

**Evaluación de la actividad de extractos y aceites
vegetales de plantas de la región contra
Proteus mirabilis uropatogénico**

Lorena De Bellis

Trabajo especial 2

Tutor: M.Sc Vanessa Sosa

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo-Uruguay 2013

RESUMEN

Este trabajo se centró en el *screening* de extractos vegetales y aceites esenciales que tuvieran efecto en el crecimiento o la virulencia de *P. mirabilis* causante de infección del tracto urinario. Se evaluaron 28 extractos vegetales, 5 de los cuales eran aceites vegetales (2 extractos oleosos y 3 aceites esenciales). Se midió concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima tanto en medio sólido como en medio líquido. Se observó que los aceites esenciales fueron los que presentaron CIM menores mientras que dentro de los extractos, los que mostraron un mejor efecto bacteriostático fueron *Acalypha communis*, *Fluorensia oolepis*, *Vernonia rubricaulis*, *Achyrocline saturoides*, *Lithraea molleoides*, y *Melia azedarach* (extracto etanólico).

Para evaluar la acción de los extractos contra factores de virulencia se hicieron ensayos de hemaglutinación, movilidad *swarming* y formación de *biofilms*. A partir de estos resultados se eligió el extracto de *Lithraea molleoides* para seguir con estudios cromatográficos y encontrar los posibles compuestos del extracto responsables de su acción.

INTRODUCCIÓN

La infección urinaria constituye la segunda infección más frecuente en el ámbito de la atención primaria de la salud (Seija et al., 2010). *Proteus mirabilis* es una causa importante de infecciones oportunistas y nosocomiales. Aunque no sea la causa más frecuente de infecciones del tracto urinario (ITU), puede causar infecciones severas particularmente en pacientes cateterizados y/o con anomalías del tracto urinario (TU) (Coker et al., 2000; Jacobsen et al., 2008; Warren et al., 1982; Wasfi et al., 2012). *P. mirabilis* es un patógeno que presenta especial afinidad por el tracto urinario superior donde puede provocar grave daño renal (Rocha et al., 2007; Taal et al., 2011). Diversos factores de virulencia estarían involucrados con la patogenicidad de *P. mirabilis*, entre ellos se destacan la adhesión al uroepitelio teniendo un rol significativo en el inicio de la infección urinaria, la movilidad *swarming* mediada por flagelos, expresión de ureasas que hidrolizan la urea y la citotoxicidad sobre células uroepiteliales mediada por la expresión de hemolisinas (Rozalski et al., 1997).

La capacidad de las bacterias de adherirse está frecuentemente asociada con la presencia de fimbrias en la superficie bacteriana (Rocha et al., 2007). Las fimbrias son estructuras proteicas filamentosas que emergen de la superficie. Las mismas poseen longitud

variable, un diámetro de 2 a 8 nm y están compuestas por diferentes subunidades proteicas de bajo peso molecular (Madigan et al., 2006). *P. mirabilis* presenta la particularidad de expresar simultáneamente distintas clases de fimbrias entre las que se encuentran las fimbrias MR/P (*Mannose Resistant Proteus-like*), UCA (*Uroepithelial Cell Adherence*), PMF (*Proteus mirabilis Fimbriae*) y ATF (*Ambient Temperature Fimbriae*) (Mobley, 1996). El rol de las fimbrias ha sido motivo de múltiples estudios y su relación con la adhesión y la patogenicidad es evaluada a través de diversos análisis (Scavone et al., 2004; Zunino et al., 2003).

Las fimbrias de *P. mirabilis* no solo contribuyen a la adhesión a células uroepiteliales sino que también se ha observado que median la adhesión a superficies abióticas y por lo tanto están involucradas en la formación de *biofilms*. En particular la fimbria MR/P estaría implicada en las primeras etapas en la formación de *biofilms* (Jacobsen and Shirtliff, 2011; Jansen et al., 2004). En otras bacterias como *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, los factores involucrados en la formación de *biofilms* están ampliamente caracterizados (Karatan and Watnick, 2009; Lemon et al., 2008; Lu et al., 2012; O'Gara, 2007; Senadheera and Cvitkovitch, 2008), no siendo este el caso de *P. mirabilis*. Una medida de la capacidad de formación de *biofilm* consiste en cuantificar en forma indirecta las bacterias adheridas a placas de poliestireno o a vidrio.

Se ha observado que pacientes con cateterizaciones prolongadas en el tiempo sufren de infecciones por *P. mirabilis*. Esta bacteria coloniza el catéter formando un *biofilm* sobre la superficie del mismo. La actividad de ureasa de la bacteria genera amoníaco a partir de la urea, aumentando el pH de la orina. En estas condiciones alcalinas se forman cristales de fosfato de amonio y magnesio, y fosfato de calcio que quedan atrapados en los *biofilms* (Morris et al., 1999). A medida que el *biofilm* se desarrolla y dispersa obstruye el flujo de orina en el catéter, teniendo esto graves consecuencias.

Los flagelos, por su parte, son apéndices filamentosos, delgados y largos que emergen de la superficie bacteriana y están formados por distintas subunidades proteicas que le confieren a la bacteria movilidad por rotación y le permiten la traducción de señales (Johnson, 1996; Mobley et al., 1994). A su vez, los flagelos son los responsables de la movilidad *swarming* característica de *P. mirabilis*. El movimiento *swarming* es un proceso cíclico, multicelular que permite una migración rápida de *P. mirabilis* sobre superficies sólidas. Una vez en contacto con una superficie sólida, las células *swimmer* (1 a 2 μm de largo) se diferencian en células *swarmer* elongadas, multiflageladas (hasta 80 μm de largo) las que muestran una expresión aumentada de factores de virulencia (Belas et al., 1991; Williams and Schwarzhoff, 1978). Se ha sugerido que la capacidad

de diferenciación *swarming* de *P. mirabilis* tendría un rol en la patogenicidad de este microorganismo, principalmente en los casos de pacientes cateterizados (Jones et al., 2005).

Por otro lado, la capacidad de *P. mirabilis* de lisar células está mediada por la producción de hemolisinas las cuales poseen acción citotóxica sobre las células epiteliales del tracto urinario (Mobley et al., 1991; Rozalski et al., 1997; Sosa and Zunino, 2009). El mecanismo de acción de las hemolisinas se basa en la formación de poros en la membrana celular que le permiten al uropatógeno ingresar a células polinucleares y monocitos, así como también a células del tracto urinario y causar eflujo de iones Na^+ y el subsecuente daño renal (Coker et al., 2000; Mobley et al., 1994).

Aún no se han desarrollado métodos efectivos para prevenir las ITU las cuales en general son tratadas con antibióticos y muy a menudo es necesario el tratamiento empírico hasta obtener el resultado del urocultivo. Si bien en muchos casos las infecciones se resuelven fácilmente y sin complicaciones, algunos pacientes no responden a esta terapia o sufren una infección recurrente luego de un tratamiento aparentemente exitoso. La evolución en los patrones de resistencia a los diferentes antibióticos empleados para el tratamiento de las infecciones urinarias representa un grave problema de salud pública. La sensibilidad a los antibióticos de las bacterias que causan ITU ha evolucionado durante décadas de tratamientos que favorecieron la aparición de cepas multiresistentes de diversos uropatógenos incluyendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia stuartii* y *P. mirabilis* (Nicolle, 2002). A su vez, *P. mirabilis* ha emergido como un serio problema terapéutico, correspondiendo a la aparición de mutaciones que comprometen el uso de drogas como ciprofloxacina, ceftazidime, imipenem y aminoglicósidos (Mutnick et al., 2002). Por ello, es necesario buscar opciones terapéuticas diferentes, especialmente en pacientes con ITU complicada y/o mayores de 60 años, además de hacer un uso más racional de la antibioticoterapia en los episodios de ITU no complicada.

El presente trabajo planteó una búsqueda en especies vegetales de propiedades bactericidas, o que interactuaran con factores de virulencia de *P. mirabilis*, de modo de disminuir de esta forma la uropatogenicidad de este microorganismo. Teniendo en cuenta que solamente entre el 5 y el 15% de las plantas superiores han sido sistemáticamente investigadas para evaluar los compuestos bioactivos (Pieters and Vlietinck, 2005), el resto de la biodiversidad vegetal representa un campo fértil y vasto para este tipo de estudios.

HIPÓTESIS

Extractos derivados de plantas autóctonas de la región presentan la capacidad de interferir con el crecimiento de *Proteus mirabilis* y/o mostrar una acción inhibitoria sobre la expresión de factores de virulencia característicos de este microorganismo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de diferentes extractos y aceites vegetales obtenidos de plantas de la región sobre *P. mirabilis* uropatogénico así como el efecto de los mismos sobre factores de urovirulencia de este patógeno.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1

Realizar un *screening* de 28 extractos vegetales obtenidos de plantas de la región, basado en la acción bactericida, bacteriostática y/o de alteración de la uropatogenicidad de *P. mirabilis* uropatogénico.

Objetivo específico 2

Evaluar la capacidad de uno de los compuestos vegetales más promisorios para realizar ensayos cromatográficos y encontrar posibles principios activos contra *P. mirabilis* uropatogénico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa Bacteriana: En este estudio se empleó la cepa de *P. mirabilis* Pr2921 que es un aislamiento clínico de *P. mirabilis* proveniente de un paciente con ITU sintomática. Esta cepa ha sido ampliamente caracterizada en el Departamento de Microbiología del IIBCE (Zunino et al., 2000, 2001, 2003 y 2007).

