

Actividad antimicrobiana y antibiofilm del extracto vegetal *Sambucus canadensis* en bacterias patógenas transmitidas por alimentos

Antimicrobial and antibiofilm activity of extract vegetal *Sambucus canadensis* in food-borne pathogenic bacteria

Guadalupe Velázquez-Vázquez^{1,2} , Elena Ortega Morente³ , Antonio Cobo Molinos^{3,4} , Beatriz Pérez-Armendáriz¹ 

¹ Decanato de Ciencias Biológicas. Facultad de Biotecnología. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. 21 sur 1103 Col. Santiago. 72160. Puebla, México.

² Universidad Tecnológica de Tehuacan Prolongación de la 1 Sur 1101 San Pablo Tepetzingo, 75859 Tehuacán, Puebla, México.

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España.

⁴ Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, España.

RESUMEN

Los alimentos contaminados por patógenos forman biopelículas con una alta resistencia a biocidas, desinfectantes y antibióticos. Los extractos vegetales pueden ser una alternativa potencial para combatirlos. Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de un extracto vegetal (*Sambucus canadensis*) utilizado ampliamente en comunidades indígenas de México. El trabajo se realizó con bacterias aisladas de alimentos orgánicos. Las pruebas antimicrobianas mostraron actividad en todas las cepas evaluadas principalmente en *S. aureus* 976, *S. entérica* 915, *E. coli* 47553 (CMI 65.1 y 50 µg/mL) respectivamente. Respecto a la obstrucción en la formación de biopelícula se encontraron resultados significativos menores a 35 % a la concentración más baja 0.01 µg/mL frente a las cepas *S. aureus* CECT 976 y *E. coli* 47553. Respecto a los resultados en la disgregación del biopelícula las bacterias *E. coli* CECT 4757, *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 lograron hasta un 36 % de disgregación en la concentración más baja de 0.01 µg/mL siendo estadísticamente significativo respecto al control ($p < 0.001$). Los resultados indican que el extracto vegetal tiene un alto potencial de actividad antibiofilm frente a bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos y plantean riesgos para la salud de las personas.

Palabras clave: extracto vegetal, disgregación, formación, bacteria, salud.

ABSTRACT

Foodborne pathogens form biofilms with high resistance to biocides, disinfectants, and antibiotics. Plant extracts can be a potential alternative to combat them. This study evaluated the antimicrobial and antibiofilm activity of a plant extract (*Sambucus canadensis*) widely used in indigenous communities in Mexico. The work was carried out with bacteria isolated from organic food. The antimicrobial tests showed activity in all the strains evaluated, mainly in *S. aureus* 976, *S. enterica* 915, and *E. coli* 4753 (MIC 65.1 and 50 µg/mL) respectively. Regarding the obstruction in the formation of

biofilm, significant results of less than 35 % were found at the lowest concentration (0.01 µg/mL) against the *S. aureus* CECT 976 and *E. coli* 4753 strains. Regarding the results in biofilm disintegration, *E. coli* CECT 4757, *S. aureus* CECT 976, and *S. aureus* CECT 4465 achieved up to 36 % disintegration under the lowest concentration of 0.01 µg/mL, being statistically significant with respect to the control $p < 0.0001$. The results indicated that the plant extract has a high potential for antibiofilm activity against bacteria that affect food safety and pose risks to people's health.

Key words: plant extract, disintegration, formation, bacteria, health.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por bacterias que contaminan los alimentos son un problema mundial que ocasiona importantes afectaciones en la salud pública (Mantzourani *et al.*, 2022; Pina *et al.*, 2018; Ritter y Tondo, 2014; WHO, 2017). La inocuidad de los alimentos es afectada por una gran cantidad de microorganismos, los cuales tienen un metabolismo que se adapta para sobrevivir frente a distintos tipos de estresores, uno de sus mecanismos de resistencia es la capacidad para formar biopelículas. En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de las biopelículas principalmente por la gran resistencia que presentan frente a diversos tipos de antibióticos (Alejo *et al.*, 2018; Lahiri *et al.*, 2019; Vasudevan *et al.*, 2014). Alrededor del 90 % de los microorganismos poseen esta característica microbiológica (Ortega-Peña y Cendejas, 2014). Las biopelículas son una densa población de células bacterianas sésiles que se adhieren a la superficie, formando una matriz compuesta por exopolisacáridos, proteínas y ADN, la cual proporciona estabilidad y nutrientes a las células que se adhieren (Friedman *et al.*, 2015; Kavanaugh y Ribbeck, 2012; Ortega y Hernández, 2018). Estas comunidades bacterianas pueden penetrar rápidamente en una amplia variedad de lugares del entorno, incluido el cuerpo humano. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud (NIH) alrededor del 80% de las infecciones

*Autor para correspondencia: Guadalupe Velázquez Vázquez
 Correo-e: ghavg@hotmail.com

