



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

**EUGENOL COMO INHIBIDOR DE GLUCOSILTRANSFERASA
INVOLUCRADA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE
*Salmonella Typhimurium***

Por

Julian Javier Palomares Navarro

TESIS APROBADA POR LA

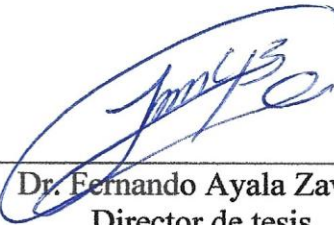
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

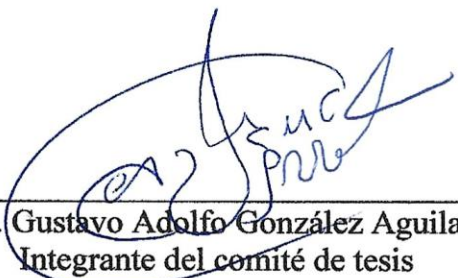
DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

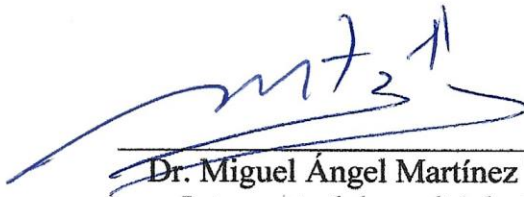
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del M.C. Julián Javier Palomares Navarro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.




Dr. Fernando Ayala Zavala
Director de tesis



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Integrante del comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Integrante del comité de tesis



Dr. Luis Alberto Ortega Ramírez
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Eugenol como Inhibidor de Glucosiltransferasa Involucrada en la Formación de Biopelículas de *Salmonella* Typhimurium" 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 Julian Javier Palomares Navarro, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Gaire Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Gaire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por brindarme la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional.

Al proyecto 319752 financiado por el fondo de ciencia básica del CONAHCYT: “Modelaje de la combinación de antibióticos convencionales y terpenos de aceites esenciales para inhibir la resistencia y factores de virulencia de bacterias patógenas alimentarias”.

A la Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen vegetal y las personas que la integran por el apoyo otorgado durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A mi director de tesis, Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, por su orientación, apoyo constante y valiosas contribuciones que han enriquecido significativamente esta investigación y sobre todo en mi formación académica y humana a lo largo de este proceso. Agradezco infinitamente toda su comprensión, empatía, paciencia y esas largas pláticas.

A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Gustavo González, Dr. Luis Ortega y Dr. Miguel Ángel Martínez por su disposición a apoyarme, por sus valiosas sugerencias y por compartir sus conocimientos durante la evaluación de este trabajo, contribuyendo en gran medida a su calidad y a mi crecimiento académico.

Al Dr. Alfonso García, por ser un guía en este camino, apoyarme, motivarme y compartirme valiosos consejos que fueron fundamentales para culminar este proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Tecnologías Emergentes por el apoyo académico brindado en este tiempo. Un agradecimiento especial al Dr. Cristóbal González, al Dr. Andrés Álvarez, al M.C.

Jesús Manuel Luna por la asesoría y apoyo técnico que me brindaron para la realización de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

Dedico esto a mi madre, Alma Alicia Navarro Soto quien me trajo a este mundo, quien decidió desde el primer momento cuidarme, protegerme, amarme incondicionalmente e inculcar grandes valores, principios y despertar esa chispa de preguntarme el porqué de todo.

A María Jaqueline Palomares Navarro con quien he compartido experiencias sin fin, alguien que siempre ha confiado plenamente en mí, que no deja de sorprenderme día tras día sobre la afinidad que tenemos y que me inspira a seguir creciendo como ser humano.

A Thalía Bernal Mercado quien confió desde que decidí comenzar el doctorado, que me ha defendido, respaldado, compartido conocimientos, momentos y detalles sin esperar a cambio, y que hasta el día de hoy ha estado apoyándome e impulsándome en las buenas y no tan buenas.

A mi novia Fátima Angelina Santa Cruz quien me ha dado cariño, amor, confianza y mucha paciencia, recordándome que no todo tiene que ser tan complejo y que en lo simple se pueden encontrar grandes alegrías.

Este enunciado es dedicado muy especialmente y engloba aquellas personas que se sientan parte de mí, a los que han estado, están y estarán, a los que han tomado caminos diferentes y sobre todo a las personas que han decidido continuar de la mano conmigo y que creen en esto a lo que yo llamo “nuestro equipo”.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	19
2.1. <i>Salmonella</i> es un Riesgo para la Salud Pública	19
2.2. Proceso de Formación de Biopelículas de <i>Salmonella</i>	23
2.3 Inhibición de Celulosa como Punto Clave para Reducir la Formación de Biopelículas de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	27
2.4 Terpenos como Posibles Inhibidores de SPE en Biopelículas de <i>Salmonella</i>	31
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo General	39
4.2. Objetivos Específicos	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. Analizar el Efecto del Eugenol sobre la Formación de Biopelículas de <i>Salmonella</i> Typhimurium en Superficies de Acero Inoxidable	40
5.1.1 Efecto Del Eugenol sobre el Crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en Estado Planctónico.....	40
5.1.2 Efecto del Eugenol sobre la Permeabilidad de la Membrana Bacteriana	40
5.1.3 Efecto del Eugenol en la Erradicación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	41
5.1.4 Efecto del Eugenol en la Formación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	42
5.1.5 Análisis Estadístico.....	43
5.2. Cuantificar la Producción de Celulosa en Biopelículas de <i>Salmonella</i> Typhimurium Expuestas a Eugenol en Superficies de Acero Inoxidable.....	43
5.2.1 Efecto del Eugenol sobre el Contenido de Celulosa en Biopelículas de <i>S.</i> Typhimurium	43
5.2.2 Análisis Estadístico.....	44
5.3. Medir la Actividad de la Glucosiltransferasa en un Extracto de <i>Salmonella</i> Typhimurium Expuesta a Eugenol	44

CONTENIDO (continuación)

5.4. Determinar las Interacciones Moleculares <i>In Silico</i> del Eugenol sobre la Actividad de Glucosiltransferasa de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	45
5.5. Evaluar Cambios en la Expresión De <i>BcsA</i> de <i>Salmonella</i> Typhimurium Expuestas a Eugenol	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
6.1. Analizar el Efecto del Eugenol sobre la Formación de Biopelículas de <i>Salmonella</i> Typhimurium en Superficies de Acero Inoxidable	48
6.1.1 Eugenol Inhibe el Crecimiento Planctónico de <i>S. Typhimurium</i>	48
6.1.2 Eugenol Afecta la Permeabilidad de la Membrana Bacteriana.....	50
6.1.3 Efecto del Eugenol en la Erradicación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	51
6.1.4 Efecto del Eugenol en la Formación de Biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	54
6.2. Cuantificar la Producción de Celulosa en Biopelículas de <i>Salmonella</i> Typhimurium Expuestas a Eugenol en Superficies de Acero Inoxidable.....	59
6.3. Medir la Actividad de la Glucosiltransferasa en un Extracto de <i>Salmonella</i> Typhimurium Expuesta a Eugenol	61
6.4. Determinar las Interacciones Moleculares <i>In Silico</i> del Eugenol sobre la Actividad de Glucosiltransferasa de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	64
6.5. Evaluar Cambios en la Expresión de <i>BcsA</i> de <i>Salmonella</i> Typhimurium Expuesta a Eugenol	70
7. CONCLUSIÓN	74
8. RECOMENDACIONES.....	75
9. REFERENCIAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Representación esquemática de la formación de biopelículas: adhesión inicial, adhesión irreversible (microcolonias y crecimiento), maduración y dispersión.....	23
2 Esquema del complejo celulosa sintasa responsable de la síntesis de celulosa en <i>S. Typhimurium</i> . BcsA produce cadenas de glucano glicosilando la UDP-glucosa; BcsB, forma complejos con BcsA para activar la celulosa sintasa; y BcsC, crea un canal en la membrana externa a través del cual se extruyen las cadenas de glucano. BcsE, BcsF, BcsG, BcsQ y BcsR participan en la síntesis de celulosa con funciones diferentes e incompletas conocidas. Adaptado de Ahmad <i>et al.</i> , (2017).....	30
3 Internalización de cristal violeta en <i>S. Typhimurium</i> tratada con eugenol. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Los valores son medias \pm desviación estándar, $n = 3$	50
4 Viabilidad de <i>S. Typhimurium</i> en biopelículas preformadas expuestas durante 1 h a eugenol. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Los valores son medias \pm desviación estándar, $n = 3$	52
5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de eugenol sobre biopelículas de <i>S. Typhimurium</i>	54
6 A) Cinética de formación de biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> en superficies de acero de inoxidable durante 24 horas de incubación expuestas a 0, 0.3 y 0.7 mg/mL de eugenol. B) Cuantificación de células planctónicas viables en el medio de cultivo de la formación de biopelículas.....	55
7 Efecto de diferentes concentraciones de eugenol en el contenido de carbohidratos en biopelículas de <i>S. Typhimurium</i> adheridas a acero inoxidable durante 12 horas de incubación.....	59
8 A) Acoplamiento molecular de UDP-glucosa con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. B) Una mirada más cercana al acoplamiento molecular de UDP-glucosa con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA C) Interacciones moleculares de UDP-glucosa con residuos de aminoácidos de la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. Las estructuras se generaron con el software Discovery Studio.....	65
9 A) Acoplamiento molecular de eugenol con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. B) Una mirada más cercana al acoplamiento molecular del eugenol con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. C) Interacciones moleculares de eugenol con residuos de aminoácidos de la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. Las estructuras se generaron con el software Discovery Studio.....	66