Medios y condiciones de cultivo: Para el crecimiento de *P. mirabilis* se emplearon medios sólidos y líquidos: caldo y agar nutriente (NB y NA, respectivamente), y caldo y agar Luria Bertani (LB y LA, respectivamente). *P. mirabilis* se incubó durante 24 horas a 37 °C en caldo o agar, según correspondiera.

Las diluciones y suspensiones bacterianas se realizaron en solución *buffer* fosfato salino (PBS) 1X.

Plantas: En este trabajo se evaluaron extractos y aceites obtenidos de plantas silvestres de la región. Todos los extractos vegetales (EV) provinieron de la provincia de Córdoba, Argentina y fueron amablemente concedidos al Laboratorio de Microbiología del IIBCE por la Dra. Sara Palacios del Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales de la Facultad de Química (Universidad Católica de Córdoba, Argentina). Los extractos oleosos y aceites esenciales (AE) provinieron de Mar del Plata, Argentina y fueron gentilmente cedidos al Laboratorio por el Dr. Martín Eguaras de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. El listado de plantas evaluadas se presenta en la Tabla 1.

Ensayos bioquímicos: Sílica gel 100, 70-230 mesh ASTM y 200-400 mesh (Sigma-Aldrich) para las cromatografías. Solventes: hexano, éter etílico, acetona, metanol, acetato de etilo, diclorometano (Cicarelli) Rotavapor Figmay JL 700. Láminas de sílica para TLC.

- Obtención del extracto vegetal

Para la obtención del EV se emplearon las partes aéreas de la planta triturada. Se las dejó macerar durante 48 horas en etanol. Luego se filtró el macerado y se lo procesó en rotavapor hasta que se obtuvo una consistencia resinosa. Se dejó evaporar lo que quedó del solvente (Carpinella et al., 2010; Joray et al., 2011). Los extractos fueron solubilizados en Dimetilsulfóxido (DMSO).

- Preparación de los extractos y aceites vegetales

Los extractos se encontraban inicialmente en un estado resinoso, por lo que fueron resuspendidos en agua destilada-DMSO en una relación 4:1. La concentración de cada extracto fue expresada en mg/mL. A partir de estas muestras iniciales se prepararon las soluciones a las concentraciones de trabajo deseadas.

Para solubilizar los aceites vegetales en el medio de cultivo se probaron diversos emulsionantes y en diferentes concentraciones de los cuales se eligió una mezcla de DMSO 10% - Tween 80 0,5% (v/v). Al no contar con los valores de concentración de los aceites vegetales, esta fue expresada en términos de %v/v.

Tabla-1. Listado de plantas estudiadas.

MUESTRA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN
1	<i>Heterothalamus alienus</i>	Romerillo
2	<i>Aristolochia argentina</i>	Charrúa
3	<i>Baccharis cordobensis</i>	Nio
4	<i>Liabum candidum</i>	Piojera
5	<i>Trichocline reptans</i>	Arnica
6	<i>Dalea elegans</i>	
7	<i>Grindelia pulchella</i>	Grindelia
8	<i>Acalypha communis</i>	Pacurí
9	<i>Fluorensia oolepis</i>	Chilca
10	<i>Dolichandra cynanchoides</i>	Sachahuasca, sachagusano
11	<i>Psoralea hiquerilla</i>	
12	<i>Pterominnina dyctiocarpa</i>	
13	<i>Lepechinia floribunda</i>	Salvia blanca
14	<i>Pithecoctenium cynanchoides</i>	Peine de mono
15	<i>Lippia turbinata</i>	Poleo
16	<i>Macfadyena unguis-cati</i>	Uña de gato
17	<i>Podranea ricasoliana</i>	Bignonia rosa
18	<i>Vernonia rubricaulis</i>	Quiebra arados
19	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Paico, pichan, pichon
20	<i>Achyrocline saturoides</i>	Marcela
21	<i>Lithraea molleoides</i>	Molle
22	<i>Aloysia gratísima</i>	Palo amarillo, azahar de campo
23 ^(a)	<i>Melia azedarach</i>	Paraíso
24 ^(b)	<i>Melia azedarach</i>	Paraíso
25 ^(c)	<i>Melia azedarach</i>	Paraíso
26 ^(d)	<i>Mentha piperita</i>	Menta
27 ^(d)	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero
28 ^(d)	<i>Cinnamomun zeylanicum</i>	Canela

(a) extracto etanólico de hojas senescentes. **(b)** aceite de fruto maduro entero. **(c)** aceite de fruto maduro limpio. **(d)** aceites esenciales.

- Inhibición del crecimiento en medio sólido

Se preparó una suspensión bacteriana de Pr2921 en PBS (ajustada al patrón de turbidez MacFarland de 0,5) y se la sembró con un hisopo estéril sobre la superficie de una placa de NA. Posteriormente se colocó en el centro de la placa de NA un disco de papel de filtro (5 mm de diámetro) embebido con 10 µL de extracto. Se incubó 24 horas a 37°C y pasado este tiempo se midió el halo de inhibición.

Las concentraciones de EV evaluadas fueron 2,5; 5 y 10 mg/mL mientras que los AV se evaluaron 0,5; 1; 2 y 4 % (v/v). Se realizó un control negativo sin EV (disco embebido en DMSO-H₂O) o AV (disco embebido en DMSO-T80 0,5 %) y un control positivo con kanamicina (40 µg/mL) ya que no se contó con un extracto que tuviese acción conocida contra *P. mirabilis*, lo cual hubiese representado un control positivo adecuado.

- Concentración inhibitoria mínima (CIM) en medio líquido

La CIM está definida como la mínima concentración de antibiótico que, en un periodo de tiempo determinado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado. Se preparó una serie de tubos con concentraciones seriadas de los EV (2,5; 5 y 10 mg/mL) mientras que para los AV se trabajó con concentraciones al 0,5; 1; 2 y 4 % (estudios preliminares en el laboratorio habían determinado que los AV presentaban una CIM menor al 5 %), (Chen et al., 2013). Se usó medio NB y un volumen final de 1 mL. La suspensión bacteriana se preparó en PBS y la concentración se ajustó al valor 0,5 de la escala Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL). De esta suspensión fueron usados 100 µL por tubo. Se realizaron controles negativos sin extracto y controles positivos con agregado de kanamicina (40 µg/mL). Se incubó a 37 °C y se observó crecimiento a las 24 horas. Al realizar el ensayo se observó que algunos extractos y aceites le daban turbidez al medio de cultivo, siendo esto un problema ya que este ensayo se basa en turbidimetría. El crecimiento se determinó por tinción de Gram, a partir de un frotis obtenido de una gota del medio líquido, la cual permite diferenciar entre muestras con crecimiento (célula bacterianas teñidas) y muestras sin crecimiento (Estrela et al., 2003). Se decidió realizar una tinción de Gram a los tubos aparentemente crecidos teniendo presente como comparación, el Gram realizado al tubo control negativo. Estudios previos sugerían que la presencia de extracto vegetal podría alterar las características de tinción en algunos microorganismos (Johnson et al., 2008)

- Concentración bactericida mínima (CBM) en medio sólido

Se sembró una gota central de 10 µL del tubo que presentó inhibición en una placa de NA y la misma se incubó durante 24 horas a 37 °C. Se consideró que el extracto vegetal tenía acción bactericida si a la concentración evaluada no se observó crecimiento.

- CIM en medio sólido

Con el objeto de determinar la CIM en medio sólido de los EV, aceites no esenciales, fracciones obtenidas del EV escogido o del principio activo aislado del EV se realizaron ensayos de dilución seriada en agar de acuerdo a los lineamientos de la CLSI (2006) con pequeñas modificaciones. El ensayo se realizó en placas de poliestireno de 6 x 4 pocillos. Los cálculos se realizaron para un volumen final de 750 µL. El medio se mantuvo fundido y termostatzado a 40 °C hasta el momento de verterlo en la placa. En

ese momento se agregó el EV a 2,5; 5 y 10 mg/mL (el aceite 24 se evaluó a 1; 2,5; 5 y 10 % mientras que para el 25 se evaluaron las concentraciones 1; 2,5 y 5 %) y se mezcló bien agitando la placa. Se dejó solidificar y se sembró 2,5 μ L de la suspensión bacteriana (ajustada al patrón de turbidez Mac Farland de 0,5). Se incubó a 37 °C y a las 24 horas se observó la presencia/ausencia de crecimiento bacteriano.

- CBM en medio líquido

A partir de aquellas concentraciones de EV, aceite o principio activo aislado que mostraron inhibición del crecimiento en el ensayo de CIM se estudió la CBM. En el caso que no se observó crecimiento en medio sólido, se realizó un corte en el agar con ansa en la zona de siembra y el mismo se pasó a medio LB. Se controló el crecimiento (a través de la turbidez del medio de cultivo) a los 5 días de inoculado el tubo a 37°C. Se realizó un control negativo sin inóculo bacteriano para comparar la turbidez que genera el trozo cortado de agar en el caldo. Al final del período la ausencia de turbidez indicó la CBM.

