mayor de *E. coli* O26 con respecto al cultivo basal en presencia de ampicilina. Fuente: Elaboración propia

Escherichia coli O103 mostró disminución de su crecimiento con las cuatro ferrochalconas evaluadas, mostrando una reducción desde el 71.89% hasta el 87.37%; siendo la F03 a 800 µg/ml la que tuvo mayor efecto (tabla 7). Las

ferrochalconas F01, F02 y F04 mostraron mejor inhibición del crecimiento a una concentración de 400 µg/ml que a 800 µg/ml (figura 8, tabla 7).

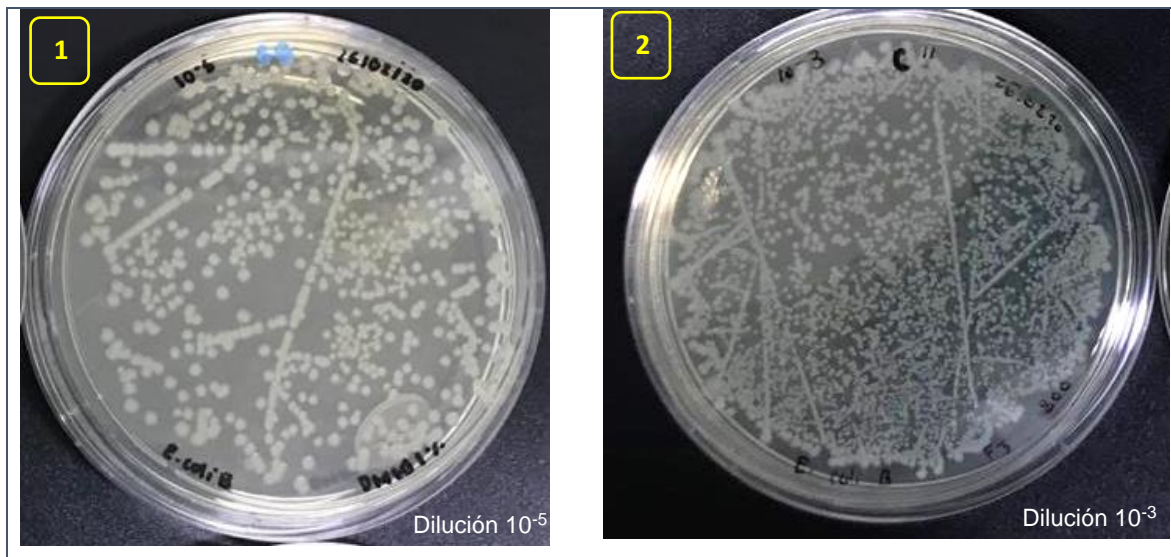


Figura 8. Comparación de los conteos de colonias de *E. coli* O103. En la placa 1 se muestra el cultivo basal de *E. coli* O103 y en la placa 2 se muestra la reducción del crecimiento de *E. coli* O103 en presencia de F03 a 800 µg/ml. Aunque a simple vista no se nota la reducción, esto se debe a que el recuento basal está en una dilución de 10^{-5} y la placa 2 en una dilución de 10^{-3} . Fuente: Elaboración propia

Escherichia coli O111 disminuyó su crecimiento con las cuatro ferrochalconas, variando el porcentaje de reducción de un 69.26% a un 85.62%; siendo la ferrochalcona F04 a 800 µg/ml la que mostró mayor actividad (tabla 7). Las ferrochalconas F01, F02 y F03 funcionaron mejor a una concentración de 400 µg/ml que a 800 µg/ml (figura 9, tabla 7).

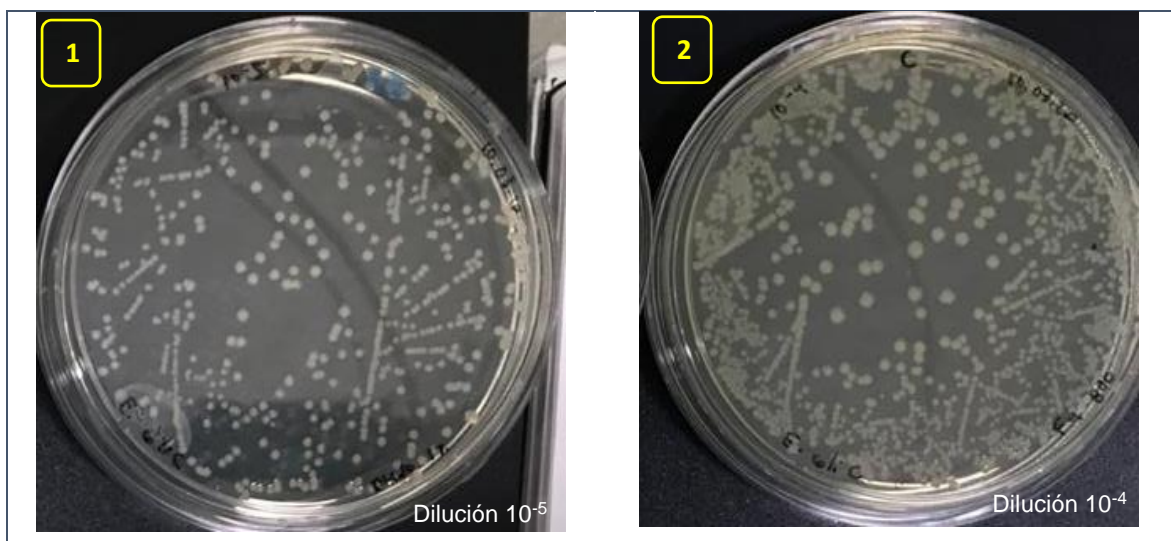


Figura 9. Comparación de los conteos de colonias de *E. coli* O111. En la placa 1 se muestra el cultivo basal de *E. coli* O111 y en la placa 2 se muestra la reducción del crecimiento de *E. coli* O111 en presencia de F04 a 800 µg/ml. Aunque a simple

vista no se nota la reducción, esto se debe a que el recuento basal está en una dilución de 10^{-5} y la placa 2 en una dilución de 10^{-4} . Fuente: Elaboración propia

Escherichia coli O121 mostró ser la más susceptible ante las ferrochalconas evaluadas. Tanto F03 como F02 a 400 $\mu\text{g/ml}$, indicaron ser una mejor opción que a 800 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 7). Sin embargo, las ferrochalconas F01 y F04 mostraron tener mayor actividad antibacteriana en la concentración de 800 $\mu\text{g/ml}$ reduciendo el crecimiento de *E. coli* O121 más del 90%; siendo F01 a 800 $\mu\text{g/ml}$ la más efectiva con un 99.37% de reducción. Por otro lado, la ampicilina no mostró ser efectiva contra esta cepa al presentar una reducción del 23.34% (figura 10).

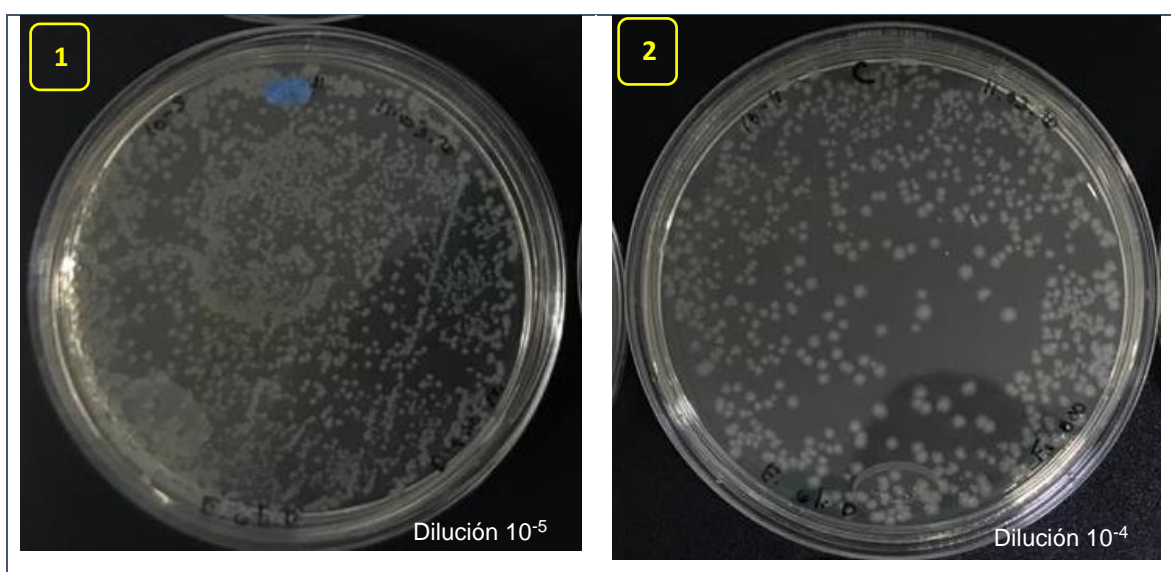


Figura 10. Comparación de los conteos de colonias de *E. coli* O121. En la placa 1 se muestra el cultivo basal de *E. coli* O121 y en la placa 2 se muestra la reducción del crecimiento de *E. coli* O121 en presencia de F01 a 800 $\mu\text{g/ml}$. En este caso se nota la reducción, aunque el recuento basal esté en una dilución de 10^{-5} y la placa 2 en una dilución de 10^{-4} . Fuente: Elaboración propia

Salmonella typhimurium ATCC 14028: esta cepa no mostró tener gran susceptibilidad contra las cuatro ferrochalconas evaluadas, ya que el máximo porcentaje de reducción fue del 54.74% con la F02 a 800 $\mu\text{g/ml}$. Todas las ferrochalconas tuvieron mayor actividad antibacteriana en la concentración de 800 $\mu\text{g/ml}$ variando desde un 25.34% a un 54.74%. Además, curiosamente el antibiótico de primera línea, la ampicilina, no logró reducir al 100% a *S. typhimurium*, ya que mostró una reducción del 99.30% (figura 11).

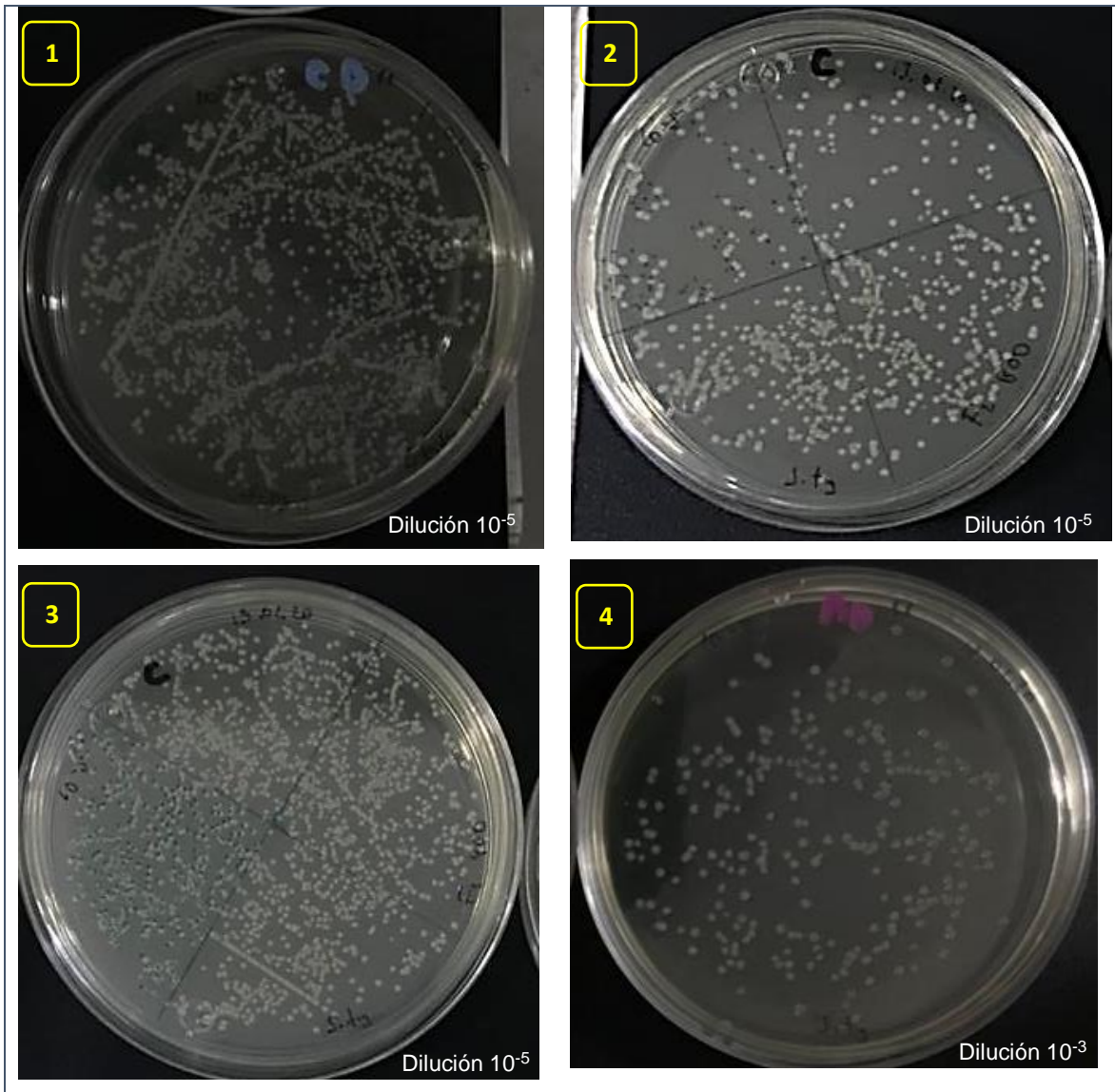
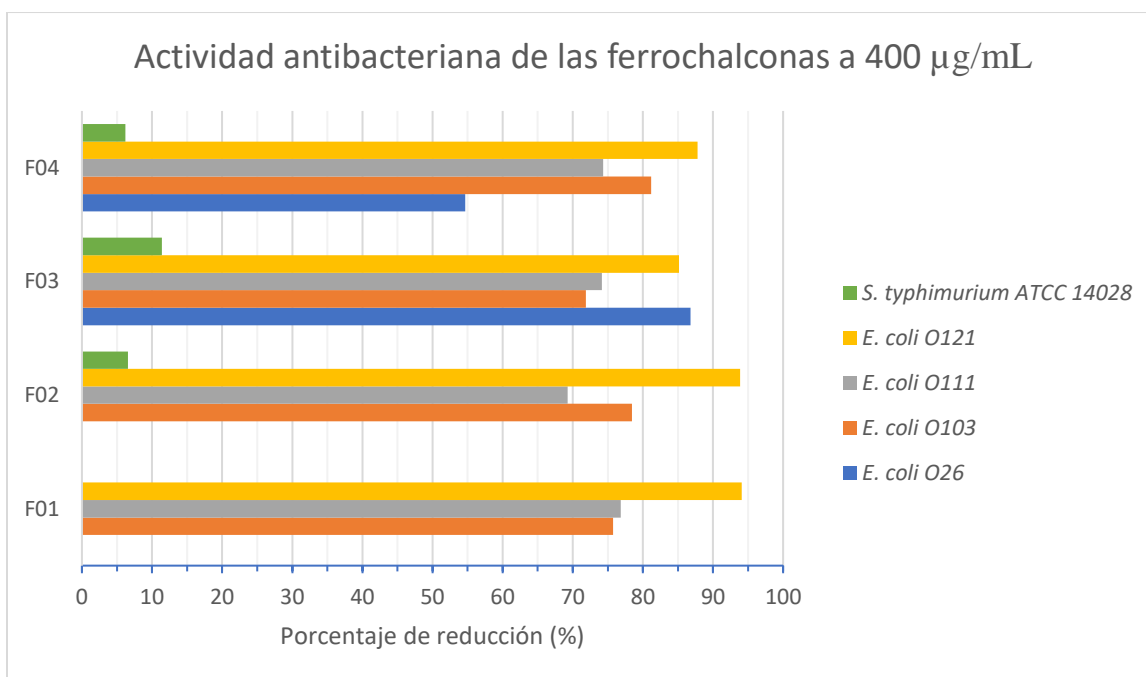