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
10 A) Comparación de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) en BcsA tratada con UDP-glucosa y Eugenol durante una simulación dinámica molecular de 100 ns. B) Evaluación de la estabilidad dinámica de los ligandos UDP-glucosa y Eugenol unidos a BcsA durante una simulación dinámica molecular de 100 ns.....	67
11 Secuencia temporal a) 0 ns b) 50 ns y c) 100 ns de la interacción de la proteína BcsA con el ligando (amarillo = UDP-glucosa) en simulaciones de GROMACS.....	67
12 Secuencia temporal a) 0 ns b) 50 ns y c) 100 ns de la interacción de la proteína BcsA con el ligando (amarillo = eugenol) en simulaciones de GROMACS.....	68
13 Expresión relativa de BcsA. Las gráficas representan el promedio \pm desviación estándar. Diferentes literales significan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).....	71

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Casos de personas infectadas con <i>Salmonella</i> spp. en el mundo.....	21
2 Eficacia antibacteriana y modo de acción de diferentes compuestos terpénicos contra bacterias patógenas de alimentos.....	33
3 Efecto del eugenol en la inhibición de la actividad de glucosiltransferasa de <i>S.</i> <i>Typhimurium</i>	62

RESUMEN

Salmonella Typhimurium, capaz de desarrollar biopelículas resistentes a antimicrobianos en superficies relacionadas con alimentos, representa una amenaza para la salud pública al causar brotes de enfermedades. Las biopelículas son células incrustadas en una matriz autogenerada de sustancias poliméricas extracelulares que contribuyen a la resistencia, lo que las hace difíciles de erradicar. La celulosa, un componente importante de estas biopelículas, es producida por la enzima glucosiltransferasa. Por lo tanto, es esencial proponer moléculas que puedan inhibir la síntesis de celulosa. En este contexto, este trabajo se enfocó en el eugenol, un compuesto vegetal conocido por su capacidad para combatir biopelículas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del eugenol sobre el crecimiento planctónico de *S. Typhimurium*, la erradicación y la formación de biopelículas en acero inoxidable. Así como su efecto sobre la producción de celulosa en biopelículas de *S. Typhimurium*, examinando específicamente las variaciones en el contenido de celulosa, la expresión del gen *bcsA* (responsable de codificar la glucosiltransferasa), la inhibición en la actividad de la glucosiltransferasa y en las interacciones (*in silico*) del eugenol con la enzima. Los resultados mostraron que el eugenol posee una concentración mínima inhibitoria y bactericida de 0.6 y 0.8 mg/mL, respectivamente, para el crecimiento planctónico de *S. Typhimurium*. La concentración mínima de erradicación de biopelículas y la concentración mínima de inhibición de biopelículas del eugenol fueron de 1.8 mg/mL y 0.7 mg/mL, respectivamente. Además, a una concentración de 0.3 mg/mL redujo significativamente la formación de biopelículas y afectó la producción de celulosa, disminuyendo el contenido de carbohidratos en un 24-27% a concentraciones de 0.3 y 0.7 mg/mL. El eugenol (0.7 mg/mL) ocasionó una reducción del 69% en la actividad enzimática de la glucosiltransferasa extraída de *S. Typhimurium*. Los análisis *in silico* revelaron una energía de afinidad de -8.5 kcal/mol entre el eugenol y la enzima, interactuando con residuos claves del sitio activo. El análisis de PCR en tiempo real indicó que el eugenol provocó un aumento significativo en la expresión de *bcsA*, gen involucrado en la síntesis de la glucosiltransferasa. Estos hallazgos sugieren que la capacidad del eugenol para reducir el contenido de polisacáridos extracelulares y la formación de biopelículas podrían estar asociadas con la inhibición de la actividad de la glucosiltransferasa. En conjunto, el estudio destaca el potencial del eugenol como una estrategia prometedora para combatir las biopelículas de *S. Typhimurium*, lo

que podría tener importantes implicaciones en la industria alimentaria.

Palabras clave: Compuestos antibiopelícula; seguridad alimentaria; sustancias poliméricas extracelulares; acoplamiento de análisis molecular; producción de celulosa bacteriana

ABSTRACT

Salmonella Typhimurium, capable of developing antimicrobial-resistant biofilms on food-related surfaces, threatens public health by causing disease outbreaks. Biofilms consist of cells embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances that contribute to their resistance, rendering them challenging to eradicate. The enzyme glucosyltransferase produces cellulose, a crucial component of these biofilms. Therefore, it is essential to propose molecules that can inhibit cellulose synthesis. In this context, this study focused on eugenol, a plant compound known for its ability to combat biofilms. This research aimed to evaluate the effect of eugenol on the planktonic growth of *S. Typhimurium*, eradication, and biofilm formation on stainless steel. Additionally, its impact on cellulose production in *S. Typhimurium* biofilms was examined, specifically analyzing variations in cellulose content, *bcsA* gene expression (responsible for encoding glucosyltransferase), inhibition of glucosyltransferase activity, and eugenol's interactions (*in silico*) with the enzyme. The results showed that eugenol has a minimum inhibitory concentration and bactericidal concentration of 0.6 and 0.8 mg/mL, respectively, for planktonic growth of *S. Typhimurium*. The minimum biofilm eradication and minimum biofilm inhibition concentrations of eugenol were 1.8 mg/mL and 0.7 mg/mL, respectively. Additionally, at a concentration of 0.3 mg/mL, it significantly reduced biofilm formation and affected cellulose production, decreasing carbohydrate content by 24-27% at concentrations of 0.3 and 0.7 mg/mL. Eugenol (0.7 mg/mL) caused a 69% reduction in glucosyltransferase enzymatic activity extracted from *S. Typhimurium*. *In silico* analyses revealed an affinity energy of -8.5 kcal/mol between eugenol and the enzyme, interacting with key active site residues. Real-time PCR analysis indicated that eugenol significantly increased *bcsA* gene expression, which is involved in glucosyltransferase synthesis. These findings suggest that eugenol's ability to reduce extracellular polysaccharide content and biofilm formation may be associated with inhibition of glucosyltransferase activity. Overall, the study highlights the potential of eugenol as a promising strategy to combat *S. Typhimurium* biofilms, which could have significant implications in the food industry.

Keywords: Anti-biofilm compounds, Food safety, Extracellular polymeric substance, Molecular analysis docking, Bacterial cellulose production

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones gastrointestinales son causadas por la ingestión de alimentos contaminados con patógenos entéricos. Entre estos patógenos, *Salmonella* desempeña un lugar destacado como una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos (Ehuwa *et al.*, 2021). Esta bacteria es responsable de una cantidad significativa de casos de enfermedades diarreicas, lo que se traduce en aproximadamente 1.35 millones de infecciones al año en los Estados Unidos de América (CDC, 2023a; Kosznik-Kwaśnicka *et al.*, 2022). La gravedad de sus efectos en la salud pública subraya la necesidad apremiante de implementar medidas eficaces para prevenir y controlar la contaminación alimentaria, con el objetivo de reducir la incidencia de estas infecciones.

Salmonella posee la capacidad de adaptarse y sobrevivir en condiciones ambientales adversas mediante la formación de biopelículas. Las biopelículas son comunidades bacterianas que exhiben un metabolismo diferenciado a sus contrapartes planctónicas y se encuentran rodeadas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de producción propia (Jahan *et al.*, 2022). La matriz de SPE tiene la función de brindar protección contra los procesos de limpieza y desinfección, aumentando así el riesgo de contaminación cruzada en superficies previamente contaminadas (Liu *et al.*, 2023b). Esto representa un inconveniente considerable para la industria alimentaria, ya que las biopelículas se han relacionado con el origen de la contaminación de productos alimenticios y enfermedades transmitidas por alimentos, lo que plantea problemas críticos para la salud pública (Galie *et al.*, 2018).

El proceso de formación de biopelículas en *Salmonella* comienza con la adhesión, que puede ocurrir en cuestión de minutos u horas, tanto en superficies abióticas como bióticas, seguido por la producción de SPE (Merino *et al.*, 2019; Moraes *et al.*, 2019). Las SPE de la matriz de biopelículas de *Salmonella* se han clasificado de acuerdo con su función más allá de su composición. Los SPE estructurales representan el grupo más grande y relevante en esta clasificación en términos de protección contra desinfectantes. Estas SPE estructurales están compuestas por polímeros como celulosa, curli, ácido colánico y antígeno O proteico (Maruzani *et al.*, 2019). En particular, la celulosa es la principal sustancia polimérica extracelular secretada por *Salmonella* para la conformación de sus biopelículas (Kim *et al.*, 2022).