- Hemaglutinación

A partir de un cultivo fresco de Pr2921 en medio LA se repicó a caldo LB suplementado con el EV o AV y se incubó 48 hs. a 37°C sin agitación. Las concentraciones evaluadas fueron 1; 0,5; 0,25 y 0,125 mg/mL para los EV y 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 % para los AV. Pasado este tiempo, el cultivo se centrifugó 10 minutos a 12000 g y el pellet se resuspendió en un volumen tres veces menor de PBS. Para obtener la suspensión eritrocítica se centrifugó sangre ovina a 4000 g durante 10 minutos y se lavó el pellet 2 veces con PBS. Finalmente se resuspendieron los eritrocitos en PBS al 3%. Para ver actividad hemaglutinante se mezclaron volúmenes iguales (50 μ L) de la suspensión bacteriana y la suspensión eritrocítica en una placa de hemaglutinación, la cual posteriormente se agitó suavemente en estufa (37°C) durante aproximadamente 5 minutos (Adegbola et al., 1983). Si en la placa se observan acúmulos significa que hubo hemaglutinación y que por lo tanto el EV o AV no alteró la capacidad de *P. mirabilis* de adherirse a los glóbulos rojos mediante sus hemaglutininas.

- Hemólisis

Para la evaluación de la expresión de hemolisinas se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos. En cada pocillo se colocaron 100 μ L de diluciones seriadas en PBS de un cultivo en fase logarítmica de Pr2921 incubado en presencia de 1, 0,5, 0,25 y 0,125 mg/ml del extracto de *Lithraea molleoides*. Las mismas concentraciones se ensayaron para el compuesto aislado. A estos cultivos se les agregó 50 μ L de sangre ovina al 3%. Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora sin agitación (Mobley and Chippendale, 1990).

Se definió el título hemolítico como el recíproco de la última dilución en la cual se observa hemólisis completa. Se realizaron controles positivos sin suplementar con extracto vegetal o compuesto aislado y control sin cultivo bacteriano para evaluar actividad hemolítica de los compuestos vegetales *per se*.

- Inhibición de la movilidad *swarming*

Para observar si los EV o AV alteraban la movilidad *swarming* se sembró una gota de 10 μ L de suspensión bacteriana (preparada en PBS y equivalente a una escala Mac Farland de 0,5) en el centro de una placa de medio LA suplementada con el EV a 3 concentraciones: 0,5; 1 y 1,5 mg/mL para los EV y 0,5; 1 y 1,5 % para el caso de los AV. Posteriormente las placas se incubaron a 37 °C y se realizó una lectura final a las 24 hs (Belas et al., 1991). Los ensayos se realizaron por duplicado. Se realizó un control positivo en medio LA sin suplementar con EV/AV. Los resultados fueron analizados estadísticamente usando el test de Kruskal–Wallis seguido del test de Dunn con $P < 0.05$.

La morfología de las células *swarming* cultivadas a distintas concentraciones del compuesto aislado de *Lithraea molleoides* fue observada tras tinción con cristal violeta en un microscopio óptico Olympus OP 70. Las concentraciones ensayadas fueron 0,125; 0,06; 0,03; 0,015 y 0,008 mg/mL. Se realizó un control con EtOH.

- Formación de *Biofilms*

Biofilms en poliestireno: Se cultivó Pr2921 en LB durante 24 h a 37 °C. Se inocularon 20 μ L de cultivo en placas de microtitulación (en volumen final de 200 μ L de LB). Cada muestra se realizó por triplicado y se realizaron blancos con LB sin suplementar. La placa se tapó y se incubó sin agitación por 48 h. a 37°C. Se removió el medio con cuidado y se realizaron dos lavados con agua destilada, luego de lo cual se procedió a teñir las células con cristal violeta (CV) 1% por 20 minutos. Pasado ese tiempo se lavó

la placa varias veces con agua destilada para eliminar el CV no adherido. Para cuantificar el CV adherido a las células el mismo se solubilizó con etanol 95% y se midió la densidad óptica a 540 nm de longitud (D.O. ₅₄₀) (O'Toole and Kolter, 1998).

Biofilms en vidrio: El procedimiento no difirió del anterior salvo que en lugar de placa de poliestireno se usaron tubos de vidrio y se inocularon 100 µL de cultivo en un volumen final de 1 mL.

La concentración de EV usada para los ensayos de *biofilms* fue de 1 mg/mL mientras que para los AV fue de 1% (v/v)

- *Cromatografía líquida en vacío (VLC)*

Una vez realizados los estudios de MIC y MBC, *Lithraea molleoides* fue escogida para aislar los posibles principios activos responsables de su actividad. Para esto, en un embudo Buchner de tamaño adecuado se colocaron papel de filtro, sílica, bolitas de vidrio y extracto vegetal de *Lithraea molleoides* de acuerdo al siguiente orden: papel de filtro, sílica, papel de filtro, extracto vegetal, papel de filtro y bolitas de vidrio. Cada capa debió quedar bien plana y pareja. La relación de sílica por gramo de muestra fue de aproximadamente 27,5. La muestra original, resinosa, se mezcló con sílica y solvente hasta obtener una arenilla suave que se pudiera extender de forma pareja sobre el papel filtro. Una vez armado el embudo se hicieron pasar los solventes que se indican en la Tabla 2 y se recogieron las fracciones líquidas. Estas fracciones fueron evaporadas en el rotavapor evitando llegar a sequedad, ya que el objetivo fue concentrar la muestra.

Tabla-2. Proporción de solventes en cada fracción de la cromatografía de VLC. El volumen de cada fracción fue de 100 mL exceptuando la fracción 1, que fue de 400 mL, y la fracción 20 que fue de 600 mL.

Fracción	Hexano	Éter Etílico	Acetona	Metanol
1	100			
2	90	10		
3	80	20		
4	70	30		
5	60	40		
6	50	50		
7	40	60		
8	30	70		
9	20	80		
10	10	90		
11		100		
12		70	30	
13		50	50	
14		30	70	
15			100	
16			90	10
17			70	30
18			50	50
19			30	70
20				100

- *Cromatografía en capa fina (TLC)*

Para determinar en que se diferenciaban las fracciones obtenidas en la VLC se sembraron las muestras en placas de sílica mediante toques de capilar. Luego se colocó la placa en una cubeta de cromatografía y se eligió un solvente o mezcla de solventes que funcionara como fase móvil. La fase móvil elegida para esta TLC fue Hexano-Éter (50-50). Una vez que el frente de corrida avanzó lo suficiente la placa se secó y reveló. Para el revelado se pueden usar métodos físicos considerando los compuestos que presentan fluorescencia y métodos químicos en los que hay una reacción entre el revelador y el compuesto presente en el extracto que se pone de manifiesto con una aparición de color en la zona revelada. Varios compuestos presentes en las plantas tienen estructuras químicas que les permiten absorber la luz a diferentes longitudes de onda. Para el revelado se iluminó con luz UV 254 nm y con UV 365 nm. Se marcó con lápiz las manchas que se visualizaron. Luego se vaporizó la placa con una solución de vainillina/ácido sulfúrico y se calentó a 110°C durante 5 minutos logrando así revelar más compuestos presentes en la fracción del extracto.

- *Cromatografía en columna*

A diferencia de la VLC en este caso no se usó vacío para que avanzara el solvente por la fase estacionaria. Los solventes empleados en la fase móvil fueron hexano, mezclas hexano-éter, éter, mezclas éter-metanol, metanol. A medida que se agregaban los solventes fue descendiendo el frente de corrida y se pudieron visualizar algunas fracciones por diferencia de coloración. Estas zonas coloreadas no indicaron necesariamente un compuesto aislado pero se trató de recoger ese volumen como una fracción única. Con las graduales diferencias en las mezclas de solventes se obtuvieron 118 fracciones. La cromatografía en columna representó una gran ventaja sobre la VLC ya que se logra una mayor separación debido a la longitud de la columna y se pueden visualizar determinadas fracciones que podría ser importante obtenerlas de forma separada. La posibilidad de cambiar la polaridad de la fase móvil permite mejorar la separación adaptando la cromatografía a los resultados que se van observando.

- *Bioensayos*

A partir de las fracciones obtenidas en las cromatografías se procedió a realizar los bioensayos. Estos consistieron en enfrentar las fracciones sospechosas de contener compuestos activos contra diferentes cepas bacterianas. Se emplearon cinco cepas bacterianas, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* para observar diferencias de efectos sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Para realizar los bioensayos se sembró, en forma de gota, 2,8 µL de cada suspensión bacteriana ajustadas al 0,5 de la escala Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL) sobre un medio de cultivo al que se le incorporó 8 mg de la fracción elegida disuelta en el mínimo volumen de solvente posible.

- *Microscopia electrónica de transmisión*

La morfología de Pr2921 en presencia del extracto de *L. molleoides* o del compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol se evaluó por medio de electromicroscopía, siguiendo el protocolo descrito por Legnani-Fajardo y colaboradores (1996) y empleando el Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) JEOL Modelo JEM-1010, ubicado en la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión (UMET) de la Facultad de Ciencias, UdelaR. La preparación de las muestras a ser analizadas se realizó siguiendo la siguiente técnica: Pr2921 se inoculó en LB suplementado con 8 mg/ml del

extracto o del principio activo y se incubó por 48 hs a 37°C. Posteriormente, se colocó una gota de la suspensión bacteriana sobre una grilla de 300 *mesh* (Sigma) recubierta con Formvar al 0.4%, se lavó y se tiñó negativamente con acetato de uranilo al 1%. El ensayo se realizó por duplicado y se realizó un control en ausencia del compuesto vegetal.

