



**Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo, A. C.**

**ACEITE ESENCIAL DE *Cymbopogon citratus* COMO  
INHIBIDOR DE GLUCOSILTRANSFERASA  
RESPONSABLE DE LA PRODUCCIÓN DE  
BIOPELÍCULAS DE *Escherichia coli* O157:H7**

---

Por:

**Luis Alberto Ortega Ramírez**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Luis Alberto Ortega Ramírez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias



---

Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Director de Tesis



---

Dra. Irasema Vargas Arispuro  
Asesor



---

Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez  
Asesor



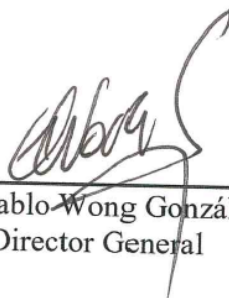
---

Dr. Gustavo A. González Aguilar  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme realizar mis estudios de maestría y ahora de doctorado, logrando así alcanzar una meta importante en mi formación.

Al proyecto CB-2013-01-222691 denominado “Caracterización y evolución de carbohidratos y metabolitos señal en biopelículas de bacterias patógenas expuestas a antimicrobianos de origen vegetal” financiado por el fondo de ciencia básica del CONACYT.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en esta área, facilitándome sus equipos y mis reiteradas gratificaciones para el personal que labora en esta coordinación.

Quiero expresar especial gratitud a mi director de tesis el Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, no sólo por su asesoría en la realización de mi tesis, sino también por el apoyo incondicional y por brindarme su amistad y confianza.

Agradezco a mi comité de tesis integrado por la Dra. Irasema Vargas Arispuro, el Dr. Miguel Angel Martínez Téllez y al Dr. Gustavo A. González Aguilar por su apoyo y asesoría durante estos cuatro años. Muchas Gracias.

## DEDICATORIAS

A **Dios** por darme la oportunidad de seguir este camino acompañándome en cada momento de mi vida.

A **toda mi familia** que aunque no estaba presente físicamente pero si en mi mente y corazón.

Especialmente a mis padres **Narciso Ortega** y **Lorena Ramírez**, que son las personas que más amo en esta vida, en primer lugar por darme la vida y en segundo por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios, ya que sin su esfuerzo para sacarme adelante nada de esto hubiera sido posible, además les quiero decir que este logro no es mío, **ES DE USTEDES**, quienes han estado siempre cuando yo los necesité, por estar a mi lado en las buenas y malas, gracias por estar en todo momento preocupándose por mí. *GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS*, los quiero con todo mi corazón.

A **Brenda** y **Reynaldo** por apoyarme tanto, no solo en las cuestiones de trabajo si no también personales, *MUCHAS GRACIAS*.

A todos mis compañeros del doctorado y amigos **Juan Manuel, Julio Cesar** y a mis amigos del Laboratorio de Tecnologías Emergentes **Thalía, Vale, Aimara, Pancho, y Melvin**, por permitirme compartir momentos muy agradables quienes me hacían el día más llevadero en el laboratorio ustedes saben que aquí tienen a un amigo y siempre estaré para apoyarlos en lo que necesiten, *GRACIAS AMIGOS...*

Muy particularmente quiero agradecer a **MELISSA** la próxima dueña de mis quincenas por estar siempre apoyándome en todo momento sabes que te amo mucho...AAHH también a Samaria Lisdeth mi cuñada a ella también la quiero mucho (pos ya venía en el paquete ni modo).

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIAS</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.1. Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> e Inocuidad Alimentaria.....	17
2.2. Composición de Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.3. Biosíntesis de Celulosa Durante la Formación de Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.4. Compuestos de Aceites Esenciales de Plantas para Inhibir la Formación de Biopelículas.....	33
2.5. <i>Cymbopogon citratus</i> como Inhibidor de Biopelículas y Enzimas.....	35
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	40
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	41
4.1. Objetivo general.....	41
4.2. Objetivos específicos.....	41
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	42
5.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol sobre la Viabilidad de Células Embebidas en Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	42
5.1.1. Antibacterianos Naturales.....	42
5.1.2. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y de Formación de Biopelícula (CMIB) de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Expuesta a <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol.....	42
5.1.3. Efecto de Concentraciones no Letales de <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol sobre la Adhesión de Células de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Durante la Formación de Biopelículas.....	43

5.1.4. Análisis por Microscopía de Contraste de Fases.....	43
5.1.5. Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	44
5.2. Etapa 2: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral y geraniol sobre la producción de Celulosa durante la formación de Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	44
<b>CONTENIDO (continuación)</b>	
	44
5.2.1. Cambios en el Contenido de Celulosa de Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Expuestas a <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol.....	
5.2.2. Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	45
5.3. Etapa 3: Determinación del Efecto de la Aplicación de <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol Sobre la Actividad de Glucosiltransferasa Responsable de Producción de Celulosa en Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	45
5.3.1. Efecto de <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol para Inhibir la Actividad de Glucosiltransferasa en un Extracto Crudo de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	45
5.3.2. Determinación de la Actividad de Glucosiltransferasa y Cinéticas de Inhibición por Citral y Geraniol.....	46
5.3.3. Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	48
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
6.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol sobre la Viabilidad de Células Embebidas en Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	49
6.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y de Formación de Biopelícula (CMIB) de <i>E. coli</i> O157:H7 Expuesta a <i>Cymbopogon Citratus</i> , Citral y Geraniol.....	49
6.1.2. Formación de Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Expuestas a Concentraciones no Letales de <i>Cymbopogon. citratus</i> , Citral y Geraniol.....	53
6.1.3. Conclusión.....	59
6.2. Etapa 2: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol sobre la Producción de Celulosa Durante la Formación de Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	59

6.2.1. Cambios en el Contenido de Celulosa de Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Expuestas a <i>Cymbopogon citratus</i> , Citral y Geraniol.....	59
6.2.2. Conclusión.....	63
6.3. Etapa 3: Efecto de la Aplicación del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre la Actividad de Glucosiltransferasa Responsable de Producción de Celulosa en Biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	63
6.3.1. Conclusión.....	71
<b>7. GENERALES.....</b>	<b>CONCLUSIONES 72</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Etapas de formación de biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7. El proceso inicia con la invasión de células planctónicas a superficies donde son adheridas, colonizando en su totalidad la superficie, enseguida los agregados liberan sustancias poliméricas extracelulares formando la estructura tridimensional de la biopelícula. En el último paso se alcanza el crecimiento es máximo y las bacterias son liberadas de la biopelícula para colonizar nuevas superficies.....	20
2 Estructura de una biopelícula madura. Las bacterias se adhieren a la superficie sólida y son embebidas en una matriz de polímeros. Las células pueden interactuar con la superficie a través de varios apéndices de proteínas y polisacáridos (pili, flagelos, lipopolisacáridos, polisacáridos capsulares). Sobre la base de la biopelícula, las células bacterianas están embebidas en una matriz que contiene altas concentraciones de eADN, además de proteínas y polisacáridos. El ADN extracelular juega un papel importante en la formación inicial de biopelícula. En el núcleo de la biopelícula, los canales de agua que transportan iones y nutrientes cruzan la matriz de la biopelícula que contiene altas concentraciones de sustancias poliméricas extracelulares. Todos estos compuestos exocelulares forman un gel protector alrededor de los microorganismos. En el área de desprendimiento de biopelícula, las enzimas microbianas destruyen la matriz exopolimérica y liberan las células que recuperan la movilidad, para poder colonizar nuevas superficies.....	22
3 Ruta de biosíntesis de celulosa. La producción del polisacárido se realiza a partir de glucosa transportada desde el exterior u obtenida de fuentes internas, la cual es fosforilada a glucosa-6-fosfato mediante la enzima glucocinasa. En seguida, glucosa-6-fosfato se convierte a glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa; la UDPG pirofosforilasa a partir de glucosa-1-fosfato y en presencia uridín trifosfato (UTP) cataliza la producción de UDP-glucosa; este nucleótido azúcar es el sustrato de la enzima celulosa sintasa.....	26
4 Arquitectura del complejo celulosa sintasa (BcsA–BcsB). a) BcsA y BcsB forman un complejo alargado con grandes dominios citosólicos y periplásmicos. Las hélices transmembrana de BcsA son de color verde, el dominio de la glicosiltransferasa beige y el dominio C-terminal rojo. BcsB se muestra en azul claro y azul oscuro para sus regiones periplasmáticas y asociadas a la membrana, respectivamente. Los terminales N y C de ambas	

subunidades están indicados y el glucano de translocación y UDP se muestran

### LISTA DE FIGURAS (continuación)

- se muestran como esferas cian y violeta. Las barras horizontales indican los límites de la membrana. IF, hélices de interfaz anfipáticas de BcsA. **b)** Frecuencia imparcial de Fo-Fc La densidad electrónica de Fourier (malla rosa) calculada antes de modelar las moléculas de glucano y UDP. La densidad continua se extiende desde el sitio catalítico intracelular hasta la interfase periplásmica BcsA-BcsB y acomoda 18 moléculas de glucosa..... 27
- 5 Polimerización y translocación de celulosa a partir de glucosa. Después de la transferencia de glicosilo, la glucosa recién añadida podría girar alrededor del enlace acetal en el plano del polímero. La dirección de rotación se determinaría por interacciones estéricas y formación del enlace de hidrógeno O3-H••O5 intramolecular característico de b-1,4-glucano. El glucano podría translocar en el canal durante esta relajación. Este proceso se repetiría con un segundo UDP-Glc pero la dirección de rotación después de la transferencia de glicosilo estaría en la dirección opuesta debido a restricciones estéricas. Alternativamente, el glucano podría no trasladarse al canal hasta que UDP sea reemplazado por UDP-Glc. Trp 383 y Cys 318 marcan la entrada al canal transmembrana..... 29
- 6 Principales componentes del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*: Citral (neral y geranial), linalool, citrolelal, geraniol, cariofileno, *cis*-vervenol,  $\beta$ -mirceno y *cis*-carveol..... 36
- 7 Cambios en la adhesión de células viables de *Escherichia coli* O157:H7 en superficies de acero inoxidable al ser expuestas al aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol durante 12 h a 37 °C. \*Diferente literal indica diferencias significativas entre tratamientos al final del tiempo de incubación. Valores medios de 3 repeticiones..... 54
- 8 Microscopía de contraste de fases (60X) de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 expuestas al aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol..... 55
- 9 Células planctónicas de *Escherichia coli* O157: H7 expuestas a *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol durante 12 horas a 37 °C. Diferente literal indica

diferencias significativas entre tratamientos al final del tiempo de incubación. \*Valores medios de 3 56 repeticiones.....

### LISTA DE FIGURAS (continuación)

- 10 Cambios en el contenido de celulosa de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 expuestas a *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol durante 12 horas a 37 °C. \*Diferente literal indica diferencias entre tratamientos..... 66
- 11 Inhibición de la actividad de glucosiltransferasa en presencia de los terpenos citral y geraniol. Los resultados se representan como el promedio  $\pm$  DE..... 72
- 12 Gráfico de Michaelis-Menten de la cinética de inhibición de glucosiltransferasa en presencia de citral (A) y geraniol (B)..... 73
- 13 Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de inhibición de glucosiltransferasa en presencia de citral (A) y geraniol (B)..... 75
- 14 Gráfico secundario del gráfico de dobles recíprocos: interceptos del eje 1/v ( $1 / V_{\max}$ ) versus concentración de citral (A) y geraniol (B) para el cálculo de  $K_i$ ..... 76

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Personas infectadas por brotes de especies de <i>Escherichia coli</i> en alimentos.....	18
2	Acercamientos utilizados para inhibir la actividad de glucosiltransferasa para evitar la formación de biopelículas utilizando extractos de plantas y compuestos derivados de las mismas.....	30
3	<i>Cymbopogon citratus</i> , sus componentes y terpenos con estructura similar han mostrado efectividad para inhibir la actividad de algunas enzimas.....	39
4	CMI y CMIB del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral y geraniol sobre la inhibición y formación de biopelículas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	50
5	Parámetros cinéticos de glucosiltransferasa en presencia de citral y geraniol.....	67

## RESUMEN

La persistencia y resistencia de *Escherichia coli* O157: H7 a los procesos de desinfección están asociados con su capacidad para formar biopelículas en superficies de contacto con alimentos. En las biopelículas de *E. coli*, la celulosa es la sustancia polimérica principal, siendo producida por el complejo enzimático celulosa sintasa, constituido por glucosiltransferasas. Por lo que un mecanismo para el control de biopelículas puede ser la inhibición de este tipo de enzimas. Compuestos terpénicos como citral y geraniol encontrados en el aceite de *Cymbopogon citratus* han mostrado efectividad para inhibir la viabilidad de células planctónicas de *E. coli*, así como la actividad de enzimas vitales del metabolismo bacteriano. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de *C. citratus* y sus componentes sobre la producción de celulosa y la actividad de glucosiltransferasa como mecanismo inhibitorio de la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7. *C. citratus*, citral y geraniol fueron eficaces para inhibir a *E. coli* en estado planctónico (0.5, 1 y 3 mg/mL, respectivamente) y biopelícula (2.0, 2.0 y 4 mg/mL, respectivamente). Todos los compuestos afectaron el desarrollo de biopelículas y el contenido de celulosa, siendo citral y geraniol los más eficaces. Citral y geraniol inhibieron la actividad de glucosiltransferasa con un IC<sub>50</sub> de 5.8 y 5.6 µM, para citral y geraniol, respectivamente. Se observó que a concentraciones mayores de citral y geraniol (8 y 10 µM) resultaron en valores menores de Km y Vmax, lo que indica un mecanismo de inhibición acompetitiva de glucosiltransferasa. El aceite esencial de *C. citratus*, citral y geraniol, fueron capaces de inhibir la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7, dicho efecto se relacionó con la inhibición de la glucosiltransferasa y una menor producción de celulosa.

**Palabras clave:** *C. citratus*, inhibición enzimática, resistencia bacteriana, celulosa, seguridad alimentaria.

## ABSTRACT

Persistence and resistance of *Escherichia coli* O157: H7 to disinfection processes are associated with their ability to form biofilms on food contact surfaces. In *E. coli* biofilm, cellulose is its main polymeric substance, produced by the enzymatic complex called cellulose synthase, constituted by glucosyltransferases; therefore, a mechanism to control biofilms could be by inhibition of these type of enzymes. Terpenes as citral and geraniol from *Cymbopogon citratus* essential oil have been effective to inhibit viability of planktonic cells of *E. coli*, as well, as the activity of vital enzymes of bacterial metabolism. For this reason, the objective of this thesis was to determinate the effect of *C. citratus*, citral and geraniol on cellulose production and glucosyltransferase activity as inhibition mechanisms of biofilm formation of *E. coli* O157: H7. *C. citratus*, citral and geraniol were effective to inhibit planktonic *E. coli* (0.5, 1 and 3 mg/mL, respectively) and biofilms (2.0, 2.0 and 4 mg/mL, respectively). All compounds affected cellulose production, being citral and geraniol the most effectives. Citral and geraniol at 2 mg/mL inhibited glucosyltransferase activity showing an IC<sub>50</sub> of 8.5 and 6.5 μM of citral and geraniol, respectively. Higher citral and geraniol concentrations added to the reaction, lower values of Km and Vmax, indicating an uncompetitive mechanism of inhibition of glucosyltransferase. The essential oil of *C. citratus*, citral and geraniol were able to inhibit biofilm formation of *E. coli* O157: H7, in addition to inhibit glucosyltransferase activity and decreased cellulose production.

**Keywords:** *C. citratus*, enzymatic inhibition, bacterial resistance, cellulose, food safety

## 1. INTRODUCCIÓN

La persistencia y resistencia de *Escherichia coli* O157:H7 a los procesos de desinfección están asociadas a su capacidad para formar biopelículas en superficies de contacto con alimentos. Una biopelícula puede definirse como una comunidad bacteriana sésil de células que viven unidas entre sí y adheridas a superficies (Vikram et al., 2013). La adhesión y formación de biopelículas de *E. coli* sobre tales superficies son un problema de contaminación cruzada y salud pública (Beuchat 2002). Sus biopelículas también pueden formarse en las superficies de los recipientes utilizados para cosechar, transportar y exhibir alimentos (Carmichael et al., 1998, Fett 2000, Cooley et al., 2003). Se ha reportado que *E. coli* O157:H7 puede formar biopelículas sobre acero inoxidable, donde un control insuficiente del crecimiento superficial puede conducir al desprendimiento de células responsables de la dispersión de la contaminación (Pérez-Conesa et al., 2006). Las frutas y hortalizas frescas contaminadas son un grupo de alimentos causantes de gran cantidad de brotes de *E. coli*, reportando infecciones bacterianas en alfalfa, melón cantaloupe, espinaca y lechuga, las cuales se han asociado con la presencia de biopelículas de este patógeno (Silagyi et al., 2009, Patel et al., 2011, Souza et al., 2014, Fu et al., 2017). Lo anterior resalta la importancia de estudiar las características de los agregados de *E. coli* para asegurar la eficacia de los procesos de desinfección y consecuente aseguramiento de la inocuidad alimentaria.

Durante la formación de biopelícula a partir de células libres se secretan polisacáridos convencionalmente llamados exopolisacáridos (Flemming et al., 2010). Estos exopolisacáridos son parte crucial de las sustancias poliméricas extracelulares asociadas con el desarrollo de biopelículas que sirven de soporte a las poblaciones bacterianas embebidas (Mah et al., 2003). La formación de biopelículas es un proceso en el cual las bacterias experimentan un cambio de estilo de vida unicelular nómada a uno sésil multicelular (Romeo 2008). Estudios previos permiten la construcción de un modelo de desarrollo hipotético para la formación de biopelículas que se ha generalizado para las

diferentes especies bacterianas (Romeo 2008). El proceso de formación de biopelículas inicia con la adherencia sobre una superficie. Una vez adherida, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión y en una etapa posterior, la bacteria comienza a secretar sustancias poliméricas las cuales constituyen la matriz de la biopelícula y finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula son liberadas para poder colonizar nuevas superficies (Kishen et al., 2010, Kerekes et al., 2013). Ryu y Beuchat (2005) evaluaron la resistencia al cloro (0, 50 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de cepas de *E. coli* O157:H7 mutadas para producir diferentes niveles de exopolisacáridos. Se observó que las cepas deficientes en la producción de exopolisacáridos fueron más sensibles a la desinfección, disminuyendo 5 log UFC en acero inoxidable después de 5 min de exposición. Por otra parte, la carga bacteriana de *E. coli* sobreproductora de exopolisacáridos no mostró una disminución significativa. Esto indica que la producción de polisacáridos favorece la prevalencia bacteriana y dificulta la desinfección de *E. coli* (Jabra-Rizk et al., 2006).

La celulosa es el exopolisacárido mayoritario de las biopelículas de *E. coli*, la cual favorece la formación de una estructura resistente mediante las interacciones célula-célula y célula-superficie. La resistencia e integridad de una biopelícula se mantiene además por factores como la adhesión, fibras de celulosa e interacciones con lipopolisacáridos (Spiers et al., 2005). Los exopolisacáridos de *E. coli* sirven como cubiertas acondicionadoras sobre superficies inertes funcionando como un adhesivo, lo cual promueve la adhesión de las células y favorece la formación de estructuras tridimensionales (Weiner et al., 1995, Frank 2001). La síntesis y secreción de celulosa de *E. coli* O157:H7 se lleva cabo mediante la enzima celulosa sintasa, la cual consiste en un complejo de proteínas transmembranales de al menos tres subunidades (BcsA, BcsB y BcsC) (Römling 2002). BcsA es la subunidad catalíticamente activa ubicada al interior de la célula encargada de condensar UDP-glucosas, siendo el producto transferido a las subunidades BcsB y BcsC para su posterior procesamiento y secreción del polisacárido (Merzendorfer 2006, Weigel et al., 2007). Entonces, la inhibición de este proceso podría ayudar a la inhibición de la formación de biopelículas y a mejorar los procesos de



desinfección de *E. coli*. Entre las tendencias de desinfección se encuentra el uso de extractos naturales y el evitar el uso de químicos

sintéticos en alimentos. Los aceites esenciales están siendo explorados como una alternativa natural de desinfección y su efectividad depende principalmente de la diversidad de constituyentes que pueden presentar (Gutierrez et al., 2008, Ortega-Ramirez et al., 2016). El aceite esencial de la planta *Cymbopogon citratus*, rico en terpenos como citral (85 %) y geraniol (1.5 %), fue efectivo para inhibir el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Bassolé et al., 2011, Gutiérrez-Larraínzar et al., 2012, Ortega-Ramirez et al., 2016). Sin embargo, la evaluación de dicha actividad antibacteriana fue realizada sobre células planctónicas; es decir, contra células bacterianas individuales dispersas, lo cual difiere de la forma de agregados bacterianos, que son el verdadero mecanismo de sobrevivencia (Mah et al., 2001). Además, el aceite esencial de *C. citratus* es capaz de inhibir la formación de biopelículas *S. aureus*, *Streptococcus mutans* y *E. coli* (Adukwu et al., 2012, Tofiño-Rivera et al., 2016). Sin embargo, se desconoce el posible mecanismo de acción de los compuestos de este aceite para inhibir la producción de biopelículas de *E. coli* O157:H7.