Este polisacárido es un polímero lineal compuesto por moléculas de glucosa que se encuentran

unidas mediante enlaces glucosídicos β -(1-4). La celulosa se forma a través de un proceso altamente regulado que implica enzimas conocidas como glucosiltransferasas. El proceso comienza con la activación del sustrato, en este caso, la UDP-glucosa (uridina difosfato glucosa), que se utiliza como la fuente de glucosa para la síntesis de celulosa. Las glucosiltransferasas transmembranales, como BcsA y BcsB en *Salmonella*, son las encargadas de transferir unidades de glucosa desde la UDP-glucosa al polímero en crecimiento. A medida que se agrega cada unidad de glucosa, el polisacárido se desplaza a través de la membrana celular a través de un canal formado por las proteínas de celulosa sintasa, es decir, BcsA y BcsB. Este canal permite la translocación del polímero a medida que se forma (Morgan *et al.*, 2013; Omadjela *et al.*, 2013).

La erradicación de biopelículas se convierte en un desafío debido a la compleja red tridimensional de la matriz de SPE que alberga bacterias y las resguarda de la acción de los desinfectantes (Flemming *et al.*, 2016). Esta matriz limita la difusión e inactiva agentes xenobióticos dentro de la biopelícula, afectando el proceso de desinfección y comprometiendo la seguridad alimentaria. Por ende, una estrategia de mayor eficacia sería buscar alternativas que prevengan la formación de biopelículas en lugar de intentar erradicarlas una vez establecidas. En este contexto, es importante destacar que, si bien estudios recientes se han enfocado en abordar la inhibición de la formación de la matriz de SPE en bacterias como *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Escherichia*, este enfoque ha sido insuficientemente explorado en el caso de *Salmonella* (Powell *et al.*, 2018). Es fundamental reconocer que los principales componentes de las biopelículas de *Salmonella* incluyen polisacáridos como la celulosa, lo que sugiere que la inhibición de su síntesis podría representar un enfoque prometedor para el control efectivo de estas biopelículas.

El uso inapropiado e intensivo de agentes desinfectantes para el control de *Salmonella* podría inducir resistencia bacteriana y, en algunos casos, afectar las superficies de contacto con alimentos (Luna-Solorza *et al.*, 2023). Por lo tanto, se ha enfatizado la necesidad de investigar alternativas para los agentes desinfectantes. Los terpenos presentes en fuentes vegetales son una opción prometedora debido a su efecto sobre el crecimiento de células planctónicas y en estado de biopelículas (Lahiri *et al.*, 2019). Dentro de los terpenos con mayor efectividad se encuentra el eugenol, un fenilpropanoide extraído de tejidos como la canela y el clavo (Souza *et al.*, 2022). Su tamaño molecular, naturaleza hidrofóbica y presencia de grupos hidroxilos le permite penetrar la membrana lipídica bacteriana y alterar su funcionalidad, lo que posteriormente resulta en la fuga de constituyentes intracelulares y causar la muerte (Su *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022)(Su *et al.*,

2022; Zhao *et al.*, 2022). También se ha demostrado que el eugenol presenta actividad contra algunas enzimas bacterianas que incluyen algunas proteasas, histidina carboxilasa, amilasa, ATPasa y glucosiltransferasas importantes en el metabolismo y formación de biopelículas de las bacterias (Hyldgaard *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Algunos estudios han informado que los terpenos reducen significativamente la formación de biopelículas de *Salmonella* (Lira *et al.*, 2020; Silva-Espinoza *et al.*, 2020; Čabarkapa *et al.*, 2019; Miladi *et al.*, 2017). Este efecto se ha correlacionado con la disminución en la producción de exopolisacáridos de biopelículas en *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus sobrinus* (Liu *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2020; Hakimi Alni *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, en estos estudios no se han considerado detalles importantes sobre cómo estos terpenos inhiben la síntesis de los polisacáridos. En otras especies bacterianas, se observó que los terpenos, debido a su estructura, podrían interactuar potencialmente con las enzimas glucosiltransferasas que participan en la síntesis de glucanos. Un estudio mostró que el citral y el geraniol inhiben la actividad de la glucosiltransferasa, reduciendo la producción de glucanos en las biopelículas de *E. coli* (Ortega-Ramírez *et al.*, 2020). Por otro lado, también se ha demostrado que los terpenos regulan la expresión de genes relacionados con la síntesis de SPE, como la celulosa, el curli o el ácido colánico. Por ejemplo, el carvacrol redujo la formación de biopelículas de *E. cloacae* y reguló negativamente algunos genes que codifican para fimbria curli y ácido colánico, necesarios para la formación de biopelículas de esta bacteria (Liu *et al.*, 2021).

Si bien existe evidencia prometedora sobre el efecto de los terpenos en la inhibición de biopelículas, sigue habiendo una carencia de conocimiento que permita desarrollar estrategias efectivas para el control de biopelículas producidas por *Salmonella*. Resulta esencial profundizar en la caracterización de la síntesis de SPE durante la formación de biopelículas, explorar los mecanismos subyacentes a la inhibición de la síntesis de celulosa mediada por terpenos y, además, investigar las interacciones moleculares específicas entre los terpenos y las enzimas implicadas en la síntesis de SPE, así como su influencia en la regulación de genes relacionados con este proceso. Partiendo de la evidencia reportada en la literatura científica, la hipótesis central de esta investigación postula que el eugenol, debido a sus propiedades estructurales, es capaz de inhibir la actividad de la glucosiltransferasa, la cual es responsable de la síntesis de celulosa en las biopelículas de *Salmonella Typhimurium*. Este efecto disminuye el contenido de SPE y, en última instancia, reduce

la formación de biopelículas de este patógeno en superficies de acero inoxidable, lo que podría abrir nuevas perspectivas en la prevención y el control de infecciones transmitidas por alimentos.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Salmonella* es un Riesgo para la Salud Pública

La diarrea infecciosa es una enfermedad común y frecuente que afecta a más de 2 mil millones de personas en todo el mundo cada año, siendo de las principales de entre las enfermedades infecciosas, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Qi *et al.*, 2019). Este tipo de infecciones se asocian con una mortalidad y morbilidad significativas. Un tercio de los casos de diarrea infecciosa es causado por el consumo de alimentos contaminados por microorganismos. Entre estos, *Salmonella* se destaca como un patógeno de gran relevancia que plantea una seria amenaza para la salud humana. Esta bacteria es responsable de provocar alrededor de 1.35 millones de infecciones, 26.500 hospitalizaciones y 420 muertes en los Estados Unidos cada año, mientras que en la Unión Europea en el 2022 se confirmaron 65 967 casos de salmonelosis de los cuales 81 fueron fatales, consolidando la salmonelosis como una de las infecciones transmitidas por alimentos más frecuentes y significativas (CDC, 2023b).

La infección por *Salmonella* abarca diversas subespecies entéricas que desencadenan tanto gastroenteritis, conocida como salmonelosis no tifoidea, como fiebre tifoidea, relacionada con los serotipos Typhi y Paratyphi (Brenner *et al.*, 2000). De los 2,600 serotipos identificados de *Salmonella* como desencadenantes de brotes de enfermedades diarreicas, *Salmonella* enterica serovar Typhimurium y *Salmonella* enterica serovar Enteritidis lideran los reportes, siendo las principales responsables de la salmonelosis no tifoidea (Nazari Moghadam *et al.*, 2023)

Las infecciones por *Salmonella*, si bien en muchas ocasiones no revisten gravedad en individuos sanos, pueden llegar a desencadenar hospitalizaciones e incluso fallecimientos especialmente en adultos mayores, niños, mujeres embarazadas y las personas inmunodeprimidas. Estas infecciones no solo afectan a nivel individual, sino que también tienen un impacto en la economía familiar y generan costos importantes para la salud pública debido al tiempo de hospitalización, tratamientos médicos y la disminución de la productividad laboral. De acuerdo con estimaciones del Servicio de Investigación Económica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en 2018, el costo anual de las enfermedades transmitidas por *Salmonella* (no tifoidea) en los Estados Unidos

de América ascendió a la considerable cifra de \$4,142,179,160 de dólares (USDA, 2021). Según el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América, *Salmonella* causa aproximadamente 1.35 millones de infecciones, 26,500 hospitalizaciones y 420 muertes al año en ese país (CDC, 2023b). Los alimentos contaminados son la causa principal de la mayoría de las enfermedades. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, en 2021, la salmonelosis fue la segunda enfermedad zoonótica más notificada en la Unión Europea, con 60,050 casos, lo que representa un aumento del 14.3% en la tasa en comparación con 2020 (Alimentaria, 2023). Por otro lado, México reportó que, en 2020, el número total de infecciones por *Salmonella* registradas en personas alcanzó los 64,778 casos, de los que el 25.4% (16,466) correspondió a fiebre tifoidea, 8.4% (5,468) a paratifoidea, y el 66.2% a otras salmonelosis (SENASICA, 2020). El número de casos de infección por *Salmonella* es considerablemente importante en todo el mundo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Casos de personas infectadas con *Salmonella* spp. en el mundo.