Recibido: 22 de julio de 2023

Aceptado: 6 de octubre de 2023

Publicado: 13 de noviembre de 2023

de tejidos blandos y duros en humanos son causadas por biopelículas patógenas. Las biopelículas incrementan la resistencia a muchos biocidas, desinfectantes y antibióticos y su tratamiento generalmente se vuelve ineficaz (Amaral *et al.*, 2015; Ortega-Vidal *et al.*, 2021). Son capaces de desarrollar una tolerancia hasta mil veces mayor que las bacterias que crecen en forma libre (Davies, 2003). En este sentido, una necesidad emergente es desarrollar alternativas eficaces y de menor costo para la prevención y control de biopelículas, tal es el caso de recubrimientos con propiedades biocidas derivados de plata o cobre, y en particular productos derivados de extractos vegetales (Trunk *et al.*, 2018). Diversos estudios han reportado la actividad antimicrobiana de algunas plantas contra distintos patógenos (Al-Dhabi *et al.*, 2015; Elhariry *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2010). Incluyendo actividad en la formación y disgregación de biopelículas contra distintas cepas (Adukwu *et al.*, 2012; Bazargani *et al.*, 2015; Pisoschi *et al.*, 2018; Rudrappa y Bais, 2008). Sin embargo, a pesar del potencial de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos antimicrobianos, un gran número de plantas aún no han sido evaluadas y limitados extractos vegetales se han desarrollado como microbiocidas con actividad antibiopelícula. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula del sauco (*Sambucus canadensis* (L.)). Esta especie ha sido reportada con actividad antimicrobiana, antiviral, antioxidante, quimiopreventiva, los cuales han sido asociadas a los componentes presentes en la especie tales como triterpenos, taninos y diversos tipos de flavonoides (Abdelmigid, 2013; Lee y Finn, 2007; Sidor y Gramza, 2014; Tedesco *et al.*, 2017). Sin embargo, no se han reportado estudios sobre la actividad antibiopelícula de la especie frente a bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La planta de *Sambucus canadensis* (L.) Bolli. fue colectada en la zona de la Sierra Negra de Puebla, México. El material vegetal fue identificado por medio de técnicas taxonómicas y un espécimen fue depositado en el Herbario del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con el ID: 83771. Para obtener el extracto se utilizaron 500 g de hojas secas, fueron maceradas con 4L de etanol al 96% con doble filtrado. Los extractos se filtraron al vacío con papel Whatman N° 4, el sobrenadante se concentró en un rota vapor Buchi® a presión reducida a 35 ± 15 °C, el extracto etanólico fue evaporado al vacío. Para la identificación cualitativa de los diferentes grupos de metabolitos se realizaron pruebas fitoquímicas: alcaloides prueba de Mayer, Drangendorff y Wagner; para Flavonoides prueba del $H_2SO_4FeCl_3$ y Shinoda; para Saponinas prueba de espuma y Rosenthaler; Cumarinas prueba de Baljet; Triterpenos y/o Esteroles prueba de Lieberman-Bouchard; Taninos prueba de Grignard, cada prueba se realizó por triplicado (Carvajal *et al.*, 2009; Patil y Bhise, 2015). Para obtener información sobre grupos funcionales asociados a los compuestos fitoquímicos presentes en la planta se utilizó el espectro en el infrarrojo región media

con transformada de Fourier (TFIR) en un espectrómetro marca Bruker de 4000 a 600 cm^{-1} con resolución de 4 cm^{-1} , Los análisis se realizaron en el departamento de Centro de Servicios de Alta Tecnología (CESAT-UPAEP).

Actividad antimicrobiana. El extracto vegetal se analizó inicialmente por el método de difusión en agar y posteriormente fue sometido a la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI). La actividad antimicrobiana del extracto se evaluó con 2 colecciones pertenecientes al laboratorio de Microbiología de los alimentos y del medio ambiente de la Universidad de Jaén; la colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la colección de cepas previamente aisladas a partir de alimentos orgánicos con una alta tolerancia a los biocidas y resistencia a los antibióticos (Tabla 1) (Fernández-Fuentes *et al.*, 2012).

Tabla 1. Cepas utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana y antibiopelícula pertenecientes a dos tipos de colecciones del Laboratorio de Microbiología de los alimentos.

Table 1. Strains used in antimicrobial and antibiofilm activity tests, belonging to two types of collections of the Food Microbiology Laboratory.

Cepas pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
Strains belonging to the Spanish Collection of Type Cultures (CECT) and Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

		CMI µg/mL
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 915	50
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4300	>100
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4395	100
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47553	50
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47557	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 976	65

Cepas resistentes aisladas de alimentos orgánicos, producto de origen y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Resistant strains isolated from organic foods, product of origin and Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

		CMI µg/mL
<i>Bacillus cereus</i>	UJA 27q (papa)	70
<i>Enterococcus faecium</i>	UJA 11c (queso)	>100
<i>Lactobacillus casei</i>	UJA 35h (harina)	100
<i>Enterobacter sp.</i>	UJA 37p (tomate)	>100
<i>Pantoea agglomerans</i>	UJA 29 (lechuga)	100
<i>Klebsiella terrigena</i>	UJA 32j (zanahoria)	>100

