

Evaluación de extractos acuosos de *Annona lutescens* Safford (Annonaceae) contra *Escherichia coli* Escherich, 1885 (Enterobacteriaceae)

Javier Gutiérrez-Jiménez¹

Ulises Alberto Santiago-Vázquez¹, Lorena Mercedes Luna-Cazárez²

¹Laboratorio de Biología Molecular y Genética, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, col. Lajas Maciel, CP 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel. 961-6170440, ext. 4303, E-mail: javier.gutierrez@unicach.mx | ²Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, col. Lajas Maciel, CP 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel. 961-6170440, ext. 4311, E-mail: lorena.luna@unicach.mx

RESUMEN

Annona lutescens Safford es un árbol con diversas actividades biológicas tales como: analgésico, antitumoral, vermífugo, insecticida y antibacteriana; sin embargo, se desconoce si muestra actividad sobre las variantes patógenas de *E. coli*, un bacilo Gramnegativo que causa diarrea. Los ensayos *in vitro* mostraron que *E. coli* ATCC 25922 fue inhibida de manera dosis dependiente con los extractos acuosos de hojas de *A. lutescens*. Dichos extractos no inhibieron las variantes patógenas de *E. coli* EAEC, DAEC o EPEC, que causan diarrea; tampoco degradó a la proteína Pic, un factor de virulencia de EAEC.

Palabras clave: *Annona lutescens*, extracto acuoso, *Escherichia coli*, diarrea.

ABSTRACT

Annona lutescens Safford is a small tree in which crude extracts have demonstrated biological activities including analgesic, anti-tumoral, vermifuge, insecticide and antibacterial; however, this biological activity against diarrheagenic *E. coli* strains have not been evaluated. *In vitro* assays performed in this study demonstrate that leaf crude aqueous extracts of *A. lutescens* exhibited antibacterial activity against the non-pathogenic *E. coli* strain ATCC 25922 in a dose-dependent manner. The extracts, however, were unable to inhibit the bacterial growth when incubated with diarrheagenic pathotypes EAEC, DAEC, or EPEC. The crude extract was tested for protease activity on secreted virulence factors. A secreted autotransporter protein, Pic, an important virulence factor from EAEC, was used as a surrogate for this studies but Pic remained intact after incubation.

Keywords: *Annona lutescens*, aqueous extract, *Escherichia coli*, diarrhea.

INTRODUCCIÓN

Annona lutescens es un árbol pequeño perteneciente a la familia Annonaceae, conocida vernáculamente como *anona amarilla* o *anona*. En América se distribuye al sur de México, Guatemala y Cuba. En México crece en el bosque tropical seco, florece al comenzar la temporada de seca y los frutos se desarrollan al terminar esta (Miranda y Hernández, 1963; Borchert, 1983). Los tejidos y órganos de las plantas de este género presentan distintas propiedades biológicas; la corteza de muchas de estas especies es aromática, estimulante y astringente; las semillas pueden actuar como vermífugas y/o bien como insecticidas; las hojas frescas contienen propiedades analgésicas por lo que muchas de estas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional.

Entre estas plantas, se han descrito metabolitos secundarios como los alcaloides, siendo la liriodenina

uno de los más abundantes en *A. lutescens* (De la Cruz Chacón y González-Esquinca, 2012). En esta planta, este metabolito participa en el metabolismo del nitrógeno así como en la defensa contra hongos fitopatógenos (De la Cruz-Chacón *et al.*, 2011). En este rubro, los extractos acuosos de *A. lutescens* también han mostrado actividad antibacteriana contra bacterias Gramnegativas como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhi, *Shigella flexneri* y el Grampositivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, todas causantes de infecciones gastrointestinales (Luna-Cazárez *et al.*, 1999).

En el caso de *E. coli*, bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo, es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino grueso del ser humano. Sin embargo, existen clones patógenos que causan diarrea y muerte infantil en los países en vías de desarrollo. Así, se han definido seis grupos patógenos que ocasionan este padecimiento: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva

(EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Kaper *et al.*, 2004).

La patogénesis de la infección por DAEC ha sido poco estudiada; se ha descrito la fimbria de superficie F1845 involucrada en la adherencia difusa, además de una proteína de membrana externa de 100 kDa, sin embargo, solo se ha reportado en una minoría de cepas aisladas (Rodríguez-Angeles, 2002).