Número de casos	<i>Salmonella</i> spp.	Fuente de contaminación	País	Año
25	<i>Salmonella</i> Saint Paul	Carne molida	EUA	2023
88	<i>Salmonella</i> Thomson	Cebollas frescas rebanadas	EUA	2023
30	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Masa de galletas	EUA	2023
17	<i>Salmonella</i> Infantis	Harina	EUA	2023
1072	<i>Salmonella</i>	Pollo	EUA y Puerto Rico	2023
73	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Brotes de alfalfa	EUA	2022
134	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Chocolate	UE	2022
Desconocido	<i>Salmonella</i>	Chocolate	México	2022
54	<i>Salmonella</i> Litchfield	Pescado	EUA	2022
25	<i>Salmonella</i> Senftenberg	Crema de cacahuete	EUA	2022
9	<i>Salmonella</i> Thomson, Oraniengbur, Typhimurium, Weltevrede, Enteritidis, Hadar	Palitos de salami, mariscos, cebollas, carnes al estilo italiano, ensaladas empaquetadas, camarones cocidos congelados, productos de pollo rellenos empanizados crudos y congelados, queso brie de anacardo y pavo molido	EUA	2021
473	<i>Salmonella</i> Braenderup, Muenchen, Thompson, and Typhimurium	Varios	EUA	2020
1000	<i>Salmonella</i> spp.	Aves de corral	EUA	2019
80	<i>S. Typhimurium</i>	Sushi	Chile	2019
49	<i>Salmonella</i> spp.	Productos de sándwich de pollo	Australia	2018
40	<i>Salmonella</i> Concord	Productos tahini	Israel	2018
14	<i>S. Typhimurium</i>	Coco deshidratado	EUA	2018
265	<i>S. Typhimurium</i>	Ensalada de pollo	EUA	2018
87	<i>Salmonella</i> spp.	Desconocido	Japan	2017
24	<i>S. Typhimurium</i>	Profesores de laboratorio clínico y microbiología	EUA	2017
907	<i>Salmonella</i> Poona	Pepino	EUA	2016
230	<i>S. Typhimurium</i>	Brotes de frijol mungo crudos	South Australia	2016
44	<i>S. Typhimurium</i>	Pollo empanizado crudo	Canada	2015
41	<i>S. Typhimurium</i>	Profesores de laboratorio clínico y microbiología	EUA	2014
22	<i>S. Typhimurium</i>	Carne molida	EUA	2013

Fuente: Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, 2023a), (Popa *et al.*, 2021).

El mecanismo de infección de *Salmonella* comienza con la ingestión de alimentos o agua contaminados. Estos alimentos a menudo son de origen animal, como aves de corral, huevos, carne de res o productos lácteos. Una vez que las bacterias ingresan al estómago, se enfrentan a un ambiente altamente ácido. Muchas de ellas no sobreviven a esta etapa debido a la acidez gástrica. Sin embargo, algunas cepas de *Salmonella* han desarrollado adaptaciones que les permiten resistir estas condiciones adversas (Li, 2022). Las bacterias que sobreviven llegan al intestino delgado, donde comienzan a colonizar la mucosa intestinal. *Salmonella* produce proteínas especiales que le permiten adherirse a las células del revestimiento intestinal. Algunas cepas de *Salmonella* pueden penetrar las células epiteliales del revestimiento intestinal utilizando una serie de proteínas especializadas (Li, 2022). Una vez que *Salmonella* ha invadido las células intestinales, comienza a multiplicarse en su interior. Este es un mecanismo inteligente de evasión del sistema inmunológico, ya que las células huésped no reconocen fácilmente la presencia de las bacterias dentro de ellas. La presencia de este patógeno dentro de las células intestinales desencadena una respuesta inflamatoria, lo que provoca los síntomas comunes de infección como fiebre, diarrea y dolor abdominal (Ehuwa *et al.*, 2021). En algunos casos, especialmente en infecciones graves, las bacterias de *Salmonella* pueden cruzar la barrera intestinal e ingresar al torrente sanguíneo y viajar a otros órganos y tejidos, lo que resulta en una infección sistémica. La diseminación al torrente sanguíneo es rara, ocurre en menos del 5% de las infecciones y depende de la virulencia de la cepa de *Salmonella* determinada y de la respuesta inmune del huésped (CDC, 2013). Este mecanismo de infección de *Salmonella* destaca su habilidad para adaptarse y sobrevivir en un entorno hostil, lo que la convierte en una de las principales causas de infecciones transmitidas por alimentos en todo el mundo.

La información antes presentada permite visualizar como esta bacteria se encuentra en diferentes productos e indican su persistencia en diferentes ambientes, lo que podría atribuirse a su capacidad para sobrevivir en diferentes superficies (Berger *et al.*, 2010). Es fundamental comprender las fuentes y cómo *Salmonella* contamina durante estos procesos para prevenir y controlar infecciones. Además, es esencial comprender las fuentes y los mecanismos de contaminación de *Salmonella* en estos procesos con el fin de prevenir y controlar las infecciones. Además, resulta crucial llevar a cabo más estudios epidemiológicos para identificar las ubicaciones y modalidades de estas infecciones, así como las principales fuentes de contaminación, los serotipos involucrados, su resistencia a procesos de desinfección y antibióticos.

2.2. Proceso de Formación de Biopelículas de *Salmonella*

La capacidad de *Salmonella* para adaptarse, sobrevivir y persistir en condiciones ambientales adversas, a través de la formación de biopelículas en equipos y superficies en contacto con alimentos, se ha identificado como una de las principales fuentes de contaminación de productos alimenticios y brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Galie *et al.*, 2018). Las biopelículas son comunidades bacterianas que exhiben un metabolismo diferenciado a sus contrapartes planctónicas y se encuentran rodeadas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de producción propia (Jahan *et al.*, 2022). El proceso de formación de biopelículas por *Salmonella* involucra varias etapas clave como se muestra en la Figura 1.

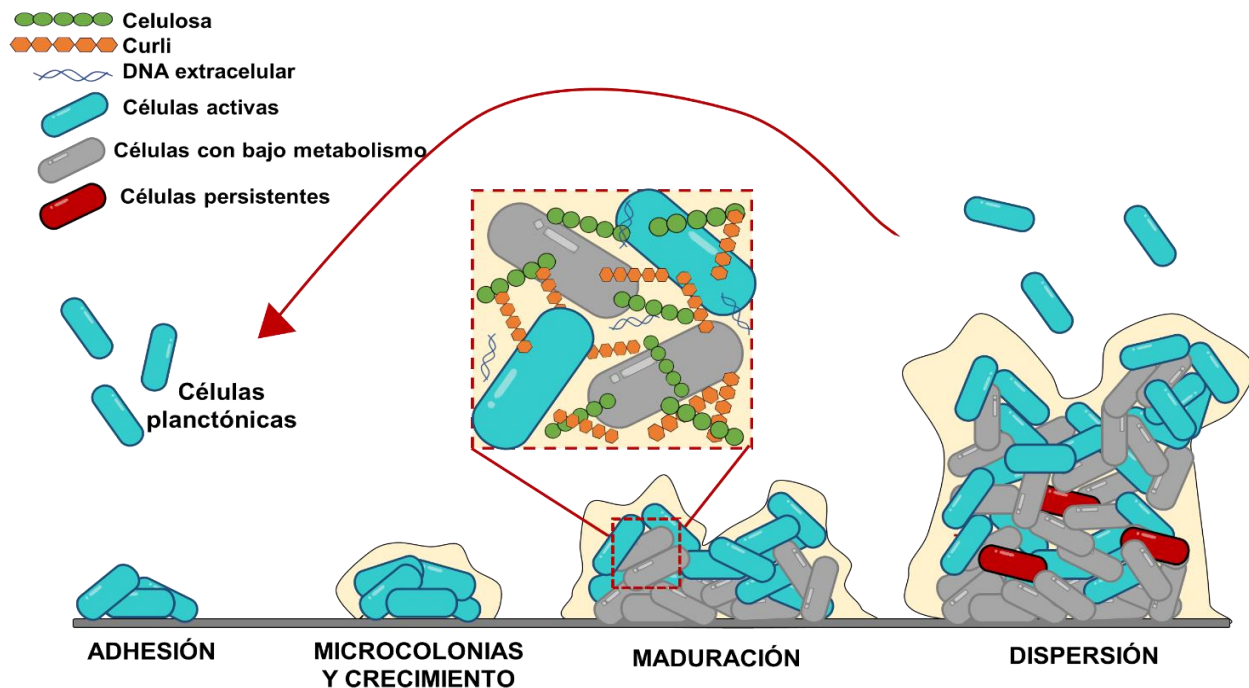


Figura 1. Representación esquemática de la formación de biopelículas: adhesión inicial, adhesión irreversible (microcolonias y crecimiento), maduración y dispersión.