Método estándar de difusión en agar. Se realizaron pruebas preliminares de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar estándar para obtener las concentraciones óptimas del extracto vegetal que posteriormente serían utilizadas en las pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI). Las cepas se cultivaron en caldo Mueller-Hinton, la suspensión microbiana ajustada a 1.0 x 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL se vertió en placas con 15 mL de medio de agar Mueller-Hinton (MHA) y se dispersó con un rastrillo microbiológico. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El vehículo (DMSO a la misma concentración alcanzada en cada dilución seriada de los compuestos ensayados) se utilizó como control negativo

y todas las muestras se analizaron por triplicado. La actividad antimicrobiana se expresó en términos del diámetro promedio de la zona de inhibición en milímetros. Un halo de inhibición ≤ 5 mm se interpretó como ausencia de actividad antimicrobiana.

Prueba de concentración inhibitoria mínima. Los valores de CMI se determinaron mediante el método de microdilución en caldo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) según lo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015), las diluciones 100 a 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se incubaron con suspensiones microbianas ajustadas a 5×10^5 UFC/mL en TSB. Se incluyeron controles de crecimiento y esterilidad para cada aislado, y el vehículo se incluyó como control negativo. Las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C y las lecturas se realizaron después de 24 h de incubación mediante lectura visual y determinación de la densidad óptica (DO 595 nm) en un lector de microplacas iMark (BioRad, Madrid, España). El valor CMI se definió como la concentración de compuesto más baja que impidió el crecimiento celular después de una incubación.

Ensayo de inhibición de la formación de biopelículas. Se analizó el extracto vegetal diluido en serie en un rango de 100 a 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, según el valor de CMI obtenido previamente, para determinar la capacidad de los compuestos para obstruir la formación de biopelículas y también su potencial para disgregar biopelículas previamente formadas, como lo describen Ulrey *et al.* (2014). La inhibición de la formación de biopelículas inducida por compuestos aislados se midió mediante el método de tinción de violeta cristal descrito por Djordjevic *et al.* (2002). Posteriormente se incubaron suspensiones bacterianas (10^6 UFC en TSB) con concentraciones crecientes del extracto (24 h, 30 °C). Los pocillos con suspensiones bacterianas y medio TSB se ejecutaron en paralelo como controles positivos para la formación de biopelículas. Todos los pozos se lavaron con agua del grifo y las biopelículas se fijaron con metanol. La placa se tiñó con cristal violeta al 0.3 % y se leyó en un iMarkMicroplate Reader (Bio-Rad, Madrid, España) DO 595 nm.

Ensayo de la disgregación de películas formadas previamente. Después de la formación de la biopelícula (24 h, 30 °C) en una placa de microtitulación de 96 pocillos, el contenido se aspiró y los pocillos se lavaron suavemente dos veces con solución salina fisiológica estéril, se añadieron 100 mL del compuesto diluido apropiado, los pozos sin el extracto sirvieron como controles positivos. Después de una incubación de 24 h a 30 °C, se realizó la tinción de violeta cristal descrita anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para analizar los resultados de la significancia estadística de las medias de la absorbancia se utilizó una prueba ANOVA y prueba post hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95 % con Statgraphics Plus versión 8.1 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE. UU.).

RESULTADOS

Las pruebas fitoquímicas del extracto de *Sambucus canadensis* reveló la presencia de alcaloides, flavonoides,

saponinas y taninos. Las pruebas del espectro de infrarrojo (TFIR) del extracto vegetal mostró distintas frecuencias de estiramiento y flexión; las frecuencias de estiramiento del enlace O-H en 3350 cm^{-1} es asociado a grupos fenólicos, al estar involucradas en enlaces por puente de hidrógeno, se produce un ensanchamiento de la banda. Las vibraciones de estiramiento del enlace C-H correspondientes a los grupos metilo y metileno aparecen en un rango $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ y las bandas en la región de la huella dactilar se deben a las vibraciones de flexión en 1386 cm^{-1} para el metilo y 716 cm^{-1} para el etilo, las vibraciones de estiramiento del enlace carbonilo, C=O aparecen en un rango $1750\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la presencia de flavonoides. Asimismo, en un rango $1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ aparece un doble enlace conjugado C=C de los anillos aromáticos característico de la estructura base de los flavonoides (Figura 1). Respecto a la actividad antimicrobiana el extracto mostro actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco con todas las cepas evaluadas, el mayor diámetro de inhibición fue de 13.5 mm frente *S. aureus* CECT 976, 12.5 mm en *B.cereus* CECT 976 y 12 mm con *E. coli*. Asimismo, la efectividad del extracto en las cepas bacterianas probadas se determinó midiendo la CMI₉₀. Las cepas más susceptibles fueron *S. aureus* CECT 976, *S. enterica* CECT 915, así como *E. coli* 47553 con valores de CMI de, 75 y 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que *Enterobacter sp.* 37p y *E. faecium* 11c fueron las bacterias más resistentes con valores mayores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 1).