En la presente tesis se plantea como hipótesis que la exposición de *E. coli* O157:H7 al aceite esencial de *C. citratus* afecta la formación de biopelículas mediante la inhibición de la producción de celulosa y la actividad de glucosiltransferasa. Tal mecanismo puede sustentarse mediante la evidencia previa que describe la capacidad de terpenos similares a citral y geraniol para atravesar la membrana bacteriana e interactuar con enzimas vitales del metabolismo (Ortega-Ramirez et al., 2016). Un estudio previo demostró que citral puede interactuar de manera reversible con aldehído deshidrogenasa interactuando con aminoácidos azufrados y debilitando su estructura cuaternaria (Kikonyogo et al., 1999). Dadas las características estructurales de citral, este presenta un carácter no polar, el cual le permite interactuar hidrofóbicamente con sitios activos no polares (Kikonyogo et al., 1999). En otro estudio, diferentes terpenoides ( $\alpha$ -bisabolol, óxido de bisabolol A y guayazuleno) fueron capaces de inhibir a la enzima ciclooxigenasa (Ortiz et al., 2016). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de *C. citratus* sobre la producción de celulosa y la actividad de glucosiltransferasa como mecanismo inhibitorio de la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Biopelículas de *Escherichia coli* e Inocuidad Alimentaria

*E. coli* O157:H7 fue reconocida por primera vez como un patógeno entérico Gram negativo en 1982. Desde entonces se ha caracterizado en varios laboratorios como causante de diarrea autolimitada, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica en niños y otros grupos susceptibles de personas (Patel et al., 2011). Los brotes de infecciones por *E. coli* O157:H7 se han asociado principalmente con el consumo de carne molida poco cocida, pero una variedad de otros alimentos también se han implicado como vehículos (CDC, 2017). La contaminación cruzada de los alimentos puede ocurrir en las plantas de procesamiento y durante el manejo y preparación posterior, lo que resulta en una amplia gama de alimentos que están implicados en brotes de infecciones por *E. coli* O157:H7 (Ryu et al., 2005). Esto destaca la problemática actual en inocuidad alimentaria que causa este patógeno.

Una parte importante de los brotes de *E. coli* en alimentos se atribuyen al consumo de frutas y vegetales frescos. En los últimos años se han reportado casos de infecciones bacterianas asociadas principalmente a la presencia de diferentes serotipos de *E. coli* en alimentos de origen vegetal (Cuadro 1) (CDC, 2017). En el 2017, se encontró la presencia de *E. coli* O157:H7 en mantequilla de soya, causando infecciones en 32 personas con 12 hospitalizaciones. Esta misma cepa fue detectada en diferentes tipos de carne congelada resultando en 11 personas infectadas con 7 hospitalizaciones (CDC, 2016). Además, un brote de *E. coli* O121 y O26 en harina de trigo resultó en 63 casos de personas infectadas con 17 hospitalizaciones. En este mismo año, se detectó un brote de *E. coli* O157 presentes en germinados de alfalfa, infectando a 11 personas y causando 2 casos de hospitalización (CDC 2016; CSPI 2016). En años previos, se han presentado

brotos de *E. coli* O157:H7 en trébol crudo, espinaca, lechuga y ensalada. Estos brotes bacterianos han llevado a la

Cuadro 1. Número de casos de personas infectadas por *Escherichia coli* por el consumo de vegetales frescos.

Casos	Bacteria	Alimento
28	<i>E. coli</i> O157:H7	Espinaca
58	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga romana
33	<i>E. coli</i> O157:H7	Ensalada
9	<i>E. coli</i> O157	Germinado de alfalfa
19	<i>E. coli</i> O121	Trébol

(CDC,

2017)

industria alimentaria, al público y al gobierno a cuestionar la idoneidad de los métodos actuales de aseguramiento de la inocuidad alimentaria (CDC 2013). Principalmente, *E. coli* O157:H7 se ha asociado a colitis hemorrágica y diarrea con sangrado, debido a su capacidad para causar lesiones en las células epiteliales humanas y producir toxinas shiga, responsables del síndrome urémico hemolítico. Desafortunadamente, no existe terapia efectiva disponible porque los agentes antimicrobianos incrementan el riesgo de desarrollar esta enfermedad. La primera etapa de infección de *E. coli* O157:H7 involucra la adhesión de células bacterianas a las células del hospedero y la formación de microcolonias, lo cual conduce a la colonización del intestino grueso. A pesar de los métodos de desinfección utilizados, los brotes de esta bacteria siguen estando presente en los alimentos y dicha resistencia puede ser atribuida a la capacidad de *E. coli* O157:H7 para formar agregados bacterianos comúnmente conocidos como biopelículas.

La formación de biopelículas es un proceso en el cual las bacterias experimentan un cambio de estilo de vida unicelular nómada a uno sésil multicelular donde el crecimiento posterior resulta en comunidades estructuradas y diferenciación celular (Romeo 2008). Estudios previos permiten la construcción de un modelo de desarrollo hipotético para la formación de biopelículas que puede generalizarse para muchas especies bacterianas diferentes (Figura 1) (Romeo 2008). El proceso de formación de biopelículas inicia al presentarse una carga celular alta, ocurriendo la adherencia bacteriana sobre la superficie (i). Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse (ii) y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar. En una etapa posterior, la bacteria comienza a secretar exopolisacáridos (iii) que constituyen la matriz de la biopelícula y forman unas estructuras similares a canales con las sustancias poliméricas excretadas, cuya composición es diferente en cada bacteria (Kerekes et al., 2013). Finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan (iv) de la misma para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de formación de biopelícula (Kishen et al., 2010). La regulación de la formación de biopelículas está relacionada con procesos de comunicación intercelular. *E. coli* O157:H7 también es capaz

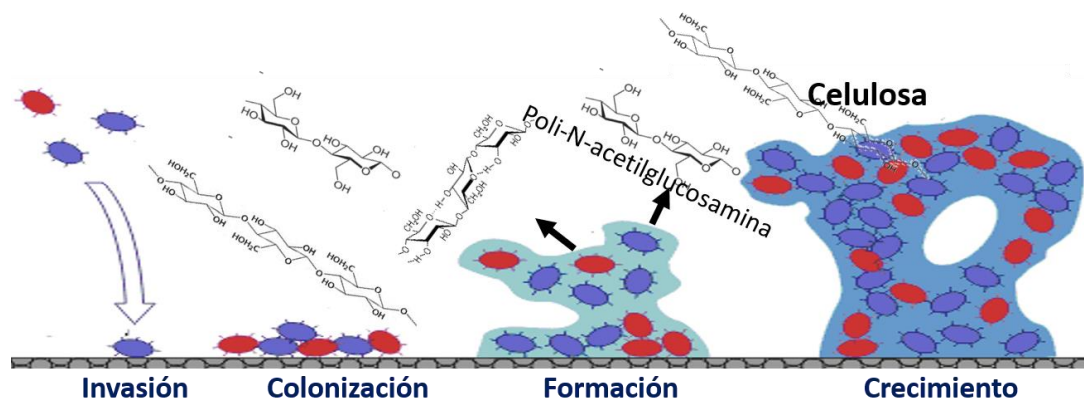


Figura 1. Etapas de formación de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 (Romeo 2008).

de formar biopelículas en superficies bióticas y abióticas; es decir, puede formar estructuras sobre plantas y vegetales, acero inoxidable, vidrio y polímeros sintéticos (Charlebois et al., 2017). Estas biopelículas son resistentes a los agentes antimicrobianos convencionales, las defensas del huésped y estreses externos. Se han presentado brotes de infecciones atribuidos de manera específica a la presencia de biopelículas bacterianas en melón, espinaca y lechuga donde se encontró la presencia de biopelículas de *Salmonella spp.* y *E. coli* (Silagyi et al., 2009). En consecuencia, en ambientes clínicos e industriales las biopelículas de *E. coli* O157:H7 representan un desafío substancial y se requieren con urgencia métodos de control para evitar su desarrollo (Dourou et al., 2011, da Silva Meira et al., 2012, Wang et al., 2013, Pilchová et al., 2014).

Las bacterias producen sustancias poliméricas extracelulares (carbohidratos, péptidos, ácidos nucleicos) para unirse formando las biopelículas sobre diferentes superficies como acero inoxidable, altamente utilizado en la industria alimentaria (Kalia 2013). Aunque algunas bacterias constitutivamente producen celulosa, la producción de celulosa bacteriana es a menudo concomitante con la formación de biopelículas (Bureau et al., 1987). Las bacterias en estado de biopelícula están encerradas en una red de polisacáridos y fibras proteínicas y son de particular preocupación para la salud humana debido a una mayor tolerancia a los tratamientos de desinfección (Stewart et al., 2001, Høiby et al., 2010).

## 2.2. Composición de Biopelículas de *Escherichia coli*

El desarrollo de biopelículas bacterianas se observa en prácticamente todo tipo de superficies, tanto en ambientes naturales como industriales. Una biopelícula es una estructura compleja hecha de agregados bacterianos dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (figura 2). La matriz de las biopelículas ofrece una capa viscosa constantemente hidratada que protege a las bacterias de la desecación o de las



defensas del huésped, impidiendo el reconocimiento de las bacterias de las biopelículas  
por el

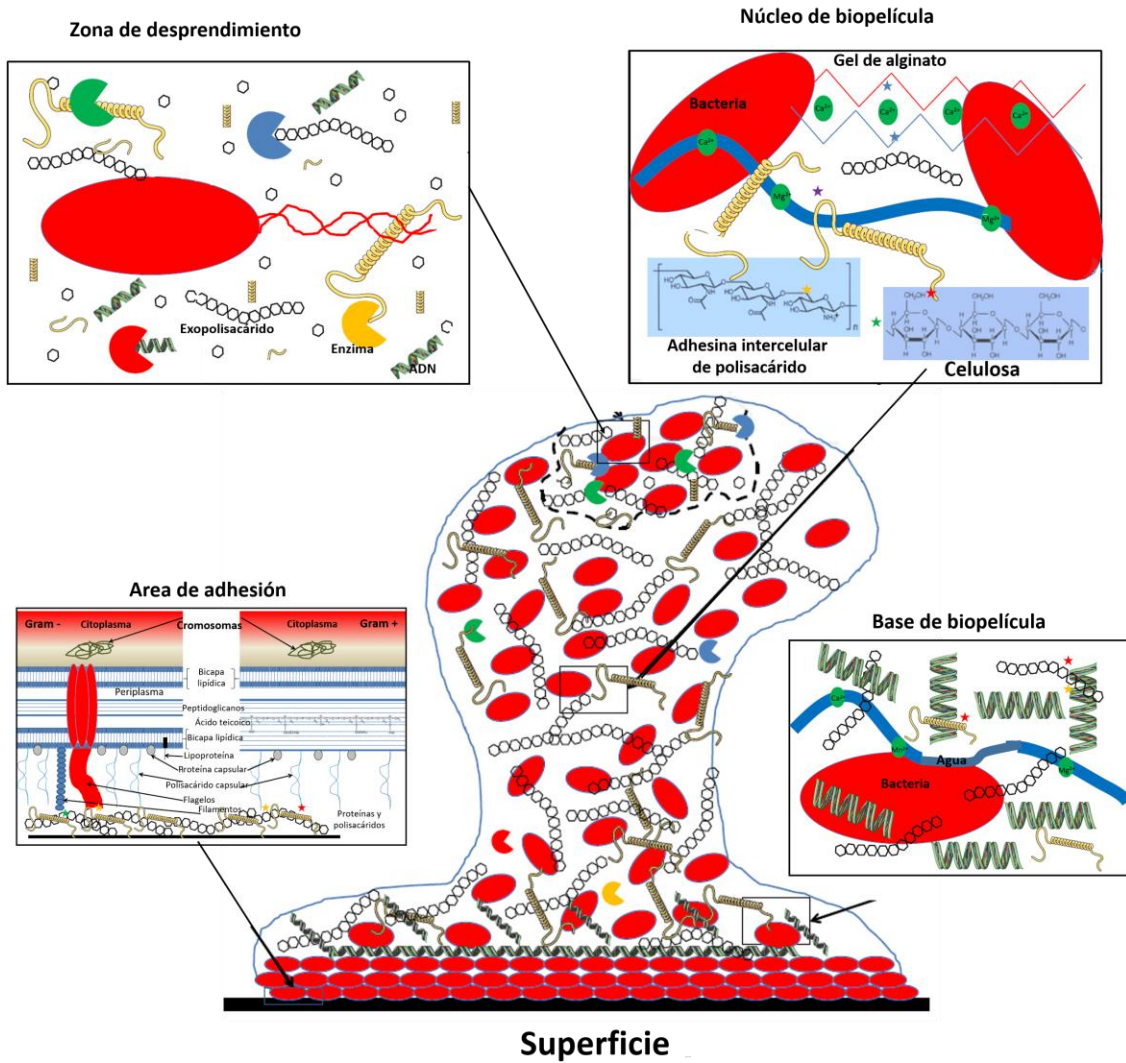


Figura 2. Estructura de una biopelícula madura. En el centro, diagrama general de la estructura de la biopelícula a una interfaz sólido/líquido.

sistema inmune (Beloin et al., 2008). La matriz también puede jugar un papel significativo como una barrera contra agentes externos que pueden afectar la viabilidad de las células dentro de la matriz como es el caso de algunos radicales y agentes antimicrobianos. Además, esta podría inhibir el lavado de enzimas, nutrientes o incluso moléculas de señalización que podrían acumularse localmente y crear microambientes más favorables dentro de la biopelícula (Starkey et al., 2004). Todos estos aspectos de las funciones putativas de la matriz contribuyen al desarrollo de la resistencia fenotípica de las biopelículas de cepas patógenas de *E. coli* (Anderson et al., 2003) y estas son dependientes de la composición de las mismas.

Las sustancias poliméricas extracelulares que conforman las biopelículas están constituidas principalmente de proteínas, ácidos nucleicos, sustancias húmicas, iones metálicos y polisacáridos (Mah et al., 2001), siendo la proporción de las mismas diferente entre microorganismos. Se sabe que *E. coli* O157:H7 produce exopolisacáridos, siendo la celulosa el principal componente de sus biopelículas. La celulosa es un homopolisacárido compuesto de unidades de D-glucopiranosas ligadas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 y es uno de los polímeros más abundantes en el planeta (Zogaj et al., 2001). La celulosa además de tener un papel importante en las propiedades adhesivas de la matriz (interacción bacteria-superficie y bacteria-bacteria) (Beloin et al., 2008) y como componente estructural en la formación de biopelículas, también juega un papel importante en la resistencia que presenta este microorganismo a desinfectantes. Se ha reportado que la interacción entre la celulosa y el curli (componente proteico principal en biopelículas de curli (componente proteico principal de biopelículas de *E. coli*) contribuye al crecimiento tridimensional de la biopelícula, así como a la tolerancia a la desecación lo cual podría verse reflejado en la persistencia que presenta esta bacteria en algunas superficies (Flemming et al., 2016).

La síntesis de celulosa en *E. coli* O157:H7 está regulada por los genes *bcs* (bacterial cellulose synthesis). Los cuatro genes *bcs* se llaman *bcsA*, *bcsB*, *bcsZ* y *bcsC* y están organizados como un operón. Los operones *bcs* son parcialmente regulados por AgfD, una delgada fimbria la cual incrementa la producción de celulosa y curli (Zogaj et al., 2001). Como se mencionó anteriormente, la celulosa, así como otras sustancias

poliméricas extracelulares ( $\beta$ -1,6-N-acetil-D-glucosamina y ácido colánico), son componentes clave durante el proceso de formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 (Beloin et al., 2008). A pesar del intenso interés en el desarrollo de biopelículas, las funciones de los exopolisacáridos que forman la matriz permanecen en gran parte indefinidas. El ácido colánico de *E. coli* afecta la arquitectura de la biopelícula pero no la adhesión de la bacteria a las superficies. A pesar de que se generaliza que *E. coli* es un productora de celulosa, se reporta que la cepa *E. coli* K12 no sintetiza este polisacárido aun cuando presenta los genes biosintéticos (Wang et al., 2004).

Las adhesinas de polisacáridos intercelulares o la relación del polímero poli-N-acetil glucosamina (PNAG) es requerido para la adherencia y formación de la biopelícula de *E. coli* (Cerca et al., 2007). PNAG es un homoglicano lineal cargado positivamente y compuesto de residuos de  $\beta$ -1,6-N acetilglucosamina con aproximadamente 20 % de residuos desacetilados (Götz 2002). Los genes involucrados en la biosíntesis de adhesinas de polisacáridos intercelulares son nombrados como *ica* (intercelular adhesión), este operón está compuesto de un gen de regulación *icaR* y cuatro genes biosintéticos: *icaABCD* (Heilmann et al., 1996, Gerke et al., 1998). PNAG forma una matriz protectora alrededor de las células bacterianas que están involucradas en las interacciones célula-célula (Cerca et al., 2007). PNAG también puede interactuar con ADN extracelular reforzando la estructura de la matriz de la biopelícula (Izano et al., 2008). Por otro lado, se reportó que la manosa representa alrededor del 10 % en biopelículas de *E. coli* (Bales et al., 2013). En este sentido, estudios recientes han puesto de manifiesto que dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, una biopelícula puede producir distintos exopolisacáridos (Wang et al., 2013).

### 2.3. Biosíntesis de Celulosa Durante la Formación de Biopelículas de *E. coli*

Celulosa es la macromolécula biológica más abundante, extracelular y es un polímero lineal formado por unidades de glucosa (Nishiyama et al., 2002). Representa un

componente esencial de paredes celulares de plantas pero también es encontrada en algas y bacterias (Matthysse et al., 1995). La producción de celulosa en bacterias se correlaciona frecuentemente con la formación de biopelículas (Grimson et al., 1996). La producción del polisacárido se realiza a partir de glucosa transportada desde el exterior u obtenida de fuentes internas la cual es fosforilada a glucosa-6-fosfato mediante la enzima glucocinasa (Figura 3). En seguida, la glucosa-6-fosfato es convertida a glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa; la UDPG pirofosforilasa a partir de glucosa-1-fosfato y en presencia de uridín trifosfato (UTP) cataliza la producción de UDP-glucosa, sustrato de la enzima celulosa sintasa.

La enzima celulosa sintasa es un complejo proteico de glucosiltransferasas que se encuentran en el espacio de membrana, que usan glucosa activada por UDP (UDP-Glucosa) para alargar el polisacárido naciente de forma procesada en una reacción (Bureau et al., 1987), invirtiendo la configuración en el carbono anomérico del azúcar recién añadido de  $\alpha$  o  $\beta$  (Lairson et al., 2008). Esta enzima, tanto en procariontas y eucariotas comparten una topología similar prevista, incluyendo ocho hélices transmembrana y al menos un bucle de glucosiltransferasa intracelular extendida (Figura 4). Bacterias Gram-negativas producen y secretan celulosa a través de un complejo de proteínas que consiste en al menos tres subunidades (BcsA, BcsB y BcsC) (Römling 2002). La proteína de membrana interna BcsA es la subunidad catalíticamente activa y contiene un dominio glucosiltransferasa conservado entre las hélices transmembrana 4 y 5 (TM4 y TM5) (Cantarel et al., 2009). BcsB es una proteína periplásmica que está anclada a la membrana interna a través de una sola hélice transmembranal. BcsA y BcsB se fusionan como un solo polipéptido en algunas especies, apoyando la observación genética de que BcsB es esencial para la síntesis de celulosa (Saxena et al., 1994, Standal et al., 1994). El dominio glucosiltransferasa de BcsA contiene la forma conservada D, D, D, Q (Q/R) XRW de tres ácidos aspárticos espaciados de forma variable y un pentapéptido que consiste en una Gln que a menudo es seguido por una Gln o Arg, un residuo variable y una Arg y Trp (Merzendorfer 2006, Weigel et al., 2007).