En la etapa inicial, las células planctónicas de *Salmonella* se adhieren a la superficie (Van Houdt y Michiels, 2010). Esto puede ocurrir en minutos u horas, y la capacidad de esta bacteria para

adherirse a una amplia gama de superficies contribuye a su éxito como patógeno alimentario. Esta adhesión está influenciada por diferentes factores como las interacciones fisicoquímicas entre las células y la superficie, la textura (rugosa o lisa), la carga, la polaridad, el pH, la temperatura y los nutrientes del medio (Van Houdt y Michiels, 2010; Abdallah *et al.*, 2009). Por ejemplo, Moraes *et al.*, 2018 estudiaron la capacidad de diferentes especies de *Salmonella* para adherirse a superficies de acero inoxidable y producir biopelículas bajo diferentes pH, temperatura y concentraciones de NaCl. Las cepas de *S. Enteritidis*, *Salmonella* Infantis, *S. Typhimurium* y *Salmonella* Heidelberg demostraron adherencia a pH 4, hasta 4% de NaCl y a temperaturas de 20 °C y 35 °C. La probabilidad de adhesión se redujo cuando las concentraciones de NaCl fueron >8% y a 8°C, así como en valores de $\text{pH} \leq 5$ y concentraciones de NaCl >6%, para todas las cepas analizadas. La generación de biopelículas se observó a 35 °C y 20 °C a pH 7 y 6 y hasta 6% de NaCl. Lo anterior indica el amplio rango de condiciones en el que *Salmonella* puede adherirse e iniciar el proceso de formación de biopelículas.

Además, *Salmonella* demuestra su versatilidad en términos de adhesión, ya que se ha observado que puede fijarse a una variedad de sustratos, que incluyen cálculos biliares, células epiteliales animales, superficies de plantas y también superficies inanimadas (Sadekuzzaman *et al.*, 2015). Numerosas investigaciones han señalado que los diferentes serovares de *S. enterica* tienen la capacidad de adherirse y formar biopelículas en una amplia gama de materiales, incluyendo plástico, vidrio y acero inoxidable, que son comunes en cocinas, baños, así como en instalaciones cruciales como mataderos, granjas e industrias alimentarias (Obe *et al.*, 2022; Da Silva *et al.*, 2018; Dantas *et al.*, 2018). Un estudio específico destacó que la adhesión de *Salmonella* puede variar significativamente según la superficie y las condiciones de temperatura en las que se encuentre, lo que, a su vez, influye en su capacidad de supervivencia en entornos de procesamiento de alimentos (Obe *et al.*, 2022). Los resultados de esta investigación indicaron que, a una temperatura de 25 °C, se observó una mayor formación de biopelículas fuertes y moderadas en superficies de plástico en comparación con el acero inoxidable. Sin embargo, a 15 °C, se registró una menor formación de biopelículas fuertes en comparación con la temperatura de 25 °C, y se notó que las superficies de plástico mostraban una mayor tendencia a la adhesión en comparación con las de acero inoxidable a esta temperatura. Este estudio sobre la adhesión de *Salmonella* en diferentes condiciones resulta fundamental, ya que proporciona información valiosa para la mitigación de las biopelículas en entornos de procesamiento.

La formación de biopelículas de *Salmonella* continúa con un proceso de adhesión irreversible,

desencadenado por la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que componen la matriz de la biopelícula (Merino *et al.*, 2019). Esta matriz está representando alrededor del 90% de la biomasa, mientras que las células microbianas contribuyen con el 10% restante. Los componentes fundamentales de la biopelícula de *Salmonella* engloban diversos polisacáridos, incluyendo la celulosa, el ácido colánico y la cápsula de antígeno O aniónico. Además, se encuentran proteínas como las fibras amiloides conocidas como curli, flagelos, componentes proteicos de superficie, ácidos grasos y ADN (Maruzani *et al.*, 2019). Es importante destacar que la composición precisa de las biopelículas no puede generalizarse para todas las especies, lo que abre un área de investigación valiosa.

El siguiente paso en el proceso de formación es la maduración de la biopelícula. La matriz de SPE crea una red tridimensional crucial para el estilo de vida y la virulencia de las biopelículas. Las SPE en las biopelículas de *Salmonella* desempeñan varias funciones que contribuyen a su formación y resistencia. La matriz de SPE facilita la adhesión de las células a las superficies, ya sean bióticas o abióticas, permitiendo que las biopelículas se anclen con seguridad a las superficies. La matriz de SPE también puede retener agua y nutrientes dentro de la biopelícula, creando un entorno viscoso hidratado que favorece la supervivencia de las células bacterianas. Esto evita la desecación y ayuda a mantener un ambiente propicio para el crecimiento y la persistencia de las células en la biopelícula (Izadi *et al.*, 2021). Además, se pueden crear microambientes o nichos ecológicos dentro de las biopelículas que tienen condiciones variables, como diferencias en la concentración de nutrientes, oxígeno, pH y temperatura (Steenackers *et al.*, 2012). Esto favorece la formación de subpoblaciones de células con diferentes estados metabólicos como activo o con bajo metabolismo (durmientes).

Una de las principales funciones de la matriz de SPE es crear una barrera física tridimensional que rodea y protege a las células bacterianas en el interior de la biopelícula. Esta barrera protege a las células de diversos factores estresantes, como antibióticos y desinfectantes, dificultando la penetración de los antimicrobianos en el interior de la biopelícula. Además, los polisacáridos y proteínas en la matriz pueden interactuar con los antimicrobianos, lo que reduce su disponibilidad para ejercer su acción antimicrobiana. Otra razón más de la resistencia de las biopelículas a los antimicrobianos es que algunas de las células dentro de las biopelículas se encuentran adormiladas o inactivas lo que las hace menos susceptibles a los antimicrobianos. Estas células pueden reactivarse más tarde, lo que contribuye a la persistencia de la infección.

Todo esto conlleva a que las células en estado de biopelícula sean más resistentes a los antibióticos

y desinfectantes en comparación con las células planctónicas. Por ejemplo, se llevaron a cabo experimentos donde aislados ambientales de *Salmonella* no tifoidea se expusieron a los desinfectantes ácido peroxiacético, y cloruro de cetilpiridinio en condiciones que simulan el procesamiento de aves (Chylkova *et al.*, 2017). Los resultados indicaron que las biopelículas formadas por cada aislado de *Salmonella* Heidelberg son más resistentes a estos desinfectantes que sus contrapartes en estado planctónicas. Específicamente, se observó que las concentraciones necesarias para lograr la erradicación bacteriana en las biopelículas fueron aproximadamente cuatro veces mayores que las requeridas para las células planctónicas. Para el ácido peroxiacético, las concentraciones bactericidas aumentaron de manera significativa, oscilando entre 8300-14700 ppm para las biopelículas y 3700-5500 ppm para las células planctónicas. Similarmente, en el caso del cloruro de cetilpiridinio, la concentración requerida para eliminar las biopelículas aumentó alrededor de cuatro veces en comparación con las células planctónicas, con valores de 1000-2600 ppm y 300-600 ppm, respectivamente (Chylkova *et al.*, 2017). Este fenómeno resalta la significativa resistencia de las biopelículas de *Salmonella* a los desinfectantes y sus implicaciones en la higiene y seguridad alimentaria (Chylkova *et al.*, 2017).

El ciclo de vida en biopelículas de *Salmonella* culmina cuando las células se desprenden y dispersan desde la biopelícula para regresar al modo planctónico (Rumbaugh y Sauer, 2020). La dispersión de bacterias desde las biopelículas es un proceso relevante, ya que las células liberadas pueden colonizar nuevos lugares y mantenerse en el entorno, lo que dificulta la eficacia de los procedimientos de desinfección. No obstante, se dispone de información limitada sobre el inicio de la dispersión de las biopelículas y los factores ambientales que la impulsan. Explorar más a fondo estos aspectos es esencial para comprender y controlar la biopelícula de *Salmonella* de manera más efectiva.

Es evidente que aún es necesario llevar a cabo investigaciones más exhaustivas en relación con la adhesión y formación de biopelículas de *Salmonella*, centrándose particularmente en la matriz de SPE. Aunque se ha avanzado en la comprensión de estos procesos, existen lagunas significativas en el conocimiento. Se requieren estudios más detallados para analizar cómo la presencia de componentes específicos en las SPE de *Salmonella* influye en su adhesión a superficies abióticas y biológicas. Estos estudios permitirían identificar los factores críticos que facilitan o inhiben la adhesión y formación de biopelículas de *Salmonella*, lo que, a su vez, podría conducir al desarrollo de estrategias más efectivas de prevención y control. Además, es esencial investigar cómo las

condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad y la presencia de nutrientes, impactan en la adhesión y formación de biopelículas, así como en la composición y estructura de las SPE. Estos estudios podrían proporcionar información valiosa para comprender los procesos de adaptación de *Salmonella* en entornos de la industria alimentaria y permitirían el diseño de medidas más específicas para prevenir la contaminación y el riesgo de infecciones transmitidas por alimentos.