Los resultados sobre la inhibición de la formación de biopelículas mostraron que el extracto a las concentraciones de 1.0 y 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibió la biopelícula de *S. enterica* CECT 915, *S. enterica* CECT 4395 y *S. enterica* 405 con porcentajes de inhibición de 41, 50 y 47 % respectivamente ($p < 0.05$). Para las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 se logró una inhibición en la formación del biofilm del 43 y 41 % respectivamente en las concentraciones más bajas de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ambas cepas mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$). La cepa *E. coli* CECT 4753 en la menor concentración 0.01 se redujo hasta

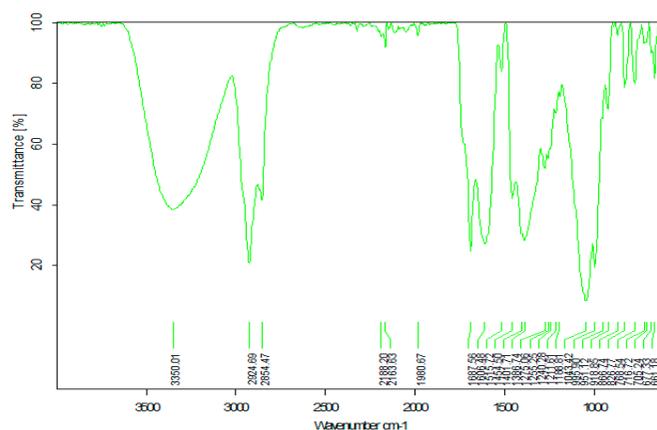


Figura 1. FTIR espectro de *Sambucus canadensis* en el rango de 4000 a 600 cm^{-1} .

Figure 1. FTIR spectrum of *Sambucus canadensis* in the range of 4000 to 600 cm^{-1} .

en un 41% la formación de biofilm siendo estadísticamente diferente respecto al control ($p = 0.001$) Para el caso de *E. coli* 47557 no se lograron resultados de inhibición significativos ($p > 0.05$). Para el caso de las bacterias resistentes aisladas de alimentos ecológicos la cepa *E. faecium* 11c tuvo menor formación de biofilm (60 %) en la concentración más baja 0.01 $\mu\text{g/mL}$ los resultados fueron estadísticamente significativos ($p = 0.05$). La cepa *Pantoea* 29j tuvo el mayor porcentaje de inhibición de formación de biofilm 35 % a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.001$). La bacteria *B. cereus* 277 redujo hasta en 33 y 35 % la formación de biofilm a la concentración de 1.0 y 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$). *L. cassei* 35h redujo hasta en un 27 % la formación de biofilm en las concentraciones más altas con resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Sin embargo, la cepa de *Klebsiella terrigena* 32j en la mayor concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ tuvo un porcentaje de inhibición en la formación de biofilm de hasta 47 % ($p = 0.05$), y menor inhibición en las concentraciones bajas. Respecto a los resultados en la disgregación del biofilm, se puede observar que en algunas bacterias mostraron diferencias significativas en la disrupción de la biopelícula previamente formada (Figura 2). La bacteria *S. enterica* CECT 915 obtuvo porcentajes de disgregación de 34 % ($p < 0.05$) en concentraciones de 0.01

y 0.10 $\mu\text{g/mL}$. Para la cepa *E. coli* CECT 47557 se alcanzó hasta un 36 % de disgregación en la concentración más baja de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ siendo estadísticamente significativo respecto al control ($p < 0.0001$). Para el caso de las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 se logró una disgregación de 30 y 24 % a las concentraciones más bajas de 0.1 y 0.10 $\mu\text{g/mL}$ siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Para el caso de las bacterias resistentes *E. faecium* 11c en las concentraciones intermedias (10 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la disgregación ($p = 0.001$). Por otro lado, la cepa de *Pantoea* 29j disgregó hasta en un 35 % en la concentración más baja de 0.01 $\mu\text{g/mL}$. ($p < 0.05$). Similares resultados se pueden observar para *Enterobacter sp.* 37p logrando una disgregación de hasta 35 % en todas las concentraciones evaluadas, incluso las diferencias significativas son más representativas en las concentraciones de 1 a 0.01 ($p < 0.01$). La cepa *B. cereus* 277 también mostró resultados positivos logrando romper la biopelícula hasta en 40% en concentraciones bajas ($p = 0.05$). Por otro lado, con la cepa de *Klebsiella terrigena* 32j y *L. cassei* 35h presentaron la menor disgregación en la concentración de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.001$).