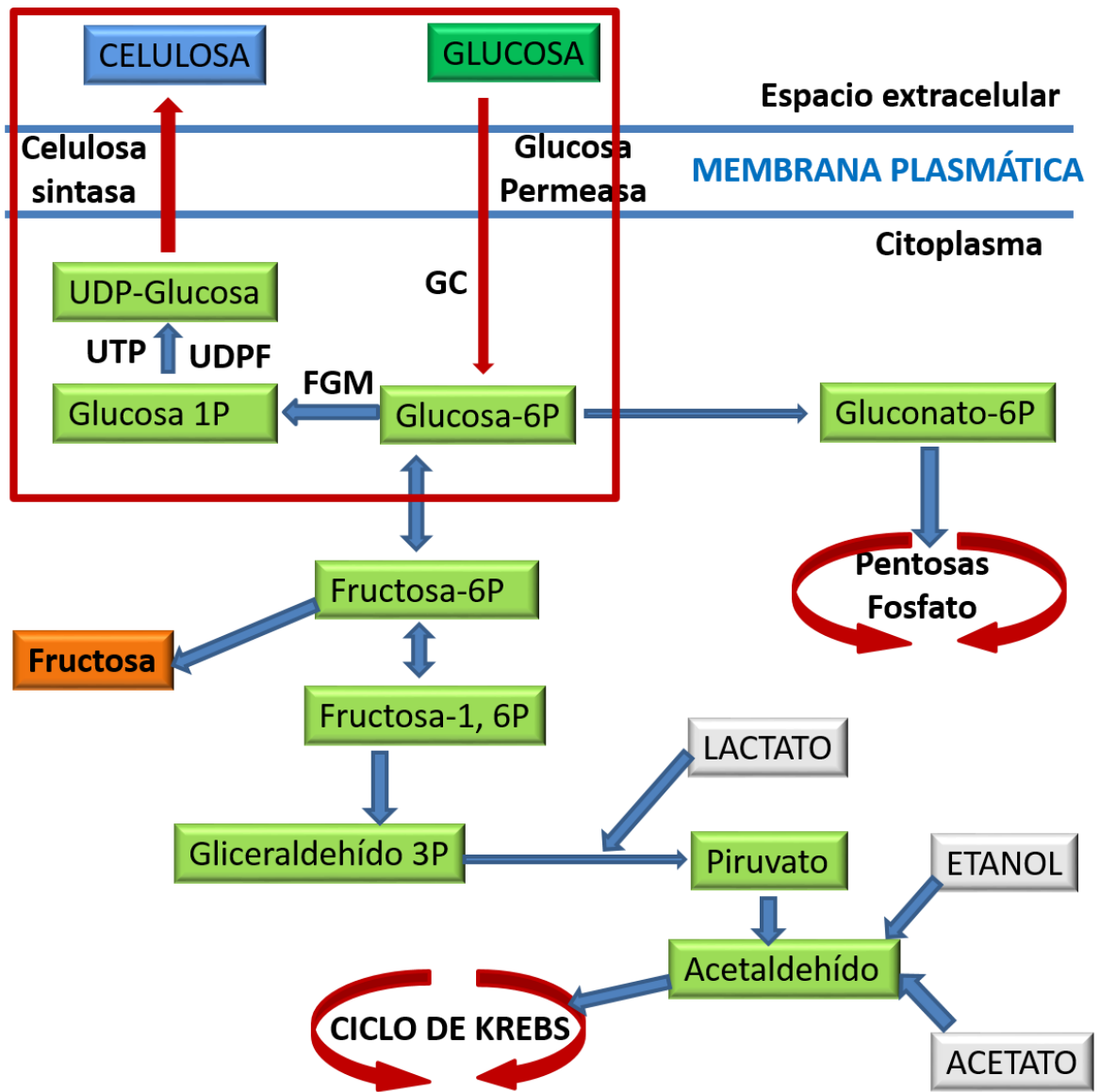


Figura 3. Ruta de biosíntesis de celulosa.

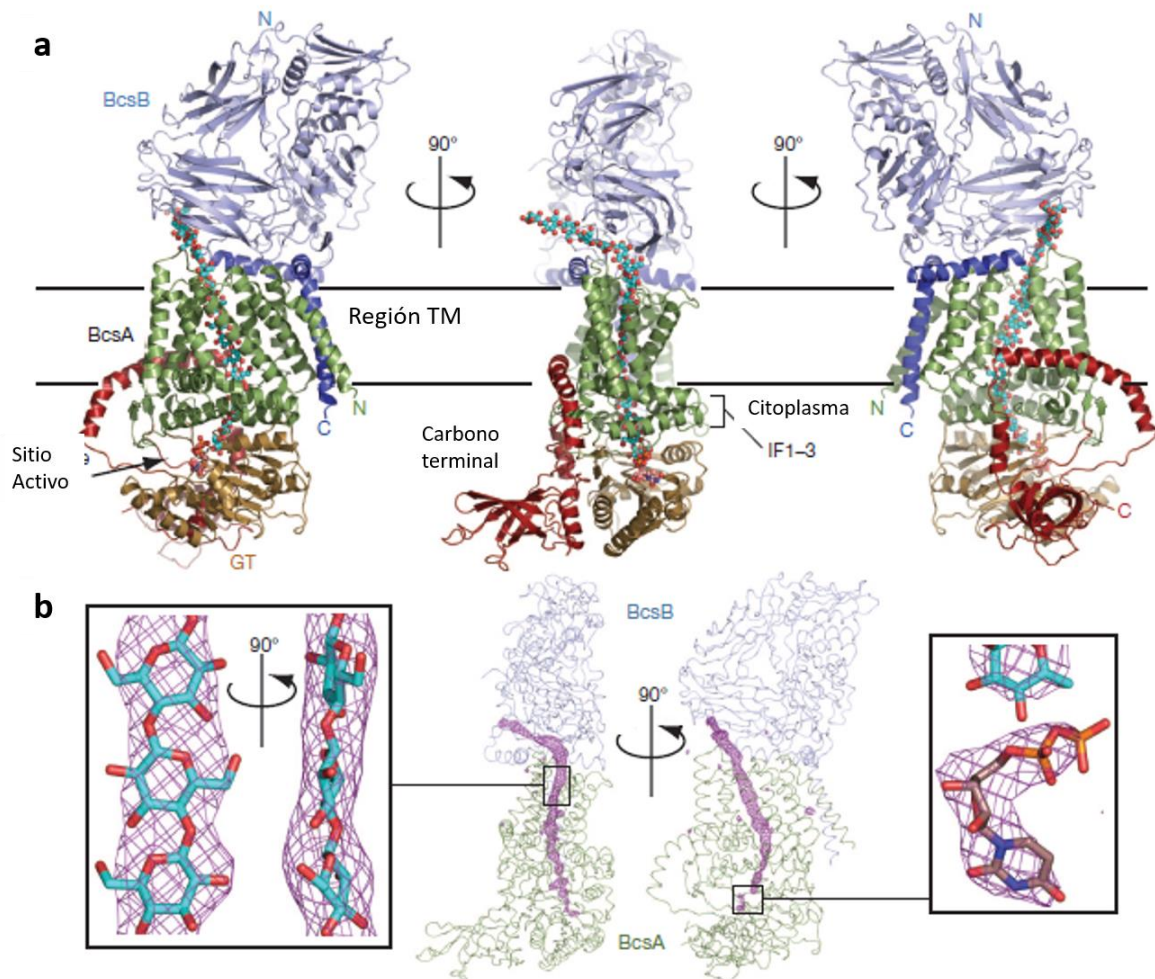


Figura 4. Arquitectura del complejo celulosa sintasa (BcsA–BcsB). **a)** BcsA y BcsB forman un complejo alargado con grandes dominios citosólicos y periplásmicos. **b)** se muestra la unión de las subunidades BcsA-BcsB que se extiende desde el sitio catalítico intracelular hasta la interfase periplásmica.

El proceso de polimerización y translocación de celulosa surge en un primer paso, tras la estimulación por el c-diGMP, la enzima une su sustrato, UDP-glucosa en el dominio glucosiltransferasa intracelular (Figura 5). En el segundo paso, la UDP-glucosa es transferida a un grupo 4'-OH en el extremo terminal no reducido de la cadena del polímero, extendiéndolo y liberando el UDP como producto secundario de la reacción. En el tercer paso, el polímero debe ser translocado al interior del canal transmembrana, para dejar un hueco que permita la adición de una nueva unidad de glucosa en el extremo no reducido del polímero, y además el UDP debe reemplazarse por otra molécula de UDP-glucosa en una nueva ronda de catálisis (Morgan et al., 2014). Trp 383 forma interacciones de Van der Waals con la penúltima molécula de glucosa en el sitio aceptor (glucosa 17), y se comprime contra el par Gln 379-Arg 380 hacia el sitio distal de la cavidad catalítica. El pentapéptido FFCGS (aminoácidos 316-320) interacciona con el lado opuesto del disacárido terminal, principalmente a través de los carbonilos de Cys 318 y Gly 319 con glucosa 18. Por lo tanto, el atacar los puntos clave en la síntesis, polimerización y secreción de celulosa se podría evitar la formación de biopelículas de *E. coli*.

Diversos estudios han evaluado la capacidad que presentan extractos de plantas y compuestos puros para inhibir la actividad de glucosiltransferasa y por lo tanto la formación de biopelículas, principalmente en bacterias causantes de placa dental (cuadro 2). Extractos de las plantas *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus ecklonii* y *Rheum undulatum* fueron efectivos para inhibir la actividad de glucosiltransferasa en extractos crudos de *S. sobrinus* (IC<sub>50</sub>=1.0, 1.2 y 0.142 mg/mL, respectivamente) y *S. mutans* (IC<sub>50</sub>=3.1, 1.6 y 0.079 mg/mL, respectivamente) (Figueiredo et al., 2010). Dentro del mismo estudio se evaluó el ácido rosmarínico, por ser uno de los componentes de las plantas estudiadas, y se obtuvo un IC<sub>50</sub> de 2.1 y 3.9 mg/mL para *S. sobrinus* y un *S. mutans*, respectivamente (Figueiredo et al., 2010). Sin embargo, en estos estudios no se evaluó mecanismo de inhibición. Por otro lado, se evaluó la eficacia de ácido oléico y linoléico (0.05 mM) para inhibir a glucosiltransferasa de un extracto de *S. mutans*, reportando para ambos compuestos un tipo de inhibición acompetitiva, es decir, estos



ácidos grasos interaccionan con el complejo enzima sustrato, disminuyendo la velocidad de la reacción (Won et al., 2007).

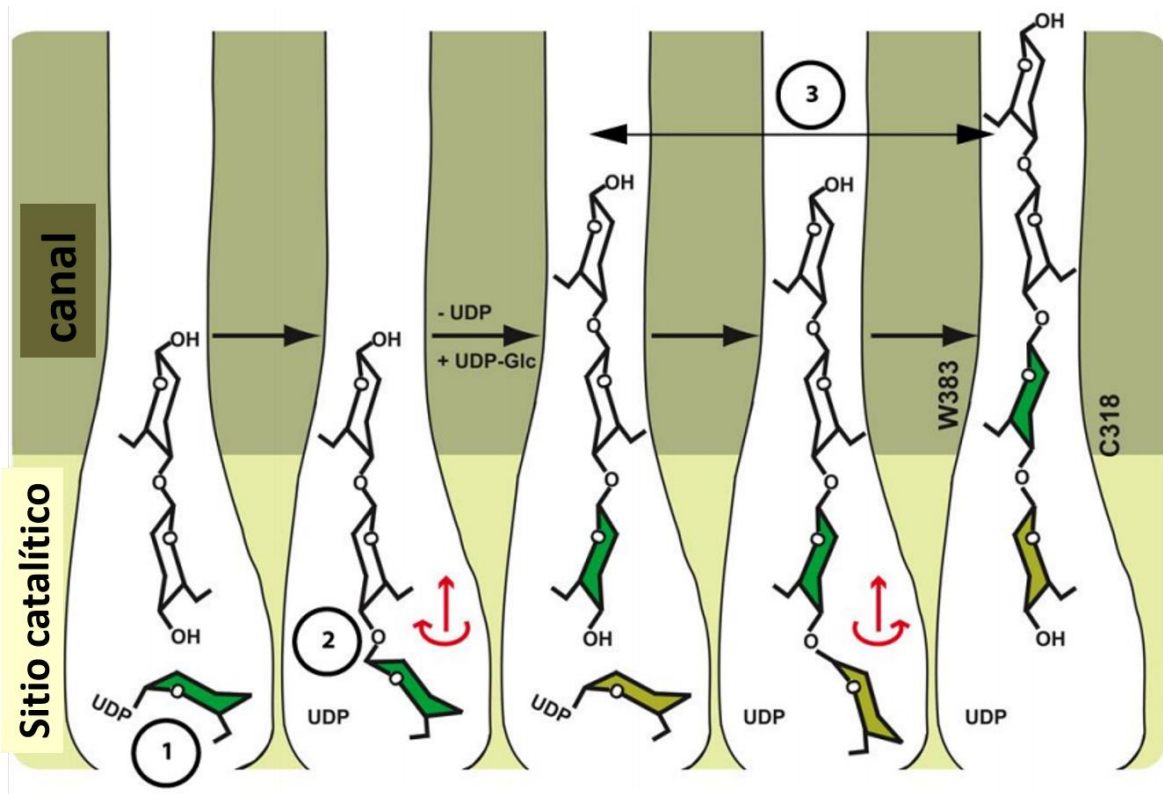


Figura 5. Polimerización y translocación de celulosa a partir de glucosa.

Cuadro 2. Acercamientos utilizados para inhibir la actividad de glucosiltransferasa para evitar la formación de biopelículas utilizando y extractos de plantas y compuestos derivados de las mismas.

Bacteria	Sistema enzimático	Inhibidor		Polisacárido		Efecto sobre biopelícula	Referencias
<i>S. sobrinus</i>	Extracto crudo	<i>P. barbatus</i>	IC <sub>50</sub> =1.0 mg/mL	Glucanos	insolubles	en IC <sub>50</sub> =0.6 mg/mL	(Figueiredo et al., 2010)
		<i>P. ecklonii</i>	IC <sub>50</sub> =1.2 mg/mL	Glucanos	insolubles	en IC <sub>50</sub> =1.0 mg/mL	
		Ácido rosmarínico	IC <sub>50</sub> =2.1 mg/mL	Glucanos	insolubles	en IC <sub>50</sub> =3.1 mg/mL	
<i>S. mutans</i>	Extracto crudo	<i>P. barbatus</i>	IC <sub>50</sub> =3.1 mg/mL	Glucanos	insolubles	en IC <sub>50</sub> =1.4 mg/mL	(Figueiredo et al., 2010)

		<i>P. ecklonii</i>	IC <sub>50</sub> =1.6 mg/mL	Glucanos insolubles en agua	IC <sub>50</sub> =2.7 mg/mL	
		Ácido rosmarínico	IC <sub>50</sub> =3.9 mg/mL	Glucanos insolubles en agua	IC <sub>50</sub> =1.3 mg/mL	
<i>S. sobrinus</i>	Extracto crudo	Ácido oleico 0.05 mM	Inhibición acompetitiv a	Glucanos insolubles en agua	No determinado	(Won et al., 2007)
<i>S. mutans</i>	Extracto crudo	Ácido linoleico 0.05 mM	Inhibición acompetitiv a	Glucanos insolubles en agua	No determinado	(Won et al., 2007)
<i>S. sobrinus</i>	Extracto crudo	<i>Rheum undulatum</i>	IC <sub>50</sub> =0.142 mg/mL	Glucanos insolubles en agua	No determinado	(Song et al., 2006)

<i>S. mutans</i>	Extracto crudo	<i>Rheum undulatum</i>	IC <sub>50</sub> =0.079 mg/mL	Glucanos insolubles en agua	No determinado	(Song et al., 2006)
<i>S. mutans</i>	Enzima Purificacada	Apigenina	1.33 mM	No determinado		
		Farnesol	1.33 mM	No determinado		
<i>S. mutans</i>		Galato de epigallocatequina (5 mg/mL)	73.1 %	No determinado	No determinado	(Kim et al., 2017)
		Epigallocatequina (3 mg/mL)	68.5 %	No determinado	No determinado	
		Ácido tánico (0.8 mg/mL)	68 %	No determinado	No determinado	
		Catecol (0.3 mg/mL)	67.6 %	No determinado	No determinado	

---

Para la misma bacteria se evaluó el efecto de apigenina y farnesol con un  $IC_{50}$  de 1.33 mM, para ambos compuestos (Kim et al., 2017). Compuestos fenólicos como galato de epigallocatequina, epigallocatequina, ácido tánico y catecol a 0.1 mg/mL mostraron efectividad para inhibir la actividad de glucosiltransferasa de un extracto de *S. mutans* en un 73.1, 68.5, 68 y 67.6 %, respetivamente (Kim et al., 2017). En estos trabajos se relaciona la inactivación de la enzima con evitar la formación de biopelículas; sin embargo, la caracterización de carbohidratos producidos no fue incluida. La mayoría de los estudios ha centrado su atención en bacterias que forman biopelículas y que son responsables de la placa dental y caries. En este punto podemos sostener la hipótesis de que el inactivar glucosiltransferasa de *E. coli* puede ser una herramienta para disminuir la producción de celulosa y la consecuente formación de biopelículas.

#### 2.4. Compuestos de Aceites Esenciales de Plantas para Inhibir la Formación de Biopelículas.

La tendencia en procesos de desinfección en la industria alimentaria contempla el uso de extractos naturales para evitar residuos de químicos sintéticos en los alimentos. Se han utilizado compuestos naturales para inhibir la producción o desarrollo de biopelículas. Los aceites esenciales derivados de plantas han sido ampliamente usados como agentes antibacterianos debido a su contenido variable en terpenoides y fenoles (Ortega-Ramirez et al., 2014). Lo anterior ha sido promovido por el hecho de que agentes antimicrobianos tradicionales, diseñados principalmente para inhibir el crecimiento celular, a menudo resultan en resistencia bacteriana a fármacos (Høiby et al., 2010). Por lo tanto, los aceites esenciales han sido estudiados usando otro enfoque de desarrollo, tales como: la inhibición de formación de biopelículas, producción de toxinas, *quorum sensing* bacteriano y factores de adhesión (Alvarez et al., 2014).

La actividad antimicrobiana de extractos de hierbas y especias ha sido atribuida a la presencia de terpenos fenólicos en aceites esenciales. Muchos autores han reportado la

eficacia de los compuestos extraídos de fuentes vegetales como agentes antimicrobianos, especialmente carvacrol de orégano, tomillo y eugenol de clavo, citral y geraniol de *C. citratus*, entre otros (Ortega- Ramirez et al., 2014). Por ejemplo, se ha reportado que carvacrol y eugenol (0.5 % p.p.) encapsulados, fueron efectivos para reducir el número de células viables por debajo de los niveles detectables en biopelículas de *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en membranas de policarbonato después de 3 horas de exposición (Pérez-Conesa et al., 2006). De manera similar,  $\beta$ -sitosterol glucósido fue identificado como un potente inhibidor de la formación de biopelículas y motilidad de *E. coli* O157:H7 (Vikram et al., 2013). Los ácidos ginkgólicos de Ginkgo biloba C15:1 y C17:1 a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el extracto de Ginkgo biloba (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibieron significativamente la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 sobre superficies de poliestireno, vidrio y membranas de nilón, sin afectar el crecimiento de células planctónicas (Lee et al., 2014). En otro estudio, el aceite de hoja de canela, cinamaldehído y eugenol (0.01 %) disminuyeron la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 (Kim et al., 2015). Sin embargo, se han realizado pocos estudios para comparar las características de la capacidad antibiopelícula de un gran número de aceites esenciales. Estos compuestos pueden alterar la integridad de la membrana citoplasmática, limitando gravemente la habilidad de las células para producir ATP y mantener la homeostasis (Pérez-Conesa et al., 2006).