Figura 11. Comparación de los conteos de colonias de *S. typhimurium* ATCC 14028. En la placa 1 se muestra el cultivo basal de *S. typhimurium*, en la placa 2 se observa la reducción de *S. typhimurium* en presencia de F02 a 800 µg/ml, en la placa 3 se observa un aumento del crecimiento de *S. typhimurium* con respecto al cultivo basal en presencia de F01 a 400 µg/ml, en la placa 4 se muestra la reducción del crecimiento de *S. typhimurium* en presencia de ampicilina en la dilución 10^{-3} . Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, al comparar la actividad antibacteriana entre las cuatro ferrochalconas a 400 µg/ml (gráfica 1) se observó que tanto F04 como F03 tuvieron efecto antimicrobiano contra todas las cepas evaluadas, seguido de la F02 (efecto contra 4 cepas) y por último F01 (efecto contra 3 cepas). Sin embargo, F01 y F02 fueron las únicas ferrochalconas que lograron un porcentaje de reducción mayor al 90%.

En general, todas las ferrochalconas lograron tener un porcentaje de reducción igual o mayor al 70% contra las cepas EHEC/STEC (*E. coli* O103, O111 y O121). Las

ferrochalconas F03 y F04 lograron un porcentaje de reducción de más del 50% contra la cepa EPEC (*E. coli* O26). Por último, las ferrochalconas F02, F03 y F04 lograron tener un porcentaje de reducción máximo del 11.41% contra *S. typhimurium* ATCC 14028.

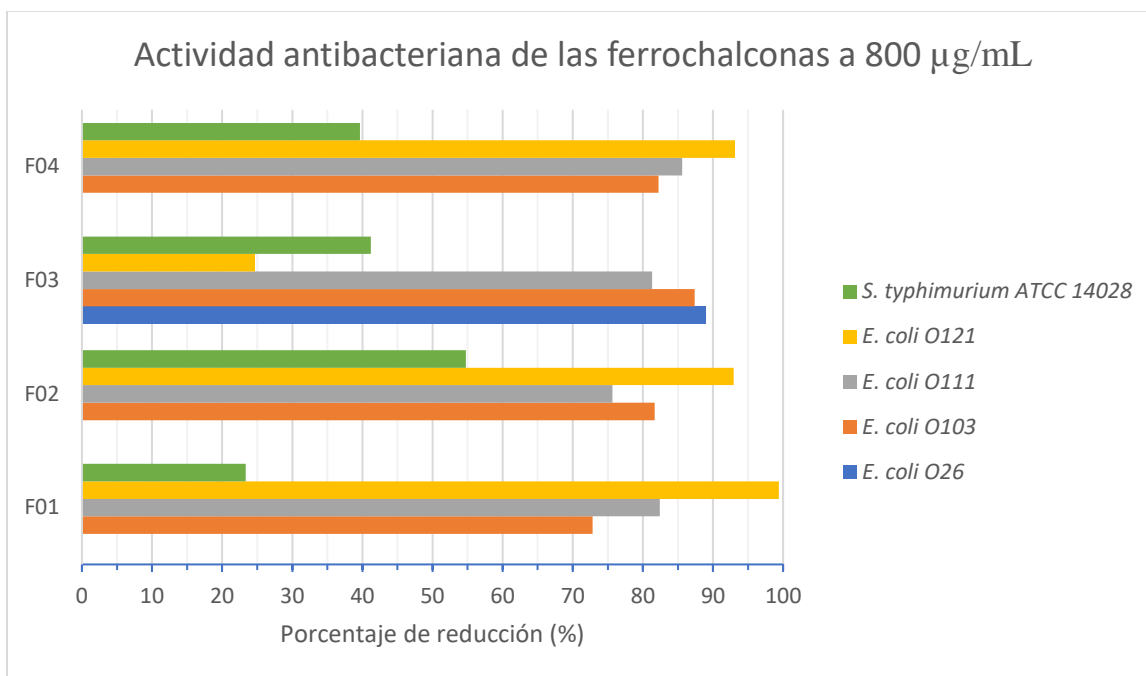


Gráfica 1. Actividad antibacteriana de las ferrochalconas (F01, F02, F03 y F04) a 400 µg/mL contra todas las cepas evaluadas en el presente estudio, donde se observa la comparación de cada una con base al porcentaje de reducción. *E. coli* O26 no se muestra en las barras de F01 y F02, y *S. typhimurium* ATCC 14028 en F01 debido a que en presencia de estas ferrochalconas su crecimiento aumentó. Fuente: Elaboración propia

En comparación con las ferrochalconas a 400 µg/ml, las ferrochalconas a concentraciones de 800 µg/ml mostraron tener efectos antimicrobianos mayores y contra un mayor número de cepas (gráfica 2). Las ferrochalcona F04 tuvo efecto contra todas las cepas, seguido de las F01, F02 y F03 que exhibieron efecto antibacteriano contra cuatro cepas. Sin embargo, estas últimas lograron tener porcentajes de reducción mayores al 90%.

En general, todas las ferrochalconas tuvieron un porcentaje de reducción igual o mayor al 72.85% contra las cepas EHEC/STEC (*E. coli* O103, O111 y O121) a excepción de la F03 evaluada contra *E. coli* O121. La ferrochalcona F03 fue la única que logró tener efecto contra la cepa EPEC (*E. coli* O26) con un porcentaje de reducción del 88.88%. Por último, todas las ferrochalconas presentaron efecto

antibacteriano contra *S. typhimurium* ATCC 14028 con un porcentaje de reducción máximo del 54.74%, a comparación con las ferrochalconas a 400 µg/ml que solo lograron una reducción máxima del 11.42% como se mencionó anteriormente.



Gráfica 2. Actividad antibacteriana de las ferrochalconas (F01, F02, F03 y F04) a 800 µg/mL contra todas las cepas evaluadas en el presente estudio, donde se observa la comparación de cada una con base al porcentaje de reducción. *E. coli* O26 no se muestra en las barras de F01, F02 y F04 debido a que en presencia de estas ferrochalconas su crecimiento aumentó. Fuente: Elaboración propia

X.4 Análisis de las poblaciones bacterianas después del tratamiento con ferrochalconas

Los logaritmos de las poblaciones bacterianas fueron analizados estadísticamente por ANOVA post hoc Tukey ($p < 0.05$) (tabla 8 y gráfica 3).

De manera general, tanto *E. coli* O26 como *S. typhimurium* ATCC 14028 muestran menor inhibición con las ferrochalconas. En el caso de *E. coli* O26, con la ferrochalcona F01 no se observa ninguna diferencia significativa con el control. Mientras que con F02 y F03 existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el control, pero no entre las concentraciones de 400 µg/ml y 800 µg/ml. Sin embargo, con F02 la diferencia es debido al incremento del crecimiento de la cepa y no por

su reducción. Con la F04, no existe una diferencia entre el control y la concentración de la ferrochalcona a 800 µg/ml, pero sí con la concentración a 400 µg/ml.

En el caso de *S. typhimurium* ATCC 14028, con las ferrochalconas F01 y F04 no se muestra ninguna diferencia significativa con el control. Con F02 y F03 (400 µg/ml), no existe diferencia significativa entre el control, no obstante, con la concentración a 800 µg/ml sí existe diferencia.

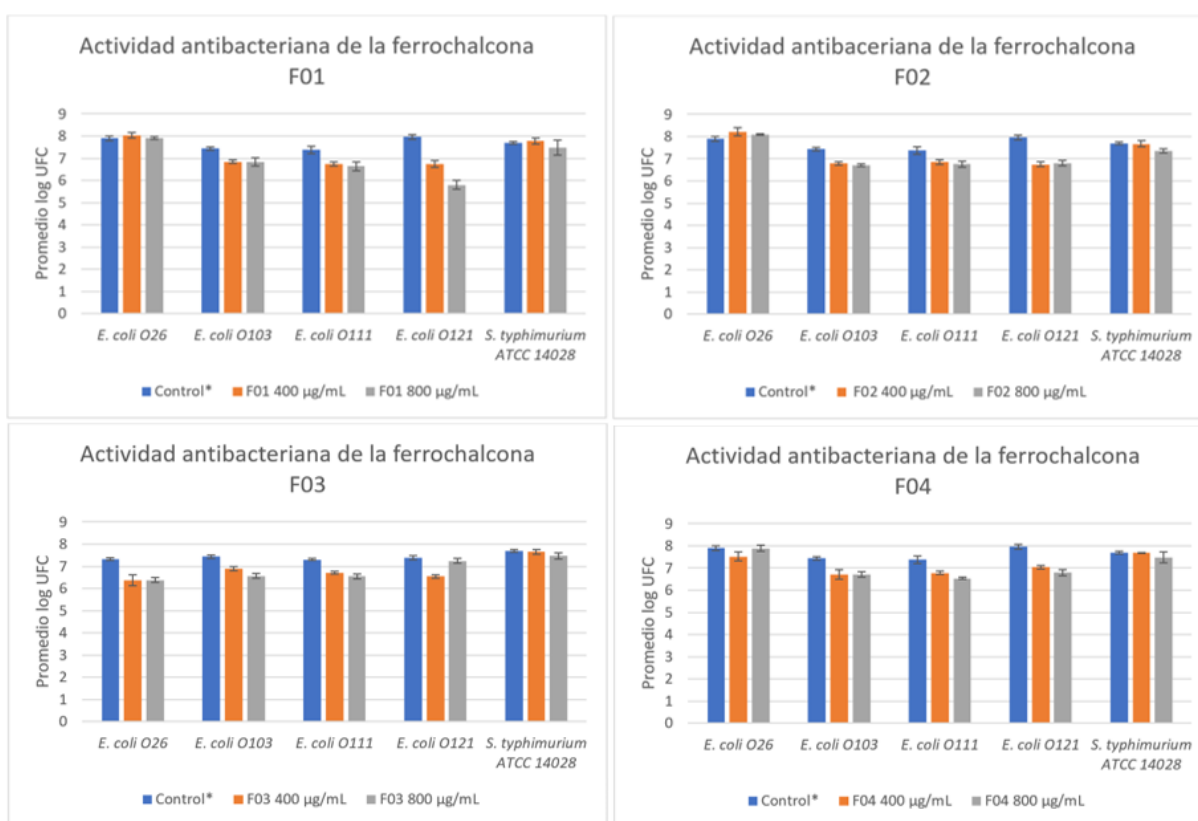
Por otro lado, las cepas que presentan mayor susceptibilidad son *E. coli* O103, O111 y O121. Para las ferrochalconas F01 y F02, en las tres cepas, hubo diferencia significativa entre el tratamiento con la ferrochalcona y su respectivo control, sin embargo, no existe diferencia entre ambas concentraciones (400 µg/ml y 800 µg/ml); a excepción de *E. coli* O121, que para la F01 también mostró tener una diferencia significativa entre ambas concentraciones. En el caso de F03 y F04, en las tres cepas, existe diferencia significativa tanto en el control comparado con el tratamiento con la ferrochalcona, como entre ambas concentraciones (400 µg/ml y 800 µg/ml), a excepción de *E. coli* O103 con la F04 donde solo hubo diferencia entre el control y el tratamiento.