Como se ha mencionado en esta sección, las biopelículas microbianas son estructuras altamente organizadas que dependen en gran medida de una matriz de SPE para su estabilidad y resistencia. En el caso de *Salmonella*, la celulosa es un componente esencial de esta matriz. Lo que lleva a proponer a la interferencia en la síntesis de SPE, como la celulosa, como un punto crucial en la estrategia para reducir la formación de biopelículas. Al dirigir los esfuerzos hacia la inhibición de la síntesis de celulosa, se debilita significativamente la capacidad de *Salmonella* para formar biopelículas. La celulosa no solo proporciona cohesión estructural a las biopelículas, sino que también sirve como una barrera protectora que reduce la eficacia de los desinfectantes y antibióticos. Al intervenir en este proceso de síntesis de celulosa, se debilita la integridad de la biopelícula y se vuelve más permeable a las estrategias de control, como desinfectantes y tratamientos antimicrobianos. Esta aproximación se destaca como un enfoque prometedor en la lucha contra las biopelículas de *Salmonella* y otros patógenos. Al comprender mejor los mecanismos de síntesis de SPE y desarrollar estrategias específicas para interferir con ellos, podemos abrir la puerta a métodos más efectivos para prevenir y controlar la formación de biopelículas, lo que a su vez contribuirá a la reducción de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

2.3 Inhibición de Celulosa como Punto Clave para Reducir la Formación de Biopelículas de *Salmonella* Typhimurium

Al interferir con la síntesis de SPE, se desarticulan los mecanismos clave de adhesión y protección de las biopelículas de *Salmonella*. Diversos estudios han señalado la importancia de las SPE y cómo su ausencia influye en la formación de biopelículas, lo que conduce a una reducción de estas

estructuras bacterianas. Por ejemplo, para *S. enterica* serovar Pullorum cepa S6702 la eliminación del gen *csgA* y *bcsA* implicado en la producción de curli y celulosa, respectivamente, disminuyó la formación de biopelículas en tubos de vidrio y la adhesión e invasión a células HeLa (El Hag *et al.*, 2017). Se ha establecido que la celulosa desempeña un papel fundamental en la formación de biopelículas de *Salmonella*, siendo un componente esencial para aumentar su resistencia y, por ende, facilitar la supervivencia bacteriana (Kim *et al.*, 2022). De acuerdo con Yaron y Römling, 2014 la celulosa de *S. enterica* se ha identificado como un factor de adherencia en superficies de origen vegetal. Además, Bhowmick *et al.*, 2011 informaron que la eliminación del gen *gcpA* en *Salmonella enterica* serovar Weltevreden condujo a la incapacidad de producir celulosa, lo que impidió el desarrollo de colonias rdar en placas de agar rojo Congo y la formación de biopelículas en superficies de poliestireno. Comprender el complejo mecanismo de síntesis de las SPE y sus componentes permite diseñar estrategias de inhibición de biopelículas. Por ejemplo, Yan *et al.*, 2020 utilizaron la arquitectura de doble poro del complejo CsgF-CsgG para crear un péptido que reduce físicamente el tamaño del poro, inhibiendo la secreción de curli y, por lo tanto, la polimerización de la fimbria en *E. coli*.

En este estudio, se plantea la interferencia en la síntesis de celulosa como una estrategia clave para la inhibición de las biopelículas de *S. Typhimurium*, dado que la celulosa representa uno de los componentes principales de las biopelículas de esta bacteria. Para llevar a cabo este enfoque con éxito, es imperativo contar con un profundo conocimiento del mecanismo de síntesis de la celulosa, los pasos involucrados en dicho proceso y las regulaciones que lo gobiernan.

La celulosa, un polímero largo de unidades de D-glucosa unidas β -(1 \rightarrow 4), es el segundo componente más importante en las biopelículas de la matriz de *Salmonella* (Steenackers *et al.*, 2012). El proceso de polimerización y translocación de la celulosa comienza con la unión de la glucosa-1-fosfato con UTP (uridina-5'-trifosfato), formando UDP-glucosa en el dominio glucosiltransferasa intracelular. En el segundo paso, la UDP-glucosa se reubica en el grupo 4'-OH en el extremo terminal no reducido de la cadena polimérica, expandiéndola y liberando la UDP. En el tercer paso, el polímero debe translocarse al canal transmembrana para permitir la adición de una nueva molécula de glucosa (Morgan *et al.*, 2014). La síntesis de celulosa está ligada a la producción de curli. El operón *bcs* (síntesis de celulosa bacteriana) contiene cuatro genes, *bcsA*, *bcsB*, *bcsC* y *bcsD*, que son necesarios para la producción y secreción de celulosa (Römling y Galperin, 2015).

El polímero se sintetiza mediante un complejo de tres glucosiltransferasas transmembrana

(subunidades BcsA, BcsB y BcsC) (Figura 2). BcsA es el componente catalítico que sintetiza la celulosa y crea el poro transmembrana de la membrana interna (Omadjela *et al.*, 2013). Esta subunidad BcsA contiene ocho fragmentos transmembrana y, como mínimo, un dominio extendido intracelular plegado por glucosiltransferasa A. El dominio intracelular glucosiltransferasa-A supervisa la unión del azúcar donante y el aceptor, además de activar la reacción de la glucosiltransferasa y la parte sumergida en la membrana para formar un poro junto al sitio catalítico, permitiendo translocar el polisacárido naciente (Morgan *et al.*, 2014). Es importante señalar que este esquema de celulosa sintasa está representado por un modelo de *Rhodobacter*, y hasta el momento no se ha encontrado evidencia de proteínas de síntesis de celulosa y proteínas cristalizadas en el caso de *Salmonella*. Se ha informado que el sitio catalítico está bien conservado y contiene la firma ácido aspártico, ácido aspártico, ácido aspártico, glutamina (glutamina/arginina), X (cualquier aminoácido), arginina, triptófano, tres ácidos aspárticos espaciados de forma variable. y un pentapéptido que consiste en una glutamina seguida a menudo por una glutamina o arginina, un residuo variable, y una arginina y triptófano. Sin embargo, pueden existir sitios alostéricos que permitan modificar la actividad de la enzima. La subunidad BcsB es una proteína periplásmica grande que puede dirigir el polímero a través del periplasma hasta la membrana externa a través de dos dominios de unión a carbohidratos (Römling y Galperin, 2015). Aunque BcsA es el componente catalíticamente activo, la catálisis requiere la subunidad BcsB anclada a la membrana. BcsC, por su parte, crea un barril β en la membrana externa, que está precedido por un gran dominio periplásmico que incluye repeticiones tetratricopeptídicas que probablemente participan en la construcción del complejo y comprende el poro de la membrana externa (Omadjela *et al.*, 2013).

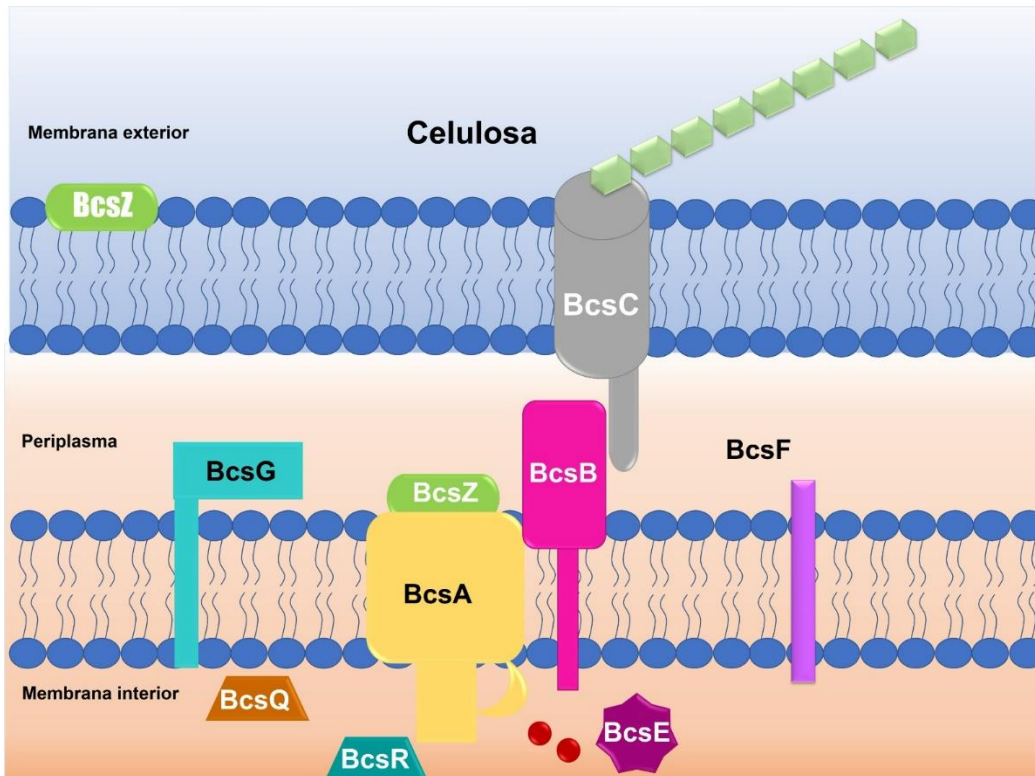


Figura 2. Esquema del complejo celulosa sintasa responsable de la síntesis de celulosa en *S. Typhimurium*. BcsA produce cadenas de glucano glicosilando la UDP-glucosa; BcsB, forma complejos con BcsA para activar la celulosa sintasa; y BcsC, crea un canal en la membrana externa a través del cual se extruyen las cadenas de glucano. BcsE, BcsF, BcsG, BcsQ y BcsR participan en la síntesis de celulosa con funciones diferentes e incompletas conocidas. Adaptado de Ahmad *et al.*, 2017.