- Curvas de muerte

Este ensayo fue realizado en caldo LB, las concentraciones finales del extracto de *L. molleoides* y el compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol fueron de 8, 4 y 2 mg/mL y la concentración bacteriana inicial fue de 5×10^4 (ufc/mL). Para determinar la cantidad de bacterias viables se tomaron alícuotas de cada concentración a los 30 min, 1, 3, 5 y 24 horas. Las mismas fueron sembradas sin diluir y en diluciones seriadas en placas de AN y se las incubó 24 hs a 37°C. Se realizaron controles paralelos con el agregado o no de etanol y los ensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS

En la Tabla 3 se presenta un resumen de resultados de los diferentes ensayos en los cuales se evaluó el efecto de EV y AV sobre el crecimiento de Pr2921.

Inhibición del crecimiento en medio sólido:

Se observó que a la mayor concentración evaluada (10 mg/mL) el 24% de los EV interfirió con el crecimiento de Pr2921. Para los aceites esenciales se pudo realizar, para la mayor concentración evaluada (4 %), medición del halo en el 100 % de los casos, obteniéndose valores entre 3 y 5 cm.

CIM y CBM:

Al determinar la CIM en medio líquido se observó que aproximadamente el 56% de los extractos vegetales presentaron una CIM mayor a la máxima concentración evaluada (mayor de 10 mg/mL). Cuando la CIM fue evaluada en medio sólido sólo en un 16% de los casos se observó igual resultado. El resto de los extractos vegetales, presentaron una CIM menor o igual a 10 mg/mL. Incluso en algunos de ellos, como los extractos 9, 12 y 21, se logró establecer un valor determinado de CIM o bien expresar la CIM como un rango de posibles valores.

Al observar los resultados de CBM a partir de medio sólido obtenidos se encontró que el 36% de las concentraciones inhibitorias no eran concentraciones bactericidas ya que se observó crecimiento a los 5 días de incubada las zonas coincidentes de agar que presentaron inhibición del crecimiento. Los resultados de CBM a partir de medio líquido mostraron que pocas de las concentraciones ensayadas se encontraban cerca de la concentración bactericida para cada extracto. Se destacan los extractos 9, 20 y fundamentalmente los aceites esenciales los cuales no presentaron crecimiento al subcultivar el caldo a la placa de NA.

Tabla-3. Resumen de los resultados obtenidos de la interferencia en el crecimiento de Pr2921 en presencia de los diferentes EV o AV.

Muestra	Inhibición en medio sólido (a)	CIM		CBM	
		medio líquido	medio sólido	medio sólido	medio líquido
1	-	>10	≤10	10	≤10
2	< 1 mm	>10	≤10	>10	>10
3	-	≤10	≤10	>10	10
4	-	≤10	≤10	>10	>10
5	-	≤10	≤10	>10	>10
6	-	>10	>10	ND	ND
7	-	>10	≤10	>10	>10
8	< 1 mm	>10	≤1	>10	>10
9	-	≤10	≤1	2-2,5	≤10
10	-	>10	>10	ND	ND
11	-	>10	≤10	>10	>10
12	1 mm	≤10	5	10	10
13	< 1 mm	≤10	2,5-5	10	≤10
14	-	>10	>10	ND	ND
15	-	>10	≤10	>10	>10
16	-	>10	≤10	>10	>10
17	< 1 mm	≤10	5-10	10	10
18	-	>10	≤5	>10	>10
19	1 mm	>10	≤10	>10	>10
20	-	>10	≤4	≤4	≤4
21	-	≤10	≤5	>10	10
22	-	≤10	>10	>10	ND
23	-	>10	≤5	ND	ND
24	-	>4	5-10	>10	>10
25	-	>4	>5	ND	ND
26	50 mm	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
27	30 mm	<2	≤2	≤2	≤2
28	50 mm	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5

(a) La zona de inhibición se expresa en milímetros, la concentración para la cual se obtuvieron estos resultados es 10 mg/mL. Concentraciones menores no mostraron inhibición, -: ausencia de inhibición, ND: No Determinado. La muestra 21 (sombreado) fue seleccionada para la purificación del componente activo.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la interferencia de los EV y AV con factores de urovirulencia de *P. mirabilis*.

Tabla-4. Resultados de la interferencia de los diferentes EV y AE sobre factores de urovirulencia de *P. mirabilis*.

Muestra	HA	Biofilms (%) D.O.	Swarming (mg/ml)
1	+	> 50%	Interferencia a 1
2	+	> 50%	Interferencia a 1
3	+	< 25%	Interferencia a 1,5
4	+	> 50%	Normal
5	+	> 50%	Normal
6	+	> 50%	Interferencia a 1,5
7	+	> 50%	Normal
8	-	< 25%	Normal
9	+	< 25%	Interferencia a 1,5
10	+	> 50%	Normal
11	+	> 50%	Inhibición a 1,5
12	+	> 50%	Normal
13	+	> 50%	Normal
14	+	> 50%	Normal
15	+	> 50%	Inhibición a 1,5
16	+	> 50%	Normal
17	+	> 50%	Normal
18	+	> 50%	Normal
19	+	> 50%	Normal
20	+	> 50%	Inhibición a 1,5
21	+	25%-50%	Inhibición a 0,5
22	+	> 50%	Interferencia a 1
23	+	> 50%	Normal
24	-	> 50%	ND
25	-	< 25%	Normal
26	+	> 50%	No crecimiento
27	+	> 50%	Interferencia a 1,5
28	+	> 50%	No crecimiento

+: presencia de hemaglutinación, -: ausencia de hemaglutinación, los resultados de *biofilms* corresponden al ensayo realizado sobre placas de poliestireno, %D.O. respecto al control, ND: No Determinado. La muestra 21 (sombreado) fue seleccionada para la purificación del componente activo.

Hemaglutinación:

Como se observa en la Tabla 4, a las concentraciones máximas evaluadas (1 mg/mL para los EV y 4% para los AE) inhiben la hemaglutinación las muestras 8, 24 y 25 (Figura 1).

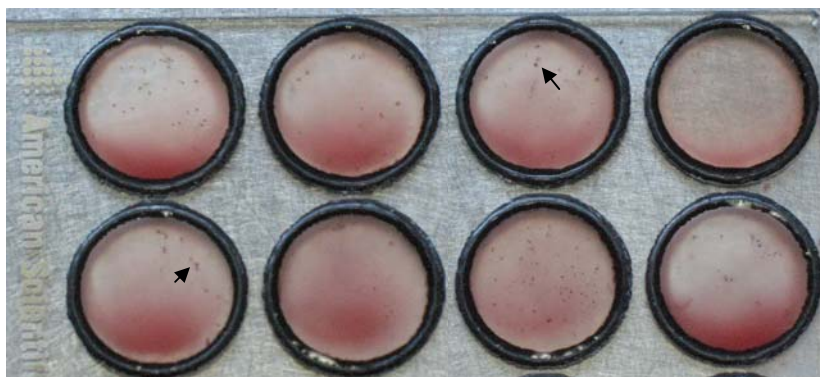


Figura 1. Ejemplo de placas de hemaglutinación. En la esquina superior derecha se observa un control negativo. En el resto de los pocillos se observan agregados de eritrocitos (indicado por la flecha).

Biofilms

Los resultados obtenidos en los ensayos fueron procesados como porcentaje de D.O.₅₄₀ respecto al control. Se distinguieron 3 rangos: menor a 25%, entre 25 y 50% y más de 50%. Se consideraron de interés aquellas muestras que presentaron valores dentro de los dos primeros rangos.

La formación de *biofilm* fue afectada por las muestras 3, 8, 9, 21 y 25 (ver Tabla 4).

Movimiento *swarming*

Como se puede observar en la Tabla 4, las muestras que presentaron inhibición del *swarming* fueron la 11, 15, 20 y 21. En los ensayos realizados se clasificó el efecto de los EV sobre el movimiento *swarming* como normal, interferencia o inhibición. Si el movimiento *swarming* obtenido fue el típico crecimiento "en ondas", resultado del comportamiento cíclico y grupal de las bacterias en la periferia de la colonia, el movimiento *swarming* fue normal y no se vio afectado por el EV. Los casos en que el *swarming* se observó en la placa pero en una forma disminuida o alterada se clasificaron como interferencia del EV a las concentraciones ensayadas. Para los casos en que se obtuvo crecimiento en la zona central de siembra sin crecimiento concéntrico alrededor

se determinó la inhibición del movimiento *swarming* por parte del EV. En la Figura 2, se observan ejemplos de cultivos de *P. mirabilis* de estas tres condiciones.

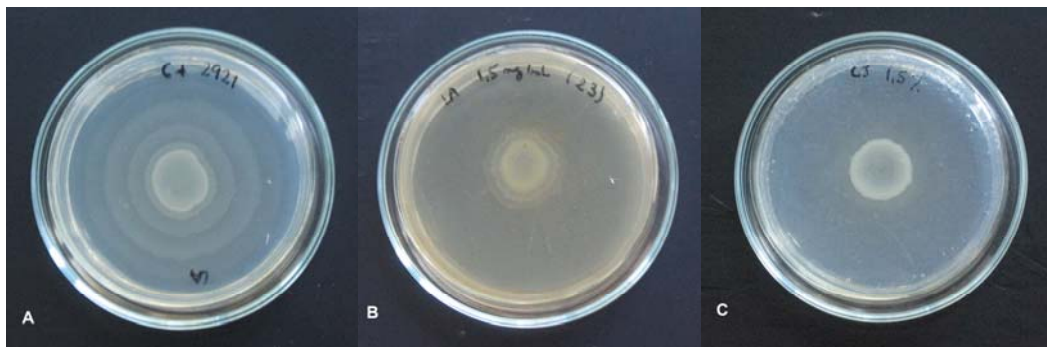


Figura 2. *Swarming*. Control, Normal (A), Interferencia (B), Inhibición (C).