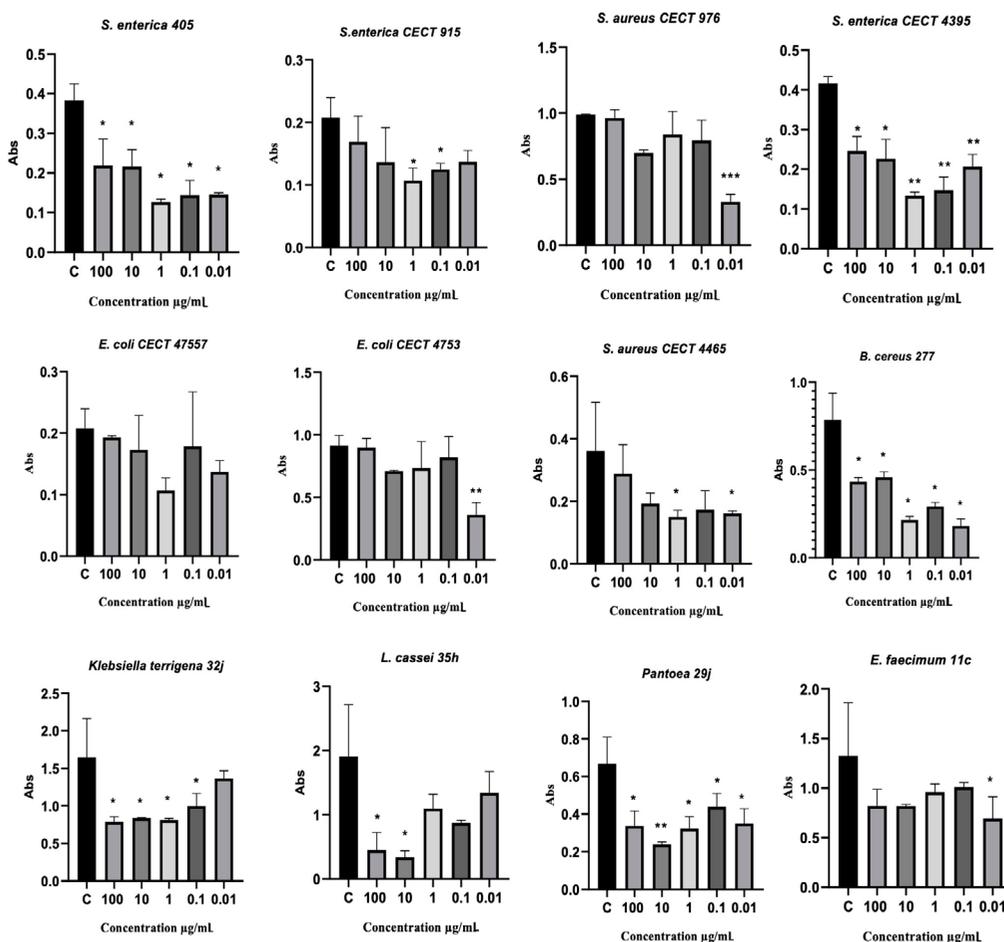


Figura 2. Resultados de la formación de biopelículas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

Figure 2. Results of biofilms formation of 12 strains isolated from organic foods. Significant differences with respect to control $p < 0.05$ are shown.