EPEC es un patógeno que produce diarrea aguda, con vómito, fiebre y mala absorción; se adhiere a las células mediante fimbrias llamadas Bfp, cuyos genes se localizan en el plásmido EAF. Esta bacteria exhibe un fenotipo localizado, donde las bacterias forman agregados que se adhieren a los polos de células en cultivo (*idem*).

EAEC tiene un fenotipo de adherencia agregativo, donde las bacterias forman empalizadas en forma de “panal de abeja”, que se adhieren sobre sustratos animados e inanimados. EAEC coloniza la mucosa del intestino grueso y delgado y en niños se presenta diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, pudiendo llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa (Kaper *et al.*, 2004).

EPEC coloniza el intestino delgado mediante las fimbrias CFA y después secreta las enterotoxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST), codificadas en plásmidos o transposones. (Rodríguez-Angeles, 2002). EIEC es una bacteria invasiva, que penetra el epitelio celular y escapa del proceso de fagocitosis celular para infectar células adyacentes del epitelio (*Idem*). EHEC provoca cólicos abdominales y diarrea acuosa con sangre; estas bacterias se adhieren al epitelio intestinal y lo destruyen (*Idem*).

Aunque se han descrito actividades antibacterianas en esta planta, se desconoce si son capaces de inhibir a las variantes patógenas de *E. coli*. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de extractos obtenidos de hojas y semillas de *A. lutescens* sobre cepas prototipo de *E. coli* que causan diarrea, así como sobre la proteína Pic de *E. coli* enteroagregativa, un factor de virulencia que favorece la colonización.

METODOLOGÍA

Obtención de extractos de hojas y semillas de *A. lutescens*
Se molieron 100 g de hojas secas y de semillas y se hirvieron; se filtró la mezcla, se dejó secar y se almacenaron a temperatura ambiente.

Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas prototipo de EAEC 042, EPEC E2348/69 (O127:H6), DAEC E66438, *E. coli* ATCC 25922 y la clona recombinante secretora de la proteína Pic. *E. coli* HB101/pPic1; todas de la colección de cultivos bacterianos de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015). Se analizó la capacidad de adhesión a células epiteliales en cultivo así como la presencia de genes específicos de estos patotipos.

Ensayo de adherencia a células epiteliales (Cravioto *et al.*, 1979)

Se cultivó la línea celular CaCO₂, proveniente de adenocarcinoma colon, en medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal de bovino al 10%, bicarbonato de sodio (1.5 g/L) y penicilina-estreptomycin (10,000 U/10,000 mg/ml) a 37° C con 5% de CO₂. Cuando se alcanzó el 100% de confluencia, las células se disgregaron con tripsina (0.5%) y se resuspendieron con 25 ml de DMEM. Se transfirió 1 ml de la suspensión celular a una microplaca de 24 pozos, a los que previamente se colocaron cubreobjetos circulares de 13 mm de diámetro; se incubó bajo las condiciones citadas arriba hasta un 70% de confluencia.

Las bacterias se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) toda la noche a 37°C bajo condiciones estáticas. El paquete celular bacteriano se obtuvo por centrifugación y se resuspendió en 1 ml de PBS IX pH 7. Se reemplazó el medio de las células por DMEM sin antibióticos ni suero fetal de bovino y con D-manosa al 1% y cada pozo se inoculó con 10⁷–10⁸ UFC/ml de bacterias (50 µl del paquete bacteriano) y se incubó a 37°C durante 3 h. Se hicieron dos lavados con PBS IX, las células se fijaron con metanol al 70% y se tiñeron con colorante de Giemsa durante 15 minutos. Los patrones de adhesión se evaluaron con microscopía óptica (Primostar, Zeiss®).

Detección de genes de virulencia en patotipos de *E. Coli*

Mediante PCR multiplex se amplificaron los genes AA Probe, *aggr* y *aap* de EAEC, así como *eaeA* y *hfpA* de EPEC. Las mezclas de reacción se prepararon con 13.5 µL de Master mix (DNAtaq, dNTP's y MgCl₂, Promega), 3.5 mL de la mezcla de iniciadores (cuadro 1), 2 µL de lisado bacteriano (ADN muestra) y 7 µL de agua estéril libre de nucleasas (USB Corp.®).