Tabla 8. Recuentos microbianos, en logaritmo, de los tratamientos de las cuatro ferrochalconas contra las cepas evaluadas en el estudio

Cepa	Ferrochalcona F01 (log UFC)		Ferrochalcona F02 (log UFC)		Ferrochalcona F03 (log UFC)		Ferrochalcona F04 (log UFC)	
	400 µg/ml	800 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml
<i>E. coli</i> O26	8.03±0.11 ^a	7.91±0.07 ^a	8.21±0.17 ^j	8.09±0.03 ^j	6.36±0.25 ^s	6.39±0.10 ^s	7.52±0.20 ^{af}	7.88±0.13 ^{ag}
<i>E. coli</i> O103	6.84±0.08 ^b	6.84±0.19 ^b	6.79±0.09 ^l	6.70±0.06 ^l	6.89±0.09 ^u	6.57±0.11 ^v	6.71±0.21 ^{ah}	6.70±0.12 ^{ah}
<i>E. coli</i> O111	6.75±0.08 ^d	6.64±0.21 ^d	6.85±0.11 ⁿ	6.75±0.13 ⁿ	6.71±0.06 ^x	6.55±0.10 ^y	6.78±0.08 ^{aj}	6.54±0.04 ^{ak}
<i>E. coli</i> O121	6.75±0.15 ^f	5.80±0.19 ^g	6.75±0.10 ^o	6.81±0.12 ^o	6.55±0.08 ^{aa}	7.24±0.11 ^{ab}	7.04±0.08 ^{am}	6.80±0.14 ^{an}
ATCC 14028*	7.77±0.15 ⁱ	7.48±0.33 ⁱ	7.67±0.14 ^q	7.36±0.09 ^r	7.65±0.11 ^{ad}	7.47±0.14 ^{ae}	7.68±0.01 ^{ao}	7.48±0.23 ^{ao}
Control <i>E. coli</i> O26	7.91±0.11 ^a		7.91±0.11 ^k		7.32±0.06 ^t		7.91±0.11 ^{ag}	
Control <i>E. coli</i> O103	7.44±0.08 ^c		7.44±0.08 ^m		7.44±0.08 ^w		7.44±0.08 ^{ai}	

Control <i>E. coli</i> O111	7.37±0.16 ^e	7.37±0.16 ^ñ	7.30±0.05 ^z	7.37±0.16 ^{al}
Control <i>E. coli</i> O121	7.96±0.09 ^h	7.96±0.09 ^p	7.39±0.08 ^{ac}	7.96±0.09 ^{añ}
Control ATCC 14028*	7.69±0.06 ⁱ	7.69±0.06 ^q	7.69±0.06 ^{ad}	7.69±0.06 ^{ao}

Recuentos microbianos, en logaritmo, de los tratamientos de las cuatro ferrochalconas contra todas las cepas evaluadas en el estudio; así como sus respectivos controles negativos (conteo basal). Letras diferentes en la misma columna y dentro del mismo tratamiento de ferrochalcona y cepa indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). Los resultados fueron evaluados con un ANOVA y un post hoc Tukey. **Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Fuente: Elaboración propia



Gráfica 3. Recuento microbiano de las cepas evaluadas contra las cuatro ferrochalconas presentados en log de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). *Control sin antibiótico (recuento basal). Los datos fueron analizados por medio de la prueba ANOVA de un factor con un post hoc con prueba de Tukey, $p < 0.05$. Fuente: Elaboración propia

Con la finalidad de poder comparar entre las cepas y los tratamientos con las cuatro ferrochalconas, se calcularon los índices de crecimiento, de tal manera que se puede conocer si existen diferencias significativas entre las diferentes cepas, dentro

del tratamiento con la misma ferrochalcona a la misma concentración (tabla 9, gráfica 4).

Las ferrochalconas F01, F02 y F04 muestran una tendencia similar con ciertas variaciones. Se observa el siguiente orden, de menor a mayor inhibición ($p < 0.05$):

- En los tratamientos con F01 (400 $\mu\text{g/ml}$ y 800 $\mu\text{g/ml}$) y F04 (800 $\mu\text{g/ml}$): *E. coli* O26 y *S. typhimurium* ATCC 14028 < *E. coli* O103 y O111 < *E. coli* O121
- En los tratamientos con F02 (400 $\mu\text{g/ml}$ y 800 $\mu\text{g/ml}$): *E. coli* O26 < *S. typhimurium* ATCC 14028 < *E. coli* O103 y O111 < *E. coli* O121
- En el tratamiento con F04 (400 $\mu\text{g/ml}$): *S. typhimurium* ATCC 14028 < *E. coli* O26 < *E. coli* O111 \leq *E. coli* O103 \leq *E. coli* O121

Por otro lado, la ferrochalcona F03 es la que muestra mayor variación en el efecto inhibitorio contra las cepas evaluadas, ya que se observa el siguiente orden, de menor a mayor inhibición ($p < 0.05$):

- En el tratamiento con F03 a 400 $\mu\text{g/ml}$: *S. typhimurium* ATCC 14028 < *E. coli* O103 y O111 < *E. coli* O26 y *E. coli* O121
- En el tratamiento con F03 a 800 $\mu\text{g/ml}$: *E. coli* O121 y *S. typhimurium* ATCC 14028 < *E. coli* O26, O103 y O111

Tabla 9. Índices de crecimiento de los recuentos microbianos de los ensayos de inhibición del crecimiento en medio líquido

Cepa	Ferrochalcona F01		Ferrochalcona F02		Ferrochalcona F03		Ferrochalcona F04	
	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$
<i>E. coli</i> O26	1.016 ^a	1.000 ^d	1.039 ^g	1.023 ^k	0.869 ⁿ	0.873 ^q	0.951 ^s	0.997 ^w
<i>E. coli</i> O103	0.920 ^b	0.920 ^e	0.913 ^h	0.901 ^l	0.927 ^o	0.883 ^r	0.902 ^{tu}	0.901 ^x
<i>E. coli</i> O111	0.915 ^b	0.901 ^e	0.929 ^h	0.916 ^j	0.920 ^o	0.897 ^q	0.920 ^u	0.887 ^x
<i>E. coli</i> O121	0.848 ^c	0.729 ^f	0.848 ⁱ	0.856 ^m	0.886 ⁿ	0.980 ^r	0.884 ^t	0.854 ^y
ATCC 14028*	1.010 ^a	0.973 ^d	0.998 ⁱ	0.957 ⁿ	0.995 ^p	0.971 ^r	0.999 ^v	0.973 ^w

Índices de los recuentos microbianos de los ensayos de microdilución de las cuatro ferrochalconas evaluadas con las cepas valoradas en el estudio. Índice de crecimiento = $\log(\phi\text{sobrevivientes})/\log(\text{Cvi})$. Letras diferentes en la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). Los resultados fueron evaluados con un ANOVA y un post hoc Tukey.

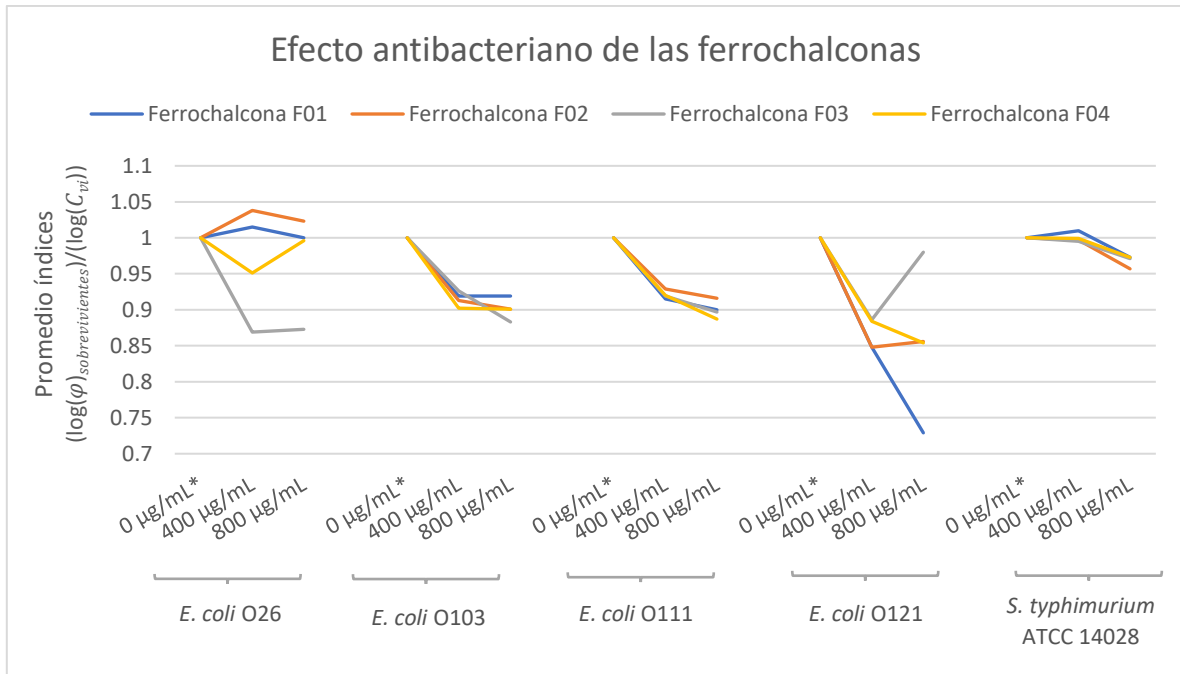
**Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Fuente: Elaboración propia.

Por último, en la gráfica 4 se muestran las comparaciones del comportamiento de las cuatro ferrochalconas con la misma cepa. Como se ha mencionado antes, *E.*

coli O26 y *S. typhimurium* ATCC 14028 son las que muestran menor susceptibilidad a las ferrochalconas, ya que en la mayoría de los casos la reducción del crecimiento microbiano permanece arriba del 0.95. Por otro lado, *E. coli* O103, O111 y O121, en general muestran una reducción de hasta el 0.90.

De manera más específica, se presentan los siguientes comportamientos para cada cepa analizados mediante ANOVA post hoc Tukey ($p < 0.05$):

- *E. coli* O26: las ferrochalconas F01 y F02 no muestran inhibición. Por otra parte, F03 muestra una inhibición significativa ($p < 0.05$) a 400 $\mu\text{g/ml}$, pero a una concentración mayor aumenta el crecimiento de la cepa. Y la F04 inhibe significativamente a la cepa a 400 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo después permanece estable.
- *E. coli* O103: todas las ferrochalconas muestran la misma tendencia, ya que existe una disminución significativa, no obstante, a una concentración mayor de ferrochalcona la inhibición de la cepa permanece estable, a excepción de F03, en donde sí existe diferencia significativa entre ambas concentraciones (400 $\mu\text{g/ml}$ y 800 $\mu\text{g/ml}$).
- *E. coli* O111: se observa el mismo comportamiento que *E. coli* O103. Sin embargo, F03 y F04 muestran una diferencia significativa entre ambas concentraciones (400 $\mu\text{g/ml}$ y 800 $\mu\text{g/ml}$).
- *E. coli* O121: tiene una tendencia parecida a *E. coli* O103 y O111, pero con una inhibición mayor, como es el caso de la F01. Tanto F01 como F03 y F04, muestran una disminución significativa en ambas concentraciones, a excepción de F03 a 800 $\mu\text{g/ml}$, en el cual aumentó el crecimiento de la cepa. F02 no tiene diferencia entre las concentraciones de 400 $\mu\text{g/ml}$ y 800 $\mu\text{g/ml}$.
- *S. typhimurium* ATCC 14028: todas las ferrochalconas muestran el mismo comportamiento. No obstante, solo existe diferencia significativa en F02 y F03 entre el control y la concentración a 800 $\mu\text{g/ml}$.



Gráfica 4. Efecto antibacteriano de las cuatro ferrochalconas comparadas entre cada cepa por medio de sus índices de crecimiento. *Control negativo (recuento basal). Fuente: Elaboración propia

XI. Discusión

La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Constantemente aparecen y se propagan nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad de tratar enfermedades infecciosas comunes. Un creciente número de infecciones, como las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), son cada vez más difíciles, y en casos más graves imposibles, de tratar a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia (OMS, 2018).

Actualmente, alrededor de todo el mundo se están buscando alternativas a los antibióticos y desinfectantes tradicionales, con el fin de que disminuya la presencia de los patógenos causantes de las ETA, principalmente en la industria de los alimentos. Es por eso que, una de las moléculas que poseen un gran potencial en este ámbito son las chalconas, ya que han mostrado tener una gran variedad de propiedades farmacológicas, particularmente actividades antibacterianas con mayor eficacia que los antibióticos tradicionales, y sus derivados poseen un alto grado de diversidad estructural, siendo útiles para el descubrimiento de nuevas opciones.

En este proyecto se evaluó la capacidad antibacteriana de cuatro ferrochalconas, F01, F02, F03 y F04, las cuales fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO), debido a que es un solvente ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y en la investigación antimicrobiana debido a su baja toxicidad, capacidad de disolver compuestos orgánicos e inorgánicos, la facultad de permanecer en estado líquido en un amplio rango de temperatura, capacidad de mejorar la permeabilidad de la membrana celular y ser miscible en agua y en una amplia gama de disolventes orgánicos (Mi et al., 2016).