Tal es el caso del uso de timol, un monoterpenoide presente en el tomillo, que inhibe la formación y destruye biopelículas a concentraciones de 125  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Braga et al., 2008). Sin embargo, estos estudios no esclarecen los mecanismos que pudieran presentarse mediante el uso de los compuestos naturales en la formación o destrucción de los agregados bacterianos. En los casos donde un aceite esencial fue efectivo para causar la destrucción de biopelículas, los autores mencionan que esta inhibición podría ser causada por la inhibición de las sustancias poliméricas extracelulares, pero no mencionan que cambios sufrieron tales sustancias (Braga et al., 2008, Adukwu et al., 2012). Lo anterior justifica la importancia de caracterizar la composición y evolución de las biopelículas bacterianas expuestas a procesos de desinfección.





## 2.5. *Cymbopogon citratus* como Inhibidor de Biopelículas y Enzimas.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* posee una alta eficacia antibacteriana contra una amplia gama de organismos que comprende bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras, y hongos (Hammer et al., 1999, Inouye et al., 2001, Figueirinha et al., 2008). Bacterias como *E. coli* O157:H7, *S. Tiphymurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcesens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, y *Corynebacterium equii* fueron inhibidas por el aceite de *C. citratus* (Baratta et al., 1998, Cimanga et al., 2002, Pereira et al., 2004, Bassolé et al., 2011, Ortega- Ramirez et al., 2016). La composición del aceite esencial de *C. citratus*, rica en terpenos, (Figura 6) es la responsable del potencial antimicrobiano de esta planta (Ortega- Ramirez et al., 2016). Por otro lado, el aceite esencial de *C. citratus* también es capaz de inhibir la formación de biopelículas de bacterias patógenas. Utilizando el aceite esencial de *C. citratus* en diferentes concentraciones (0.125-4 % v/v) fue capaz de inhibir y destruir las biopelículas formadas por *S. aureus* (Adukwu et al., 2012). De manera similar, fue eficaz para erradicar la formación de biopelículas de *Streptococcus mutans*, determinando que 0.1 mg/100 mL del aceite esencial causa una reducción de 1.3 logaritmos de mortalidad (Tofiño-Rivera et al., 2016). Se ha reportado que geraniol, uno de los componentes del aceite de *C. citratus* (0.06 %) inhibió más de un 75 % las biopelículas de *Candida albicans* sobre superficies de poliestireno (Dalleau et al., 2008).

Para el caso de células planctónicas se ha reportado que los terpenos pueden interaccionar con proteínas de membrana provocando su desestabilización e inhibiendo su función principal (Ortega- Ramirez et al., 2016). Por lo tanto, se puede establecer que también pueden inhibir a proteínas involucradas en la síntesis y excreción de sustancias poliméricas extracelulares. Un estudio previo demostró que citral puede interaccionar de manera reversible con aldehído deshidrogenasa formando puentes de hidrógeno con grupos sulfhidrilos de la enzima, interaccionando principalmente con el aminoácido

citral y sus isómeros son inhibidores competitivos para aldehído deshidrogenasa, es decir su

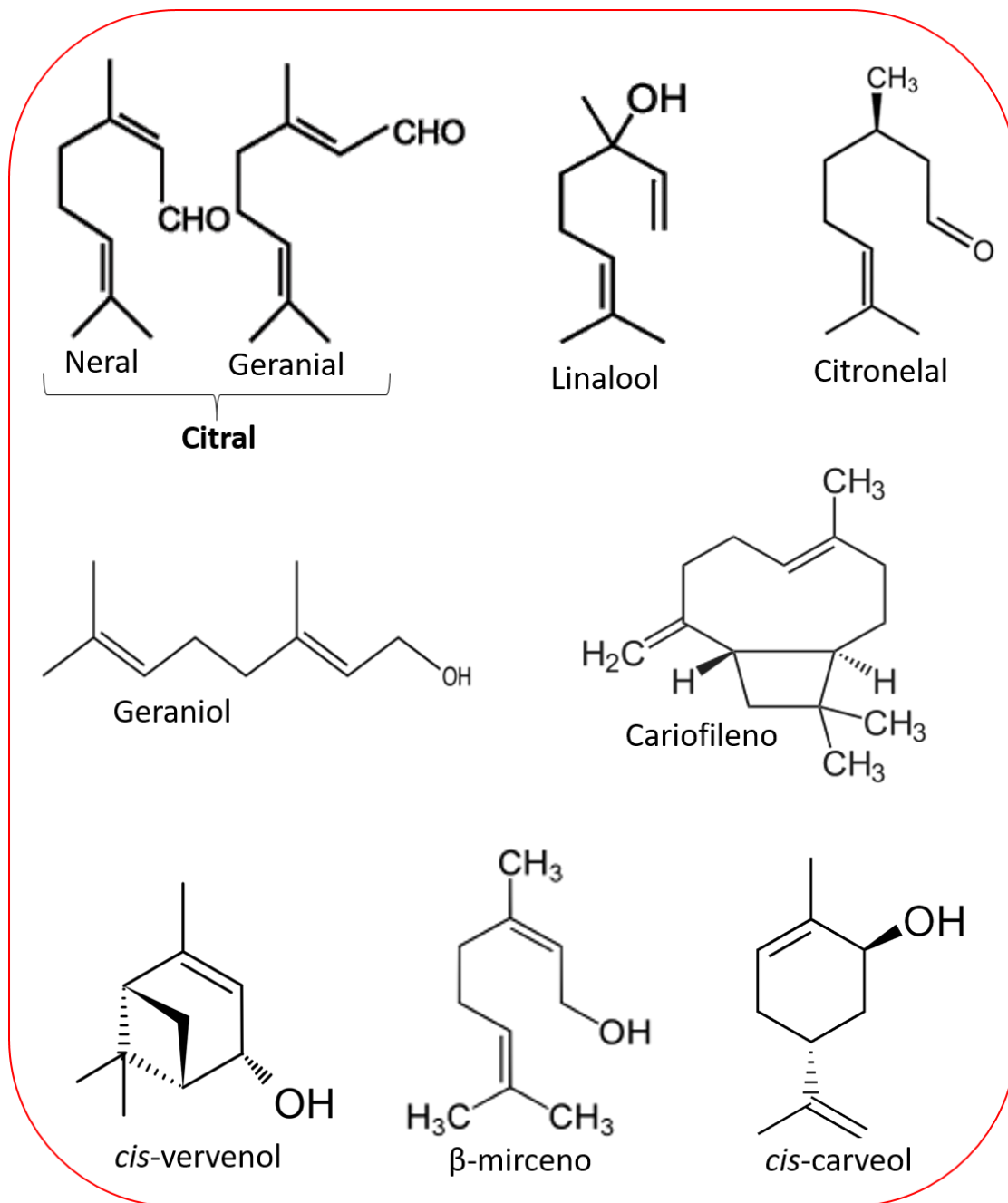


Figura 6. Principales componentes del aceite esencial de *C. citratus*: neral (50 %), geranial (35 %), linalool (0.4 %), citrolelal (0.16 %), geraniol (1.5 %), cariofileno (1.7 %), *cis*-vervenol (1.0 %),  $\beta$ -mirceno (0.5 %) y *cis*-carveol (1.0 %) (Ortega- Ramirez et al., 2016).

efecto es directamente en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, dadas las características estructurales de citral, éste presenta a su vez un carácter no polar, el cual le puede permitir interaccionar hidrofóbicamente con sitios activos no polares (Kikonyogo et al., 1999).

En otro estudio (Ortiz et al., 2016) se evaluaron diferentes terpenoides ( $\alpha$ -bisabolol, oxido de bisabolol A, y guayazuleno) capaces de inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX) encontrando que  $\alpha$ -bisabolol presentó afinidad con residuos de aminoácidos como HSE193, ASP199, HSD200, ILE260, VAL277, PHE278, GLY279, LEU280, y VAL281; oxido de bisabolol: ILE260, TYR261, PRO262, HSD374, TYR390, VAL430, GLN431 y LYS432; y guayazuleno: VAL277, PHE278, GLY279, LEU280, ILE394, y TYR395. Estos resultados sugieren que la polaridad, la rotación libre de un solo enlace o, por el contrario, la rigidez molecular, el número de conformeros, así como el tamaño e impedimento estérico de algunos restos en los tres terpenoides corresponden bien con las características químicas de grupos funcionales de los residuos de aminoácidos en las zonas de interacción de COX. El grupo hidroxilo de  $\alpha$ -bisabolol parece interactuar con tres residuos polares de dos aminoácidos básicos (HSE193 y HSD200, tautómeros prototrópicos de histidina) que también pueden protonarse y uno de aminoácidos ácidos (ASP199); además, el resto de los seis residuos que interaccionan con  $\alpha$ -bisabolol son de aminoácidos hidrófobos que pueden tener afinidad por los restos no polares de este terpenoide.

*C. citratus*, sus componentes y terpenos con estructura similar han mostrado efectividad para inhibir la actividad de algunas enzimas. Tal es el caso de eugenol y carvacrol los cuales fueron efectivos para inhibir la enzima Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa con  $IC_{50}$  de 97.31 y 139.24  $\mu$ M para eugenol y carvacrol. Eugenol presentó un tipo de inhibición competitiva y carvacrol del tipo acompetitiva; este tipo de inhibición es debida a la interacción de la enzima mediante puentes de hidrógeno con Asn 226 y Pro 273 (Hui et al., 2017). Por otro lado, los compuestos neral y geranial inhibieron a aldehído deshidrogenasa, mostrando un tipo de interacción no competitiva (Kikonyogo et al., 1999). Mientras que mirceno presentó inhibición del tipo competitiva

contra las enzimas pentoxiresorufina-O-deetilasa (PROD) y etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD)

con un  $IC_{50}$  de 0.14 y  $>50 \mu\text{M}$ , respectivamente pero no se determinó el tipo de interacción con dicha enzima (De-Oliveira et al., 1997). La información anterior nos permite plantear la interacción de *C. citratus* y sus constituyentes con glucosiltransferasa y la consecuente producción de celulosa y biopelícula de *E. coli* O157:H7.

Extractos metanólicos de *C. citratus* han sido efectivos en la inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos a  $500 \mu\text{g/mL}$ , con valores en el rango de 19-71 % e inhibiendo a la enzima xantina oxidasa a  $50 \mu\text{g/mL}$  (Cheel et al., 2005). En otro estudio, se evaluaron siete monoterpenos de *C. citratus* sobre la actividad de pentoxiorresorufina obteniendo  $IC_{50}$  de 0.087 mM para (-)- $\alpha$ -pineno; (+)- $\alpha$ -pineno, 0.089 mM; *d*-limoneno, 0.19 mM;  $\alpha$ -terpineno, 0.76 mM; citral, 1.19 mM; citronelal, 1.56 mM, y (9) camfor, 7.89 mM (De-Oliveira et al., 1997). Compuestos obtenidos de *C. citratus* (*d*-limoneno y geraniol) se ensayaron en cuanto a su capacidad para inducir la actividad de la enzima desintoxicante glutatión S-transferasa, resultando que *d*-limoneno y geraniol aumentaron la actividad de glutatión S-transferasa 2,4-3,0 y 2,5 veces, respectivamente con respecto al control (Zheng et al., 1993). Como se muestra en los estudios anteriores, existe evidencia que muestra que el aceite de *C. citratus* y sus compuestos presentan efectividad para inhibir diferentes tipos de enzimas, pero no existe evidencia del efecto de este aceite contra enzimas productoras de biopelículas como glucosiltransferasa de *E. coli* O157:H7

Cuadro 3. *Cymbopogon citratus*, sus componentes y terpenos con estructura similar han mostrado efectividad para inhibir la actividad de algunas enzimas

Inhibidor	Enzima	IC <sub>50</sub> (μM)	Interacción con aminoácidos	Modo de inhibición	Referencias
Eugenol	Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (recombinante de <i>E. coli</i> )	97.31	Lys124, Asp149, Ser150, Trp211, Met213, Ile217, Glu230 y Met275 (puente de hidrógeno con Asn226).	Competitiva	(Hui et al., 2017)
Carvacrol	Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (recombinante de <i>E. coli</i> )	139.24	Trp211, Ser212, Met213, Asp274 y Met275 (puente de hidrógeno con Pro273)	Acompetitiva	(Hui et al., 2017)
Neral	Aldehído deshidrogenasa (Humana)	ND	ND	No competitiva	(Kikonyogo et al., 1999)
Geranial				No competitiva	
Mirceno	PROD	0.14 μM	ND	Competitiva	(De-Oliveira et al., 1997)
	EROD	>50 μM	ND	Competitiva	
Citral	PROD	1.19 μM			(De-Oliveira et al., 1997)

### **3. HIPÓTESIS**

Citral y geraniol componentes del aceite esencial de *C. citratus* inhiben la formación de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 al afectar la actividad de glucosiltransferasa y la secreción de celulosa.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Determinar el efecto de *Cymbopogon citratus* sobre la producción de celulosa y la actividad de glucosiltransferasa como mecanismo inhibitorio de la formación de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

### 4.2. Objetivos Específicos

Evaluar el efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol sobre la viabilidad de células embebidas durante la formación de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

Evaluar el efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol sobre la producción de celulosa durante la formación de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

Determinar el efecto de la aplicación de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol sobre la actividad de glucosiltransferasa responsable de producción de celulosa en biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol sobre la Viabilidad de Células Embebidas en Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

### 5.1.1. Antibacterianos Naturales.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (W523100) y los principales componentes de esta planta: citral (W230316) y geraniol (W250716) fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich (Toluca-México).

### 5.1.2. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y de Formación de Biopelícula (CMIB) de *Escherichia coli* O157:H7 Expuesta a *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol.

El efecto antibacteriano del aceite esencial, citral y geraniol fue evaluado contra *E. coli* O157:H7 (ATCC 43890) en su forma planctónica y sétil, respectivamente. Para el efecto sobre la forma planctónica se evaluaron diferentes concentraciones del aceite esencial y los terpenos (1-20 mg/mL) usando caldo nutritivo Mueller Hinton con un inóculo ajustado a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. La CMI (mg/mL) se determinó como la concentración más baja que inhibió completamente el crecimiento bacteriano visible de células planctónicas. Para la inhibición de la forma sétil se determinó la CMIB, la que consistió en determinar la concentración más baja de cada compuesto para inhibir la adhesión bacteriana en cupones (1.0 x 1.0 x 0.1 cm) de acero inoxidable (grado 304), los resultados se expresaron como Log UFC/cm<sup>2</sup>. Para lo anterior, en tubos de ensaye con 10 mL de caldo Mueller Hinton previamente inoculados ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) que contenía

los cupones de acero inoxidable, se adicionaron diferentes concentraciones de los agentes antibacterianos (1-20 mg/mL) y

fueron incubados a 37 °C durante 24 h. Para la determinación de las células viables embebidas en la biopelícula los cupones fueron retirados del medio de cultivo y lavados con agua, para remover las células débilmente adheridas al cupón. Se agregaron 5 mL de agua peptonada, seguido de 5 min de baño con ultrasonido para liberar las células unidas fuertemente, las cuales fueron cuantificadas en placas de agar Mueller Hinton después de 24 h de incubación a 37 °C. La concentración que inhibió completamente el crecimiento bacteriano se determinó como la CMIB (Kerekes et al., 2013).

### **5.1.3. Efecto de Concentraciones no Letales de *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol sobre la Adhesión de Células de *Escherichia coli* O157:H7 Durante la Formación de Biopelículas.**

Este ensayo se realizó con el propósito de determinar los tiempos y el efecto de concentraciones que no afecten la viabilidad de las células de *E. coli*, para evitar tal interferencia sobre la producción de celulosa. Las condiciones utilizadas para la formación de biopelículas se describieron en el apartado 5.1.2., variando las concentraciones de *C. citratus* (0.5 mg/mL), citral (0.5 mg/mL) y geraniol (0.25 mg/mL); y los tiempos de cuantificación de las células adheridas (0, 2, 4, 8, 10, 12 h). Adicionalmente se cuantificaron las células planctónicas en el medio de cultivo, expresando estos resultados como Log UFC/mL.

### **5.1.4. Análisis por Microscopía de Contraste de Fases.**

El microscopio invertido (Zeiss Axio Vert A1 Inverted) se utilizó para observar los cambios morfológicos durante la formación de las biopelículas de *E. coli* O157:H7, basados en el apartado anterior. Con el propósito de favorecer el paso de luz necesaria para este tipo de microscopía las biopelículas fueron formadas en superficies de poliestireno. Posteriormente el medio de cultivo fue retirado en cada tiempo de incubación y la

superficie se lavó suavemente con agua. Las biopelículas se tiñeron durante 10 min a temperatura ambiente con cristal violeta (0.1 %) y fijado con lugol. Las células adherentes fueron vistas en un microscopio con contraste de fases (600x).

### **5.1.5. Diseño Experimental y Análisis de Datos**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar para todos los ensayos. El efecto de los compuestos probados (*C. citratus*, citral y geraniol) y el tiempo de muestreo (0, 2, 4, 8, 10, y 12 h) se evaluó sobre las células viables de *E. coli* O157:H7. Se realizó un ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. Se utilizó el software estadístico NCSS (2007) para el análisis de resultados.

## 5.2. Etapa 2: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol sobre la producción de Celulosa durante la formación de Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

### **5.2.1. Cambios en el Contenido de Celulosa de Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 Expuestas a *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol.**

El contenido de celulosa de biopelículas de *E. coli* O157:H7 expuestas al aceite esencial y los terpenos se cuantificaron como equivalentes de glucosa. Como se mencionó previamente, después del tiempo de incubación los cupones de acero inoxidable fueron retirados del medio de cultivo y se lavaron con agua para remover las células débilmente adheridas. Subsecuentemente, se agregaron 5 mL de agua y 30  $\mu$ L de formaldehído (33 %). Una hora después, se le adicionó 2 mL de NaOH (1 M) y se aplicó un baño con ultrasonido durante 5 min, la mezcla fue refrigerada durante 3 h a 4 °C. El volumen final (7 mL) fue filtrado (milliporo 0.22  $\mu$ L) y dializado con agua Milli-Q usando una

membrana de diálisis de 14 kD, para su posterior liofilización. La muestra liofilizada fue diluida en 300  $\mu$ L de agua Milli-Q para la subsecuente cuantificación de celulosa adherida a los cupones (Liu et al., 2002). El contenido de celulosa se determinó por el método de fenol/ácido sulfúrico usando glucosa como estándar expresando los resultados como mg equivalentes de glucosa/cm<sup>2</sup> (Masuko et al., 2005).

### **5.2.2. Diseño Experimental y Análisis de Datos**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, evaluando el efecto de *C. citratus*, citral y geraniol y el tiempo de muestreo (0, 2, 4, 8, 10 y 12 h) en el contenido de celulosa de las biopelículas de *E. coli*. Se realizó un ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. Se realizó correlación de Pearson entre el contenido de celulosa secretada sobre la superficie de acero inoxidable y las células viables adheridas. Se utilizó el software estadístico NCSS (2007) para el análisis de resultados.

### **5.3. Etapa 3: Determinación del Efecto de la Aplicación de *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol Sobre la Actividad de Glucosiltransferasa Responsable de Producción de Celulosa en Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.**

#### **5.3.1. Efecto de *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol para Inhibir la Actividad de Glucosiltransferasa en un Extracto Crudo de *Escherichia coli* O157:H7.**

La preparación del extracto enzimático fue hecha de acuerdo al método descrito por Koo y col. (2000). *E. coli* O157:H7 fue cultivada en caldo Mueller Hinton durante 24 h a 37

°C; después del tiempo de incubación la bacteria fue removida mediante centrifugación  
a

6000 g durante 10 min a 4 °C, filtrando el sobrenadante en miliporo (2 µm). El filtrado fue dializado en membranas de 14 kD en solución buffer de fosfato de potasio (50 mM) y el retenido fue usado como extracto crudo extracelular de glucosiltransferasa. La mezcla de reacción contuvo 5 % de glucosa, solución de la enzima, buffer fosfato 50 mM (pH 6.9) y los agentes inhibidores *C. citratus*, citral y geraniol (utilizando concentraciones por debajo de la CMIB de 0-4 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Después de la incubación se agregó un volumen igual de metanol para detener la reacción. La mezcla fue enfriada por 10 min y centrifugada durante 10 min a 6000 g. El pellet fue resuspendido 5 mL de agua Milli-Q, fue filtrado (millipore 0.22 µm) y dializado con una membrana de diálisis de 14 kD. El contenido de celulosa se determinó por el método de fenol/ácido sulfúrico usando glucosa como estándar y expresando los resultados como % de inhibición de glucosiltransferasa con respecto al control (ecuación 1) (Masuko et al., 2005).