Patotipo/locus	Secuencia (5'-3')	Conc. (pMol)	Tamaño (pb)	Referencia
EAEC				Cerna <i>et al.</i> (2003)
AA Probe	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	20	629	
	CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T			
aggR	CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA	15	457	
	AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG			
aap	CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG	10	310	
	AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC			
EPEC				López-Saucedo <i>et al.</i> (2003)
eaeA	GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	3.8	384	
	CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG			
bfpA	ATT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	2.5	324	
	GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA			

CUADRO 1

Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Las reacciones se procesaron en un termociclador (Eppendorf®) bajo las condiciones descritas en la literatura (López-Saucedo *et al.*, 2003, Cerna *et al.*, 2003). Los productos de PCR se resolvieron con electroforesis en agarosa al 2.3 % en regulador TAE 1X (Promega®), durante 45 min a 100 V. Las bandas de ADN se visualizaron luego de la tinción con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se digitalizaron con un fotodocumentador de luz UV (Enduro GDS™, Labnet International, Inc). Como marcador de peso molecular se usó la escalera de 100 pb (Fermentas®).

Actividad antimicrobiana de los extractos (Bauer *et al.*, 1966)

Se construyeron discos de papel filtro Whatman No. 2 de 5 mm de diámetro y se esterilizaron. Los extractos acuosos de hojas y semillas se prepararon a 2.5, 5, 10, 15 y 20 mg/disco y con ellos se impregnaron los discos de papel filtro. Las cepas microbianas fueron sembradas en 3 mL de caldo Müeller Hinton (excepto *E. coli* HB101/pPic1) e incubadas a 37°C hasta alcanzar una $DO_{590} = 0.08 - 0.1$; las cepas se sembraron masivamente en agar Müeller Hinton y se depositaron los discos; se incubaron a 37°C por 18 h y se examinaron en búsqueda de halos de inhibición. Los ensayos se hicieron por triplicado.

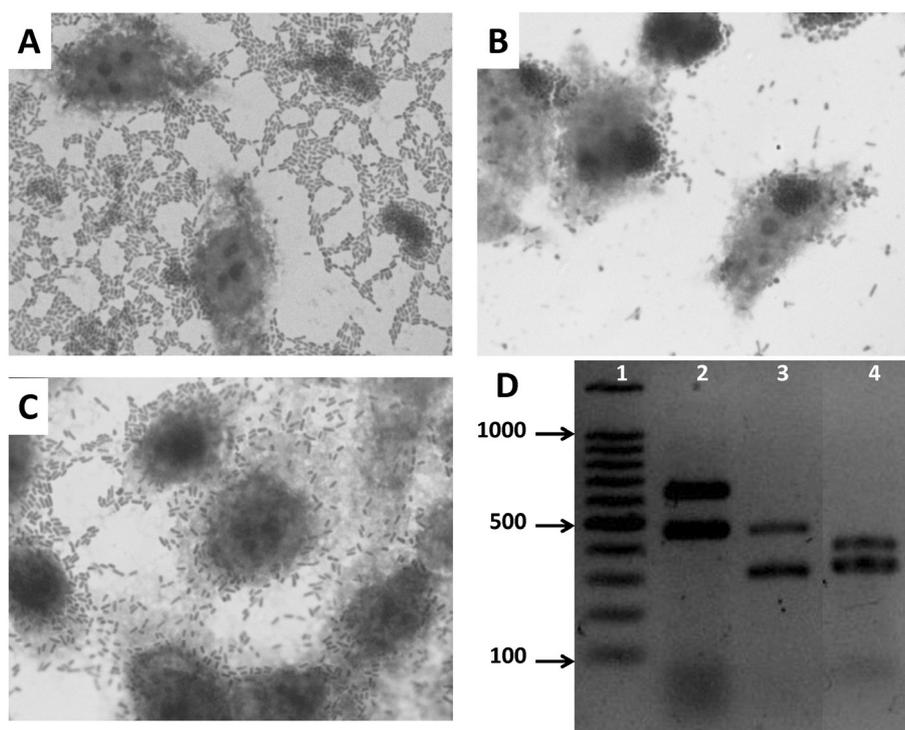
Obtención de la proteína Pic recombinante. La cepa *E. coli* HB101/pPic1 se sembró en caldo LB con tetraciclina (10 g/mL), se incubó a 37°C por 16 h y el sobrenadante

(conteniendo a la proteína Pic) se concentró en filtros con un valor de corte de 100 KDa. La proteína se resolvió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes.