Para obtener un acercamiento sobre la actividad antibacteriana de las cuatro ferrochalconas, se realizó un screening mediante la difusión de discos (técnica de Kirby-Bauer). Los resultados obtenidos permitieron establecer las concentraciones de las ferrochalconas que se evaluarían en los ensayos de microdilución, los cuales fueron 400 µg/ml y 800 µg/ml, puesto que fueron las que mostraron mayor inhibición.

Dentro del ensayo de microdilución, en términos de porcentaje de reducción, *E. coli* O26 fue la que mostró mayor variabilidad debido a que los porcentajes de reducción rondan desde el 88.88% para la F03 a 800 µg/ml hasta un aumento en su crecimiento en presencia de F01 y F02. Asimismo, fue la que mostró tener menor susceptibilidad a las ferrochalconas a comparación de las demás cepas de *E. coli*, ya que en algunos casos no presentó diferencia significativa ($p < 0.05$), como con F01, o solo mostró diferencia significativa entre el control negativo (recuento basal) y el tratamiento con la ferrochalcona (F03 y F04), debido a que a concentraciones mayores la inhibición permanecía estable, por lo que probablemente llegó al límite de inhibición a la concentración de 400 µg/ml. Esto se puede deber a que esta cepa al ser multiresistente [Ap^R , Tet^R , Cm^R , Km^R] cuenta con una gran diversidad de mecanismos que le permiten evadir las moléculas con efecto antimicrobiano, ya que se ha visto que cepas resistentes a betalactámicos (ampicilina) y anfenicoles (cloranfenicol) cuentan con una reducción de la permeabilidad, así como cepas resistentes a tetraciclinas cuentan con bombas de eflujo (Ochoa & Gómez-Duarte, 2016). Además, al ser ésta la única *E. coli* EPEC evaluada existen diferencias en comparación con EHEC/STEC.

Por otro lado, *E. coli* O103 y O111 mostraron una tendencia similar en la sensibilidad contra las cuatro ferrochalconas, donde en las concentraciones de 400 µg/ml se observó un porcentaje de reducción en promedio del 75.2% y en las concentraciones de 800 µg/ml del 81.1%. Del mismo modo, ambas cepas mostraron tener una diferencia significativa en todas las concentraciones (0, 400 y 800 µg/ml) de la F03, y en el caso de *E. coli* O111 también para F04, por lo que seguramente a concentraciones mayores de estas dos ferrochalconas haya más inhibición. Para la F01 y F02 se llegó al límite de inhibición a 400 µg/ml.

E. coli O121 fue la cepa que mostró mayor variabilidad y sensibilidad contra las cuatro ferrochalconas con un promedio en el porcentaje de reducción en la concentración de 400 µg/ml del 90.23% y en la concentración de 800 µg/ml del 95.15% (excluyendo el valor de la F03, debido a que mostró un porcentaje del 24.68%); siendo la F01 a 800 µg/ml la que mostró mayor efecto con un 99.37% en

la reducción de *E. coli* O121. Además, todas las ferrochalconas mostraron mayor efectividad que la ampicilina, un antibiótico de primera línea, la cual solo obtuvo un 23.34% en la reducción de esta *E. coli*. Aquí se puede observar el gran potencial de las ferrochalconas para el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli* resistentes a antibióticos. De la misma manera, tanto F01 como F04 tuvieron una diferencia significativa en todas las concentraciones (0, 400 y 800 µg/ml) por lo que también puede ser que a concentraciones mayores de estas dos ferrochalconas haya más inhibición. Para la F02 y F03 se llegó al límite de inhibición a 400 µg/ml.

Las razones por las que las cepas EHEC/STEC (*E. coli* O103, O111 y O121) mostraron ser más susceptibles a la ferrochalconas que la cepa EPEC (*E. coli* O26), se puede deber a lo siguiente; según estudios realizados por Kalule et.al. (2018), existen diferencias entre estos patotipos que hacen que STEC sea más sensible a los antibióticos. En primer lugar, EPEC multirresistente presenta una envoltura significativamente más gruesa que EHEC/STEC, lo cual evita que EPEC sea más susceptible al ataque de antibióticos. Del mismo modo, se ha visto que EPEC multirresistente presenta una menor cantidad de porinas OmpC y OmpF, las cuales están involucradas en la regulación de la difusión pasiva de moléculas pequeñas e hidrofóbicas a través de la membrana externa, como nutrientes, toxinas y antibióticos (Barba-Ostria, 2014), el cual, es el caso de la ferrochalconas evaluadas; asimismo en otros estudios muestran la relación de la baja abundancia de Omp C y OmpF con el aumento a la resistencia a antibióticos (Liu et.al., 2012), esto se debe a que la baja presencia de estas porinas permiten que entren menos moléculas de antibióticos dentro de la bacteria, es decir, hay una reducción en la permeabilidad de la membrana. Por último, también se ha observado que EPEC multirresistente, a diferencia de EHEC/STEC, presenta mayores niveles de bombas de eflujo de la superfamilia ABC las cuales están involucradas en la resistencia a antibióticos (Kalule et.al., 2018).

Por otro lado, *S. typhimurium* ATCC 14028, fue el patógeno que mostró una menor susceptibilidad al efecto de las ferrochalconas, siendo F02 a 800 µg/ml la que mostró mayor efecto con un 54.74% de reducción. Además, no hubo diferencia

significativa entre las concentraciones (0, 400 y 800 µg/ml) de F01 y F04, y solo se presentó una diferencia en la concentración de 800 µg/ml en F02 y F03, siendo probable que ha mayores concentraciones haya más inhibición. Esto se puede deber tanto a la menor presencia de porinas OmpC y OmpF, como en el caso de *E. coli* EPEC (Kalule et.al. 2017), como a la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana y al mecanismo de acción de las ferrochalconas.

Las ferrochalconas son moléculas que actúan perturbando la membrana celular (Sivakumar et al. 2009) y que reaccionan con grupos nucleófilos de proteínas esenciales (Cadena-Cruz, 2018), ya que al ser moléculas que contienen átomos con carga positiva (catiónico) y al mismo tiempo tener una lipofilidad por la presencia de los anillos aromáticos (Nielsen et al., 2005), permiten una alta actividad con la membrana de las bacterias. Esto se debe a que esta membrana externa de la bacteria contiene glucolípidos y lipopolisacáridos, los cuales son hidrofílicos permitiendo una alta permeabilidad de compuestos cargados de bajo peso molecular, como es el caso de las chalconas y, por otro lado, que su membrana interna contiene fosfolípidos los cuales son hidrofóbicos (Sivakumar et al., 2009).

Asimismo, una característica que influye en el efecto de las chalconas es la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana, ya que se ha visto en estudios como los de Sivakumar et al. (2009) que las chalconas actúan mejor contra organismos más hidrofóbicos y peor contra organismos más hidrofílicos.

Basándonos en los datos de este artículo (Sivakumar et al., 2009), *E. coli* posee una hidrofobicidad aproximada del 20% y *Salmonella typhi* del 4%. Con esta información y con nuestros resultados podemos decir que, debido a que *S. typhimurium* presenta menor hidrofobicidad (ya que al pertenecer a la misma especie, tiene un porcentaje parecido al de *S. typhi*) la actividad antibacteriana de las cuatro ferrochalconas se vio reducida en comparación con *E. coli*, que presenta una mayor hidrofobicidad.

Lamentablemente, no se pueden discutir las diferencias entre las ferrochalconas y sus efectos antimicrobianos a mayor profundidad debido a que no se conocen las estructuras moleculares de estos antibióticos por efectos de que están próximas a ser patentadas.

Sin embargo, en general, las ferrochalconas F01, F02 y F04, mostraron una misma tendencia en la inhibición de las cepas, siendo *E. coli* O121 la que presentó mayor susceptibilidad, seguida de *E. coli* O103 y O111, y por último *E. coli* O26 y *S. typhimurium* ATCC 14028. Por otro lado, F03 mostró mayor variación, dado que tenía mayor efecto antibacteriano contra *E. coli* O26 y menor contra *E. coli* O121.

Además, la ferrochalcona F03 tuvo actividad antimicrobiana contra un mayor número de cepas, seguida de la F04. Asimismo, ambas ferrochalconas presentaron más diferencias significativas ($p < 0.05$) en las tres concentraciones de ferrochalconas (control negativo, 400 y 800 $\mu\text{g/ml}$), de manera que es probable que a concentraciones mayores ofrezcan un efecto inhibitorio mayor. Por lo que F03 y F04 muestran ser las más efectivas dentro del estudio. Por otra parte, tanto F01 como F02, son las que tienen efecto contra menos cepas. De igual modo, estas dos ferrochalconas son las que presentan una mayor estabilidad a concentraciones mayores, por lo que su actividad antibacteriana parece estancada en la concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, sorprendentemente F01 a 800 $\mu\text{g/ml}$ fue la única ferrochalcona que logró tener un efecto del 99.37% contra al menos una cepa (*E. coli* O121).

Finalmente, contrario a todo lo mencionado, posiblemente una de las razones por las que estas ferrochalconas no lograron tener resultados mayores a los obtenidos en este estudio se debe a que se ha visto que las chalconas con complejos con Fe muestran una menor actividad antimicrobiana, tanto en bacterias como en hongos, comparados con otros metales como Cu, Ni y Co (Mahapatra et.al., 2019).

XII. Conclusiones

- De acuerdo con el perfil de resistencia a antibióticos se identificó que las cepas evaluadas en el estudio eran resistentes o multirresistentes: *Escherichia coli* O26 (EPEC): [Ap^R, Tet^R, Cm^R, Km^R], *E. coli* O103 (STEC/EHEC): [Ap^R, Tet^R, Cm^R, Nal^R], *E. coli* O111 (STEC/EHEC): [Tet^R], *E. coli* O121 (STEC/EHEC): [Ap^R]
- La inhibición del crecimiento por ferrochalconas por medio del ensayo de difusión en discos no fue muy evidente, pero permitió distinguir las concentraciones de las ferrochalconas a utilizar en el ensayo en medio líquido, las cuales fueron a 400 µg/ml y 800 µg/ml.
- Las ferrochalconas F01, F02 y F04 muestran la misma tendencia de inhibición de cepas, siguiendo el siguiente orden de inhibición en las cepas (de mayor a menor): *E. coli* O121 > *E. coli* O103 y *E. coli* O111 > *E. coli* O26 y *S. typhimurium* ATCC 14028.
- La ferrochalcona F03 mostró una tendencia diferente en relación con la inhibición de las cepas, presentando mayor inhibición contra *E. coli* O26 y menor contra *E. coli* O121.
- Las ferrochalconas F03 y F04 muestran ser las más efectivas en este estudio, al presentar actividad antibacteriana contra todas las cepas y más diferencias significativas ($p < 0.05$) a las concentraciones de ferrochalconas (400 y 800 µg/ml), de manera que es probable que a concentraciones mayores ofrezcan un efecto inhibitorio mayor. Además, lograron porcentajes de reducción mayores del 70% a excepción de *S. typhimurium* ATCC 14028.
- Las ferrochalconas F01 y F02, son las que tienen efecto contra menos cepas y mayor estancamiento del efecto antibacteriano en la concentración de 400 µg/ml.
- *E. coli* O26 y *S. typhimurium* ATCC 14028 son las cepas más resistentes al efecto antimicrobiano de las ferrochalconas.
- *E. coli* O103, O111 y O121 son las cepas más susceptibles al efecto antimicrobiano de las ferrochalconas.

XIII. Perspectivas

- Realizar ensayos de inhibición del crecimiento con las ferrochalconas a concentraciones mayores, especialmente F03 y F04, con el fin de conocer su comportamiento y si tienen mayor efecto antibacteriano.
- Realizar ensayos de microdilución de las cuatro ferrochalconas y sus efectos antimicrobianos para identificar las concentraciones mínimas inhibitorias.
- Evaluar nuevas cepas de alto interés en la industria de los alimentos como *E. coli* O45, *E. coli* O145 y *E. coli* O157:H7, para conocer su susceptibilidad a las cuatro ferrochalconas.
- Realizar ensayos para conocer el mecanismo de acción de las cuatro ferrochalconas dentro de bacterias patógenas.
- Realizar ensayos *in situ* en muestras de productos cárnicos con el fin de conocer el comportamiento de las ferrochalconas en este tipo de alimentos.
- Comparar el efecto antimicrobiano de las ferrochalconas con antibióticos y desinfectantes usados en la industria de los alimentos.