Los AV 26 y 28 no mostraron crecimiento luego de la incubación lo que podría deberse a que las concentraciones usadas para el ensayo de movilidad *swarming* fueron más altas que las CIM de los mencionados AV.

En base a los resultados de la actividad antibacteriana y de la evaluación de la influencia de los EV y AV sobre la expresión de potenciales factores de virulencia asociados a la uropatogenicidad de *P. mirabilis* se decidió continuar el estudio profundizando el análisis particular del extracto de *Lithraea molleoides*. La primera parte de este trabajo basó el *screening* en *P. mirabilis* por lo que la capacidad de inhibir el movimiento *swarming* fue una característica preponderante en la elección final de un único extracto. De las muestras capaces de inhibir la movilidad *swarming* de *P. mirabilis*, sólo la número 21 presentó un valor de CIM en medio líquido de 10. Además, la incubación con el EV 21 provocó una disminución en la formación de *biofilms*. Si bien varias de las muestras revelaron propiedades de interés, como la 9 y la 20 que presentaron CIM y CBM bajas, se seleccionó el extracto número 21, *Lithraea molleoides*, para realizar los ensayos bioguiados, correspondientes a la segunda etapa del trabajo.

Purificación y caracterización del compuesto activo de *Lithraea molleoides*

La primera técnica cromatográfica empleada para la purificación del compuesto activo de *L. molleoides* fue la VLC. Se usó el gradiente de solventes indicado en la Tabla 2.

A medida que se fueron colectando las fracciones, las mismas se colocaron en un rotavapor para concentrarlas. Cuando se logró reducir el volumen se sembró cada fracción en una placa de TLC mediante toques con capilares de vidrio. Al correr la placa

de TLC se obtuvo un perfil de manchas con diferentes polaridades con respecto al solvente (Figura 3).

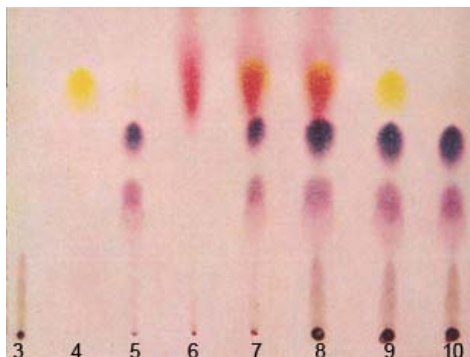


Figura 3. Imagen representativa de una TLC característica. Cada uno de los puntos numerados son las fracciones sembradas con capilar en la línea base.

Las fracciones obtenidas variaron en volumen e incluso en aspecto. Por ejemplo se obtuvieron algunas fracciones con claro aspecto aceitoso mientras que otras fueron de aspecto acuoso.

Bioensayos

Los ensayos bioguiados consistieron en enfrentar las diferentes fracciones del extracto a varios microorganismos y evaluar si tenían efecto sobre el crecimiento. Se emplearon cinco cepas bacterianas, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Así se continuó el estudio cromatográfico sobre las fracciones que presentaban actividad hasta obtener fracciones con una sola mancha en la TLC.

Se evaluó si la ausencia de crecimiento fue debida a un efecto bacteriostático o bactericida. Para ello, en aquellos ensayos en los que no se observó crecimiento, se obtuvo un fragmento de agar de la zona sembrada. Este fragmento fue incubado en medio líquido a 37 °C durante 5 días. La aparición de turbidez en el medio fue un indicador de crecimiento bacteriano, lo cual implica un efecto bacteriostático.

Se continuó con las sucesivas separaciones por cromatografía en columna hasta obtener una fracción con actividad bactericida y con una sola mancha en la TLC. Investigadores del Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina, sometieron esta fracción a una cromatografía preparativa radial y se determinó por HPLC que la muestra resultante presentó una pureza del 92%. La

estructura del compuesto activo ((Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol), que se observa en la Figura 4, fue determinada por NMR.

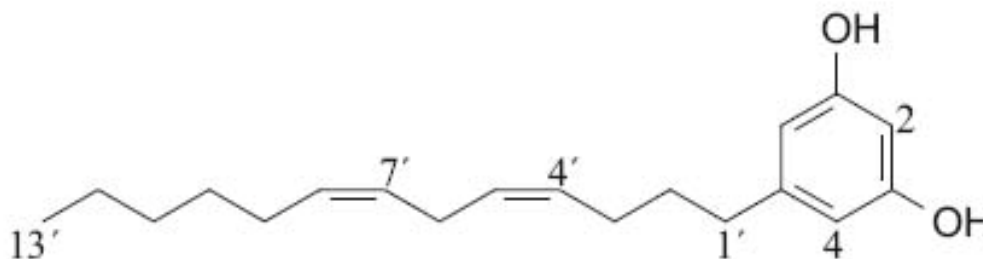


Figura 4. (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol.

Con el compuesto puro (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol obtenido de *L. molleoides* se realizaron ensayos de hemólisis y movilidad *swarming*. También se hicieron curvas de muerte y observación microscópica de cultivos de *P. mirabilis* en presencia del compuesto. En paralelo se realizaron estos mismos análisis con el extracto de *L. molleoides* completo.

Microscopia electrónica

Cuando a Pr2921 se lo hizo crecer en presencia tanto del extracto vegetal *Lithraea molleoides*, como del compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4, 7-dienyl)-resorcinol aislado, se observaron células bacterianas con bordes indefinidos, más pequeñas y más agrupadas (Figura 5 b y c) que en el control de Pr2921 en medio de cultivo sin suplemento (Figura 5 a). Estas formas celulares menos elongadas y más compactas se observan claramente en el cultivo suplementado con el compuesto puro.



Figura 5. Cultivo de Pr2921 suplementado con extracto de *L. molleoides* y con (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol, a-control de Pr2921, b-Pr2921 con extracto de *L. molleoides*, c- Pr2921 con (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol,

Hemólisis

Las concentraciones iniciales ensayadas de extracto de *Lithraea molleoides* y de compuesto aislado fueron 1; 0,5; 0,25 y 0,125 mg/ml.

Tabla-5. Placas de hemólisis.

a) Control (extracto)

Dilución	1,000 mg/mL	0,500 mg/mL	0,250 mg/mL	0,125 mg/mL
1	H	H	N	N
2	H	N	N	N
4	N	N	N	N
16	N	N	N	N
32	N	N	N	N
64	N	N	N	N
128	N	N	N	N

b) Control (compuesto)

Dilución	1,000 mg/mL	0,500 mg/mL	0,250 mg/mL	0,125 mg/mL
1	H	H	H	H
2	H	H	H	H
4	H	H	H	H
16	H	H	H	N
32	H	H	N	N
64	H	N	N	N
128	N	N	N	N

c) Extracto *L. molleoides*

Dilución	C+	1,000 mg/mL	0,500 mg/mL	0,250 mg/mL	0,125 mg/mL
1	H	H	H	I	I
2	H	H	I	I	I
4	H	I	I	I	I
16	H	I	I	I	I
32	H	I	I	I	I
64	H	I	I	I	I
128	N	N	N	N	N

d) Compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol

Dilución	C+	1,000 mg/mL	0,500 mg/mL	0,250 mg/mL	0,125 mg/mL
1	H	H	H	H	H
2	H	H	H	H	H
4	H	H	H	H	H
16	H	H	H	H	I
32	H	H	H	I	I
64	H	H	I	I	I
128	N	N	N	N	N

a) control de extracto de *L. molleoides* sin suspensión bacteriana b) control del compuesto aislado sin suspensión bacteriana, c) extracto de *L. molleoides* con suspensión bacteriana, d) compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol con suspensión bacteriana. H. hemólisis; I inhibición de la hemólisis, N. no hemólisis. C+ control positivo. Las zonas sombreadas indican las concentraciones a tener en consideración.

Se hizo un control positivo con la suspensión bacteriana sin componentes vegetales y se observó el efecto hemolítico de *P. mirabilis* en todas las diluciones excepto en la dilución 1/128 donde no se observó hemólisis por lo que esas concentraciones no se tuvieron en cuenta. A su vez, el ensayo sin la suspensión bacteriana (Tabla 5. a y b) mostró que el extracto completo y el compuesto aislado de *Lithraea molleoides* provocaron hemólisis *per se* hasta una concentración de 0,5 y 0,015 mg/mL respectivamente por lo que se trabajó a concentraciones inferiores. En el caso del compuesto puro muy pocos valores representaron verdadera hemólisis ya que exhibió mucha actividad hemolítica *per se*. Se pudo observar que el extracto completo interfirió con la hemólisis de Pr2921 hasta concentraciones de 0,0039 mg/mL. Con el compuesto aislado se pudo observar inhibición de la hemólisis de Pr2921 a concentraciones de 0,0039 mg/mL pero al tener tanta actividad hemolítica propia, los valores útiles encontrados fueron muy pocos.