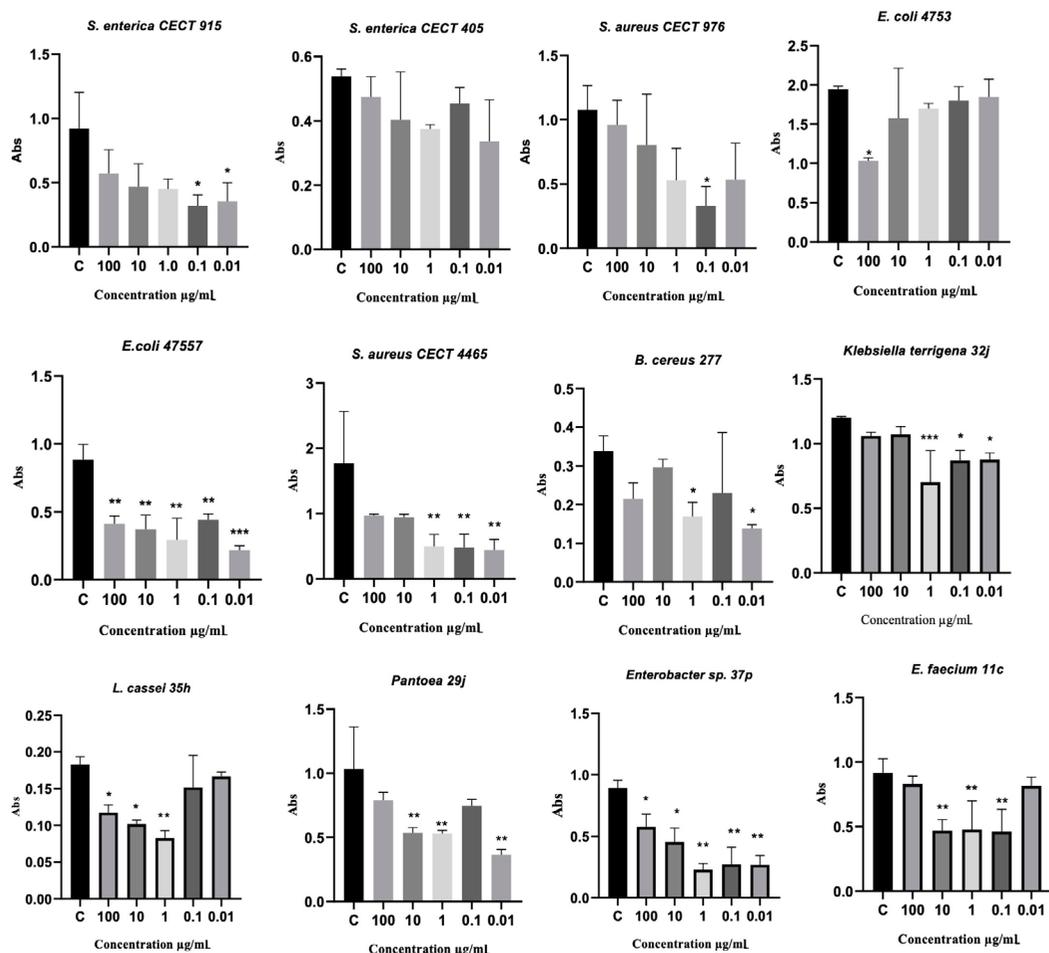


Figura 3. Resultados de la disgregación de biopelículas previamente formadas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

Figure 3. Results of previously formed biofilms disintegration from 12 strains isolated from organic food. Significant differences with respect to control $p < 0.05$ are shown.

DISCUSIÓN

La alta resistencia desarrollada por las biopelículas bacterianas a los antibióticos y biocidas varía de un organismo a otro, por lo tanto, su erradicación no es fácil (Caraher *et al.*, 2007). Reducir la capacidad de que las bacterias formen biopelículas es fundamental para poder aplicar un tratamiento más eficaz (Dean *et al.*, 2011; Ulrey *et al.*, 2014). Algunos estudios desarrollados con productos naturales han demostrado que podrían ser eficaces contra las biopelículas bacterianas (Alejo-Armijo *et al.*, 2018; Upadhyay *et al.*, 2013; Vasudevan, 2014). A este respecto Budri *et al.* (2015) reportó una fuerte actividad anti-biopelícula de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*. Cha *et al.* (2005) también mostró que los aceites esenciales de *Artemisia lavandulaefolia*, tienen efectos inhibitorios sobre 15 cepas de bacterias anaerobias entre las que se encuentran *S. aureus*, *Enterobacter* *sp.* entre otras. Yatsuda *et al.* (2005) encontró que los extractos de *Mikania laevigata* y *M. glomerata* inhibían significativamente la adherencia celular de *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. cricetus*. Asimismo, diversos estudios han reportado actividad antimicrobiana de *Sambucus canadensis*

frente a distintas cepas entre las principales se encuentra *E. coli* y *S. aureus* (Hearst *et al.*, 2010; Holetz *et al.*, 2002) lo cual coincide con lo encontrado en este estudio.

Respecto a los resultados en la formación de biopelículas y la disgregación de películas previamente formadas, se encontró inhibición significativa pues hubo reducción de 30% e incluso en la capacidad de formación de biopelículas dependiendo de la concentración probada. Para el caso de la formación de biofilm de la cepa *S. enterica* CECT 4465, *Klebsiella terrigena* 32j y *L. casei* 35h se presentó una dosis dependiente, induciendo una disminución de 43 a 55% de 47 a 83% y de 23 a 70.4% respectivamente aumentando cuando la concentración incrementó de 0.01 a 100 µg/mL. La dosis dependiente encontrado en la formación de *biofilm* ha sido reportada por microorganismos que afectan los alimentos (Alejo-Armijo *et al.*, 2018; Rane *et al.*, 2014). Por otro lado, también se encontraron resultados en los cuales a menor concentración mayor actividad antibiopelícula, en otros estudios también se han reportado efectos paradójicos; menor formación de biofilm en concentraciones más bajas Rane *et al.* (2014) al estudiar el efecto de las proantocianidinas