XIV. Bibliografía

- Abbas Z, Dasari S, & Patra AK. (2017). Ternary Eu (iii) and Tb (iii) β -diketonate complexes containing chalcones: photophysical studies and biological outlook. *Rsc Advances*, 7(70):44272-44281.
- Abdulla G, Abdel-Samie MA & Zaki D. (2016). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of ziziphus leaves extract in sausage during cold storage. *Pak J Food Sci*, 26(1):10–20.
- Abdullah MI, Mahmood A, Madni M, Masood S & Kashif M. (2014). Synthesis, characterization, theoretical, anti-bacterial and molecular docking studies of quinoline based chalcones as a DNA gyrase inhibitor. *Bioorg. Chem.*, 54:31-37.
- Alós JI. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(10):692-699.
- Amézquita-López BA, Quiñones B, Soto-Beltrán M, Lee BG, Yambao JC, Lugo-Melchor OY & Chaidez C. (2016). Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrob Resist Infect Control*, 5:1
- Arantes PR, Polêto MD, John EB, Pedebos C, Grisci BI, Dorn M & Verli H. (2019). Development of GROMOS-Compatible Parameter Set for Simulations of Chalcones and Flavonoids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 123(5):994-1008.
- Ayman M, El-Messery SM, Habib EE, Al-Rashood ST, Almehizia AA, Alkahtani HM & Hassan GS. (2019). Targeting microbial resistance: synthesis, antibacterial evaluation, DNA binding and modeling study of new chalcone-based dithiocarbamate derivatives. *Bioorg. Chem.*, 85:282-292
- Ban Z, Qin H, Mitchell AJ, Liu B, Zhang F, Weng JK, ... & Wang G. (2018). Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(22):E5223-E5232.
- Banco Mundial. (2018). The Safe Food Imperative: Accelerating Progress in Low- and Middle-Income Countries. The World Bank. Recuperado de: <https://www.worldbank.org/en/topic/agriculture/publication/the-safe-food-imperative-accelerating-progress-in-low-and-middle-income-countries>
- Bandgar BP, Patil SA, Korbad BL, Nile SH & Khobragade CN. (2010). Synthesis and biological evaluation of β -chloro vinyl chalcones as inhibitors of TNF- α and IL-6 with antimicrobial activity. *European journal of medicinal chemistry*, 45(6):2629-2633.
- Barba-Ostria, CA. (2014). Los sistemas de dos componentes: Circuitos moleculares versátiles. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1):62-76.
- Barbosa LN, Rall VL, Fernandes AA, Ushimaru PI, da Silva Probst I & Fernandes Jr A. (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathog Dis*, 6:725–8.
- Barreto M, Castillo-Ruiz M & Retamal P. (2016). *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Rev Chilena Infectol*, 33(5):547-557
- Basnet A, Thapa P, Karki R, Na Y, Jahng Y, Jeong BS, ... Lee ES. (2007). 2, 4, 6-Trisubstituted pyridines: synthesis, topoisomerase I and II inhibitory activity, cytotoxicity, and structure–activity relationship. *Bioorganical & Medicinal Chemistry*, 15:4351-4359
- Bauer, AW, Kirby, WM, Sherris JC, & Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility by standardized single disc method. *Am J. Clin. Pathol.* 45(4):493-96.
- Bentancor AB, Ameal LA, Calviño MF, Martínez MC, Miccio L & Degregorio OJ. (2012). Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in preadolescent schoolchildren in Buenos Aires, Argentina. *J Infect Dev Ctries*, 6:378–386

- Borch E, Kant-Muermans ML & Blixt Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Intl J Food Microbiol*, 33(1):103–20.
- Bryce A, Hay AD, Lane IF, Thornton HV, Wootton M & Costelloe C. (2016). Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 352:i939.
- Cadena-Cruz JE. (2018). Preparación y caracterización de compuestos con estructura de chalconas. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico de Bragança y Universidad de Salamanca, España
- Calloway NO & Green LD. (1937). Reactions in the Presence of Metallic Halides. I. β -Unsaturated Ketone Formation as a Side Reaction in Friedel—Crafts Acylations. *Journal of the American Chemical Society*, 59(5): 809-811.
- Calvo MA, Angulo E, Costa-Batllo P, Shiva C, Adelantado C, & Vicente A. (2006). Natural plant extracts and organic acids: synergism and implication on piglet's intestinal microbiota. *Biotechnology*, 5(2):137-142
- Canizalez-Roman A, Gonzalez-Nuñez E, Vidal JE, Flores-Villaseñor H & León-Sicairos N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *Int J Food Microbiol*. 164:36–45
- Carattoli A, Tosini F, Giles WP, Rupp ME, Hinrichs SH, Angulo FJ, Barrett TJ & Fey PD. (2002). Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46:1269–1272.
- Carrasco E, Morales-Rueda A, García-Gimeno RM. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45:545-556
- Carvalho SA, Feitosa LO, Soares M, Costa TE, Henriques MG, Salomão K, ... & Wardell SM. (2012). Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *European journal of medicinal chemistry*, 54:512-521.
- Casaburi A, Martino VD, Ercolini D, Parente E & Villani F. (2015). Antimicrobial activity of *Myrtus communis* L. water-ethanol extract against meat spoilage strains of *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fragi* *in vitro* and in meat. *Annals of Microbiology*, 65(2):841–50
- Castro-Alcocer GE. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas y flores de Iso (*Dalea mutisii*). (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Celis F. (2017). Bayer lanzará productos contra plagas en México. Forbes. Recuperado de <https://www.forbes.com.mx/bayer-lanzara-productos-contra-plagas-en-mexico/>
- Chaudhary AS. (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(6):552-556.
- Chen S. (2013). Identification of the Enteric Organism *Salmonella typhimurium*. Rutgers University. Recuperado de <http://static1.squarespace.com/static/547fe1d4be4b0a782f71f75ef/t/54e2893ae4b0406fb3dffbc4/1424132410535/Microbiology.pdf>
- Chiaradia LD, Martins PGA, Cordeiro MNS, Guido RVC, Ecco G, Andricopulo AD, Yunes RA, Vernal J, Nunes RJ & Terenzi H.(2012). Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). *J. Med. Chem.*, 55:390-402
- Chiu CH, Wu TL, Su LH, Chu C, Chia JH, Kuo AJ, Chien MS & Lin TY. (2002). The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype choleraesuis. *The New England Journal of Medicine*, 346:413-419

- Claisen L & Claparède A. (1881). Condensationen von ketonen mit aldehyden. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 14(2):2460-2468.
- Coburn B, Grassl GA & Finlay BB. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol*, 85:112–118
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M & Finlay BB. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4):822-880.
- Custodio JM, Michelini LJ, de Castro MRC, Vaz WF, Neves BJ, Cravo PV, ... & Napolitano HB. (2018). Structural insights into a novel anticancer sulfonamide chalcone. *New Journal of Chemistry*, 42(5):3426-3434.
- Dan W & Dai J. (2020). Recent developments of chalcones as potential antibacterial agents in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 187:1-20
- De Simone A, Bartolini M, Baschieri A, Apperley KY, Chen HH, Guardigni M, ... & Andrisano V. (2017). Hydroxy-substituted trans-cinnamoyl derivatives as multifunctional tools in the context of Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, 139:378-389.
- Desai V, Desai S, Gaonkar SN, Palyekar U, Joshi SD & Dixit SK. (2017). Novel quinoxaliny chalcone hybrid scaffolds as enoyl ACP reductase inhibitors: synthesis, molecular docking and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 27:2174-2180.
- Deshmukh AY, Raghuvanshi PB & Doshi AG. (2003). Synthesis of New 2, 3-Disubstituted Quinoxalines from 4, 4-Substituted Chalcones. *Asian Journal of Chemistry*, 15(2):821.
- Dou YY, Xie YF & Tang LF. (2008). Synthesis, electrochemical properties and fungicidal activity of 1,1'-bis (aroyl) ferrocenes and their derivatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 22(1):25-29.
- Ducki S, Mackenzie G, Lawrence NJ & Snyder JP. (2005). Quantitative structure– activity relationship (5D-QSAR) study of combretastatin-like analogues as inhibitors of tubulin assembly. *Journal of medicinal chemistry*, 48(2):457-465.
- Duffy G, Cummins E, Nally P, O'Brien S & Butler F. (2006). A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Sci*, 74:76-88
- Eblen DR, Barlo KE & Naugle AL. (2006). U.S. Food Safety and Inspection Service testing for *Salmonella* in selected raw maeat and poultry products in the United States, 1998 through 2003: An establishment-levels análisis. *Journal of Food Protection*, 69:2600-2606
- Efenberger-Szmechtyk M, Nowak A & Czyzowska A. (2020). Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-30
- Eng SK, Pusparajah P, Ab-Mutalib NS, Ser HL, Chan KG & Lee LH. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3):284-293
- Erdem B, Ercis S, Hascelik G, Gur D, Gedikoglu S, Aysev AD, Sumerkan B, Tatman-Otkun M & Tuncer I. (2005). Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000–2002. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 24:220–225
- Fàbrega A & Vila J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2):308-341
- Fagundes-Neto U & Scaletsky ICA. (2000). The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *São Paulo Med J*, 118:21–29
- Fairbrother RW & Martyn G. (1951). The disc technique for determining sensitivity to the antibiotics. *Journal of clinical pathology*, 4(3), 374.

- Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA & Vargas-Remolina LV. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450.
- Fegan N & Jenson I. (2018). The role of meat in foodborne disease: Is there a coming revolution in risk assessment and management? *Meat Science*, 144:22-29
- Feng L, Maddox MM, Alam MZ, Tsutsumi LS, Narula G, Bruhn DF, Wu XQ, Sandhaus S, Lee RB, Simmons CJ, Tse-Dinh YC, Hurdle JG, Lee RE & Sun DQ. (2014). Synthesis, structure-activity relationship studies, and antibacterial evaluation of 4-chromanones and chalcones, as well as olympicin A and derivatives. *J. Med. Chem.*, 57:8398-8420.
- Fernández-Canigia L & Dowzicky MJ. (2012). Susceptibility of important Gram-negative pathogens to tigecycline and other antibiotics in Latin America between 2004 and 2010. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 11:29
- Galli L, Brusa V, Rodríguez R, Signorini M, Oteiza JM & Leotta GA. (2016). *Escherichia coli* in Food Products. En Torres AG. (Ed). *Escherichia coli* in the Americas (pp. 173-203). Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-45092-6_8
- Girón JA, Ho AS & Schoolnik GK. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 254(5032):710–713
- Golay, MJ. (1964). Note on Gas Chromatographic Injection. *Nature*, 202(4931):489-490.
- Gómez-Aldapa CA, Torres-Vitela M, Acevedo-Sandoval OA, Rangel-Vargas E, Villarruel-López A & Castro-Rosas A. (2013). Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteroinvasive *E. coli*, enteropathogenic, *E. coli*, and enterotoxigenic *E. coli* on tomatoes from public markets in Mexico. *J Food Prot*. 76:1621–1625
- Gould JC & Bowie JH. (1952). The determination of bacterial sensitivity to antibiotics. *Edinburgh medical journal*, 59(4):178.
- Grimont PAD & Weill FX. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th revision. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- Guerra B, Soto S, Helmuth R & Mendoza MC. (2002). Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:2977–2981.
- Güerri-Santos MJ. (2002). Estudio de la resistencia a antibióticos beta-lactámicos en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Hafez T, Osman S, Yosef H, El-Ail A, Hassan A, El-Sawy A, ... & Youns M. (2013). Synthesis, structural elucidation, and in vitro antitumor activities of some pyrazolopyrimidines and Schiff bases derived from 5-amino-3-(arylamino)-1H-pyrazole-4-carboxamides. *Scientia pharmaceutica*, 81(2):339-358.
- Hammer KA, Carson CF, & Riley TV. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol*. 86(6):985-90
- Hasaninejad A, Zare A, Balooty L, Mehregan H & Shekouhy M. (2010). Solvent-free, Cross-Aldol condensation reaction using silica-supported, phosphorus-containing reagents leading to α , α' -bis (arylidene) cycloalkanones. *Synthetic Communications*, 40(23):3488-3495.
- Hassan AS, Hafez TS, Osman SAM & Ali MM. (2015). Synthesis and in vitro cytotoxic activity of novel pyrazolo pyrimidines and related Schiff bases. *Turkish Journal of Chemistry*, 39(5):1102-1113.
- Helgren TR, Xu LL, Sotelo D, Mehta YR, Korkmaz MA, Pavlinov I & Aldrich LN. (2018). Microwave-Assisted, Asymmetric Synthesis of 3-Amino-2, 3-Dihydrobenzofuran Flavonoid Derivatives from Chalcones. *Chemistry–A European Journal*, 24(18):4509-4514.
- Holmberg SD, Osterholm MT, Senger KA & Cohen ML. (1984). Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *The New England Journal of Medicine*, 311(10):617–622.

Holmberg SD, Solomon SL & Blake PA. (1987). Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Reviews of infectious diseases*, 9(6):1065-1078.

Hu G, Li X, Zhang X, Li Y, Ma L, Yang LM, ... & Tang Y. (2012). Discovery of inhibitors to block interactions of HIV-1 integrase with human LEDGF/p75 via structure based virtual screening and bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55:10108-10117.

Hussain RA., Badshash A, Sohail M, Lal B & Altaf AA. (2013). Synthesis, chemical characterization, DNA interaction and antioxidant studies of ortho, meta and para fluoro substituted ferrocene incorporated selenoureas. *Inorganica Chimica Acta*, 402:133-139.

Hyeon JY, Chon JW, Hwang IG, Kwak HS, Kim MS, Kim SK, Choi S, Song CS, Park C & Seo KH. (2011). Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in retail meat products. *J Food Prot*, 74:161–166.

Iranpoor N & Kazemi F. (1998). RuCl₃ catalyses aldol condensations of aldehydes and ketones. *Tetrahedron*, 54(32):9475-9480.

ISO/TS 13136:2012. (2012). Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

Itoh T, Shirakami S, Ishida N, Yamashita Y, Yoshida T, Kim HS & Wataya Y. (2000). Synthesis of novel ferrocenyl sugars and their antimalarial activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(15):1657-1659.

Jandhyala DM, Thorpe CM & Magun B. (2012). Ricin and Shiga toxins: effects on host cell signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol*, 357:41–65

Jiménez-Corona ME. (2018). Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Secretaría de Salud. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/334668/7._Vigilancia_Epidemiol_gica-Ma._Eugenia-DGE-SSA.pdf

Kalule JB, Fortuin S, Calder B, Robberts L, Keddy KH, Nel AJ, ... & Blackburn JM. (2018). Proteomic comparison of three clinical diarrhoeagenic drug-resistant *Escherichia coli* isolates grown on CHROMagar™ STEC media. *Journal of proteomics*, 180: 25-35.