Interacción de extractos vegetales con la proteína Pic (Stabach *et al.*, 1997). Se mezclaron 2 µg de proteína Pic con 5, 10, 15 y 20 mg/mL del extracto acuoso de hojas de *A. lutescens*; la mezcla se incubó a 30°C por 1 y 2 h. Para buscar productos de degradación de la proteína Pic, las muestras se analizaron con electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

RESULTADOS

La cepa prototipo de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) exhibió un fenotipo agregativo, donde grupos de bacilos en empalizadas se adhirieron al cristal en forma de “panal de abeja”; la cepa de *E. coli* enteropatogena (EPEC) mostró un fenotipo localizado, en el que se observaron microcolonias de bacterias adheridas en los polos de las células epiteliales, en tanto que la cepa *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) se observó el fenotipo difuso, donde las bacterias se adhieren sobre las células de forma azarosa (figura 1A-C); la cepa de *E. coli* ATCC 25922 no exhibió capacidad de adhesión a las células $CaCO_2$. La caracterización genotípica reveló los genes AA probe, *aggR* y *aap* en la cepa EAEC, en tanto que en la cepa EPEC los genes *bfpA* y *eaeA* (figura 1D).



CUADRO 1

Patrones de adhesión y genes típicos en variantes patógenas de *E. coli*. A, fenotipo agregativo en EAEC 042; B, fenotipo localizado en EPEC E2348/69; C, fenotipo difuso en DAEC E66438; D, genes AA probe y *aggR* (carril 2), genes *aggR* y *aap* (carril 3) de EAEC; genes *eaeA* y *bfpA* (carril 4) de EPEC; MPM (carril 1).

El ensayo de difusión para evaluar la actividad antibacteriana, reveló que los extractos acuosos de hojas de *A. lutescens* inhibieron el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 de manera dosis-dependiente, exhibiendo halos de 6, 7.6, 8.3 y 8.3 mm con 5, 10, 15 y 20 mg/disco, res-

pectivamente. Sin embargo, estos extractos no mostraron actividad contra los patotipos EAEC, DAEC ni EPEC (tabla 1). Los extractos acuosos de semillas de *A. lutescens* no manifestaron actividad antibacteriana contra ninguna bacteria (datos no mostrados).

Extracto acuoso de hojas de <i>A. lutescens</i> (mg/d)	Halo de inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	EAEC 042	EPEC E2348/69	DAEC E66438
	Media (\pm DE)			
5	6 (0.05)	Neg	Neg	Neg
10	7.6 (1.5)	Neg	Neg	Neg
15	8.3 (0.81)	Neg	Neg	Neg
20	8.3 (0.3)	Neg	Neg	Neg

TABLA 1

Actividad antibacteriana de extractos acuosos de hojas de *A. lutescens* sobre *E. coli*.

Los ensayos de interacción entre la proteína Pic de EAEC y los extractos acuosos de hojas de esta proteína bacteriana (figura 2). de *A. lutescens* (10 y 20 mg) durante 1 y 2 h, no mostraron subproductos de degradación.

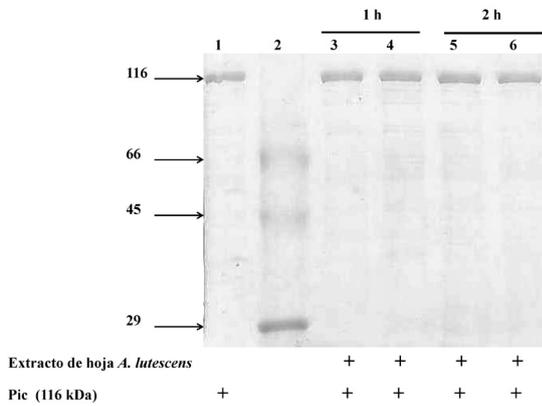


FIGURA 2

Interacción entre extractos acuosos de *A. lutescens* y la proteína Pic de *E. coli* enteroagregativa. Carril: 1, proteína Pic de EAEC; 2, MPM; 3-4; Proteína Pic mas 10 y 20 mg de extracto acuoso de hojas de *A. lutescens*, respectivamente (1 hora); 5-6, Proteína Pic mas 10 y 20 mg de extracto acuoso de hojas de *A. lutescens*, respectivamente (2 horas). MPM: marcador de peso molecular: albúmina sérica bovina, ovoalbúmina y anhidrasa carbónica (66, 45 y 29 kDa, respectivamente).

CONCLUSIONES

Desde tiempo remoto, el hombre ha utilizado las plantas como un recurso medicinal. Ello ha impulsado la investigación farmacológica y el desarrollo de nuevas drogas a partir de compuestos activos presentes en ellas (Arun *et al.*, 2015). Entre las actividades biológicas descritas en compuestos obtenidos de plantas de la familia Annonaceae están la citotóxica, biopesticida, antitumoral, vermífugo, inmunosupresora, anti-emética, inhibidor del apetito, antimalaria, insecticida y antibacteriana (Kriniski *et al.*, 2014).

La actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas de *A. lutescens* sobre *E. coli* ATCC 25922 reportada aquí, quizá obedezca a que esta bacteria no posee elementos genéticos que codifiquen factores de virulencia, tales como las fimbrias que fomentan la capacidad de adhesión de las bacterias a las células epiteliales. Por otro lado,

también podrían participar los diterpenos descritos en *Annona*, dado que se ha reportado que estos compuestos presentes en extractos metanólicos de *A. squamosa* inhibieron el crecimiento de patógenos como *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Wiar *et al.*, 2005); los diterpenos fomentan la lisis de la membrana celular bacteriana, actividad debida a su estructura lipofílica (Urzúa *et al.*, 2008).

Un estudio reportó que los extractos acuosos obtenidos de la corteza de raíz de *Annona senegalensis* no exhibieron actividad contra *E. coli* ATCC 25922 (Lino y Deogracious, 2006), esto quizá porque en esta estructura de la planta no se encuentran presentes moléculas con actividad bactericida. También se observó que los extractos acuosos de hojas y semillas de *A. lutescens* no inhibieron, en condiciones *in vitro*, el crecimiento de las cepas prototipo EAEC, DAEC y EPEC que causan diarrea (tabla 1). Dicho fenómeno puede obedecer a que en dichas variantes patógenas hay elementos genéticos extracromosomales como los plásmidos; por ejemplo, la cepa EAEC 042 posee un plásmido de 60-65 MDa en el que están codificadas las fimbrias de adherencia agregativa (AAF), las enterotoxinas Pet y EAST, así como una proteína antiagregante (Cerna *et al.*, 2003) **Bacterial</keyword><keyword>Humans</keyword><keyword>Plasmids</keyword><keyword>Polymerase Chain Reaction</keyword><keyword>Sensitivity and Specificity</keyword><keyword>Trans-Activators</keyword><keyword>Virulence</keyword></keywords><urls><related-urls><url>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734261</url></related-urls></urls><isbn>0095-1137</isbn><custom2>PMC154749</custom2><titles><title>Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative Escherichia coli strains</title><secondary-title>J Clin Microbiol</secondary-title></titles><pages>2138-40</pages><number>5</number><contributors><authors><author>Cerna, J. F.</author><author>Nataro, J. P.</author><author>Estrada-Garcia, T.</author></authors></contributors><language>eng</language><added-date format="utc">1422993170</added-date><ref-type name="Journal Article">17</ref-type><rec-number>36</rec-number><last-updated-date format="utc">1422993170</last-updated-date><accession-num>12734261</accession-num><volume>41</volume></record></Cite></EndNote>**

Las fimbrias participan en la formación de biopelículas en EAEC, lo que puede explicar la resistencia de

esta bacteria ante agentes biocidas como los presentes en los extractos vegetales de *Annona* (Shamir *et al.*, 2010). Además de los factores de virulencia codificados en el plásmido de EAEC, en su cromosoma está codificada la proteína Pic, que favorece la colonización de la bacteria en el intestino degradando el moco intestinal (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que dichos extractos no degradaron a la proteína Pic de EAEC, probablemente por la carencia de afinidad de los compuestos vegetales con esta proteína bacteriana. En cuanto a la variante EPEC, ésta posee el plásmido EAF en cuyo material genético está codificada la fimbria Bfp que participa en la adherencia localizada de esta bacteria (Donnenberg *et al.*, 1992); así, la capacidad de formar microcolonias por esta fimbria en EPEC podría explicar

la falta de actividad antibacteriana de los extractos de *A. lutescens*. Aunque los extractos acuosos de esta planta no inhibieron estos patotipos de *E. coli* en particular. Se ha reportado su actividad antibacteriana contra otros patógenos intestinales como *Salmonella* serovar Typhi o *Shigella flexneri* (Luna-Cazás *et al.*, 1999), lo que revalida su uso como parte de la medicina tradicional en México.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen los apoyos otorgados durante el 2014, por parte de la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, para el proyecto titulado *Evaluación de extractos de Annona lutescens sobre Escherichia coli*.