Otras proteínas también participan en la síntesis de celulosa y están codificadas por los operones *bcsABZC* y *bcsEFG* (Steenackers *et al.*, 2012). La BcsZ es una proteína periplásmica cuya función no es muy conocida, aunque mejora la producción de celulosa. Ahmad *et al.*, 2017 demostraron que en *S. Typhimurium*, BcsZ regula negativamente la síntesis de celulosa, lo que afecta la formación de biopelículas, la interacción con el huésped y la colonización de órganos en la infección de un modelo murino. Otras proteínas como BcsE, BcsF, BcsG, BcsQ y BcsR también participan en la síntesis de celulosa, aunque su función no está del todo aclarada (Sun *et al.*, 2018). La porción transmembrana de BcsG es necesaria para que la subunidad BcsA se produzca correctamente (Sun *et al.*, 2018).

La di-guanilato ciclasa AdrA produce el c-di-GMP necesario para activar la biosíntesis de celulosa. El regulador de respuesta CsgD, que tiene un efecto favorable sobre *adrA*, regula su actividad a

nivel transcripcional (MacKenzie *et al.*, 2017). CsgD en su forma no fosforilada se une al promotor *adrA* de forma complicada y *AdrA* controla *bcsABZC* cambiando la cantidad de c-di-GMP (Ahmad *et al.*, 2017). Existe información limitada sobre la estructura de proteínas relacionadas con la síntesis de celulosa, como la *Salmonella* glucosiltransferasa. Además, es necesario estudiar en profundidad la regulación de la síntesis de celulosa y cómo en ella influyen factores externos como el tiempo, la temperatura, los nutrientes y la superficie utilizada en las industrias procesadoras de alimentos. La generación de este conocimiento podría permitir el desarrollo de estrategias que inhiban la síntesis de celulosa y como resultado tener biopelículas más susceptibles.

Los estudios sugieren que la síntesis de SPE podría ser un punto de control de biopelículas, ya que la disminución de su contenido produce biopelículas más débiles y menos estructuradas, haciéndolas menos resistentes a los desinfectantes convencionales. Sin embargo, pocas investigaciones estudian qué componentes precisamente se reducen y si esto se debe a una inhibición en la enzima sintetizadora o a la expresión génica. Además, se deben estudiar las interacciones y mecanismos del agente inhibidor. Esto abre un área grande para explorar agentes que inhiben la síntesis de SPE, junto con la necesidad de controlar las biopelículas en la industria alimentaria.

2.4 Terpenos como Posibles Inhibidores de SPE en Biopelículas de *Salmonella*

El proceso tradicional para erradicar las biopelículas bacterianas en las superficies en contacto con alimentos es la limpieza y desinfección con productos químicos convencionales como cloro, ácido peracético e hipoclorito de sodio (Liu *et al.*, 2022). Sin embargo, los métodos de saneamiento actuales en la industria alimentaria tienen algunas desventajas bien conocidas, como los residuos tóxicos de los agentes desinfectantes, la corrosión de las superficies en contacto con los alimentos o la creciente resistencia de estos químicos en los microorganismos transmitidos por los alimentos (Luna-Solorza *et al.*, 2023). Por lo tanto, es necesario buscar agentes antibiopelículas efectivos y que no causen daño.

Una alternativa prometedora para prevenir la formación de biopelículas bacterianas es la aplicación de antimicrobianos naturales (Sadekuzzaman *et al.*, 2015). Se sabe que los terpenos y terpenoides como timol, carvacrol, eugenol y mentol presentes en los aceites esenciales exhiben actividades

pronunciadas contra diversos microorganismos. Varios aceites esenciales y sus principales compuestos han ejercido actividad antibiopelícula contra *Salmonella* (Cuadro 2) (Oh *et al.*, 2017). Por ejemplo, el aceite esencial de clavo a 1.2 mg/mL disminuyó 1.8 log UFC/cm² de *S. Typhimurium* adheridas a acero inoxidable (Silva-Espinoza *et al.*, 2020). El carvacrol y el timol, componentes fenólicos de los aceites esenciales de orégano y tomillo, exhibieron acción antibacteriana y antibiopelícula contra *S. Typhimurium* (Trevisan *et al.*, 2018). Las biopelículas jóvenes y maduras producidas por *S. Enteritidis* en superficies de acero inoxidable fueron destruidas por aceites esenciales de *Origanum vulgare* (0.25%) y *Rosmarinus officinalis* (4%), lo que demuestra un impacto dependiente del tiempo y un mecanismo de acción multiobjetivo en la membrana bacteriana (Lira *et al.*, 2020). Čabarkapa *et al.*, 2019 investigaron las actividades antimicrobianas y antibiopelículas de *Origanum vulgare*, *Origanum heracleoticum*, *Thymol vulgaris* y *Thymol serpylluma* versus *S. Enteritidis*. Los resultados demostraron que los aceites esenciales y sus componentes principales (carvacrol y timol) impidieron el desarrollo de biopelículas en niveles sub-CMI y erradicaron la biopelícula preformada de 48 h con el tiempo en un enfoque dependiente de la concentración. El cinamaldehído (2 mg/mL), el principal compuesto del aceite esencial de corteza de canela (55–76%), redujo la población inicial de biopelículas en 6 log UFC/cm² de *Salmonella* aislada de un entorno de granja porcina convencional (Keelara *et al.*, 2016).

Generalmente, el mecanismo antibacteriano de los terpenos presentes en aceites esenciales está relacionado con su hidrofobicidad y su estructura. La naturaleza lipófila les permite atravesar la pared celular y dañar la membrana citoplásmica al mismo tiempo que altera varias capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y eventualmente los vuelve permeables. También pueden unirse a las proteínas para evitar que realicen sus funciones normales como transporte de moléculas y iones. Los componentes hidrofóbicos presentes en el aceite esencial podrían cambiar la permeabilidad de la membrana celular microbiana para cationes como H⁺ y K⁺, los cuales modifican el flujo de protones, modificando el pH celular y afectando la composición química de las células y su actividad. La pérdida de permeabilidad diferencial da como resultado un desequilibrio en la presión osmótica intracelular, que posteriormente altera los orgánulos intracelulares, conduce a la liberación del contenido citoplasmático, afecta la fuerza motriz de los protones y el agotamiento de la reserva de ATP, desnaturaliza varias enzimas y proteínas, causando finalmente la muerte celular (Cui *et al.*, 2019; Marchese *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Eficacia antibacteriana y modo de acción de diferentes compuestos terpénicos contra bacterias patógenas de alimentos.

Compuesto	Concentración usada	Mecanismo de acción	Referencias
Eugenol	<i>E. coli</i> (800–3000 µg/mL) <i>L. monocytogenes</i> (800 -1000 µg/mL) <i>S. enterica</i> serovar Thyphimurium (3.18–500 µg/mL)	Inhibición: ATPasa, histidina descarboxilasa y producción de enzimas extracelulares (en concentraciones subletales) Permeabilidad de la membrana Fuga de iones de ATP y potasio.	(Gill y Holley, 2006)
Eugenol	IC ₅₀ (µM) 97.31	Interacción de la desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa con los aminoácidos Lys124, Asp149, Ser150, Trp211, Met213, Ile217, Glu230 y Met275 (enlace de hidrógeno con Asn226). Inhibición competitiva	(Hui, Yan, Tian, Li, & Gao, 2017)
Carvacrol	IC ₅₀ (µM) 139.24	Interacción de la desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa con los aminoácidos Trp211, Ser212, Met213, Asp274 y Met275 (enlace de hidrógeno con Pro273). Inhibición no competitiva	(Hui et al., 2017)
Eugenol	0.625 mg mL ⁻¹ CMI	Inhibición de la síntesis de glucanos por <i>Streptococcus sobrinus</i>	(Li et al., 2012)
Citral	IC ₅₀ 8.5 µM <i>E. coli</i>	Inhibición no-competitiva	(Ortega-Ramirez et al., 2020)
Geraniol	IC ₅₀ 6.5 µM <i>E. coli</i>	Inhibición no-competitiva	(Ortega-Ramirez et al., 2020)
Cinnamaldehido	<i>S. Typhimurium</i> 2 mg/mL	Reducción de la población de biopelículas en 6 log CFU/cm ²	(Keelara et al., 2016)
Carvacrol	<i>Pectobacterium carotovorum</i> 0.66mM	Reducción de la síntesis de SPE	(Gutierrez-Pacheco et al., 2018)

No obstante, existen pocas investigaciones que hayan profundizado en los mecanismos mediante los cuales los terpenos pueden inhibir la formación de biopelículas de *Salmonella*. Algunos estudios han señalado que la interferencia en la síntesis de SPE representa uno de los mecanismos clave de acción de compuestos fenólicos y terpenos en otras bacterias. Como ejemplo, se puede mencionar el carvacrol, que a una concentración de 1.33 mM, demostró reducir la formación de biopelículas

en *Pectobacterium carotovorum*, una bacteria relacionada con la descomposición de alimentos vegetales, y se atribuyó este efecto a su capacidad para interferir con la síntesis de SPE (Gutierrez-Pacheco *et al.*, 2018). En dicho estudio, se observó que el carvacrol, cuando se aplicó a una concentración subinhibitoria de 0.66 mM, redujo significativamente el contenido de polisacáridos en las biopelículas de *P. carotovorum*, disminuyendo la cantidad de equivalentes de glucosa/cm² de 22.94 a 9.11. Paralelamente, también se registró una reducción en el contenido de proteínas, aunque en menor medida, pasando de 11.07 a 7.10 equivalentes de albúmina/cm² (Gutierrez-Pacheco *et al.*, 2018). Estos resultados sugieren que los terpenos, como el carvacrol, pueden afectar de manera significativa la síntesis de SPE en biopelículas bacterianas, lo que podría representar un enfoque prometedor para inhibir la formación de biopelículas de *Salmonella*.