Kaper JB, Nataro JP & Mobley HLT. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2):123–140

Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J & Hart CA. (2006). Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *BMC Microbiol*, 6:101

Kazemizadeh AR, Shajari N, Shapouri R, Adibpour N, Teimuri-Mofrad R & Dinmohammadi P. (2016). One-pot, four-component synthesis of 1, 3, 4-oxadiazole derivatives containing a ferrocene unit and their antimicrobial activity. *Applied Organometallic Chemistry*, 30(3):148-153.

Kim SJ, Min SC, Shin HJ, Lee YJ, Cho AR, Kim SY & Han J. (2013). Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef. *Meat Sci*, 93(3):715–22.

Kucerova-Chlupacova M, Dosedel M, Kunes J, Soltsova-Prnova M, Majekova M & Stefek M. (2018). Chalcones and their pyrazine analogs: Synthesis, inhibition of aldose reductase, antioxidant activity, and molecular docking study. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 149(5):921-929.

Kulkarni P. (2015). Calcium oxide catalyzed synthesis of chalcone under microwave condition. *Current Microwave Chemistry*, 2(2):144-149.

Kumar S & Makrandi JK. (2005). Cyclization of 2'-Hydroxychalcones in Dimethyl Sulphoxide. *Asian Journal of Chemistry*, 17(2):1293.

- Laos EV & Gonzalez A. (1995). Reacción de Claisen-Schmidt para la obtención de chalconas. *Revista de Química*, 9(2):137-143.
- Lee GS & Hong SH. (2018). Formal Giese addition of C(sp³)-H nucleophiles enabled by visible light mediated Ni catalysis of triplet enone diradicals. *Chemical science*, 9(26):5810-5815.
- Lee MS, Kim MH & Tesh VL. (2013). Shiga toxins expressed by human pathogenic bacteria induce immune responses in host cells. *J Microbiol*, 51:724–730
- Levine MM & Edelman R. (1984). Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev*, 6:31–51
- Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, et. al. (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*, 1(8074):1119-1122
- Li N, Dong XY, Zhang JL, Yang KF, Zheng ZJ, Zhang WQ, ... & Xu LW. (2017). Graphene-enhanced platinum-catalysed hydrosilylation of amides and chalcones: a sustainable strategy allocated with in situ heterogenization and multitask application of H₂ PtCl₆. *RSC Advances*, 7(80):50729-50738.
- Li X, Sheng JZ, Huang GH, Ma RX, Yin FX, Song D, Zhao C & Ma ST. (2015). Design, synthesis and antibacterial activity of cinnamaldehyde derivatives as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ. *Eur. J. Med. Chem*, 97:32-41
- Liu XF & Shi DH. (2009). Research progress in the synthesis of chalcone. *Appl. Chem. Ind*, 38:1210-1213.
- Liu XL, Zhao ZG, Zeng BT & Yi FM. (2007). Microwave-assisted synthesis of chalcones under solvent-free conditions. *Chemical Research and Application*, 19(5):574.
- Liu YF, Yan JJ, Lei HY, Teng CH, Wang MC, Tseng CC & Wu JJ. (2012). Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. *Infection and Immunity*, 80(5):1815-1822.
- Llamas-García AJ. (2018). Identificación de metabolitos secundarios de Baja California Sur con actividad antibacteriana en cepas de interés clínico y su potencial uso farmacológico. (Tesis de maestría). Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*; 380:2095–128.
- Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH et. al. (2014). Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect*, 142:2270–2280
- Mahapatra DK, Bharti SK, Asati V & Singh SK. (2019). Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. *European journal of medicinal chemistry*, 174: 142-158.
- Majeed A & Moser K. (1999). Age-and sex-specific antibiotic prescribing patterns in general practice in England and Wales in 1996. *Br J Gen Pract*, 49(446):735-736.
- Maldonado T, Ferraudi G, Lappin AG & Godoy F. (2018). Kinetic and Mechanistic Observations on the Photoinduced Isomerization Reaction of Organometallic Chalcones: A Steady State and Flash Photolysis Study. *ChemPhotoChem*, 2(2):95-104.
- Maqsood S & Benjakul S. (2010). Preventive effect of tannic acid in combination with modified atmospheric packaging on the quality losses of the refrigerated ground beef. *Food Control*, 21:1282-90.
- Martins PGA, Menegatti ACO, Chiaradia-Delatorre LD, Oliveira KN, Guido RVC, Andricopulo AD, Vernal J, Yunes RA, Nunes RJ & Terenzi H. (2013). Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 64:35-41

- Mascarello A, Chiaradia LD, Vernal J, Villarino A, Guido RVC, Perizzolo P, Poirier V, Wong D, Martins PGA, Nunes RJ, Yunes RA, Andricopulo AD, Av-Gay Y & Terenzi H. (2010). Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorg. Med. Chem.*, 18:3783-3789.
- Mazza LJ & Guarna A. (1980). An improved synthesis of 1, 3-diphenyl-2-buten-1-ones (β -methylchalcones). *Synthesis*, 1980(1):41-44.
- Mele C, Remuzzi G & Noris M. (2014). Hemolytic uremic syndrome. *Semin Immunopathol*, 36:399-420
- Melton-Celsa AR. (2014). Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr*, 2(3):EHEC-0024-2013
- Mhalla D, Bouaziz A, Ennouri K, Chawech R, Smaoui S, Jarraya R, Tounsi S & Trigui M. (2017). Antimicrobial activity and bioguided fractionation of *Rumex tingitanus* extracts for meat preservation. *Meat Sci*, 125:22-9.
- Mi H, Wang D, Xue Y, Zhang Z, Niu J, Hong Y, Drlica K & Zhao X. (2016). Dimethyl sulfoxide protects *Escherichia coli* from rapid antimicrobial-mediated killing. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(8):5054-5058.
- Molitor C, Mauracher SG & Rompel A. (2016). Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13):E1806-E1815.
- Monack DM, Mueller A & Falkow S. (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol*, 2:747-765.
- Moreira PL, Lourencao TB, Pinto JP & Rall VL. (2009). Microbiological quality of species marketed in the city of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. *Journal of Food Protection*, 72:421-424
- Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* -associated diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 28:648-656
- Muškinja J, Burmudžija A, Ratković Z, Ranković B, Kosanić M, Bogdanović GA & Novaković SB. (2016). Ferrocenyl chalcones with O-alkylated vanillins: synthesis, spectral characterization, microbiological evaluation, and single-crystal X-ray analysis. *Medicinal Chemistry Research*, 25(9):1744-1753.
- Nakano T, Irifune S, Umamo S, Inada A, Ishii Y & Ogawa M. (1987). Cross-condensation reactions of cycloalkanones with aldehydes and primary alcohols under the influence of zirconocene complexes. *The Journal of Organic Chemistry*, 52(11):2239-2244.
- Narender T & Reddy KP. (2007). A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron letters*, 48(18):3177-3180.
- Nataro JP & Kaper JB. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11(1):142-201
- Nielsen AT & Houlihan WJ. (2004). The aldol condensation. *Organic reactions*, 16:1-438.
- Nielsen SF, Larsen M, Boesen T, Shonning K & Kromann H. (2005). Cationic chalcone antibiotics. Design, synthesis and mechanism of action. *J Med Chem*, 48: 2667-2677
- Nyati M, Rao NS, Srivastava YK & Verma BL. (2006). Synthesis of some benzimidazolyl chalcones. *Asian Journal of Chemistry*, 18(1):757.
- Ochoa TJ & Gómez-Duarte OG. (2016). Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. En Torres AG. (Ed). *Escherichia coli in the Americas* (pp. 301-322). Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-45092-6_8
- OMS. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- OMS. (2015). Foodborne diseases. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2
- OMS. (2018). *E. coli*. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- OMS. (2018). Resistencia a los antibióticos. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- OMS. (2018). *Salmonella* (no tifoidea). Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Resistencia a los antibióticos. Consultado el 24 de noviembre de 2019 en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Pape L, Hartmann H, Bange FC, Suerbaum S, Bueltmann E & Ahlenstiel-Grunow T. (2015). Eculizumab in typical hemolytic uremic syndrome (HUS) with neurological involvement. *Medicine*, 94(24).
- Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V & Stefan G. (2017). Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: classification, structures, sources, and action mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16:1243-1268.
- Park S, Kim EH, Kim J, Kim SH & Kim I. (2018). Biological evaluation of indolizine-chalcone hybrids as new anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 144:435-443.
- Pascual ZA & González SC. (2018). Síntesis de Chalconas: Estructuras Privilegiadas en la Síntesis de Heterociclos con Actividad Biológica. *Psychologia Latina*, 20-23.
- Patel DD & Lee JM. (2012). Applications of ionic liquids. *The Chemical Record*, 12(3):329-355.
- Prescott H, et al. (1999). Microbiología. Mc GrawHill Interamericana, 4a. ed., Madrid, España. Pp.82-87.
- Preti D, Romagnoli R, Rondanin R, Cacciari B, Hamel E, Balzarini J, ... & Estévez F. (2018). Design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and apoptosis-inducing studies of 1-(3', 4', 5'-trimethoxyphenyl)-3-(2'-alkoxycarbonylindolyl)-2-propen-1-one derivatives obtained by a molecular hybridisation approach. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 33(1):1225-1238.
- Purser S, Moore PR, Swallow S & Gouverneur V. (2008). Fluorine in medicinal chemistry. *Chemical Society Reviews*, 37(2):320-330.
- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG & Sack RB. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*, 18(3):465-483.
- Quiroz-Santiago C, Rodas-Suárez OR, Carlos RV, Fernández FJ, Quiñones-Ramírez EI & Vázquez-Salinas C. (2009). Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection*, 72:1279-1282
- Rangel-Vargas E, Gómez-Aldapa CA, Torres-Vitela M, Villarruel-López A, Gordillo-Martínez AJ & Castro-Rosas J. (2015). Presence and correlation of some enteric indicator bacteria, diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes, and *Salmonella* serotypes in alfalfa sprouts from local retail markets in Pachuca, Mexico. *J Food Prot.*, 78:609-614
- Rateb NM & Zohdi HF. (2009). Atom-efficient, solvent-free, green synthesis of chalcones by grinding. *Synthetic Communications*, 39(15):2789-2794.
- Reddy DS, Hosamani KM & Devarajegowda HC. (2015). Design, synthesis of benzocoumarin-pyrimidine hybrids as novel class of antitubercular agents, their DNA cleavage and X-ray studies. *European journal of medicinal chemistry*, 101:705-715.

- Reddy PV, Hridhay M, Nikhil K, Khan S, Jha PN, Shah K & Kumar D. (2018). Synthesis and investigations into the anticancer and antibacterial activity studies of β -carboline chalcones and their bromide salts. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 28(8):1278-1282.
- Ríos-Muñiz D, Cerna-Cortés JF, Morán-García N, Meza-Segura M & Estrada-García T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *Gaceta medica de México*, 155(4): 410-416.
- Rivas M, Chinen I & Guth BEC. (2016). Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*. En Torres AG. (Ed). *Escherichia coli* in the Americas (pp. 97-123). Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-45092-6_8
- Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HA & Masana M. (2011). Epidemiology of Argentinean STEC. In: Walk S, Feng P (eds) *Bacterial population genetics: a tribute to Thomas S. Whittam*. ASM Press, Washington, DC, pp 109-132
- Rocchi D, González JF & Menéndez JC. (2014). Montmorillonite clay-promoted, solvent-free cross-aldol condensations under focused microwave irradiation. *Molecules*, 19:7317-7326.
- Rodríguez-Angeles G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5):464-475
- Romagnoli R, Prencipe F, Lopez-Cara LC, Oliva P, Baraldi S, Baraldi PG, ... & Estévez F. (2018). Synthesis and biological evaluation of alpha-bromoacryloylamido indolyl pyridinyl propenones as potent apoptotic inducers in human leukaemia cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 33(1):727-742.
- Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J, Kohli DV. (2012). Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Current Medicinal Chemistry*, 19:209-225.
- Sashidhara KV, Avula SR, Mishra V, Palnati GR, Singh LR, Singh N, ... & Bhatta RS. (2015). Identification of quinoline-chalcone hybrids as potential antiulcer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 89:638-653.
- Scaletsky ICA & Fagundes-Neto U. (2016). Typical Enteropathogenic *Escherichia coli*. En Torres AG. (Ed). *Escherichia coli* in the Americas (pp. 59-76). Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-45092-6_8
- Scheutz F. (2014). Taxonomy meets public health: the case of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 2(4):EHEC-0019-2013
- Schmidt JG. (1881). Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl bei Gegenwart von Alkalilauge. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 14(1):1459-1461.
- SDA MLG 5B.05 (2015) Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges. <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>
- Sebti S, Solhy A, Smahi A, Kossir A & Oumimoun H. (2002). Dramatic activity enhancement of natural phosphate catalyst by lithium nitrate. An efficient synthesis of chalcones. *Catalysis Communications*, 3(8):335-339.
- Seo W, Ryu Y, Curtis-Long M, Lee C, Ryu H & Jang K. (2010). Evaluation of anti-pigmentary effect of synthetic sulfonylamino chalcone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(5):2010-2017.
- Shan B, Cai YZ, Brooks JD & Corke H. (2009). Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11):1879-85.
- Sharma H, Patil S, Sanchez TW, Neamati N, Schinazi RF & Buolamwini JK. (2011). Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of 3-keto salicylic acid chalcones and related amides as novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(6):2030-2045.