Movilidad *swarming*:

En la Tabla 6 se observan los resultados obtenidos al evaluar la inhibición *swarming* de Pr2921 en ausencia y presencia del extracto de *L. molleoides* y del compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol a diferentes tiempos. El efecto inhibitorio del extracto de *L. molleoides* se observa a la máxima concentración ensayada y durante las primeras 8 horas. Los halos de crecimiento no presentaron una estructura definida lo cual puede deberse a las alteraciones producidas en las células o a la viscosidad del medio de cultivo junto con el extracto. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas

en las bacterias incubadas en presencia del extracto vegetal y las bacterias control luego de 24 horas de incubación.

Tabla-6. Efecto del extracto completo y del compuesto purificado sobre la movilidad *swarming*. Se realizaron ensayos con EtOH que mostraron valores similares a los obtenidos en el control (datos no mostrados).

Tiempo (h)	Distancia (mm)									
	Extracto de <i>L. molleoides</i> (µg/mL)				Compuesto puro (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol (µg/mL)					Control
	1000	500	250	125	125	62	31	16	8	
6	-	1,0±0	1,7±0,1	2,0±0	-	-	-	-	-	1,7±0,1
8	-	2,0±0	6,0±0	8,0±0	-	-	-	-	-	2,0±0
24	7±1,0	6,0±0	9,0±0	8,0±0	-	1,0±0	3,0±0	3,0±0	6,0±0	10,3±0,3

El compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4, 7-dienyl)-resorcinol puro provocó una inhibición total en las primeras 8 horas incluso a una concentración de 8 µg/mL. Aún a las 24 horas la inhibición en el fenómeno también fue total a 125 µg/ml y se observó una capacidad inhibitoria de hasta un 90% a una concentración de 62 µg/ml.

Para la observación microscópica de las células *swarming* versus células vegetativas se contó el número de células *swarming* presentes cada 500 células vegetativas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 7.

Tabla-7. Efecto del compuesto purificado sobre la relación célula vegetativa:célula *swarming*.

CONTROL	Relación (célula vegetativa:célula <i>swarming</i>)				
	Compuesto puro (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol (µg/mL)				
	125	62,5	31,25	15,625	7,8
500:10	500:0	500:1	500:3	500:3	500:9

Curva de muerte:

Cuando se realizó la curva de tiempo de muerte se observó que el extracto vegetal a una concentración de 8000 µg/mL (4 veces la CIM) produjo una completa mortalidad de *P. mirabilis* a las 2 hs de incubación, mostrando diferencias significativas respecto al control ya a la primer hora de incubación donde se produjo una reducción de 3,5 log₁₀ en el recuento bacteriano (Fig. 6). El compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4, 7-dienyl)-resorcinol provocó una disminución de 2.2log₁₀ en la viabilidad del uropatógeno en la primer hora y de-2.9 log₁₀ a las 5 horas de ensayo produciendo un efecto bactericida luego de las 24 horas.

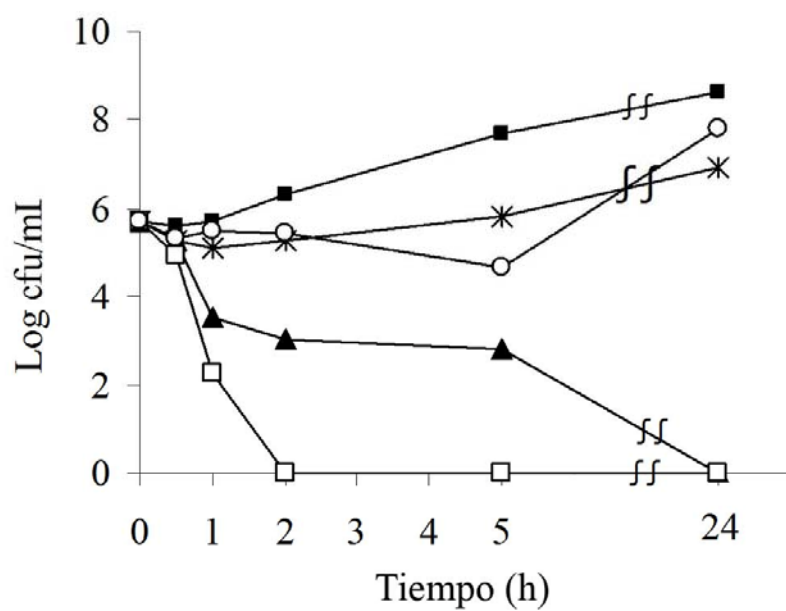


Figura 6. Curva de muerte de *Proteus mirabilis*, control con etanol (cuadrado negro), con extracto a concentración 4 veces la CIM (cuadrado blanco), con extracto a concentración 2 veces la CIM (círculo blanco), (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol a concentración 4 veces la CIM (triángulos negros) y (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol a concentración 2 veces la CIM (asterisco).

DISCUSIÓN

Entre las infecciones más importantes del ser humano se encuentran las ITU que constituyen un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año. Es la segunda causa de infección más frecuente, solo superada por las infecciones del tracto respiratorio. La prevalencia de la ITU varía con el sexo, la edad, y la existencia de patologías subyacentes. En la gran mayoría de los casos se trata de infecciones monomicrobianas siendo *E. coli* el agente más frecuente. En infecciones hospitalarias, pacientes con uropatías obstructivas o portadores de sondas, la frecuencia relativa de *E. coli* disminuye y se aíslan otros bacilos Gram negativos entre los que se encuentra *P. mirabilis* (Mattera et al., 2008).

El empleo popular de diferentes partes vegetales con el objetivo de obtener distintos efectos terapéuticos es común en todo el mundo. Varios estudios han validado científicamente el empleo de estos vegetales de uso tradicional. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales se incluyen las que se usan con un objetivo antimicrobiano (Cowan, 1999). En Uruguay y la región existe una amplia variedad de plantas que se emplean con fines terapéuticos, pero en la gran mayoría de los casos el uso de estas plantas no sigue una regla en cuanto a dosificación y frecuencia de consumo con lo que se estaría perdiendo eficacia y obteniendo resultados variables en los diferentes individuos.

Por esto es importante conocer de forma específica qué compuestos son los que están generando esta acción antimicrobiana. En este trabajo se seleccionaron un grupo de plantas, algunas con conocida acción antibacteriana. Empleando métodos cromatográficos se separaron diversos compuestos, los que mediante ensayos bioguiados mostraron actividad frente a distintos patógenos.

Cuando se analizó la inhibición del crecimiento en medio sólido, se observó que los AV mostraron una mayor inhibición del crecimiento que los EV. Este fenómeno observado puede estar relacionado con la solubilidad y las propiedades de difusión en el agar que diferencian a ambos tipos de compuesto. Los aceites esenciales de *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis* y *Cinnamomun zeylanicum* han sido objeto de estudio y se ha demostrado su actividad antifúngica (Behnam et al., 2006) y antibacteriana (Brito-Junior et al., 2012; Rosas-Pinon et al., 2012) en especial sobre bacterias que colonizan la cavidad oral.

En los ensayos de CIM se observó que el método en medio líquido coincidió con el método en medio sólido en el 52% de los casos. Los valores de CIM obtenidos indicarían que el método en medio sólido sería más exacto que el ensayo en medio líquido ya que en varios casos se observaron valores más acotados de concentración e incluso valores netos como el caso de los extractos número 8 y 12. Para el caso de los AV se encontraron valores interesantes de CIM en medio líquido. Si bien se realizó una verificación de crecimiento de las diluciones mediante la tinción de Gram, se podría haber confirmado el crecimiento repicando el medio líquido a placa de agar nutriente. Sin embargo ninguna de las metodologías representan una solución definitiva. La tinción de Gram sería adecuada si el mecanismo de acción del extracto vegetal fuese por lisis bacteriana, mientras que el resultado del repique a un medio sólido sería significativo si la acción del extracto fuese bactericida. El método de determinación de CIM en medio líquido es de uso común pero los resultados se vieron complicados por la turbidez que presentaron los extractos ensayados. una posible solución podría haber sido usar placas de titulación para realizar microdiluciones que pudieran leerse en un espectrofotómetro. En el caso de la CBM sólo los extractos 1, 9, 12, 13, 17, 20 y 21 mostraron ser efectivos bactericidas a concentraciones determinadas siendo la mejor aproximación la del extracto 9 con una CBM entre 2 y 2,5 mg/mL. Los AE fueron los que mostraron valores de CBM más bajos pero debido a la disponibilidad de muestra no se pudieron determinar los valores con precisión pero los resultados de inhibición del crecimiento y movilidad *swarming* sugirieron que la CIM y la CBM mostrarían valores bajos. Al momento de realización de este trabajo no se contaba con datos sobre CIM y CBM de algunos extractos aunque existían estudios de la capacidad antifúngica de ciertos metabolitos de *Heterothalamus alienus*, (Pacciaroni Adel et al., 2008) o de la acción insecticida del extracto etanólico de *Flourensia oolepis* (Diaz Napal et al., 2009) Recientemente se han establecido valores de CIM y CBM que van de 0.006 a 2 y de 0.012 a 10 mg/mL, respectivamente, para *Achyrocline satureioides*, *Flourensia oolepis*, *Lepechinia floribunda*, y *Lithrea molleoides* frente a bacterias gram-positivas y negativas (Joray et al., 2011). Además se han aislado compuestos como el *achyrofurano* con actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a concentraciones nanomolares (Casero et al., 2013).