Ecuación 1.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{glucosa control} - \text{glucosa tratamiento}}{\text{glucosa control}} \times 100$$

### **5.3.2. Determinación de la Actividad de Glucosiltransferasa y Cinéticas de Inhibición por Citral y Geraniol.**

Se midió la actividad de glucosiltransferasa a 30 °C en Tris-Cl 40 mM, pH 8, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 5 mM UDP-glucosa en un volumen total de 300 µL. La mezcla de ensayo se preincubó a 30 °C durante 10 min y la reacción se inició mediante la adición de glucosiltransferasa, EC 2.4.1. (SRP0416, Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.). La actividad de glucosiltransferasa se midió por el método fluorométrico que monitorea la liberación de UDP-fluoresceína (λ<sub>ex</sub> 490 nm; λ<sub>em</sub> 514 nm) como producto de la hidrólisis del sustrato UDP-glucosa. Para la determinación del % de actividad de glucosiltransferasa se utilizaron diferentes concentraciones de citral y geraniol (0, 2, 4 8



y 10  $\mu\text{M}$ ), la actividad se determinó como los conteos de fluorescencia tomando como 100 % al control, sin

terpenos. Para los parámetros cinéticos, las velocidades iniciales de la actividad se obtuvieron usando 2 mM de glucosiltransferasa. Las concentraciones de sustrato utilizadas en la mezcla de reacción fueron 2, 4, 8, 10, y 20  $\mu\text{M}$ . Los terpenos fueron ensayados individualmente a 8  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  para citral y geraniol, respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, y teniendo un blanco para cada concentración de sustrato utilizada. Para su análisis, los datos experimentales se ajustaron a un modelo no lineal aplicando la ecuación básica de cinética enzimática de Michaelis-Menten para el cálculo de  $K_m$  y  $V_{\max}$  y posteriormente éstos se transformaron mediante el ajuste a la ecuación de Lineweaver-Burk. El tipo de inhibición se determinó mediante el análisis del gráfico de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos), observando el patrón y punto de intersección de las líneas. Para el cálculo de  $K_i$ , se graficaron los interceptos en el eje  $(1/V_{\max})$  del gráfico de dobles recíprocos *versus* la concentración del terpeno.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Donde:

$v$  representa la velocidad inicial de reacción  $V_{\max}$  es la velocidad máxima de reacción enzimática.

$K_m$  representa la constante de Michaelis-Menten y a su vez es la constante de afinidad por el sustrato.

$S$  es la concentración de sustrato en reacción.

### **5.3.3. Diseño Experimental y Análisis de Datos.**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Para la inhibición del extracto crudo de glucosiltransferasa se evaluó el factor de concentración de los compuestos, teniendo como variable el % de inhibición. Se realizó un ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. Se utilizó el software estadístico NCSS (2007) para el análisis de resultados.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Etapa 1: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol sobre la Viabilidad de Células Embebidas en Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7

#### 6.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y de Formación de Biopelícula (CMIB) de *E. coli* O157:H7 Expuesta a *Cymbopogon Citratus*, Citral y Geraniol.

En el Cuadro 4 se muestra la actividad antibacteriana y antibiopelícula de *C. citratus*, citral y geraniol contra *E. coli* O157:H7. *C. citratus* fue más efectivo para inhibir las bacterias en estado planctónico (CMI=0.5 mg/mL) comparado con el estadio de biopelícula (2 mg/mL), seguido de citral (CMI= 1 mg/mL y CMIB=2) y geraniol (CMI=3 mg/mL y CMIB=4 mg/mL). Se observó que es necesaria una mayor concentración de antibacteriano para inhibir la adhesión de células y la formación de biopelículas comparado con la inhibición de células en estado planctónico.

Recordando que el aceite esencial de *C. citratus* evaluado presentó en su composición citral (85 %) y geraniol (1.5 %) además de otros constituyentes con diversas estructuras y reactividades, como se mostró en la Figura 6, tal diversidad podría ser la causante de su efecto antibacteriano mayor. El mayor potencial antibacteriano del aceite de *C. citratus* y citral se relacionan también con sus características hidrofóbicas, ya que éstos poseen un log P (coeficiente de partición) de 3.5 y 3.56, que reflejan una mayor afinidad por las membranas citoplasmáticas. Por su parte, geraniol presentó la menor actividad para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7, lo cual puede deberse a su menor carácter lipofílico (log P= 2.57) y a que presenta mayor solubilidad en agua la cual está dada por su grupo hidroxilo, que hace más difícil su paso a través de la membrana en comparación con citral y el aceite esencial (Cristani et al., 2007). Aun cuando se ha reportado que compuestos con un grupo hidroxilo en su estructura presentan valores más

altos en la inhibición bacteriana debido a su reactividad para interactuar con proteínas,  
esa misma característica

Cuadro 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y formación de biopelículas (CMIB) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol sobre la inhibición y formación de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 en superficies de acero inoxidable.

<b>Antibacteriano</b>	<b>CMI (mg/mL)</b>	<b>CMIB (mg/mL)</b>
<b>Hierba de limón</b>	0.5	2
<b>Citral</b>	1	2
<b>Geraniol</b>	3	4

hace más difícil su llegada a los puntos de ataque. Tal es el caso de timol que presentó una menor eficacia contra *E. coli* (CMI=5 mg/mL), lo cual se relacionó con la presencia de un grupo hidroxilo, comparado con *p*-cimeno que presentó una mayor capacidad antibacteriana y no tiene grupos polares (CMI=2.5 mg/mL) (Cristani et al., 2007). En un estudio previo se determinó la CMI de *C. citratus* para *E. coli* con un valor de 2.2 mg/mL (Ortega- Ramirez et al., 2016). En otro estudio se encontró que citral y geraniol inhibieron a *E. coli* O157:H7 con una CMI de 0.5 mg/mL (Kim et al., 1995). Por otro lado, se encontró también que este aceite fue efectivo inhibiendo el crecimiento de una cepa de *E. coli* con una CMI=10 mg/mL (Bassolé et al., 2011). La variabilidad en la actividad antibacteriana puede deberse a diferentes factores como el proceso de extracción del aceite, la composición, las condiciones climáticas del lugar de origen, así como la carga bacteriana utilizada en el análisis (Somolinos et al., 2010, Ortega-Ramirez et al., 2016).

La actividad antibacteriana de los terpenos puede explicarse considerando sus diferentes estructuras y por lo tanto la posibilidad de diferentes mecanismos de acción de cada compuesto. El mecanismo de acción antibacteriano encontrado para cimeno y timol se denominó ataque a la membrana celular, donde el cimeno facilitó la absorción del timol dentro de la bicapa lipídica, resaltando que de igual manera timol presenta un grupo hidroxilo y el cimeno no (Pei et al., 2009). Además, se reporta que carvacrol y timol podrían romper la membrana externa de la célula, permitiendo el efecto de eugenol o del cinamaldehído sobre la funcionalidad de las enzimas bacterianas vitales dentro del citoplasma (Pei et al., 2009). Por ejemplo, el eugenol mediante su grupo hidroxilo podría combinarse con proteínas, afectando la actividad enzimática, al igual que el grupo carbonilo del cinamaldehído que podría favorecer su interacción con las regiones polares de las proteínas. Por otro lado, carvacrol y timol fueron propensos a alterar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, liberando lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y la pérdida de ATP (Pei et al., 2009, de Sousa et al., 2012). La información anterior evidencia la ventaja que implica el uso de aceites esenciales constituidos por mezclas de compuestos con diferentes estructuras y reactividades, asegurando diferentes puntos de ataque en las células bacterianas.

Durante la conversión del desarrollo bacteriano de planctónico al modo biopelícula se segregan polisacáridos convencionalmente llamados exopolisacáridos, que otorgan una



mayor resistencia a la desinfección (Flemming et al., 2010). Esta matriz formada favorece la prevalencia bacteriana y dificulta su completa eliminación durante los procesos de desinfección, pudiendo existir en cualquier tipo de superficie en el procesamiento de alimentos (Jabra-Rizk et al., 2006). Varios mecanismos pueden explicar el aumento de la resistencia bacteriana de células embebidas en biopelículas a los antibióticos. Uno de los más aceptados es que estas forman una barrera física que dificulta la llegada de los desinfectantes a las células (Lynch et al., 2008). La resistencia de *E. coli* O157:H7 es debida a la producción de exopolisacáridos como celulosa, la cual podría interactuar con los terpenos del aceite a través de interacciones hidrofóbicas. Los exopolisacáridos están también involucrados en la adhesión celular durante la formación de biopelículas, pudiendo servir como una película acondicionadora sobre superficies inertes e influenciar en la formación de estructuras tridimensionales (Weiner et al., 1995, Frank 2001). En otro estudio (Charlebois et al., 2017), se demostró que biopelículas de *Clostridium perfringens* expuestas a diferentes desinfectantes (monopersulfato de potasio, cloruro de amonio cuaternario, peróxido de hidrógeno y glutaraldehído) tienen un mayor porcentaje de viabilidad comparado con células en estado planctónico con porcentajes de viabilidad en células planctónicas del 0.8–10 % y en biopelícula de un 19.3 - 51.5 %. Aiemsaard et al. (2011) demostraron que *C. citratus* (CMIB=1.09 mg/mL), citral (CMIB=2.5 mg/mL) y geraniol (CMIB=2.5 mg/mL) fueron efectivos para inhibir la formación de biopelículas de *E. coli*. Por otro lado, este aceite esencial ha sido probado contra bacterias como *S. aureus*, presentando una CMIB de 1.25 mg/mL. Entonces, la formación de biopelículas es un mecanismo de sobrevivencia pero también contribuye a la virulencia y persistencia de las bacterias (Vuong et al., 2004, Soto et al., 2006). Por esta razón, se ha sugerido que la prevención de la adhesión de bacterias para la formación de biopelículas es una manera de abordar el problema de las biopelículas en la industria alimentaria.

### **6.1.2. Formación de Biopelículas de *Escherichia* O157:H7 Expuestas a Concentraciones no Letales de *Cymbopogon. citratus*, Citral y Geraniol**

La Figura 7 muestra la reducción de las células de *E. coli* adheridas a superficies de acero inoxidable expuestas al aceite esencial de *C. citratus*, citral y geraniol. Las cinéticas presentadas se realizaron con concentraciones no letales de los terpenos para profundizar en el estudio del mecanismo de inhibición de formación de biopelícula, es decir, evitar la influencia de los cambios en la carga celular sobre la secreción de celulosa, y los cambios en la actividad enzimática. La muestra control mostró una alta carga viable de 6.98 Log UFC/cm<sup>2</sup> adherida a la superficie del cupón de acero inoxidable después de 12 h de incubación a 37 °C. El aceite esencial de *C. citratus* y citral mostraron un efecto similar en la adhesión hasta las 8 h de incubación; a las 10 y 12 horas citral no mostró células viables adheridas comparado con el aceite esencial de *C. citratus* el cual tuvo una carga bacteriana de 4.99 y 5.34 Log UFC/cm<sup>2</sup> a las 10 y 12 h de incubación, respectivamente. Geraniol mostró el mejor efecto para inhibir la adhesión bacteriana reduciendo el contenido de células viables adheridas a lo largo del tiempo de incubación; sólo se observó la presencia de bacterias viables adheridas al inicio del muestreo (2 h). De manera adicional, se confirmó mediante microscopias por contraste de fases la capacidad de los agentes antibacterianos naturales para inhibir la formación de biopelículas (Figura 8). A pesar de que no se observó la presencia de células viables en el acero inoxidable al final del tiempo de incubación, no significó que las bacterias estén muertas, si no que el proceso de adhesión fue afectado, la cual es una de las etapas más importantes en la formación de biopelículas. En la Figura 9 se observa la viabilidad de las células planctónicas en el medio de cultivo para los diferentes agentes antibacterianos probados. A pesar de que geraniol no mostró células adheridas viables en el cupón de acero inoxidable de 4-12 h, estas se encontraban en el medio de cultivo en estado planctónico, dejando claro que el aceite esencial de *C. citratus*, citral y geraniol son capaces de inhibir la adhesión de células de *E. coli* O157: H7.

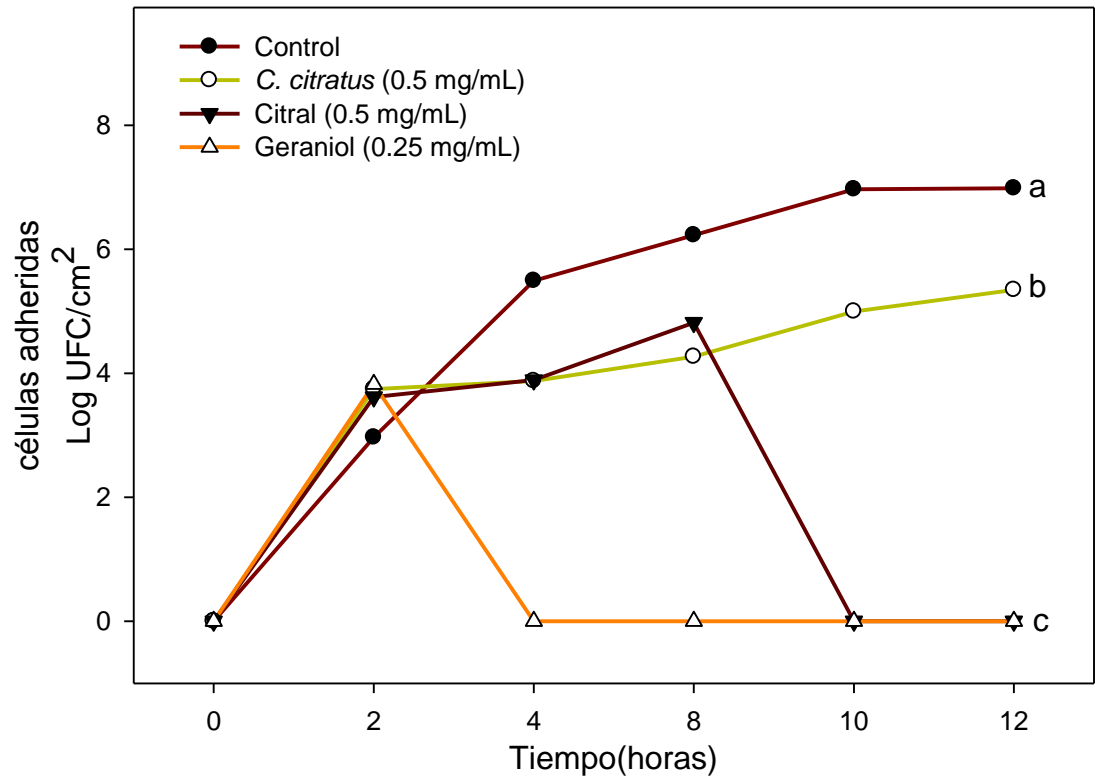


Figura 7. Cambios en la adhesión de células viables de *Escherichia coli* O157:H7 en superficies de acero inoxidable al ser expuestas al aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol durante 12 h a 37 °C. \*Diferente literal indica diferencias significativas entre tratamientos al final del tiempo de incubación. Valores medios de 3 repeticiones.

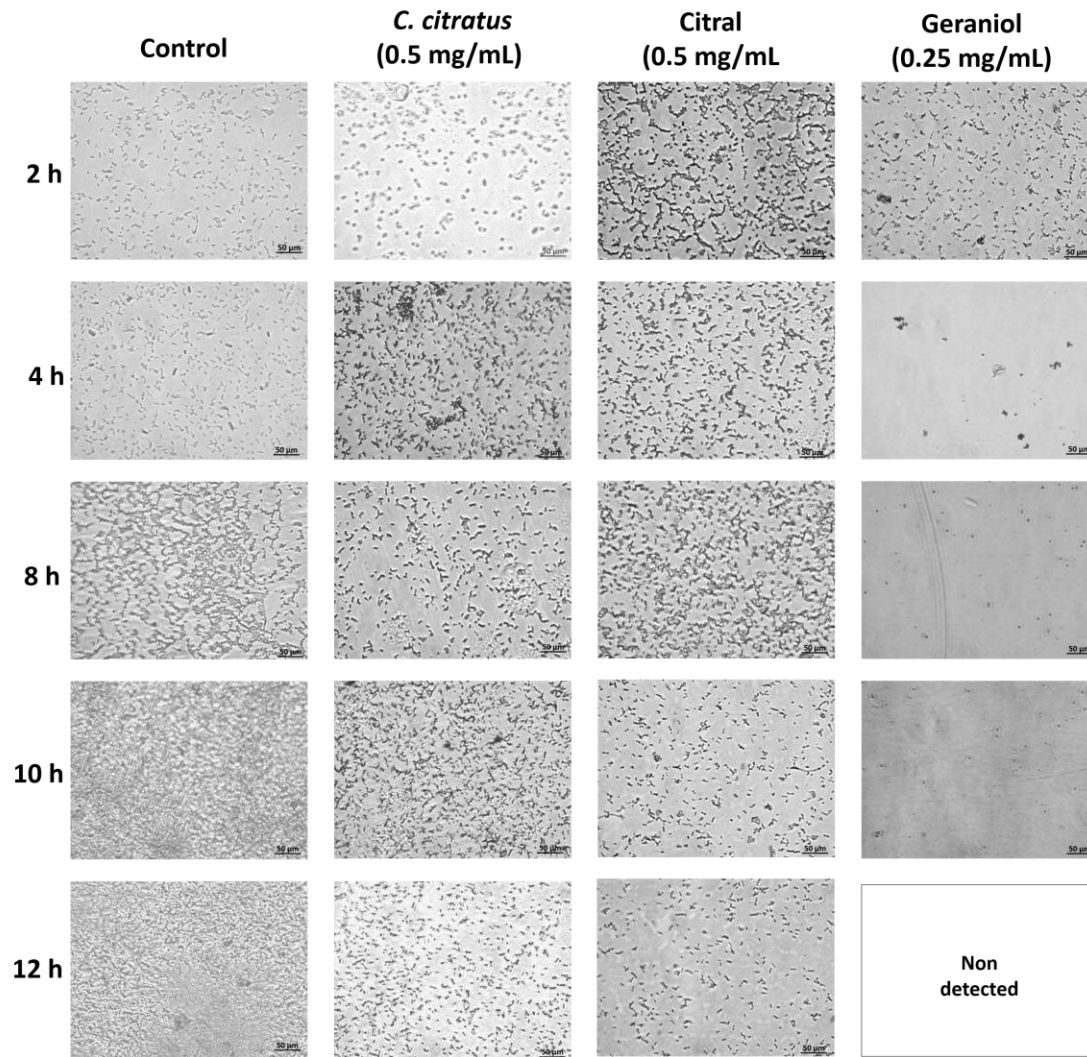


Figura 8. Microscopía de contraste de fases (600X) de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 expuestas al aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol.