- Shelke SN, Dalvi NR, Gill CH & Karale BK. (2007). Synthesis of various heterocycles from 3-(naphthylene-3-yl)-1H-pyrazol-4-carbaldehyde. *Asian Journal of Chemistry*, 19(7):5068.
- Shiva-Ramayuni, CM. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos inorgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. (Tesis doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona. España
- Signorini ML & Fizzo LS. (2009). Modelo de contaminación cruzada por *Escherichia coli* verocitotoxigénica durante la elaboración de hamburguesas caseras y evaluación cuantitativa de riesgos. *Rev Argent Microbiol*, 41:237-244
- Singh G, Arora A, Kalra P, Maurya IK, Ruizc CE, Estebanc MA, ... & Sehgal R. (2019). A strategic approach to the synthesis of ferrocene appended chalcone linked triazole allied organosilatrane: Antibacterial, antifungal, antiparasitic and antioxidant studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(1):188-195.
- Sivakumar PM, Priya S & Doble M. (2009). Synthesis, biological evaluation, mechanism of action and quantitative structure-activity relationship studies of chalcones as antibacterial agents. *Chem Biol Drug Des*, 73: 403-415
- Smith JP, Daifas DP, El-Khry W, Koukoutsis J & El-Khry A. (2004). Shelf life and safety concerns of bakery products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:19-55
- Spears KJ, Roe AJ & Gally DL. (2006). A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS microbiology letters*, 255(2), 187-202.
- Spinale JM, Ruebner RL, Copelovitch L et. al. (2013). Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 28:2097-2105
- Subramanian K, Selvakkumar C, Vinaykumar KS, et. al. (2009). Tackling multiple antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates: a diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* shows promising antibacterial and immunomodulatory activity against EPEC and its lipopolysaccharide-induced inflammation. *Int J Antimicrob Agents*, 33:244-250
- Sultanbawa Y. (2011). Plant antimicrobials in food applications: Minireview. In: Mendez-Vilas A editor. Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2:1084-99.
- Swartz MN. (2002). Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clinical Infectious Disease*, 34:111-122.
- Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ & McDermott PF. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infect Dis*, 18:741-749
- Takaya A, Suzuki M, Matsui H, Tomoyasu T, Sashinami H, Nakane A & Yamamoto T. (2003). Lon, a stress-induced ATP dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice. *Infect Immun*, 71:690-696.
- Talukdar JI, Kachroo M & Razdan R. (2013). Antiinflammatory activity of some newly synthesized chalcones. *International Journal of Pharmacy*, 3:728-733.
- Tan CH, Zheng RX, Luo SY & Xin QY. (2012). Synthesis of Chalcone Catalyzed by P-toluenesulfonic Acid. *Contemporary Chemical Industry*, 1.
- Tan MY, Crouse KA, Ravoo TB, Jotani MM & Tiekink ER. (2017). 1-((E)-[(2E)-3-(4-Methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-ylidene] amino)-3-phenylurea: crystal structure and Hirshfeld surface analysis. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 73(11):1607-1611.
- Terajima J, Iyoda S, Ohnishi M et. al. (2014). Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* in Japan. *Microbiol Spectr*, 2(5):EHEC-0011-2013

- Thompson A, Fulde M & Tedin K. (2018). The metabolic pathways utilized by *Salmonella Typhimurium* during infection of host cells. *Environmental Microbiology Reports*, 10(2):140-154
- Torpdahl M, Tsai-Ling L, Shiu-Yun L, Ishien L, Sung-Hsi W & Chien-Shun C. (2013). Human Isolates of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium from Taiwan Displayed Significantly Higher Levels of Antimicrobial Resistance than Those from Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2):69-75.
- Voetsch AC, Kennedy MH, Keene WE, Smith KE, Rabatsky-Her T, Zansky S, Thomas SM, MohleBoetani J, Sparling PH, McGavern MB & Mead PS. (2007). Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in FoodNet sites, 1999-2000. *Epidemiol Infect*, 135:993-1000
- Voloski FL, Tonello L, Ramires T, Reta GG, Dewes C, Iglesias M, Mondadori RG, Gandra EA, da Silva WP & Duval EH. (2016). Influence of cutting and deboning operations on the microbiological quality and shelf life of buffalo meat. *Meat Sci*, 116:207-12.
- Wang Y, Li F, Zhuang H, Chen X, Li L, Qiao W & Zhang J. (2015). Effects of plant polyphenols and α -tocopherol on lipid oxidation, residual nitrites, biogenic amines, and N-nitrosamines formation during ripening and storage of dry-cured bacon. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1):199-206
- Wilson IG. (2002). *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of raw retail chickens from different producers: A six year survey. *Epidemiology and Infection*, 129:636-645.
- Wray C & Sojka WJ. (1978). Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves. *Res. Vet. Sci*, 25:139-143
- Wu X, Wilairat P & Go ML. (2002). Antimalarial activity of ferrocenyl chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12:2299-2302
- Xu M, Wu P, Shen F, Ji J & Rakesh KP. (2019). Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. *Bioorganic chemistry*, 91:103133.
- Xu Q, Yang Z, Yin D & Zhang F. (2008). Synthesis of chalcones catalyzed by a novel solid sulfonic acid from bamboo. *Catalysis Communications*, 9(7):1579-1582.
- Yadav P, Lal K, Kumar L, Kumar A, Paul AK & Kumar R. (2018). Synthesis, crystal structure and antimicrobial potential of some fluorinated chalcone-1,2,3-triazole conjugates. *Eur. J. Med. Chem.*, 155:263-274
- Yang W & Du DM. (2010). Highly enantioselective Michael addition of nitroalkanes to chalcones using chiral squaramides as hydrogen bonding organocatalysts. *Organic letters*, 12(23):5450-5453.
- Yin BT, Yan GY, Peng XM, Zhang SL, Rasheed S, Geng RX & Zhou CH. (2014). Synthesis and biological evaluation of α -triazolyl chalcones as a new type of potential antimicrobial agents and their interaction with calf thymus DNA and human serum albumin. *Eur. J. Med. Chem*, 71:148-159
- Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C & Miao Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical reviews*, 117(12):7762-7810.

XV. Anexos

Anexo 1

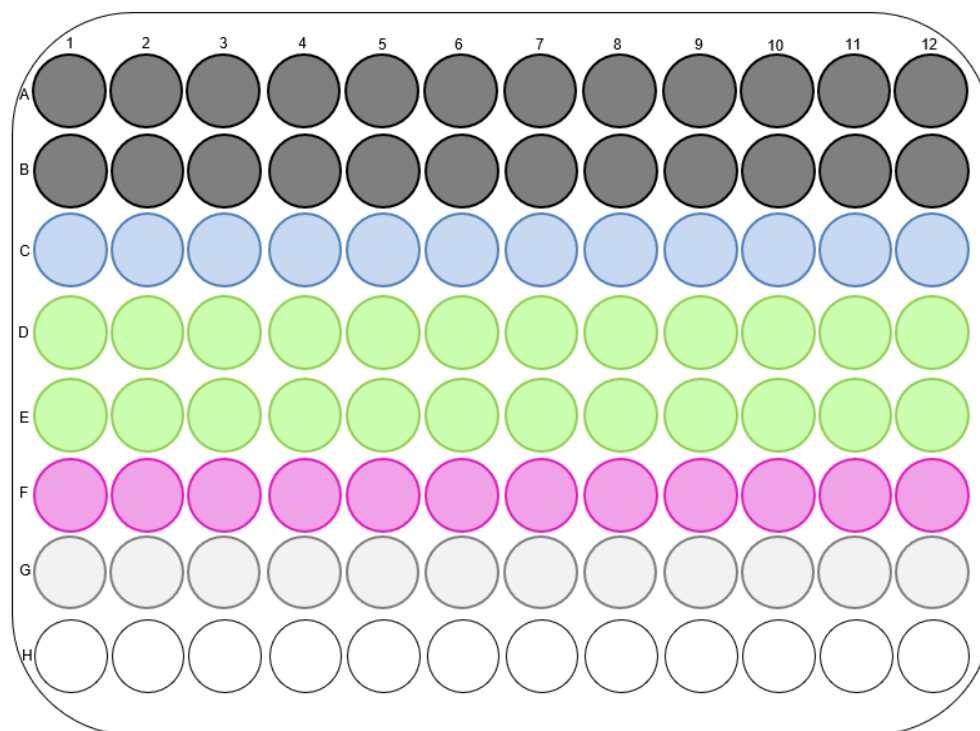


Figura 12. Esquema del ensayo de microdilución. El color negro representa los pocillos con las ferrochalconas, el color azul los pocillos del cultivo basal (control negativo), el color verde los pocillos para el control de contaminación, el color morado los pocillos con antibióticos (control positivo) y el color gris los pocillos sin DMSO.

Anexo 2

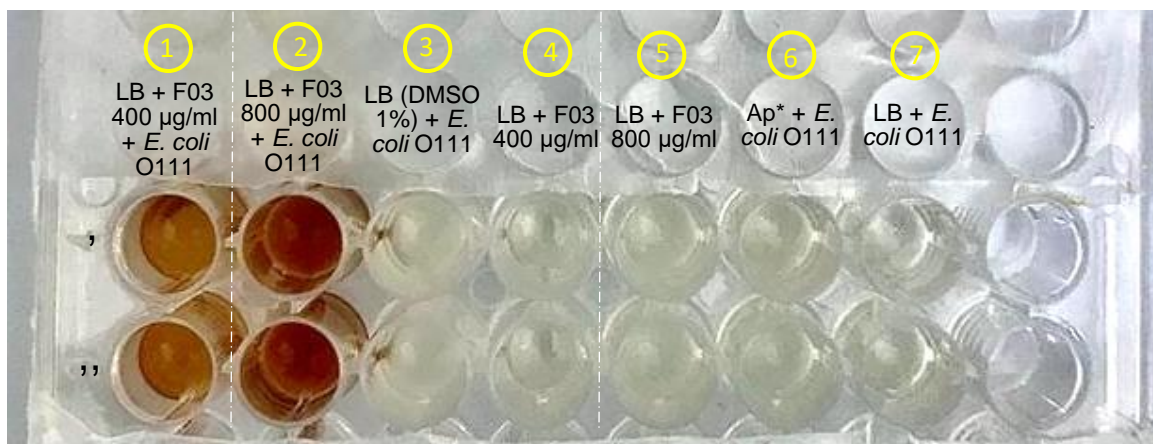


Figura 13. Ejemplo de un ensayo de microdilución donde se evaluó la actividad antibacteriana de la ferrochalcona F03 contra Escherichia coli O111. De izquierda a derecha se muestran: 1) y 2) E. coli O111 con F03 a 400 µg/ml y 800 µg/ml, respectivamente, el color café anaranjado se debe a la naturaleza de la ferrochalcona. 3) Control negativo=recuento basal de E. coli O111. 4) y 5) Controles de contaminación para evaluar la esterilidad de F03. 6) Control positivo= E. coli O111 con ampicilina (Ap*). 7) Control para ver si existía algún efecto del DMSO en el crecimiento de E. coli O111. La comilla sencilla y doble representan el número de replicaciones del ensayo. Fuente: Elaboración propia

Anexo 3

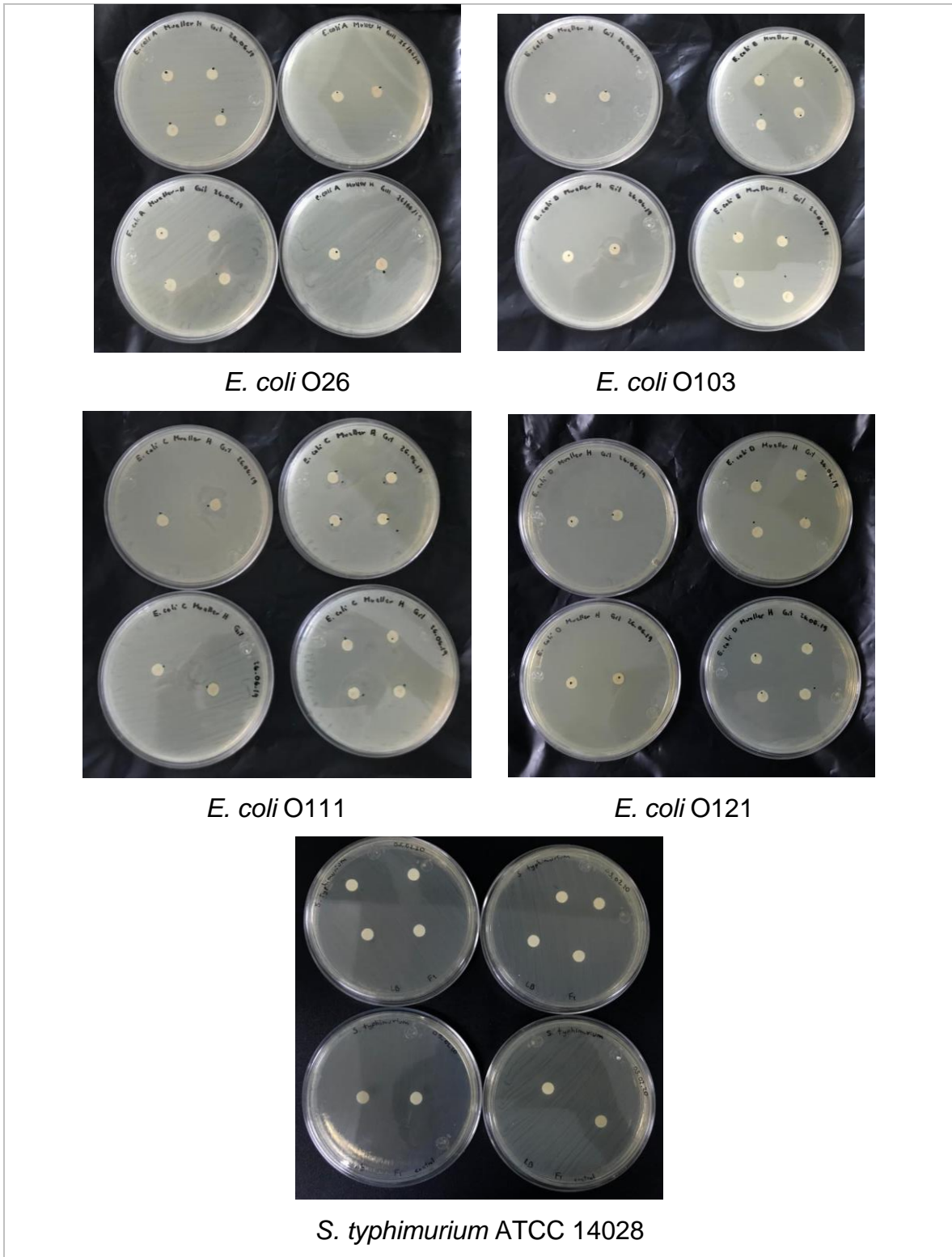


Figura 14. Antibiogramas de la evaluación de la ferrochalcona F01 con todas las cepas evaluadas. Se muestran las diferentes concentraciones de F01 y los controles.