Uno de los factores de virulencia más importantes de *P. mirabilis* son las adhesinas. Para determinar si los diferentes EV y AV presentaban algún efecto sobre las hemaglutininas de *P. mirabilis* responsables de la unión del uropatógeno a eritrocitos se realizaron ensayos de hemaglutinación. A las concentraciones máximas evaluadas (10 mg/mL para los EV y 4% para los AV) sólo inhiben la hemaglutinación las muestras 8, 24 y 25. La inhibición de la hemaglutinación de *P. mirabilis* por EV había sido

observada al evaluar la actividad del extracto de *Ibicella lutea*, una planta autóctona de Sudamérica, sobre este uropatógeno (Sosa and Zunino, 2009).

La formación de *biofilms* sobre diferentes superficies es una característica que muestra *P. mirabilis* (Jacobsen and Shirtliff, 2011). Cuando se quiere evaluar formación de *biofilms* en el Laboratorio, se puede evaluar el crecimiento y adhesión bacteriana sobre poliestireno o vidrio, entre otros. La formación de *biofilm* impide que la bacteria se desprenda del sustrato con los sucesivos lavados. La bacteria es teñida con cristal violeta y resuspendida en etanol para su cuantificación colorimétrica. Los resultados obtenidos en los ensayos fueron procesados como porcentaje de D.O.₅₄₀ respecto al control. Se distinguieron 3 rangos: menor a 25%, entre 25 y 50% y más de 50%. Se consideraron de interés aquellas muestras que presentaron valores dentro de los dos primeros rangos. La formación de *biofilm* fue afectada sólo por las muestras 3, 8, 9, 21 y 25.

Como se mencionó en la Introducción, el *swarming* es un mecanismo de expansión rápida y característica de *P. mirabilis*. Un criterio importante para la selección del EV o AV es la capacidad de inhibición del movimiento *swarming*. Las muestras que presentaron inhibición del *swarming* fueron la 11, 15, 20 y 21, siendo la número 21 la que presentó inhibición a menor concentración. Al comparar la acción del extracto completo y del compuesto puro sobre la movilidad *swarming* se pudo observar que a las concentraciones ensayadas el extracto sólo presentó inhibición en las primeras 8 horas mientras que el efecto inhibitorio del compuesto puro se extendió en el tiempo y a concentraciones menores. Estos resultados sugieren que en el extracto completo hubo una inhibición de la actividad del compuesto puro en su acción sobre el *swarming* de *P. mirabilis*.

Al realizar la curva de muerte con concentraciones de 4 veces la CIM, se observó que el extracto completo podría tener un efecto bactericida mientras que el compuesto puro no mostró un efecto bactericida tan marcado. Entre las 2 y las 5 horas el efecto observado fue bacteriostático a esa concentración. La acción del compuesto puro a una concentración de 2 veces la CIM, si bien luego de las 5 horas provocó la muerte bacteriana, pareció ser bacteriostático. El extracto crudo mostró acción bacteriostática al disminuir su concentración a la mitad. Estos resultados sugieren que si bien el compuesto puro no es el responsable directo de la actividad bactericida del extracto no se descarta su acción conjunta con otros compuestos presentes en el extracto. El rápido efecto bactericida observado al realizar la curva de muerte podría estar relacionado con la ruptura de la membrana bacteriana (Kubo and Fujita, 2001), fenómeno que se vio

sustentado en la microscopía electrónica donde se observaron cambios en la morfología de la bacteria. Dichos cambios probablemente representen una alteración de la permeabilidad de la membrana afectando su estructura y funcionalidad.

De las muestras capaces de inhibir la movilidad *swarming* de *P. mirabilis*, sólo la número 21 presentó un valor de CIM en medio líquido de 10. Además, la incubación con el EV 21 provocó una disminución en la formación de *biofilms*. Si bien varias de las muestras revelaron propiedades de interés, se seleccionó el extracto número 21, *Lithraea molleoides*, para realizar los ensayos bioguiados, correspondientes a la segunda etapa del trabajo.

Purificación y caracterización del compuesto activo de *Lithraea molleoides*

La primera técnica cromatográfica empleada fue la VLC. El perfil de manchas obtenidas en la placa de TLC representó uno o más compuestos con una polaridad específica. Las manchas que avanzaron más (mayor Rf) tienen una polaridad similar al solvente, otras son intermedias y las que quedan en la línea base poseen una polaridad opuesta al solvente. Se pudieron observar fracciones con un perfil de manchas similar, esas fracciones se debieron juntar en principio para contar con más masa, y luego probar con solventes que hicieran más fina la separación ya que el objetivo era tener cada vez más pureza en las fracciones. Hay manchas que fueron difíciles de separar por lo que se debió probar con diferentes polaridades de solventes e incluso realizar una columna isocrática en la cual se emplean solo dos solventes y sirve para mostrar una separación bien marcada en dos grupos (Harris, 2001; Svec, 2012).

Los ensayos bioguiados consistieron en enfrentar las diferentes fracciones obtenidas de la VLC a *Proteus. mirabilis*, *Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* y evaluar si los mismos tenían efecto sobre el crecimiento. En base a los resultados obtenidos se continuó con las sucesivas separaciones por cromatografía en columna hasta obtener una fracción con actividad bactericida y con una sola mancha en la TLC. Esta mancha correspondió al compuesto activo ((Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol).

Con el compuesto puro (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol obtenido de *L. molleoides* se realizaron nuevamente algunos de los análisis previamente descriptos como hemaglutinación y movilidad *swarming*. También se hicieron curvas de muerte, hemólisis y observación microscópica de cultivos de *P. mirabilis* en presencia del

compuesto. En paralelo se realizaron estos mismos análisis con el extracto de *L. molleoides* completo.

Cuando a Pr2921 se lo hizo crecer en presencia tanto del extracto vegetal *Lithraea molleoides* como del compuesto (Z,Z)-5-(trideca-4, 7-dienyl)-resorcinol aislado, se observaron cambios morfológicos de las células de *P. mirabilis* que podrían atribuirse a la naturaleza anfipática del alkylresorcinol que provocaría desorden en la bicapa lipídica de la célula bacteriana (Bitkov et al., 1992).

Cuando se analizó si el extracto *L. molleoides* o su compuesto aislado inhibían la hemólisis, se observó que el compuesto aislado presentó hemólisis *per se* incluso a concentraciones bajas. El extracto vegetal presentó hemólisis pero a concentraciones mayores, eso posiblemente se deba a que en el extracto completo de *L. molleoides* estén presentes otros compuestos que tienen capacidad de inhibir la hemólisis que debido a su concentración mayoritaria y a posibles interacciones dentro del extracto que enmascaren la actividad hemolítica del compuesto puro. Debido a esto podría ser relevante el aislamiento de otros componentes del extracto para definir sus acciones e incluso la posible sinergia (o antagonismo) que presenten entre sí.

El extracto de *L. molleoides* fue elegido en parte por su capacidad de inhibir el movimiento *swarming* característico de *P. mirabilis*. Por esto era relevante que el compuesto purificado fuera el responsable asociado a dicha inhibición. Los resultados obtenidos sugieren que el alkylresorcinol es el o uno de los compuestos responsables del efecto de inhibición del movimiento *swarming* de Pr2921 detectado en el EV completo. El compuesto purificado fue el primero obtenido a partir de *L. molleoides* con propiedades antibacterianas.

Cuando se observaron las células al microscopio óptico se pudo determinar una disminución significativa del número de células *swarmer* respecto al número de células *swimming* con el agregado del compuesto. Esto indicaría una modificación celular de las células de *P. mirabilis* en presencia del compuesto aislado. Sin embargo se tendrían que realizar más observaciones para poder analizar estadísticamente esta tendencia.

Como se mencionó anteriormente, otros extractos mostraron efectos sobre factores de virulencia y crecimiento de *P. mirabilis*, los extractos 11, 15 y 20 mostraron inhibición del *swarming*, y los extractos 3, 8, 9 y 25 presentaron mayor efecto sobre la formación de *biofilms*, mientras que los extractos 8, 24 y 25 inhibieron la hemaglutinación, por lo que podrían ser objeto de futuros estudios. Las muestras 26 a 28 presentaron halos de

inhibición del crecimiento importantes. Las cantidades de estas muestras fueron insuficientes para completar su estudio por lo que sería de interés realizar nuevas extracciones para continuar su análisis.

Parte de estos resultados fueron utilizados en la publicación de un artículo en colaboración con Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina (Carpinella et al., 2011).

CONCLUSIÓN

Habitualmente en Uruguay se consumen diversas infusiones con fines terapéuticos. Muchos de los compuestos activos con funciones antibacterianas encontrados en estas plantas son metabolitos secundarios producidos con fines defensivos (Pieters and Vlietinck, 2005). Si bien algunos pueden presentar beneficios para la salud, pueden al mismo tiempo ser nocivos en cantidades excesivas. Un ejemplo regional es el *Peumus boldus* tradicionalmente conocido como "boldo". Esta infusión es consumida por sus propiedades antioxidantes y diuréticas (Gotteland et al., 1995; O'Brien et al., 2006). Sin embargo algunos autores encuentran que, en dosis altas, extractos de hojas de *P. boldus* presentan efectos abortivos y teratogénicos en ratas (Almeida et al., 2000). Además, otros compuestos podrían ocasionar trastornos por sí mismos. La identificación y purificación de los productos activos de los extractos vegetales es de gran relevancia en la producción de nuevas drogas alternativas o complementarias a los antibióticos y tiene un importante impacto en la industria farmacéutica.