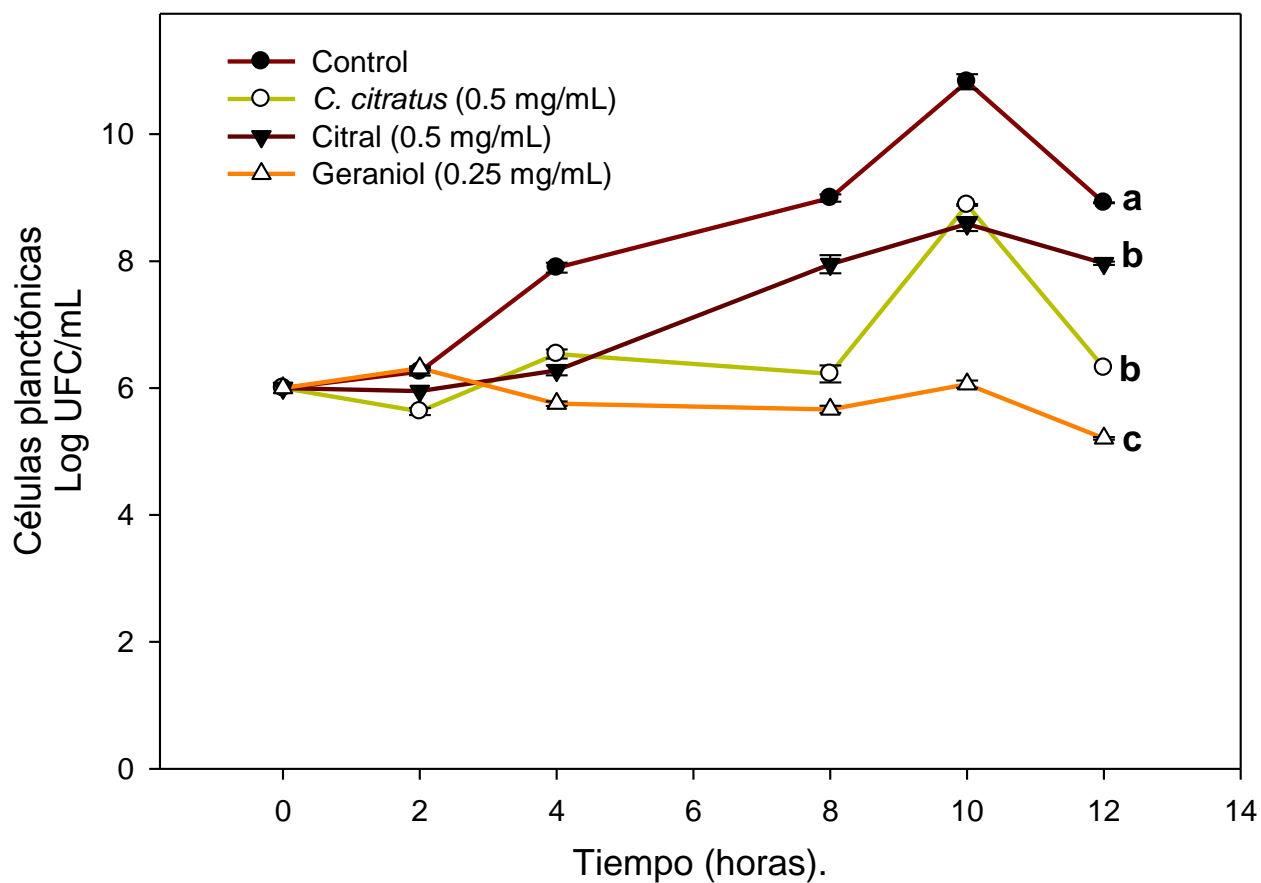


Figura 9. Células planctónicas de *Escherichia coli* O157: H7 expuestas a *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol durante 12 horas a 37 °C. Diferente literal indica diferencias significativas entre tratamientos al final del tiempo de incubación. \*Valores medios de 3 repeticiones.

La mayor eficacia mostrada del geraniol comparado con citral para inhibir la adhesión de células viables puede deberse a sus características estructurales. Se ha descrito que la estructura de las biopelículas es similar a geles altamente hidratados con huecos y canales intersticiales y pueden considerarse como estructuras altamente porosas, que presentan mecanismos de transporte complejos (Stoodley et al., 1999). Normalmente el transporte de nutrientes y moléculas secretadas por las células es regido por agua intersticial; sin embargo, la estructura y mecanismos de transporte también afectan la llegada de biocidas hasta las células embebidas en la matriz. La presencia del grupo hidroxilo en la molécula de geraniol le permite una mayor interacción con el medio acuoso y podría permitir una mayor movilización desde el exterior de la biopelícula hasta las células embebidas comparado con citral y el aceite esencial de *C. citratus* que presentan una mayor hidrofobicidad. Por ejemplo, la actividad antibiopelícula contra *E. coli* O157:H7 de eugenol, un terpeno estructuralmente similar al geraniol, está estrechamente relacionada a la presencia y tamaño de la cadena hidrocarbonada del C-4, y a la presencia del grupo hidroxilo y metoxilo en las posiciones C-1 y C-2 del anillo benceno (Kim et al., 2016). Adicionalmente, las sustancias poliméricas que conforman la biopelícula pueden interactuar con las moléculas de desinfectantes, truncando su camino hacia las células bacterianas. Se ha reportado que las limitaciones del transporte son un mecanismo importante que contribuye a la resistencia de las biopelículas a los desinfectantes, además se ha relacionado a las interacciones fisicoquímicas entre los antibacterianos y las sustancias poliméricas extracelulares o a las células bacterianas (Bridier et al., 2011).

Niu y Gilbert (2004), observaron que diferentes aceites esenciales de *Cinnamomum camphora*, *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Melaleuca alternifolia*, *Cymbopogon nardus*, y *Zingiber officinale*, afectaron la formación de biopelículas debido a sus componentes, los cuales ejercen la actividad. Los autores mencionan que la respuesta observada es dosis dependiente, sugiriendo que los compuestos pueden interactuar con las bacterias a través de diferentes mecanismos. De igual forma ejemplifican como la formación de biopelículas en *E. coli* O157:H7 disminuyó gradualmente durante el tiempo de exposición a cinamaldehído (1.75 mM), probablemente debido a su acumulación, que se reflejó en el daño a la membrana

celular. En contraste, con concentraciones similares de cinamaldehído se observó una reducción en la formación de biopelículas de

*Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, el efecto dejó de presentarse al retirar el terpeno del medio, presentándose un mayor desarrollo de biopelícula por la producción de exopolisacáridos.

Lo anterior puede ser atribuido a que las múltiples capas de células y las sustancias poliméricas extracelulares forman una estructura compleja y gruesa, la cual dificulta la penetración de los desinfectantes hacia el interior de la biopelícula (Grobe et al., 2002). Además de las limitaciones de difusión que pueden producirse, la penetración de desinfectantes en las biopelículas se ve afectada por la materia orgánica, partículas inorgánicas y desechos celulares (Bridier et al., 2011). El proceso de adhesión de *E. coli* a superficies abióticas se generaliza al igual que en otras bacterias patógenas, y se puede describir como un proceso de dos fases. La fase inicial es instantánea y físicamente reversible e involucra un balance entre las fuerzas atractivas de Van der Waals y las fuerzas electroestáticas, en función de la distancia entre las dos entidades (bacteria y superficie) (AlAbbas et al., 2012). Sin embargo, en *E. coli* se ha establecido que la motilidad mediada por flagelos también es un factor crítico en la fase inicial de adhesión, lo que le permite su llegada a las superficies a colonizar (Lemon et al., 2007). La segunda fase es la adhesión irreversible que involucra la interacción célula-célula y célula-superficie, lo cual se abordó en el siguiente objetivo específico.

Los tiempos de adhesión y formación de biopelículas en bacterias son muy variados, en esta investigación se encontró que las bacterias empiezan a adherirse inmediatamente después de ponerse en contacto con la superficie. Entonces, el tiempo en que *E. coli* inicia el proceso de formación de biopelículas es casi seguido de la exposición de la superficie al desarrollo bacteriano. En un estudio previo, se encontró una rápida adhesión de *E. coli* O157:H7 (inóculo inicial de 6 log UFC/mL) después de 5 min en contacto con superficies de vegetales intactas y cortadas de repollo, lechuga iceberg y romana, resultando en la adhesión de 3.59 y 4.98 log UFC/cm<sup>2</sup> para repollo; 3.77 y 4.74 log UFC/cm<sup>2</sup> lechuga iceberg; 3.8 y 4.86 log UFC/cm<sup>2</sup> para lechuga romana, respectivamente. Por otro lado, el aceite esencial de *C. citratus* a concentraciones subinhibitorias (1.7 mg/mL) fue capaz de inhibir la adhesión de células de *Candida*



*dubliniensis* en un 80 % sobre una superficie acrílica después de 15 min de exposición (Taweechaisupapong et al., 2012). Este efecto

nos habla de la importancia y el grave problema que pueden ocasionar en los alimentos, superficies y principalmente a la salud de las personas el fenómeno de adhesión.

### **6.1.3. Conclusión.**

Los resultados de esta etapa permiten visualizar la capacidad antibacteriana del aceite de *C. citratus* y sus componentes sobre células planctónicas; además de afectar la adhesión de *E. coli* O157:H7 a superficies de acero inoxidable. Adicionalmente, se identificaron las concentraciones de los agentes antibacterianos que permitieron comprobar el mecanismo de inhibición de la secreción de celulosa por los terpenos como un efecto modulador de la formación de biopelícula, lo cual se muestra en la siguiente etapa.

## 6.2. Etapa 2: Evaluación del Efecto del Aceite Esencial de *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol sobre la Producción de Celulosa Durante la Formación de Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

### **6.2.1. Cambios en el Contenido de Celulosa de Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 Expuestas a *Cymbopogon citratus*, Citral y Geraniol**

El aceite esencial y los terpenos fueron efectivos para reducir la producción de celulosa durante la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 en superficies de acero inoxidable (Figura 10), siendo geraniol y citral los que presentaron la mayor eficacia. El aceite esencial de *C. citratus* (0.5 mg/mL), citral (0.5 mg/mL) y geraniol (0.25 mg/mL) provocaron una menor producción de celulosa durante la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 con respecto al testigo. Los cupones de acero inoxidable expuestos a citral y geraniol presentaron un menor contenido de celulosa en comparación con las superficies tratadas con *C. citratus* y el control.

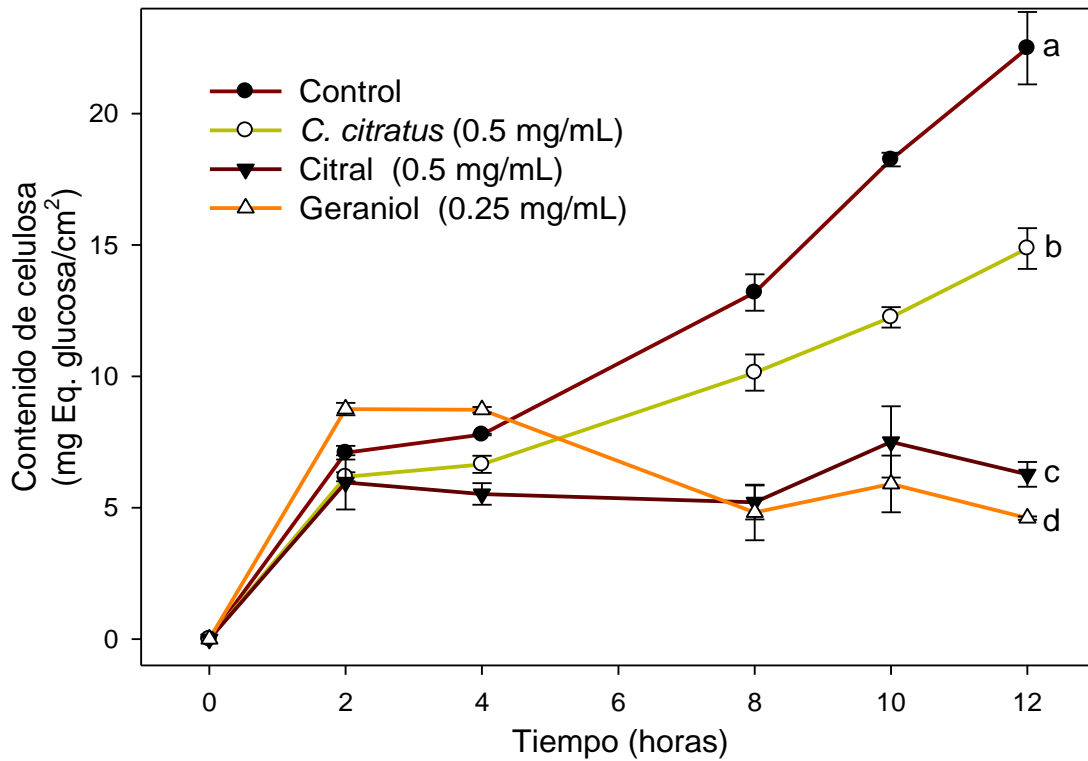


Figura 8. Cambios en el contenido de celulosa de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7 expuestas al aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, citral y geraniol, durante 12 horas a 37 °C. \*Diferente literal indica diferencias significativas entre tratamientos al final del tiempo de incubación. \*Valores medios de 3 repeticiones.

Se observó la relación que existe entre el contenido de celulosa secretada sobre la superficie de acero inoxidable y las células viables adheridas, cuyas variables de respuesta presentaron un coeficiente de correlación de Pearson de 0.768 a una probabilidad de 0.0000119. Estos resultados indican la efectividad de los terpenos de *C. citratus* para reducir la producción de celulosa y la relación de este proceso con la adhesión de células durante la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 en superficies de acero inoxidable.

Dentro de los factores que regulan la secreción de exopolisacáridos durante la formación de biopelículas se encuentran la comunicación intercelular y la biosíntesis de los mismos. La comunicación intercelular en *E. coli* se da mediante la producción y detección de acyl homoserinalactonas, lo cual es producto de un aumento en la densidad bacteriana (Tan 2011). Dicho proceso dispara la expresión de diferentes genes relacionados con la virulencia de la bacteria, dentro de los cuales se encuentran los destinados a la producción de sistema enzimático celulosa sintasa y por ende glucosiltransferasa (Whitehead et al., 2001). Por lo anterior, dentro de los mecanismos de acción de los terpenos para disminuir la producción de celulosa se encuentran la afectación de la expresión del sistema enzimático o un efecto directo sobre la actividad de tal sistema (De-Oliveira et al., 1997, Kalia 2013). Ambos acercamientos han sido probados para otros sistemas bacterianos; sin embargo, la mayoría de la evidencia hace hipotetizar un efecto negativo sobre la producción enzimática de este polímero, lo cual es el planteamiento de la presente tesis.

Para que los terpenos del aceite de *C. citratus* reaccionen con la glucosiltransferasa deben difundirse desde el medio acuoso, embeberse en la membrana e interactuar con la enzima que se encuentra integrada en tal organelo (Won, 2007). Es importante considerar que adicionalmente se presenta la barrera protectora de la celulosa ya secretada, la cual puede bloquear la llegada del terpeno hasta la célula diana (Gualdi, 2008). Tratando de explicar la mayor efectividad de geraniol sobre la inhibición de la producción de celulosa en comparación con citral se tiene que considerar una vez más su mayor afinidad para ser difundido a través de medios acuosos y su interacción con las superficies polares de proteínas. La solubilidad del geraniol en agua es de 10 mg/mL,

mientras que la del citral es de 1 mg/mL, esto sustenta el acercamiento a que la solubilidad puede favorecer un

mejor transporte del geraniol a través de los canales acuosos de la estructura tipo gel de la biopelícula en comparación con la menor afinidad del citral al agua (PubChem, 2017). Debido a esta característica de solubilidad, geraniol permearía más fácil la estructura de la biopelícula, afectando de esta manera la síntesis de celulosa.

Las bacterias generalmente producen celulosa como un componente extracelular para la protección mecánica y química, pero también se utiliza para facilitar su adhesión a diferentes superficies. La evidencia sugiere que las interacciones entre curli y las fibras de celulosa facilitan la estabilidad de la matriz y las interacciones célula-célula de *E. coli*. Estas estructuras forman un puente entre la célula bacteriana y la superficie de contacto permitiendo una asociación irreversible que le confiere una mayor resistencia para su remoción (Katsikogianni y Missirlis, 2004; Li et al., 2012). Diversos estudios han evaluado la capacidad que presentan extractos de plantas y compuestos puros para inhibir la producción de glucanos insolubles en agua y por lo tanto la formación de biopelículas, principalmente en bacterias formadoras de placa dental. Extractos de las plantas *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus ecklonii* y *Rheum undulatum* fueron efectivos para inhibir la producción de glucanos en extractos crudos de *S. sobrinus* (IC<sub>50</sub>=1.0, 1.2 y 0.142 mg/mL, respectivamente) y *S. mutans* (IC<sub>50</sub>=3.1, 1.6 y 0.079 mg/mL, respetivamente) (Figueiredo et al., 2010). Dentro del mismo estudio se evaluó el ácido rosmarínico y se obtuvo un IC<sub>50</sub> de 2.1 y 3.9 mg/mL para *S. sobrinus* y un *S. mutans*, respectivamente (Figueiredo et al., 2010). Para la misma bacteria se evaluó el efecto de apigenina y farnesol con IC<sub>50</sub> de 1.33 mM, para ambos compuestos (Kim et al., 2017). Compuestos fenólicos como galato de epigalocatequina, epigalocatequina, ácido tánico y catecol a 0.1 mg/mL mostraron efectividad para inhibir la producción de glucanos insolubles en agua en un 73.1, 68.5, 68 y 67.6 %, respetivamente (Kim et al., 2017). En estos trabajos se relaciona la reducción en la producción de glucanos con evitar la formación de biopelículas; sin embargo, la mayoría de los estudios ha centrado su atención en bacterias que forman biopelículas y que son responsables de la placa dental y caries. En este punto nuestros resultados muestran que la aplicación de los terpenos de *C. citratus* puede ser una herramienta para disminuir la producción de celulosa, la adhesión celular y la consecuente formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7.

## 6.2.2. Conclusión

El aceite esencial de *C. citratus*, citral y geraniol fueron efectivos para reducir la producción de celulosa durante a la formación de biopelículas de *E. coli* afectando el proceso de formación. Adicionalmente, se encontró la relación entre la producción de celulosa y la adhesión celular en superficies de acero inoxidable.

### 6.3. Etapa 3: Efecto de la Aplicación del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre la Actividad de Glucosiltransferasa Responsable de Producción de Celulosa en Biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7.

Los componentes del aceite esencial de *C. citratus*; citral y geraniol fueron efectivos para inhibir la actividad de la enzima glucosiltransferasa. En la Figura 11 se observa el efecto de los terpenos sobre la actividad de la enzima glucosiltransferasa. Determinando que las concentraciones que inhibieron el 50 % de la enzima fueron 8.5 y 6.5  $\mu\text{M}$ , para citral y geraniol, respectivamente. En la Figura 12 se muestra el ajuste no lineal de las velocidades iniciales ( $V_o$ ) contra el sustrato [UDP-glucosa], en ausencia y presencia de citral y geraniol, respectivamente; donde se observó que glucosiltransferasa muestra un comportamiento de una cinética de Michaelis-Menten. En el Cuadro 5 se observan los valores calculados de las constantes cinéticas, donde se observa que tanto  $K_m$  y  $V_{max}$  disminuyeron al aumentar la concentración de citral y geraniol (Figura 13A y 13B). Este comportamiento sugiere que el mecanismo de inhibición de glucosiltransferasa que siguieron citral y geraniol fue de tipo incompetitivo. Este tipo de inhibición enzimática se caracteriza en que el inhibidor se une de manera reversible sólo al complejo enzima-sustrato y no a la enzima libre, dando como resultado la formación del complejo ternario enzima-sustrato-inhibidor, el cual es catalíticamente inactivo.

De la misma manera se realizó el cálculo de la constante de disociación/inhibición ( $K_i$ ) para citral y geraniol mediante los gráficos secundarios de  $1/V_{max}$  versus [citral] y

[geraniol] (Figuras 14A y 14B). Donde se observó que ambos gráficos resultaron ser lineales, lo cual comprueba que el mecanismo de inhibición fue de tipo acompetitivo (Segel, 1993). Por otro lado, los valores bajos de  $K_i$  (Cuadro 5) indican que ambos inhibidores presentan una alta afinidad hacia el complejo ES, siendo mayor en el caso de geraniol respecto a citral. Considerando la estructura, para que el mecanismo de inhibición enzimática del tipo acompetitivo se lleve a cabo es necesario que la enzima sufra cambios conformacionales. El tipo de cambio que ocurre en la enzima tras la unión con el sustrato es determinante para revelar el sitio de unión del inhibidor. Tras la formación del complejo ESI, ocurre un segundo cambio conformacional importante en la enzima, donde el inhibidor podría causar la deformación del sitio activo y así impedir que el proceso catalítico se lleve a cabo (Segel 1993, Copeland 2005).

Tanto el aceite esencial como sus principales componentes presentaron eficacia contra la actividad de glucosiltransferasa. Dicha actividad inhibitoria puede estar relacionada con diferentes factores como el carácter anfipático que presentan los compuestos del aceite. Por ejemplo, citral es una molécula capaz de aceptar átomos de hidrógeno, es decir puede interactuar con residuos de aminoácidos (PubChem, 2017). Por otro lado, geraniol es una molécula que puede donar y aceptar 1 átomo de hidrógeno siendo una molécula con mayor capacidad de interacción (PubChem, 2017). Lo cual les otorga la capacidad de interactuar con diferentes residuos de glucosiltransferasa; a continuación, nos enfocaremos en describir aquellos residuos más probables de interacción diferentes al sitio activo, debido que ya se comprobó anteriormente el tipo de inhibición acompetitivo. Además, estas moléculas también podrían interactuar con residuos de aminoácidos claves en el proceso de polimerización de celulosa. Es decir, Trp 383 forma interacciones de Van der Waals con la penúltima molécula de glucosa en el sitio aceptor (glucosa 17), y se comprime contra el par Gln 379-Arg 380 hacia el sitio distal de la cavidad catalítica. El pentapéptido FFCGS (aminoácidos 316-320) interactúa con el lado opuesto del disacárido terminal, principalmente a través de los carbonilos de Cis 318 y Gli 319 con glucosa 18. Los terpenos del aceite esencial son de naturaleza hidrofóbica, entonces podrían interactuar con las cadenas laterales aromáticas de la fenilalanina y triptófano, que son de naturaleza hidrófoba. Glutamina, carece de carga



pero puede participar en los enlaces de hidrógeno. El grupo amino de la cadena lateral arginina está protonado y por.