(PAC) de arándano sobre la formación de biopelículas de *C. albicans* encontró que las dosis altas de PAC de arándano no tuvieron un efecto significativo ($P > 0,05$) sobre la actividad de *C. albicans* pero si las dosis más bajas, también se había observado un efecto paradójico dependiente de la cepa y del fármaco (Melo *et al.*, 2007). Posteriormente, en el experimento de disgregación cuando se permitió que las bacterias se adhieran y formen biopelículas, los mejores resultados se encontraron con las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 que indujeron una reducción del 24.8 % y 36 % ($p < 0.05$) a la menor concentración 0.01 $\mu\text{g/mL}$. También se detectó una reducción significativa ($p < 0.05$) del 35.2 % en el *biofilm* preformado con *E. coli* 4757 a la misma concentración. Los resultados encontrados en el estudio pueden asociarse a los compuestos bioactivos de las plantas; por ejemplo, los polifenoles tienden a auto asociarse cuando aumenta la concentración (Pui *et al.*, 2011; Tarakada *et al.*, 2004). También las estructuras externas de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas pueden ser responsables del efecto dosis-dependiente. Los metabolitos secundarios de las plantas tienen diversas propiedades biológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiano, modulación de enzimas, entre otras (Kurmukov *et al.*, 2013; Skogman *et al.*, 2012). De acuerdo con Rojas *et al.* (2016) algunas plantas poseen alcaloides como los indólicos y los oxidoles a los cuales se les puede asociar la actividad de formación y disgregación debido a que aumentan la actividad fagocítica de neutrófilos, macrófagos, granulocitos como defensa al huésped. Lu *et al.* (2020) indica que compuestos como lactonas y flavonoides presentes en algunas plantas, tienen efectos directos sobre genes y proteínas encargadas de la comunicación celular de las bacterias. En este sentido, el extracto de *Sambucus canadensis* presenta altas cantidades de alcaloides, así como flavonoides, saponinas y terpenos, por tanto, los resultados de este trabajo pueden deberse a estos compuestos los cuales se han reportado que inhiben la formación de biopelículas y dispersan las biopelículas bacterianas. De acuerdo con Dwivedi *et al.* (2016) y Teanpaisan *et al.* (2017) la presencia de alcaloides y flavonoides en extractos vegetales han mostrado una actividad de inhibición de biopelículas. Asimismo, se ha reportado que la sinergia de los compuestos que presentan los extractos crudos podría presentar mejores efectos antimicrobianos y antibiopelícula que los componentes individuales (Mehmood y Murtaza, 2018). Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Adnad *et al.* (2020) mostrando que las plantas pueden emplearse en la industria alimentaria como antibacterianos por el efecto que muestran frente a bacterias patógenas.

CONCLUSIÓN

En este estudio se mostró que el extracto vegetal *Sambucus canadensis* presenta importante actividad antimicrobiana y anti biopelícula frente a bacterias patógenas. Estos resultados se asocian a los componentes de la planta, debido al aumento de la resistencia microbiana a las biopelículas bacterianas, los extractos vegetales ofrecen grandes oportunidades para

desarrollar nuevos productos eficaces e inocuos como una alternativa potencial para combatir bacterias transmitidas en los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento por las facilidades otorgadas para realizar los ensayos en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos y del Medio Ambiente de la Universidad de Jaen, España.

REFERENCIAS

- Abdelmigid, H.M. 2013. New insights into toxicity and drug testing. En: Screening of herbal Medicines for potential toxicities. O. Ifelowua y S. Oluwakanyinsola. (ed.), p 89-121. Sivakumar Joghi Thatha Gowder. Kingdom of Saudi Arabia.
- Adnan, M., Patel, M., Deshpande, S., Alreshidi, M., Siddiqui, A.J., Reddy, M.N., Emira, N., y De Feo, V. 2020. Effect of *Adiantum philippense* extract on biofilm formation, adhesion with its antibacterial activities against foodborne pathogens, and characterization of bioactive metabolites: An in vitro-in silico Approach. *Frontiers in Microbiology*. 11:823-838
- Alejo-Armijo, A., Glibota, N., Frías, M.P., Altarejos, J., Gálvez, A., Salido, S., Ortega-Morente, E. 2018. Synthesis and evaluation of antimicrobial and antibiofilm properties of A-type procyanidin analogues against resistant bacteria in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2151-2158.
- Al-Dhabi ,N.A., Arasu, M.V., y Rejiniemon, T.S. 2015. In vitro antibacterial, antifungal, antibiofilm, antioxidant, and anticancer properties of Isosteviol isolated from endangered medicinal plant *Pittosporum tetraspermum*. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. 15:1-11.
- Adukwu, E.C., Allen, S.C.H., y Phillips, C.A. 2012. The antibiofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 113:1217-1227
- Bazargani, M.M., y Rohloff, J. 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. 61:156-164
- Budri, P.E., Silva, N.C., Bonsaglia, E.C.R., Fernandes, A., Araujo, J.P., Doyama, J.T., Goncalves, J.L., Santos, M.V., Fitzgerald-Hughes, D, y Rall, V.L.M. 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *Journal of Dairy Science*. 98: 5899-5904
- Caraher, E., Reynolds, G., y Murphy, P. 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 26: 213-221
- Cha, J.D., Jeong, M.R., Choi, H.J., Jeong, S., Moon, S.E., Yun, S., Kim, Y.H., Kil, B.S., y Song, Y.H. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*. *Planta Medica*. 71: 575-577.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Vol. 34. Document M100eS24, No. 3; CLSI: Wayne, PA, 2015.

- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Review Drugs Discovery*. 2: 114-22
- Dean, S.N., Bishop, B.M., y Van Hoek, M.L. 2011. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. 11: 114-126.
- Djordjevic D., Wiedmann M., y McLandsborough L.A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2950-2958.
- Dwivedi D., y Singh, V. 2016. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 6: 57-61
- Elhariry, H., Abuzaid, A.A., Khiralla, G.M., y Gherbawy, Y. 2014. Antibiofilm formation and anti-adhesive (to HEp-2 cells) effects of rosemary water extract against some food-related pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*. 49: 1132-1141
- Fernández-Fuentes M.A., Ortega-Morente E., Abriouel H., Perez R., Galvez A. 2012. Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to Biocides and Antibiotics. *Food Control*. 2: 73-78.
- Friedman, M. 2015. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63: 3805-3822
- Holetz, F., Barbiéri, P., Greisiele, L., Sanches, N., Rogério, C., Diógenes, A., Nakamura, C., Vataru D, y Filho, B. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 1027-1031.
- Hearst, C., McCollum, G., Nelson, D., Ballard, L.M., Millar, B.C., Goldsmith, C.E., y Rao, J.R. 2010. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4: 1805-1809.
- Kot, B., Wicha, J., Piechota, M., Wolska, K., y Gruzewska, A. 2015. Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 45: 919-924.
- Kavanaugh, N.L., y Ribbeck, K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 4057-4061.
- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., y Nag., M. 2019. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of Biosciences*. 44-52.
- Lee J, y Finn C.E. 2007. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 2665-2675
- Lu, H., Tang, S., Yun, G., Li, H., Zhang, Y., Qiao, R., y Li, W. 2020. Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis—A Review. *Biosensors*. 10 (11), p.165.
- Mantzourani, I., Daoutidou, M., Dasenaki, M., Nikolaou, A., Alexopoulos, A., Terpou, A., Thomaidis, N, y Plessas, S. 2022. Plant Extract and Essential Oil Application against Food-Borne Pathogens in Raw Pork Meat. *Foods*. 11:1-13
- Melo, A.S., Colombo, A.L., y Arthington-Skaggs, B.A. 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51: 3081-3088.
- Mehmood, A., y Murtaza, G. 2018. Phenolic contents, antimicrobial and antioxidant activity of *Olea ferruginea* Royle (Oleaceae). *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 18: 173-178.
- Naz, S., Jabeen, S., Llyas, S., Manzoor, F., Aslam, F., y Ali, A. 2010. Antibacterial Activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of Bacteria. *Pakistan Journal of Botany*. 42: 455-462
- Ortega-Vidal J., Cobo, A., Ortega-Morente, E., Gálvez, A., Alejo-Armijo, A., Salido, S., y Altarejos, J. 2021. Antimicrobial and antioxidant activities of flavonoids isolated from wood of sweet cherry tree (*Prunus avium* L.). *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 41:104-117
- Ortega-Peña, S., y Hernández-Zamora, E. 2018. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 75: 79-88.
- Ortega-Peña, F., y Cendejas, R. 2014. Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular. *Investigacion en Discapacidad*. 3:106-110.
- Rane, H.S., Bernardo, S.M., Howell, A.B., y Lee, S.A. 2014. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence- specific mechanisms. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 69: 428-436.
- Rudrappa, T., y Bais, H.P. 2008. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56: 1955-1962
- Rojas, J, Velasco, J., Buitrago, A., Mender, T., y Rojas, J. 2016. Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres , Estado Bolívar . *Rev Fac Odontol Univ Nacional*. 58: 2-10.
- Sidor, A., y Gramza-M.A. 2014. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food a review. *Journal of functional foods*. 18:941-958.
- Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K., y Kato, T.A. 2004. Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology Immunology*. 19: 61-64
- Tedesco, M., Kuhn, A.W., Frescura, V.D, Boligon, A.A., Athayde, M.L., Tedesco, S.B., y Silva, A.C. 2017. Assessment of the antiproliferative and antigenotoxic activity and phytochemical screening of aqueous extracts of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. (Adoxaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 89: 2141-2154.
- Pina-Pérez, M.C., y Ferrús-Pérez, M.A. 2018. Antimicrobial potential of legumes extracts against foodborne pathogens: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 72:114-124.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor, H., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., y Son, R. 2011. Salmonella: A foodborne pathogen. *Review Article. International Food Research Journal*. 18: 465-473.

- Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcus, V., Olah, N.K., y Mathe, E. 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143: 922-935.
- Ritter, A.C, y Tondo, E.C. 2014. Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travellers. *Review Article. The journal of infection in Developing Countries*. 8: 254-257.
- Skogman, M.E., Kujala, J., Busygin, I., Leino, R., Vuorela, P.M., y Fallarero, A. 2012. Evaluation of antibacterial and anti-biofilm activities of cinchona alkaloid derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Communications*. 7: 1173-1176.
- Sarkar, R., Chaudhary, S.K., Sharma, A., Yadav, K., Nema, N.K., Sekhoacha, M., y Sen, T. 2014. Anti-biofilm activity of Marula – a study with the standardized bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 154:170-175
- Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., y Puripattanavong, J. 2017. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 7: 172-177.
- Trunk, T., Khalil, H. S., y Leo, J. C. 2018. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology*. 4: 140-164.
- Ulrey, R.K., Barksdale, S.M., Zhou, W., Van, y Hoek, M.L. 2014. Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14: 499-511.
- Vasudevan, R. 2014. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*. 1: 1-16
- Yatsuda, R., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Murata, R.M., Rehder, V.L.G., Melo, L.V., y Koo, H. 2005. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 183-189.
- WHO (World Health Organization). 2016. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Ginebra, Switzerland.