Los efectos sobre *P. mirabilis* hacen del (Z,Z)-5-(trideca-4, 7-dienyl)-resorcinol un posible candidato para futuros estudios de acción terapéutica. Asimismo, la molécula podría ser blanco de modificaciones químicas para mejorar su acción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto "Papel de extractos vegetales autóctonos de Sudamérica en la prevención y el tratamiento de las infecciones del tracto urinario causadas por *Proteus mirabilis*" Programa de Desarrollo Tecnológico, "Fondo Profesor Clemente Estable" PDT-FPR/F/BI/64/07.

BIBLIOGRAFÍA

- Adegbola, R.A., D.C. Old, and B.W. Senior. 1983. The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity for the urinary tract. *Journal of medical microbiology*. 16:427-431.
- Almeida, E.R., A.M. Melo, and H. Xavier. 2000. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. *Phytotherapy research : PTR*. 14:99-102.
- Behnam, S., M. Farzaneh, M. Ahmadzadeh, and A.S. Tehrani. 2006. Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogens. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 71:1321-1326.
- Belas, R., D. Erskine, and D. Flaherty. 1991. *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behavior. *Journal of bacteriology*. 173:6279-6288.
- Bitkov, V.V., V.A. Nenashev, N.N. Pridachina, and S.G. Batrakov. 1992. Membrane-structuring properties of bacterial long-chain alkylresorcinols. *Biochimica et biophysica acta*. 1108:224-232.
- Brito-Junior, M., S.A. Nobre, J.C. Freitas, C.C. Camilo, and A.L. Faria-e-Silva. 2012. Antibacterial activity of a plant extract and its potential for disinfecting gutta-percha cones. *Acta odontologica latinoamericana : AOL*. 25:9-13.
- Carpinella, M.C., D.G. Andrione, G. Ruiz, and S.M. Palacios. 2010. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytotherapy research : PTR*. 24:259-263.
- Carpinella, M.C., L. De Bellis, M.B. Joray, V. Sosa, P.M. Zunino, and S.M. Palacios. 2011. Inhibition of development, swarming differentiation and virulence factors in *Proteus mirabilis* by an extract of *Lithrea molleoides* and its active principle (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 18:994-997.
- Casero, C., A. Estevez-Braun, A.G. Ravelo, M. Demo, S. Mendez-Alvarez, and F. Machin. 2013. Achyrofuran is an antibacterial agent capable of killing methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in the nanomolar range. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 20:133-138.
- Coker, C., C.A. Poore, X. Li, and H.L. Mobley. 2000. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2:1497-1505.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12:564-582.
- Chen, C.H., S. Ravishankar, J. Marchello, and M. Friedman. 2013. Antimicrobial Activity of Plant Compounds against *Salmonella Typhimurium* DT104 in Ground Pork and the Influence of Heat and Storage on the Antimicrobial Activity. *Journal of food protection*. 76:1264-1269.
- Diaz Napal, G.N., M.C. Carpinella, and S.M. Palacios. 2009. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Bioresource technology*. 100:3669-3673.
- Estrela, C.R., C. Estrela, C. Reis, L.L. Bammann, and J.D. Pecora. 2003. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. *Brazilian dental journal*. 14:187-192.

- Gotteland, M., J. Espinoza, B. Cassels, and H. Speisky. 1995. [Effect of a dry boldo extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers]. *Revista medica de Chile*. 123:955-960.
- Harris, D.C. 2001. Análisis Químico Cuantitativo.
- Jacobsen, S.M., and M.E. Shirtliff. 2011. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*. 2:460-465.
- Jacobsen, S.M., D.J. Stickler, H.L. Mobley, and M.E. Shirtliff. 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*. 21:26-59.
- Jansen, A.M., V. Lockatell, D.E. Johnson, and H.L. Mobley. 2004. Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. *Infection and immunity*. 72:7294-7305.
- Johnson, B.J., B. Lin, M.A. Dinderman, R.A. Rubin, A.P. Malanoski, and F.S. Ligler. 2008. Impact of cranberry on *Escherichia coli* cellular surface characteristics. *Biochemical and biophysical research communications*. 377:992-994.
- Jones, B.V., E. Mahenthiralingam, N.A. Sabbuba, and D.J. Stickler. 2005. Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *Journal of medical microbiology*. 54:807-813.
- Joray, M.B., M.R. del Rollan, G.M. Ruiz, S.M. Palacios, and M.C. Carpinella. 2011. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina--isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. *Planta medica*. 77:95-100.
- Karatan, E., and P. Watnick. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*. 73:310-347.
- Kubo, I., and K. Fujita. 2001. Naturally occurring anti-Salmonella agents. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49:5750-5754.
- Lemon, K.P., A.M. Earl, H.C. Vlamakis, C. Aguilar, and R. Kolter. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current topics in microbiology and immunology*. 322:1-16.
- Lu, Y., S. Chen, H. Dong, H. Sun, D. Peng, and X. Liu. 2012. Identification of genes responsible for biofilm formation or virulence in *Salmonella enterica* serovar pullorum. *Avian diseases*. 56:134-143.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and T.D. Brock. 2006. Brock biology of microorganisms. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. p. pp.
- Mattera, A., M. Parada, M.E. Torres, and V. Machado. 2008. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Capítulo 11. Udelar.
- Mobley, H.L., and G.R. Chippendale. 1990. Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. *The Journal of infectious diseases*. 161:525-530.
- Mobley, H.L., G.R. Chippendale, K.G. Swihart, and R.A. Welch. 1991. Cytotoxicity of the Hpma hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. *Infection and immunity*. 59:2036-2042.
- Morris, N.S., D.J. Stickler, and R.J. McLean. 1999. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World journal of urology*. 17:345-350.
- Mutnick, A.H., P.J. Turner, and R.N. Jones. 2002. Emerging antimicrobial resistances among *Proteus mirabilis* in Europe: report from the MYSTIC Program (1997-2001). Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection. *J Chemother*. 14:253-258.

- Nicolle, L.E. 2002. Urinary tract infection: traditional pharmacologic therapies. *The American journal of medicine*. 113 Suppl 1A:35S-44S.
- O'Brien, P., C. Carrasco-Pozo, and H. Speisky. 2006. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-biological interactions*. 159:1-17.
- O'Gara, J.P. 2007. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*. 270:179-188.
- O'Toole, G.A., and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*. 28:449-461.
- Pacciaroni Adel, V., L. Gette Mde, M. Derita, L. Ariza-Espinar, R.R. Gil, S.A. Zacchino, and G.L. Silva. 2008. Antifungal activity of *Heterothalamus alienus* metabolites. *Phytotherapy research : PTR*. 22:524-528.
- Pieters, L., and A.J. Vlietinck. 2005. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of ethnopharmacology*. 100:57-60.
- Rocha, S.P., J.S. Pelayo, and W.P. Elias. 2007. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *FEMS immunology and medical microbiology*. 51:1-7.
- Rosas-Pinon, Y., A. Mejia, G. Diaz-Ruiz, M.I. Aguilar, S. Sanchez-Nieto, and J.F. Rivero-Cruz. 2012. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of ethnopharmacology*. 141:860-865.
- Rozalski, A., Z. Sidorczyk, and K. Kotelko. 1997. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 61:65-89.
- Scavone, P., V. Sosa, R. Pellegrino, U. Galvalisi, and P. Zunino. 2004. Mucosal vaccination of mice with recombinant *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 6:853-860.
- Seija, V., V. Frantchez, M. Pintos, M.N. Bataglini, M. Torales, A. Díaz, and C. Dufrechou. 2010. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. *Revista Médica del Uruguay*. 26.
- Senadheera, D., and D.G. Cvitkovitch. 2008. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Advances in experimental medicine and biology*. 631:178-188.
- Sosa, V., and P. Zunino. 2009. Effect of *Ibicella lutea* on uropathogenic *Proteus mirabilis* growth, virulence, and biofilm formation. *Journal of infection in developing countries*. 3:762-770.
- Svec, F. 2012. Quest for organic polymer-based monolithic columns affording enhanced efficiency in high performance liquid chromatography separations of small molecules in isocratic mode. *Journal of chromatography. A*. 1228:250-262.
- Taal, M.W., B.M. Brenner, and F.C. Rector. 2011. Brenner & Rector's the kidney. Elsevier/Saunders, Philadelphia, PA. p. pp.
- Warren, J.W., J.H. Tenney, J.M. Hoopes, H.L. Muncie, and W.C. Anthony. 1982. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. *The Journal of infectious diseases*. 146:719-723.
- Wasfi, R., O.A. Abd El-Rahman, L.E. Mansour, A.S. Hanora, A.M. Hashem, and M.S. Ashour. 2012. Antimicrobial activities against biofilm formed by *Proteus mirabilis* isolates from wound and urinary tract infections. *Indian journal of medical microbiology*. 30:76-80.

- Williams, F.D., and R.H. Schwarzhoff. 1978. Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. *Annual review of microbiology*. 32:101-122.
- Zunino, P., V. Sosa, A.G. Allen, A. Preston, G. Schlapp, and D.J. Maskell. 2003. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. *Microbiology*. 149:3231-3237.