Anexo 4

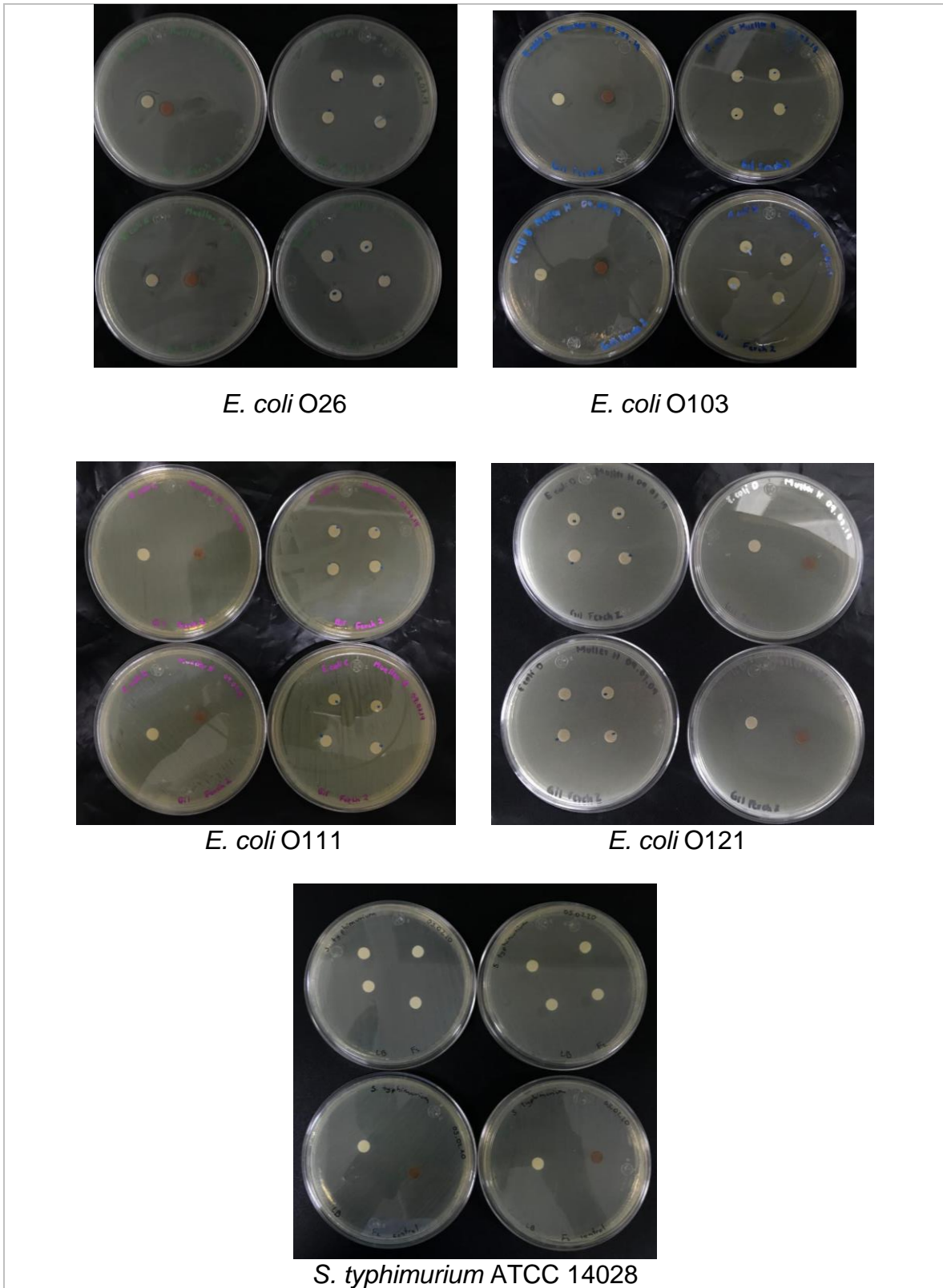


Figura 15. Antibiogramas de la evaluación de la ferrochalcona F02 con todas las cepas evaluadas. Se muestran las diferentes concentraciones de F02 y los controles.

Anexo 5

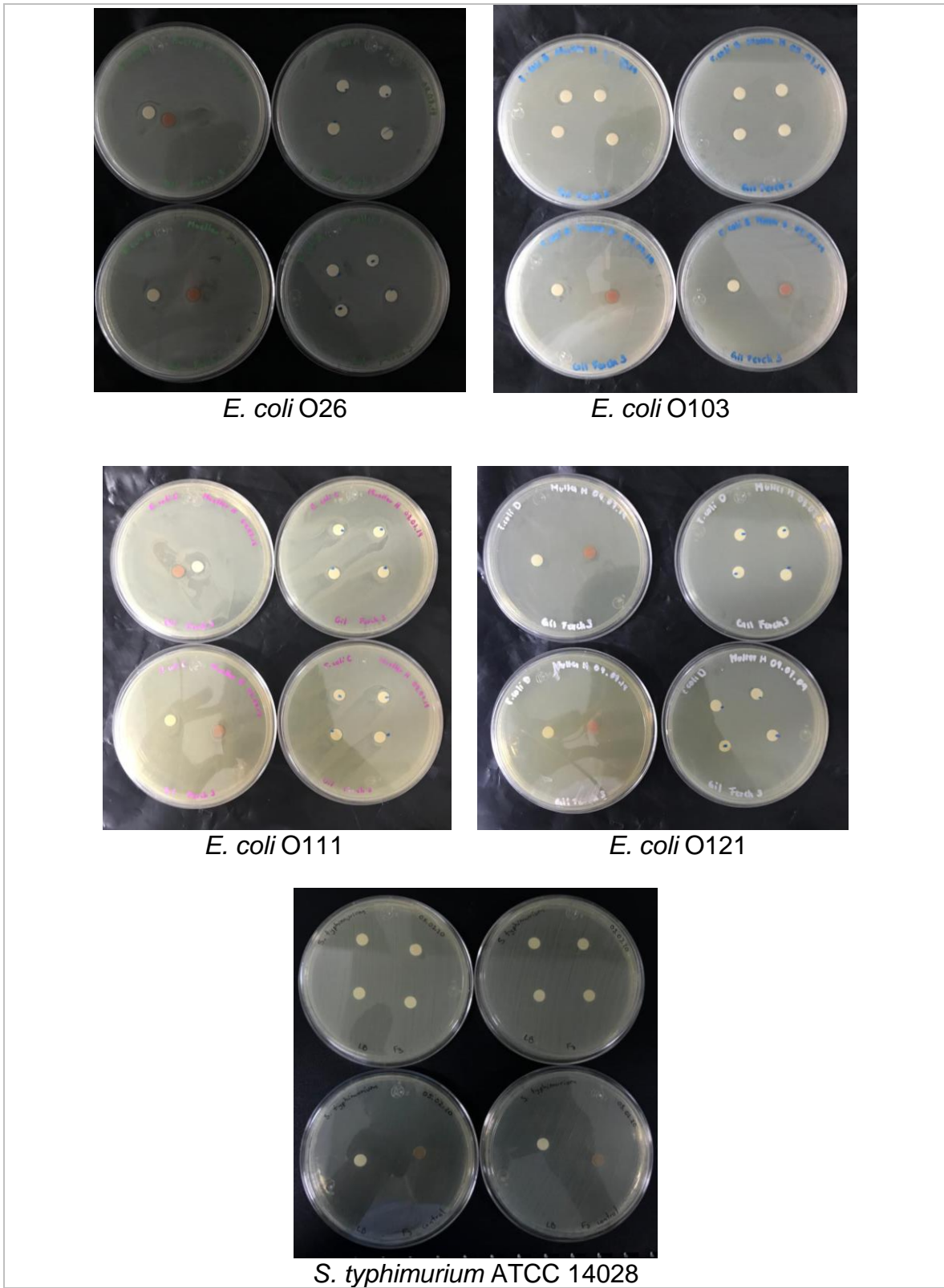


Figura 16. Antibiogramas de la evaluación de la ferrochalcona F03 con todas las cepas evaluadas. Se muestran las diferentes concentraciones de F03 y los controles.

Anexo 6

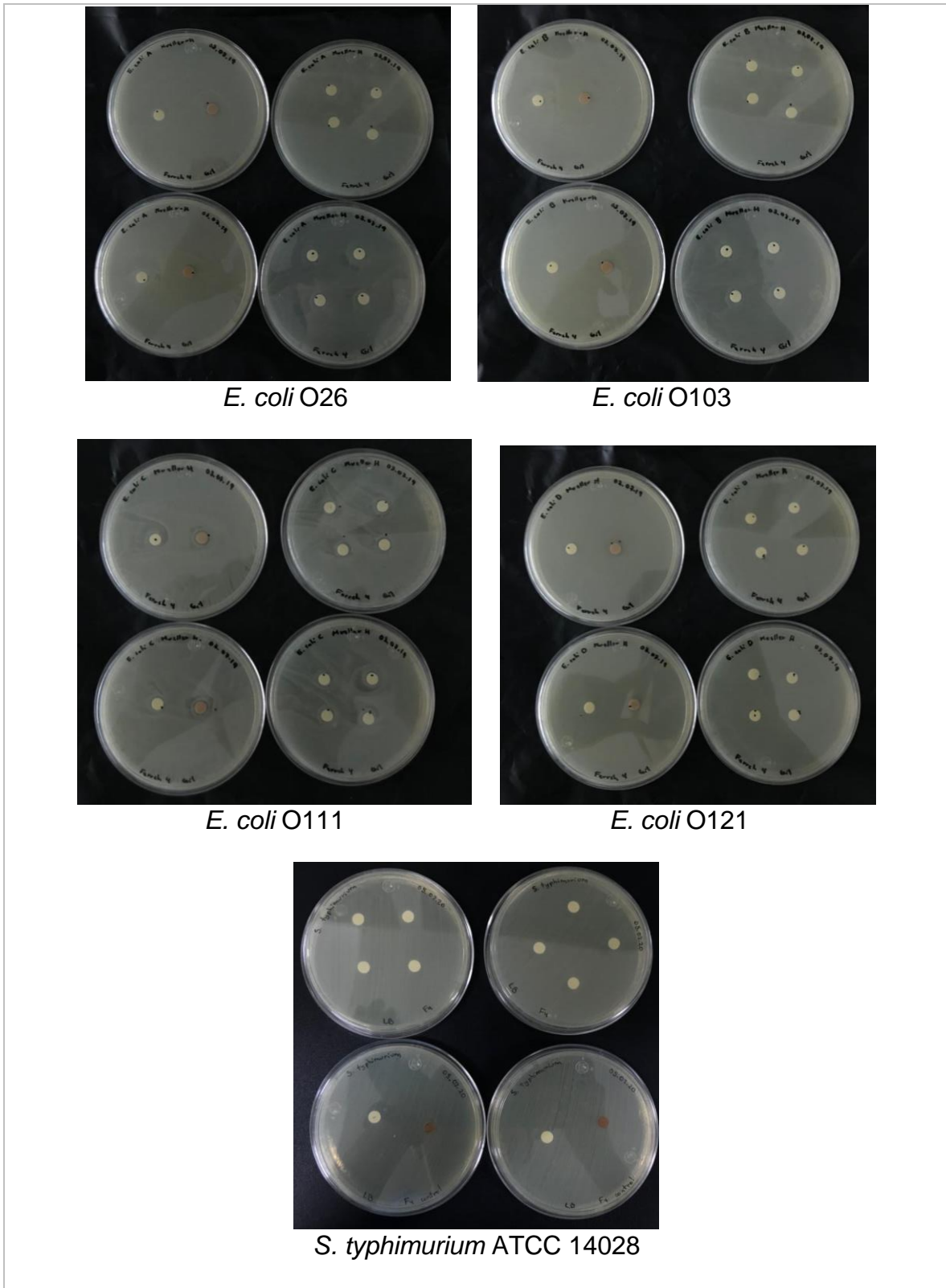


Figura 17. Antibiogramas de la evaluación de la ferrochalcona F04 con todas las cepas evaluadas. Se muestran las diferentes concentraciones de F04 y los controles.