LITERATURA CITADA

- ARUN, R., A. PHILIP, P. KANNANMON & J. NIMISHA, 2015. Screening of Anti Cancer and Antibacterial Activity of Methanolic Extracts of *Annona muricata* Leaf and Bark. *Immoriginal International Journal of Sciences* 2: 1-4.
- BAUER, A.W., W.M. M.KIRBY, J.C. SHERRIS & M. TURCK, 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American journal of clinical pathology* 45: 493.
- BORCHERT, R., 1983. Phenology and control of Flowering Tropical Trees. *Biotropica* 81-89.
- CERNA, J.F., J.P. NATARO & T. ESTRADA-GARCIA, 2003. Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteropagative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 41: 2138-40.
- CRAVIOTO, A., R.J. GROSS, S.M. SCOTLAND & B. ROWE, 1979. An Adhesive Factor Found in Strains of *Escherichia coli* Belonging to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes. *Current Microbiology* 3: 95-99.
- DE LA CRUZ-CHACÓN, I., A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, P. GUEVARA FEFER & L.F. JÍMENEZ GARCÍA, 2011. Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 66: 377-384.
- DE LA CRUZ CHACÓN, I. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012. Liriodenine Alkaloid in *Annona diversifolia* During Early Development. *Natural product research* 26: 42-49.
- DONNENBERG, M.S., J.A. GIRON, J.P. NATARO & J.B. KAPER, 1992. A Plasmid-Encoded Type IV Fimbrial Gene of Enteropathogenic *Escherichia coli* Associated with Localized Adherence. *Molecular microbiology* 6: 3427-3437.
- GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J., I. ARCINIEGA & F. NAVARRO-GARCÍA, 2008. The Serine Protease Motif of Pic Mediates a Dose-Dependent Mucolytic Activity After Binding to Sugar Constituents of the Mucin Substrate. *Microbial Pathogenesis* 45: 115-123.
- GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J., L.M. LUNA-CAZÁRES, M.I. MENDOZA-OROZCO, G.J. DÍAZ-MARINA, J.C. BURGUETE-GUTIÉRREZ & J.M. FELICIANO-GUZMÁN, 2015. Organización, mantenimiento y preservación de la colección de cultivos bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 35: 95-102.

- KAPER, J. B., J.P. NATARO & H.L. MOBLEY, 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-40.
- KRINSKI, D., A. MASSAROLI & M. MACHADO, 2014. Potencial insecticida de plantas da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36: 225-242.
- LINO, A. & O. DEOGRACIOUS, 2006. The *in-vitro* Antibacterial Activity of *Annona senegalensis*, *Securidacca longipendiculata* and *Steganotaenia araliacea*-Ugandan Medicinal Plants. *African Health Sciences* 6: 31-35.
- LUNA-CAZÁRES, L.M., M.G. MARTÍNEZ-SANTIAGO, I. DE LA CRUZ CHACÓN & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 1999. Inhibición de cepas bacterianas por extractos acuosos de *Annona lutescens* Saff. *II Congreso Internacional de Anonáceas*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- LÓPEZ-SAUCEDO, C., J.F. CERNA, N. VILLEGAS-SEPULVEDA, R. THOMPSON, F.R. VELAZQUEZ, J. TORRES, P.I. TARR & T. ESTRADA-GARCÍA, 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 9: 127-31.
- MIRANDA, F. & X.E. HERNÁNDEZ, 1963. *Los tipos de vegetación de México y su clasificación*. México, D.F.: Colegio de Postgraduados.
- RODRÍGUEZ-ANGELES, G, 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44: 464-475.
- SHAMIR, E. R., M. WARTHAN, S. P.BROWN, J.P. NATARO, R. L.GUERRANT & P.S. HOFFMAN, 2010. Nitazoxanide Inhibits Biofilm Production and Hemagglutination by Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains by Blocking Assembly of AafA Fimbriae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 1526-1533.
- STABACH, P. R., C.D. CIANCI, S.B. GLANTZ, Z. ZHANG & J.S. MORROW, 1997. Site-Directed Mutagenesis of α II Spectrin at Codon 1175 Modulates its μ -Calpain Susceptibility. *Biochemistry* 36: 57-65.
- URZÚA, A., M.C. REZENDE, C. MASCAYANO & L. VÁSQUEZ, 2008. A Structure-Activity Study of Antibacterial Diterpenoids. *Molecules* 13: 882-891.
- WIART, C., T.S. AU, Y. MOHD, H. HAMIMAH & M. SULAIMAN, 2005. 16 Hydroxy(-)-Kauran-19-oic acid: an Antibacterial Diterpene from Sweet Apple (*Annona squamosa* L., Annonaceae). *International journal of Pharmacology* 1: 296-298.