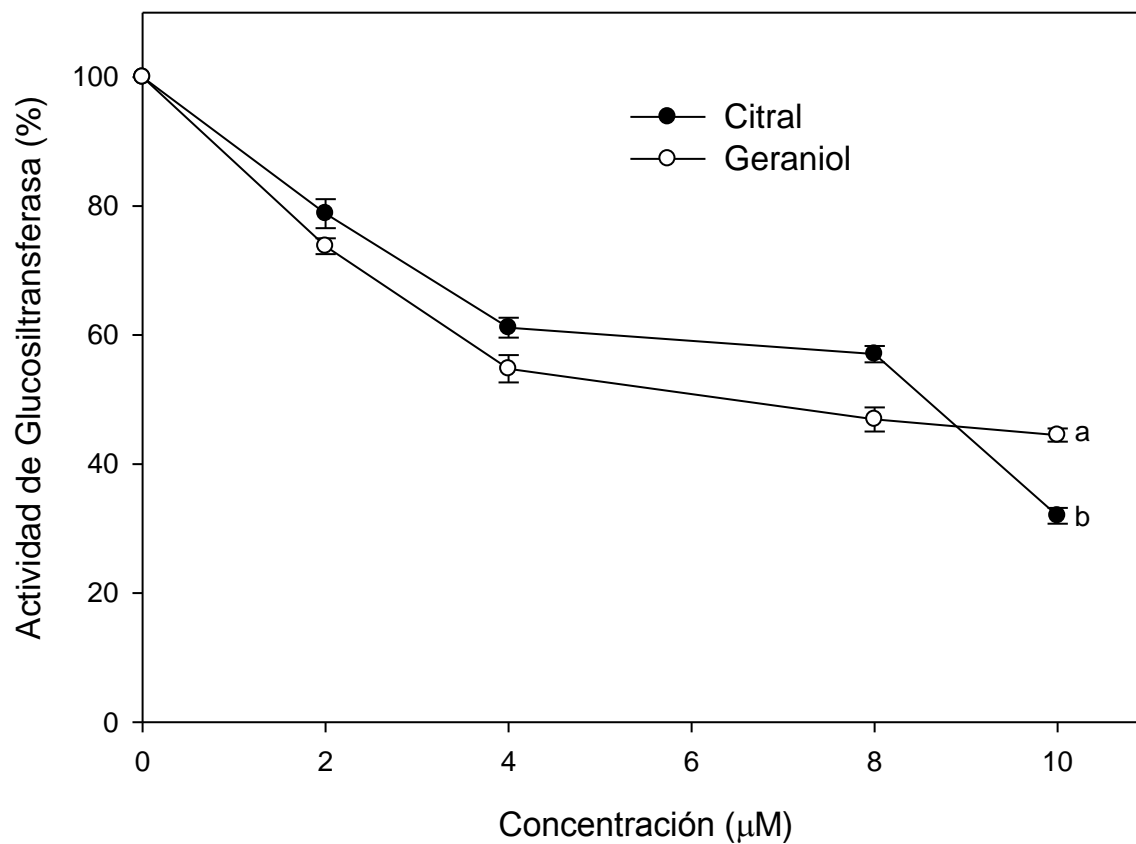


Figura 11. Actividad de glucosiltransferasa en presencia de los terpenos citral y geraniol. Los resultados se representan como el promedio  $\pm$  DE de tres replicas por concentración evaluada.

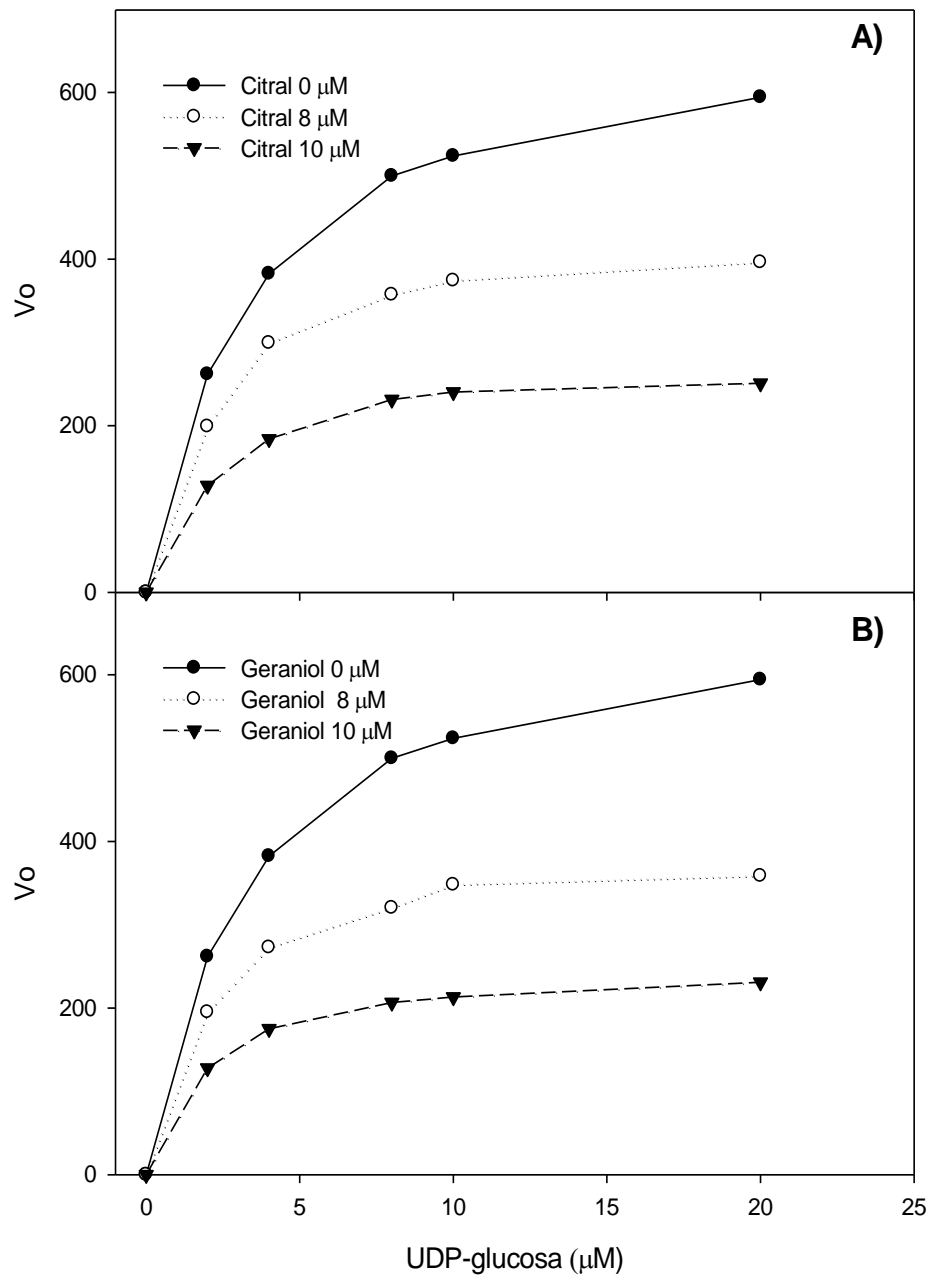


Figura 12. Gráfico de Michaelis-Menten de la cinética de inhibición de glucosiltransferasa en presencia de citral (A) y geraniol (B).

Cuadro 5. Parámetros cinéticos de glucosiltransferasa en presencia citral y geraniol.

Inhibidor	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}$ de UPD-glucosa $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
Citral	0	3.42	714.28	
	8	2.66	476.19	7.0
	10	2.66	303.03	
Geraniol	0	3.42	714.28	
	8	2.20	416.66	6.5
	10	2	256.41	

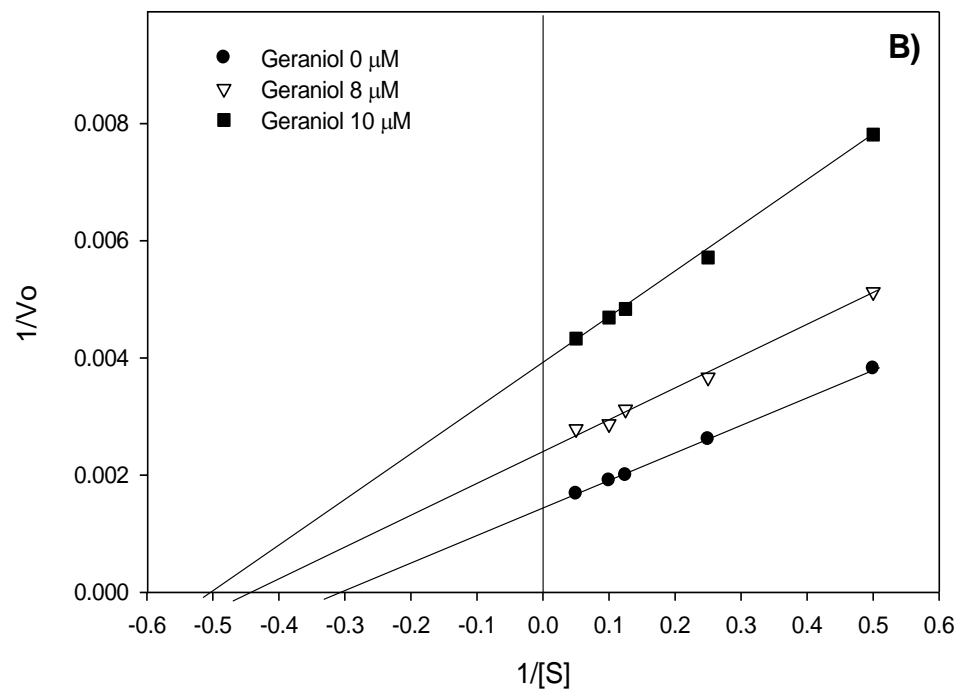
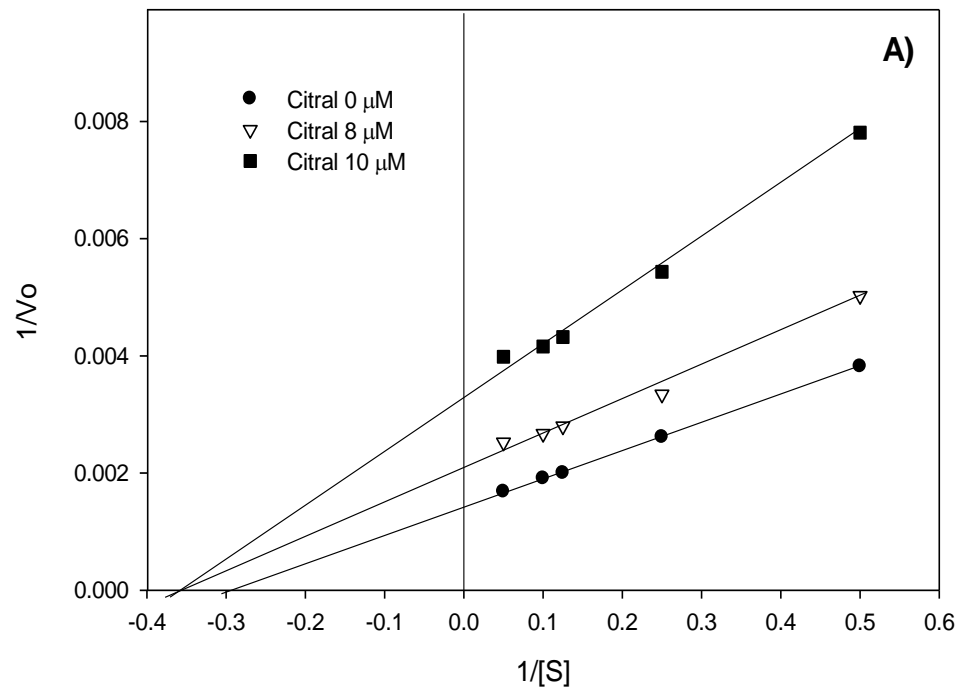


Figura 13. Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de inhibición de glucosiltransferasa en presencia de citral (A) y geraniol (B).

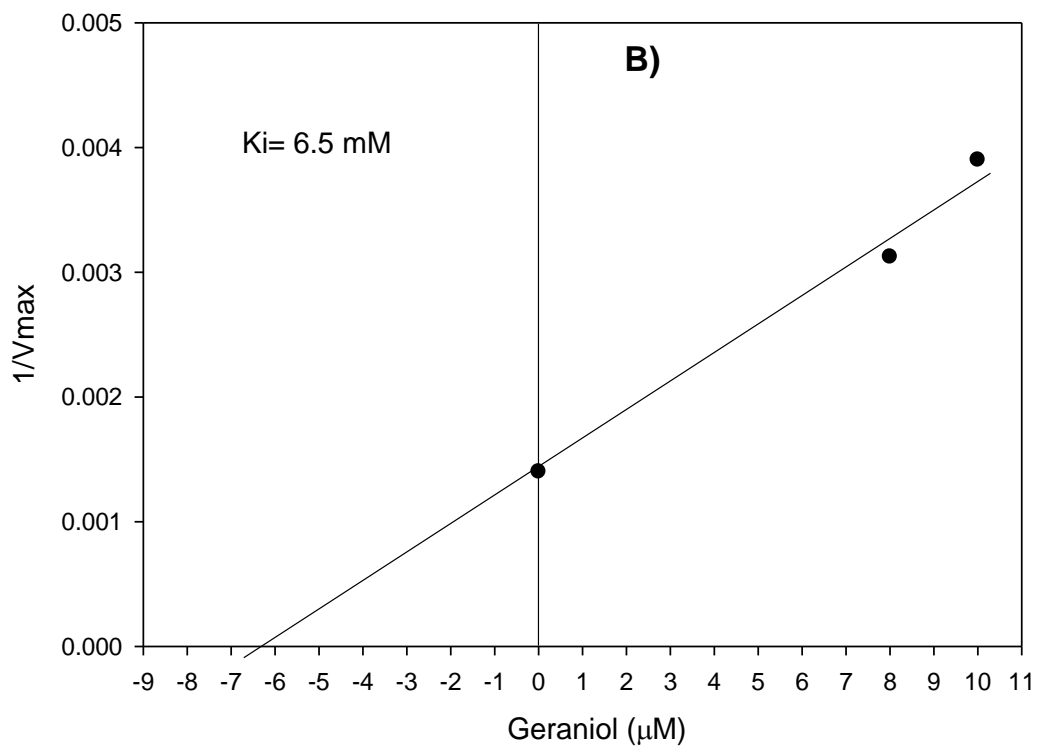
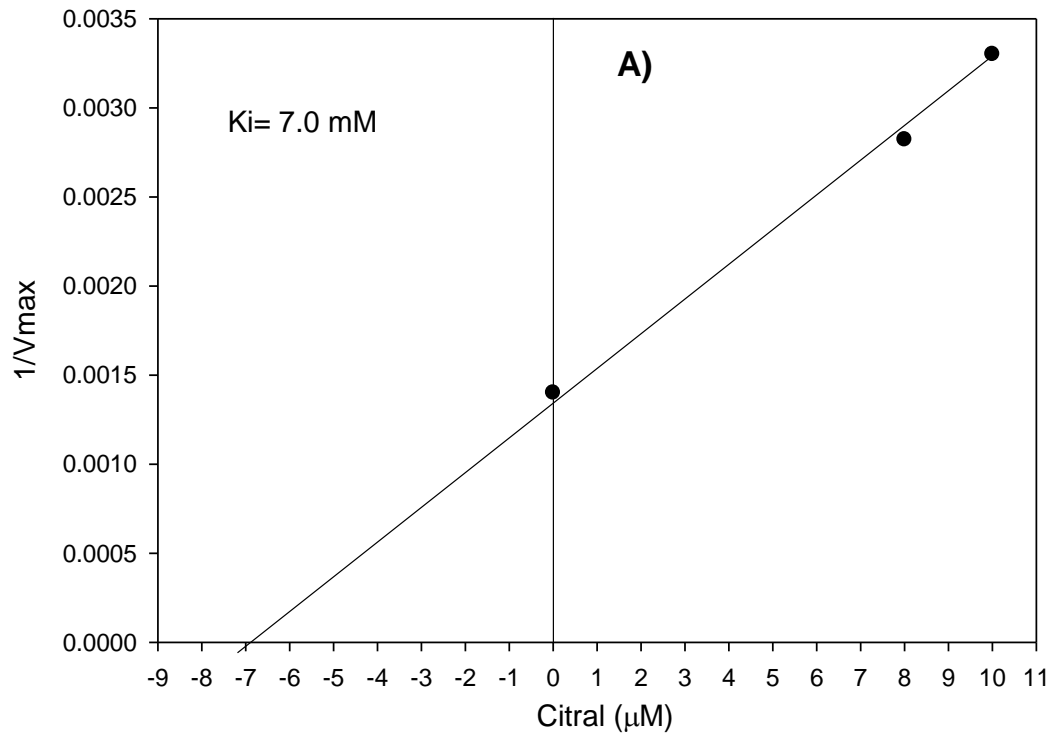


Figura 14. Gráfico secundario del gráfico de dobles recíprocos: interceptos del eje  $1/v$  ( $1/V_{\text{max}}$ ) versus concentración de citral (A) y geraniol (B) para el cálculo de  $K_i$ .

lo tanto tiene carga positiva a en un pH neutral. Puede haber interacción con glicina (Gly, G) que tiene un átomo de hidrógeno en su grupo R. La cadena lateral azufrada de cisteína es hidrófoba y puede formar un enlace disulfuro. La cadena lateral hidroxilo de la serina es polar y sin carga y puede formar enlaces de hidrógeno. Todos estos aminoácidos que conforman el pentapéptido podrían ser tipos de interacción con los terpenos de *C. citratus*. La interacción en esta sección de la enzima podría generar cambios conformacionales lo que provocaría que el proceso de secreción de celulosa no se lleve a cabo. Por lo tanto, el atacar los puntos clave en la síntesis, polimerización y secreción de celulosa se podría evitar la formación de biopelículas de *E. coli*.

Extractos de las plantas *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus ecklonii* y *Rheum undulatum* fueron efectivos para inhibir la actividad de glucosiltransferasa en extractos crudos de *S. sobrinus* (IC<sub>50</sub>=1.0, 1.2 y 0.142 mg/mL, respectivamente) y *S. mutans* (IC<sub>50</sub>=3.1, 1.6 y 0.079 mg/mL, respectivamente)(Figueiredo et al., 2010). Dentro del mismo estudio se evaluó el ácido rosmarínico, por ser uno de los componentes de las plantas estudiadas, y se obtuvo un IC<sub>50</sub> de 2.1 y 3.9 mg/mL para *S. sobrinus* y un *S. mutans*, respectivamente (Figueiredo et al., 2010). Sin embargo, en estos estudios no se evaluó mecanismo de inhibición. Por otro lado, se evaluó la eficacia de ácido oleico y linoleico (0.05 mM) para inhibir a glucosiltransferasa de un extracto de *S. mutans*, reportando para ambos compuestos un tipo de inhibición incompetitiva, es decir estos ácidos grasos interaccionan con el complejo enzima sustrato, disminuyendo la velocidad de la reacción, de manera similar a lo observado con los terpenos de *C. citratus* (Won et al., 2007). Compuestos fenólicos como galato de epigalocatequina, epigalocatequina, ácido tánico y catecol a 0.1 mg/mL mostraron efectividad para inhibir la actividad de glucosiltransferasa de un extracto de *S. mutans* en un 73.1, 68.5, 68 y 67.6 %, respectivamente, sin embargo en estos estudios no se evaluó el tipo de inhibición de los compuestos contra la enzima (Kim et al., 2017).

*C. citratus* y sus componentes han mostrado efectividad para inhibir la actividad de algunas enzimas diferentes a glucosiltransferasa. Citral (10 mM) inhibió a aldehído deshidrogenasa, mostrando un tipo de inhibición no competitiva (Kikonyogo et al.,

1999). Mientras que el compuesto mirceno ( $0.2 \mu\text{M}$ ) presentó inhibición del tipo competitiva



contra las enzimas pentoxiresorufina-O-depentilasa (PROD) y etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) con un IC<sub>50</sub> de 0.14 y >50 µM, respectivamente (De-Oliveira et al., 1997). Extractos metanólicos de *C. citratus* han sido efectivos en la inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos a 500 µg/mL, con valores en el rango de 19-71% e inhibiendo a la enzima xantina oxidasa a 50 µg/mL (Cheel et al., 2005). En otro estudio, se evaluaron siete monoterpenos de *C. citratus* sobre la actividad de pentoxioresorufina obteniendo IC<sub>50</sub> a 0.087 mM para (-)-α-pineno, 0.089 mM para (+)-α-pineno, 0.76 mM para α-terpineno y de 1.19 mM para citral, por lo cual es importante considerar el efecto del resto de los componentes del aceite sobre la actividad de glucosiltransferasa, en la producción de celulosa, la inhibición de la adhesión y la inhibición de biopelículas de *E. coli* O157:H7 (De-Oliveira et al., 1997). Por otro lado, geraniol aumentó 2.5 veces la actividad de glutatión S-transferasa respecto al control (Zheng et al., 1993). Como se muestra en los estudios anteriores, existe evidencia que el aceite de *C. citratus* y sus compuestos presentan efectividad para inhibir diferentes tipos de enzimas, pero no existía evidencia del efecto de este aceite contra enzimas productoras de biopelículas como glucosiltransferasa de *E. coli* O157:H7, lo cual es una contribución de este estudio.

### **6.3.1. Conclusión**

Los terpenos de *C. citratus* inhibieron la actividad de glucosiltransferasa en un extracto crudo de *E. coli* y en la enzima pura. Además, los terpenos citral y geraniol mostraron un mecanismo de inhibición acompetitiva de glucosiltransferasa.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

El aceite esencial de *C. citratus* y sus componentes citral y geraniol fueron efectivos para inhibir la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7, disminuyendo la adherencia celular y la producción de celulosa sobre superficies de acero inoxidable. Adicionalmente se observó un efecto inhibitorio acompetitivo de ambos terpenos sobre la actividad de glucosiltransferasa. Este resultado sugiere un posible mecanismo de inhibición de los terpenos de *C. citratus* sobre la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7.

## 7. RECOMENDACIONES

Para seguir avanzando en el conocimiento sería interesante evaluar los siguientes parámetros que permitirían ampliar los mecanismos antibacterianos que ejercen los terpenos de *C. citratus* sobre *E. coli* O157:H7:

- Impacto sobre la expresión genética de celulosa sintasa.
- Impacto sobre la comunicación intercelular a nivel genético y de metabolitos.
- Interacciones específicas de los terpenos con el complejo enzima sustrato mediante ensayo de difracción de rayos X.
- Cambios en la producción de monosacáridos y otros constituyentes de las sustancias poliméricas extracelulares como proteínas, ADN y lípidos.

## 9. REFERENCIAS

- Adukwu, E., S. C. Allen and C. A. Phillips (2012). "The anti- biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*." Journal of applied microbiology **113**(5): 1217-1227.
- Adukwu, E., C. Stuart and C. Phillips (2012). "The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*." Journal of Applied Microbiology **113**(5): 1217-1227.
- Alvarez, M. V., L. A. Ortega-Ramirez, M. M. Gutierrez-Pacheco, A. T. Bernal-Mercado, I. Rodriguez-Garcia, G. A. Gonzalez-Aguilar, A. Ponce, M. d. R. Moreira, S. I. Roura and J. F. Ayala-Zavala (2014). "Oregano essential oil-pectin edible films as *anti-quorum sensing* and food antimicrobial agents." Frontiers in microbiology **5**: 699.
- Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser and S. J. Hultgren (2003). "Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections." Science **301**(5629): 105-107.
- Bales, P. M., E. M. Renke, S. L. May, Y. Shen and D. C. Nelson (2013). "Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens." PLOS ONE **8**(6): e67950.
- Baratta, M. T., H. Dorman, S. G. Deans, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso and G. Ruberto (1998). "Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils." Flavour and Fragrance Journal **13**(4): 235-244.
- Bassolé, I. H. N., A. Lamien-Meda, B. Bayala, L. C. Obame, A. J. Ilboudo, C. Franz, J. Novak, R. C. Nebié and M. H. Dicko (2011). "Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination." Phytomedicine **18**(12): 1070-1074.
- Beloin, C., A. Roux and J.-M. Ghigo (2008). *Escherichia coli* Biofilms. Bacterial Biofilms. T. Romeo. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 249-289.
- Beuchat, L. R. (2002). "Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables." Microbes and infection **4**(4): 413-423.
- Braga, P. C., M. Culici, M. Alfieri and M. Dal Sasso (2008). "Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm." International journal of antimicrobial agents **31**(5): 472-477.
- Bridier, A., R. Briandet, V. Thomas and F. Dubois-Brissonnet (2011). "Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review." Biofouling **27**(9): 1017-1032.

Bureau, T. E. and R. M. Brown (1987). "In vitro synthesis of cellulose II from a cytoplasmic membrane fraction of *Acetobacter xylinum*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**(20): 6985-6989.

Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard and B. Henrissat (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics." *Nucleic acids research* **37**(suppl 1): D233-D238.

Carmichael, I., I. Harper, M. Coventry, P. Taylor, J. Wan and M. Hickey (1998). "Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables." *Journal of applied microbiology* **85**(S1).

CDC. (2013). "Reports of Outbreak Investigations of *Listeria*, by Year." Retrieved 6 de julio, 2013.

Cerca, N., T. Maira-Litrán, K. K. Jefferson, M. Grout, D. A. Goldmann and G. B. Pier (2007). "Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(18): 7528-7533.

Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, J. Totté, L. Pieters and A. Vlietinck (2002). "Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo." *Journal of Ethnopharmacology* **79**(2): 213-220.

Cooley, M. B., W. G. Miller and R. E. Mandrell (2003). "Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and competition by *Enterobacter asburiae*." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(8): 4915-4926.

Copeland, R. A. (2005). *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, Wiley (pp. 79-80).

Cristani, M., M. D'Arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M. G. Sarpietro, D. Micieli, V. Venuti, G. Bisignano, A. Saija and D. Trombetta (2007). "Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(15): 6300-6308.

Charlebois, A., M. Jacques, M. Boulianne and M. Archambault (2017). "Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry." *Food Microbiology* **62**: 32-38.

Cheel, J., C. Theoduloz, J. Rodríguez and G. Schmeda-Hirschmann (2005). "Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(7): 2511-2517.

da Silva Meira, Q. G., I. de Medeiros Barbosa, A. J. Alves Aguiar Athayde, J. P. de Siqueira-Júnior and E. L. de Souza (2012). "Influence of temperature and surface kind on

biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers." *Food Control* **25**(2): 469-475.

Dalleau, S., E. Cateau, T. Bergès, J.-M. Berjeaud and C. Imbert (2008). "In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms." *International Journal of Antimicrobial Agents* **31**(6): 572-576.

De-Oliveira, A. C., L. F. Ribeiro-Pinto and F. J. Paumgarten (1997). "In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by  $\beta$ -myrcene and other monoterpenoid compounds." *Toxicology letters* **92**(1): 39-46.

de Sousa, J. P., G. A. de Azerêdo, R. de Araújo Torres, M. A. da Silva Vasconcelos, M. L. da Conceição and E. L. de Souza (2012). "Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables." *International journal of food microbiology* **154**(3): 145-151.

Dourou, D., C. S. Beauchamp, Y. Yoon, I. Geornaras, K. E. Belk, G. C. Smith, G.-J. E. Nychas and J. N. Sofos (2011). "Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing." *International Journal of Food Microbiology* **149**(3): 262-268.

Fett, W. F. (2000). "Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts." *Journal of food protection* **63**(5): 625-632.

Figueiredo, N. L., S. R. M. de Aguiar, P. L. Falé, L. Ascensão, M. L. M. Serralheiro and A. R. L. Lino (2010). "The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*." *Food Chemistry* **119**(2): 664-668.

Figueirinha, A., A. Paranhos, J. J. Pérez-Alonso, C. Santos-Buelga and M. T. Batista (2008). "*Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols." *Food Chemistry* **110**(3): 718-728.

Flemming, H.-C. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." *Nature Reviews Microbiology* **8**(9): 623-633.

Flemming, H.-C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2016). "Biofilms: an emergent form of bacterial life." *Nature Reviews Microbiology* **14**(9): 563-575.

Frank, J. F. (2001). "Microbial attachment to food and food contact surfaces." *Advances in food and nutrition research* **43**: 319-370.

Fu, Y., A. J. Deering, A. K. Bhunia and Y. Yao (2017). "Biofilm of *Escherichia coli* O157:H7 on cantaloupe surface is resistant to lauroyl arginate ethyl and sodium hypochlorite." *International Journal of Food Microbiology* **260**: 11-16.

Gerke, C., A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer and F. Götz (1998). "Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis Polysaccharide Intercellular Adhesin." *Journal of Biological Chemistry* **273**(29): 18586-18593.

Götz, F. (2002). "Staphylococcus and biofilms." *Molecular microbiology* **43**(6): 1367-1378.

Grimson, M. J., C. H. Haigler and R. L. Blanton (1996). "Cellulose microfibrils, cell motility, and plasma membrane protein organization change in parallel during culmination in *Dictyostelium discoideum*." *Journal of cell science* **109**(13): 3079-3087.

Grobe, K., J. Zahller and P. Stewart (2002). "Role of dose concentration in biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**(1): 10-15.

Gutiérrez-Larraínzar, M., J. Rúa, I. Caro, C. de Castro, D. de Arriaga, M. R. García-Armesto and P. del Valle (2012). "Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria." *Food Control* **26**(2): 555-563.

Gutierrez, J., C. Barry-Ryan and P. Bourke (2008). "The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients." *International Journal of Food Microbiology* **124**(1): 91-97.

Hammer, K. A., C. Carson and T. Riley (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts." *Journal of applied microbiology* **86**(6): 985-990.

Heilmann, C., C. Gerke, F. Perdreau-Remington and F. Götz (1996). "Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation." *Infection and immunity* **64**(1): 277-282.

Høiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin and O. Ciofu (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." *International journal of antimicrobial agents* **35**(4): 322-332.

Hui, X., G. Yan, F.-L. Tian, H. Li and W.-Y. Gao (2017). "Antimicrobial mechanism of the major active essential oil compounds and their structure–activity relationship." *Medicinal Chemistry Research* **26**(2): 442-449.

Inouye, S., T. Takizawa and H. Yamaguchi (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**(5): 565-573.

Izano, E. A., M. A. Amarante, W. B. Kher and J. B. Kaplan (2008). "Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Applied and environmental microbiology* **74**(2): 470-476.



Jabra-Rizk, M., T. Meiller, C. James and M. Shirtliff (2006). "Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**(4): 1463-1469.

Kalia, V. C. (2013). "Quorum sensing inhibitors: An overview." *Biotechnology Advances* **31**(2): 224-245.

Kerekes, E., É. Deák, M. Takó, R. Tserennadmid, T. Petkovits, C. Vágvölgyi and J. Krisch (2013). "Antibiofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms." *Journal of Applied Microbiology* **115**(4): 933-942.

Kerekes, E. B., É. Deák, M. Takó, R. Tserennadmid, T. Petkovits, C. Vágvölgyi and J. Krisch (2013). "Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms." *Journal of Applied Microbiology* **115**(4): 933-942.

Kikonyogo, A., D. P. Abriola, M. Dryjanski and R. Pietruszko (1999). "Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist." *European journal of biochemistry* **262**(3): 704-712.

Kim, J., M. R. Marshall and C.-i. Wei (1995). "Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens." *Journal of Agricultural and Food chemistry* **43**(11): 2839-2845.

Kim, Y.-G., J.-H. Lee, G. Gwon, S.-I. Kim, J. G. Park and J. Lee (2016). "Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7." *Scientific reports* **6**.

Kim, Y.-G., J.-H. Lee, S.-I. Kim, K.-H. Baek and J. Lee (2015). "Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production." *International Journal of Food Microbiology* **195**: 30-39.

Kim, Y., S.-J. Jang, H.-R. Kim and S.-B. Kim (2017). "Deodorizing, antimicrobial and glucosyltransferase inhibitory activities of polyphenolics from biosource." *Korean Journal of Chemical Engineering* **34**(5): 1400-1404.

Kishen, A. and M. Haapasalo (2010). "Biofilm models and methods of biofilm assessment." *Endodontic Topics* **22**(1): 58-78.

Lairson, L., B. Henrissat, G. Davies and S. Withers (2008). "Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms." *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 521-555.

Lee, J.-H., Y.-G. Kim, S. Y. Ryu, M. H. Cho and J. Lee (2014). "Ginkgolic acids and Ginkgo biloba extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation." *International Journal of Food Microbiology* **174**: 47-55.

Liu, H. and H. H. Fang (2002). "Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges." *Journal of biotechnology* **95**(3): 249-256.

Lynch, A. S. and G. T. Robertson (2008). "Bacterial and fungal biofilm infections." *Annu. Rev. Med.* **59**: 415-428.

Mah, T.-F., B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart and G. A. O'Toole (2003). "A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance." *Nature* **426**(6964): 306-310.

Mah, T.-F. C. and G. A. O'Toole (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." *Trends in Microbiology* **9**(1): 34-39.

Masuko, T., A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S.-I. Nishimura and Y. C. Lee (2005). "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format." *Analytical Biochemistry* **339**(1): 69-72.

Matthysse, A. G., D. L. Thomas and A. R. White (1995). "Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*." *Journal of bacteriology* **177**(4): 1076-1081.

Merzendorfer, H. (2006). "Insect chitin synthases: a review." *Journal of Comparative Physiology B* **176**(1): 1-15.

Nishiyama, Y., P. Langan and H. Chanzy (2002). "Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction." *Journal of the American Chemical Society* **124**(31): 9074-9082.

Ortega- Ramirez, L. A., I. Rodriguez- Garcia, J. M. Leyva, M. R. Cruz- Valenzuela, B. A. Silva- Espinoza, G. A. Gonzalez- Aguilar, M. W. Siddiqui and J. F. Ayala- Zavala (2014). "Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis." *Journal of food science* **79**(2): R129-R137.

Ortega- Ramirez, L. A., B. A. Silva- Espinoza, I. Vargas- Arispuro, G. A. Gonzalez- Aguilar, M. R. Cruz- Valenzuela, F. Nazzaro and J. F. Ayala- Zavala (2016). "Combination of *Cymbopogon citratus* and *Allium cepa* essential oils increased antibacterial activity in leafy vegetables." *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Ortiz, M. I., E. Fernández-Martínez, L. E. Soria-Jasso, I. Lucas-Gómez, R. Villagómez-Ibarra, M. P. González-García, G. Castañeda-Hernández and M. Salinas-Caballero (2016). "Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **78**: 248-256.

Patel, J., M. Sharma and S. Ravishakar (2011). "Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157: H7 on attachment to fresh produce surfaces." *Journal of applied microbiology* **110**(3): 737-745.

- Pei, R. s., F. Zhou, B. p. Ji and J. Xu (2009). "Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method." *Journal of food science* **74**(7).
- Pereira, R. S., T. C. Sumita, M. R. Furlan, A. O. C. Jorge and M. Ueno (2004). "Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection." *Revista de Saúde Pública* **38**(2): 326-328.
- Pérez-Conesa, D., L. McLandsborough and J. Weiss (2006). "Inhibition and Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 Colony Biofilms by Micellar-Encapsulated Eugenol and Carvacrol." *Journal of Food Protection* **69**(12): 2947-2954.
- Pilchová, T., M. Hernould, H. Prévost, K. Demnerová, J. Pazlarová and O. Tresse (2014). "Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*." *Food Control* **35**(1): 366-372.
- Romeo, T. (2008). *Bacterial biofilms*, Springer.
- Römling, U. (2002). "Molecular biology of cellulose production in bacteria." *Research in microbiology* **153**(4): 205-212.
- Ryu, J.-H. and L. R. Beuchat (2005). "Biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(1): 247-254.
- Saxena, I. M., K. Kudlicka, K. Okuda and R. Brown (1994). "Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization." *Journal of bacteriology* **176**(18): 5735-5752.
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley (pp. 136-144, 188).
- Silagyi, K., S.-H. Kim, Y. Martin Lo and C.-i. Wei (2009). "Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products." *Food Microbiology* **26**(5): 514-519.
- Somolinos, M., D. García, S. Condón, B. Mackey and R. Pagán (2010). "Inactivation of *Escherichia coli* by citral." *Journal of applied microbiology* **108**(6): 1928-1939.
- Song, J.-H., T.-C. Yang, K.-W. Chang, S.-K. Han, H.-K. Yi and J.-G. Jeon (2006). "In vitro anti-cariogenic activity of dichloromethane fraction from *Rheum undulatum* L. root." *Archives of pharmacal research* **29**(6): 490-496.
- Soto, S., A. Smithson, J. Horcajada, J. Martinez, J. Mensa and J. Vila (2006). "Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*." *Clinical microbiology and infection* **12**(10): 1034-1036.

Souza, E. L. d., Q. G. S. Meira, I. d. M. Barbosa, A. J. A. A. Athayde, M. L. d. Conceição and J. P. d. Siqueira Júnior (2014). "Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers." *Brazilian Journal of Microbiology* **45**(1): 67-75.

Spiers, A. J. and P. B. Rainey (2005). "The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity." *Microbiology* **151**(9): 2829-2839.

Standal, R., T.-G. Iversen, D. H. Coucheron, E. Fjaervik, J. M. Blatny and S. Valla (1994). "A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the bcs operon." *Journal of bacteriology* **176**(3): 665-672.

Starkey, M., M. R. Parsek, K. A. Gray and S. I. Chang (2004). A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. *Microbial biofilms*, American Society of Microbiology: 174-191.

Stewart, P. S. and J. W. Costerton (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *The lancet* **358**(9276): 135-138.

Stoodley, P., Z. Lewandowski, J. D. Boyle and H. M. Lappin-Scott (1999). "Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology." *Biotechnology and bioengineering* **65**(1): 83-92.

Tan, T.-J. B. E. (2011). The Effects of *Melaleuca Alternifolia* (tea Tree) Oil on Bacterial Biofilms, University of Western Australia.

Taweekhaisupapong, S., P. Ngaonee, P. Patsuk, W. Pitiphat and W. Khunkitti (2012). "Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate." *South African Journal of Botany* **78**: 37-43.

Tofiño-Rivera, A., M. Ortega-Cuadros, D. Galvis-Pareja, H. Jiménez-Rios, L. J. Merini and M. C. Martínez-Pabón (2016). "Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells." *Journal of Ethnopharmacology* **194**: 749-754.

Vikram, A., G. K. Jayaprakasha, R. M. Uckoo and B. S. Patil (2013). "Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 motility and biofilm by  $\beta$ -Sitosterol glucoside." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**(11): 5219-5228.

Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo and M. Otto (2004). "A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence." *Journal of Biological Chemistry* **279**(52): 54881-54886.

Wang, H.-H., K.-P. Ye, Q.-Q. Zhang, Y. Dong, X.-L. Xu and G.-H. Zhou (2013). "Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*." *Food Control* **32**(2): 650-658.

Wang, X., J. F. Preston and T. Romeo (2004). "The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation." *Journal of bacteriology* **186**(9): 2724-2734.

Weigel, P. H. and P. L. DeAngelis (2007). "Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases." *Journal of Biological Chemistry* **282**(51): 36777-36781.

Weiner, R., S. Langille and E. Quintero (1995). "Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides." *Journal of industrial microbiology* **15**(4): 339-346.

Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson and G. P. Salmond (2001). "*Quorum-sensing* in Gram-negative bacteria." *FEMS microbiology reviews* **25**(4): 365-404.

Won, S.-R., M.-J. Hong, Y.-M. Kim, C. Y. Li, J.-W. Kim and H.-I. Rhee (2007). "Oleic acid: an efficient inhibitor of glucosyltransferase." *FEBS letters* **581**(25): 4999-5002.

Zheng, G. Q., P. M. Kenney and L. K. T. Lam (1993). "Potential anticarcinogenic natural-products isolated from lemongrass oil and galanga root oil." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**(2): 153-156.

Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz and U. Römling (2001). "The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix." *Molecular microbiology* **39**(6): 1452-1463.