De manera similar, el carvacrol en dosis subinhibitorias (64 y 128 µg/mL) redujo la formación de biopelículas de *E. cloacae* (Liu *et al.*, 2021). Este efecto se correlacionó con la disminución en la producción de exopolisacáridos de biopelículas, lo que se tradujo en una reducción del grosor de la biopelícula y de la matriz extrapolimérica mediante estudios de microscopía de barrido láser confocal y microscopía electrónica de barrido. Además, un análisis transcripcional demostró que el carvacrol ejercía una regulación negativa sobre la expresión de algunos genes, incluyendo aquellos responsables de la síntesis de fimbrias curli y de polisacáridos como ácido colónico, los cuales son esenciales para la formación de biopelículas en *E. cloacae*. Estos hallazgos subrayan el potencial del carvacrol y compuestos similares para interferir con la formación de biopelículas bacterianas al reducir la producción de exopolisacáridos y la expresión de genes clave (Liu *et al.*, 2021).

Los aceites esenciales de pimienta, clavo, laurel y su componente principal, el eugenol (0.0053 mg/mL), demostraron su capacidad para reducir la presencia de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, un patógeno de importancia global transmitido por alimentos (Kim *et al.*, 2016). Los autores destacaron que ciertos atributos estructurales del eugenol, como la cadena alquilo o alcano C-4 en el anillo de benceno, la unidad metoxi C-2 y la unidad hidroxilo C-1, desempeñan un papel fundamental en los mecanismos que subyacen a su actividad antibiopelícula. Con el fin de comprender con mayor detalle el mecanismo de acción de este terpeno, los investigadores llevaron a cabo un análisis transcripcional, que reveló que el eugenol ejercía una regulación negativa sobre la expresión de genes cruciales para la biopelícula de *E. coli*. Estos genes incluían la fimbria tipo 1, la fimbria curli y la celulosa (*csgABDFG*), que son componentes fundamentales de la biopelícula

de *E. coli*. En vista de las evidencias recopiladas, es posible notar ciertas similitudes en los diversos sistemas de estudio, que involucran diferentes terpenos, bacterias y proteínas secretoras de SPE. Por ejemplo, en el caso de las bacterias gramnegativas, existe una asociación significativa con la reducción de los exopolisacáridos en respuesta al tratamiento. Por lo tanto, es razonable hipotetizar que un enfoque similar podría ser efectivo en el caso de *Salmonella*.

Hakimi Alni *et al.*, 2020 encontraron que el aceite esencial de *Cuminum cyminum*, cuyos componentes principales incluyen terpenos como terpineol, careno y pineno, suprimía el crecimiento de *S. Typhimurium* a una concentración de 2.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Además, en concentraciones subinhibitorias, este aceite esencial reducía la formación de biopelículas y promovía la liberación de células desde las biopelículas, en contraste con las bacterias del grupo de control que se adherían fuertemente y quedaban atrapadas en una matriz densa. Los investigadores también informaron que la concentración subinhibitoria del aceite de *C. cyminum* ejercía una regulación negativa sobre genes cruciales relacionados con la formación de biopelículas, incluyendo los genes involucrados en la síntesis de celulosa (*csgD* y *adrA*) y en la detección de quórum (*sdiA* y *luxS*).

El aceite esencial de clavo, cuyo componente principal es el eugenol, tuvo un impacto significativo en la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* y en la eliminación de biopelículas en superficies vegetales (Zhang *et al.*, 2020). Los resultados revelaron que todas las concentraciones analizadas (0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL) redujeron los polisacáridos extracelulares en un rango del 35% al 88% y disminuyeron el contenido de proteínas en las biopelículas de *Listeria* en un margen que osciló entre el 34% y el 76%. Además, este aceite esencial reguló la expresión de genes clave, como *agrA*, *agrD*, *agrC* y *prfA*, y aumentó positivamente la intensidad de expresión del gen *sigB*, controlando así la formación de biopelículas.

De manera similar, Li *et al.*, 2012 determinaron el efecto del eugenol sobre la síntesis de glucanos y la formación de biopelículas de *S. sobrinus*, un patógeno relacionado con la caries dental. Los resultados indicaron que la concentración mínima inhibitoria de eugenol para las biopelículas (8 mg/mL) en un modelo de boca artificial fue de 0.625 mg/mL. Se observó una reducción del 63% en la síntesis de glucanos insolubles y del 46% en los glucanos solubles. Es importante destacar que los glucanos desempeñan un papel crucial en la formación de biopelículas en las bacterias relacionadas con la caries dental. Sin embargo, se carece de detalles específicos sobre cómo el eugenol inhibe la síntesis de glucanos. Se postula que el eugenol podría interactuar con enzimas involucradas en la síntesis de glucanos, como la glucosiltransferasa, y así inhibir su actividad.

Además, dado que muchos estudios se centran en bacterias orales, sería de gran relevancia llevar a cabo investigaciones adicionales para comprender el mecanismo de las glucosiltransferasas en patógenos alimentarios.

En este sentido, el estudio realizado por Ortega-Ramirez *et al.*, 2020 reveló que los terpenos citral y geraniol, presentes en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, inhibieron el crecimiento en forma planctónica (1.0 y 3.0 mg/mL) y de la formación de biopelículas (2.0 y 4.0 mg/mL) de *E. coli* en superficies de acero inoxidable. El efecto sobre las biopelículas se atribuyó a una reducción en la producción de glucanos. Para comprobar esto, se evaluó la actividad de los terpenos sobre la glucosiltransferasa, encontrando que ambos inhiben la actividad enzimática con valores de IC₅₀ de 8.5 y 6.5 μ M, para citral y geraniol, respectivamente. Un análisis de acoplamiento molecular reveló las interacciones más probables entre los terpenos y la enzima, situándolos en la bolsa hidrofóbica bajo el bucle de activación y en proximidad a la hélice del dedo de la enzima. Estos terpenos parecen modificar la actividad de la glucosiltransferasa, lo que sugiere un mecanismo de inhibición no competitiva de esta enzima por parte de los terpenos. La interacción de estos terpenos en la bolsa hidrofóbica bajo el bucle de activación y la hélice del dedo podría influir en la unión de UDP-glucosa y, por ende, en la síntesis de glucanos. Este estudio describe un posible mecanismo de acción mediante análisis computacionales de acoplamientos moleculares. Sin embargo, para una comprensión más completa de estos mecanismos, futuras investigaciones que utilicen técnicas como el dicroísmo circular, la resonancia magnética nuclear (RMN) y métodos de difracción de rayos X podrían proporcionar una visión más detallada y precisa.

Al realizar un análisis breve de las características fisicoquímicas de ciertos terpenos, como el eugenol, el carvacrol y el timol, se destaca que su estructura, que incluye un anillo aromático, les confiere una naturaleza hidrofóbica que podría brindarles ventajas para difundir a través de la membrana bacteriana y alcanzar el espacio intercelular (Burt, 2004). Además, estos compuestos presentan una parte polar debido a la presencia de grupos hidroxilo, lo que podría permitirles interactuar con los aminoácidos en el sitio activo y modificar la acción de la enzima glucosiltransferasa. Una vez que estos terpenos penetran en la región intercelular, podrían interactuar con la subunidad catalítica BcsA de la enzima. Esta subunidad contiene aminoácidos polares, como el ácido aspártico, la glutamina o la arginina en su dominio conservado (Morgan *et al.*, 2014). Estas interacciones podrían llevarse a cabo mediante enlaces de hidrógeno entre el grupo OH de los terpenos y los grupos oxígeno de las cadenas laterales de los aminoácidos polares en la

enzima. Sin embargo, es importante señalar que, hasta la fecha, la evidencia existente no es suficiente para determinar con certeza el tipo de inhibición que podría ocurrir ni en qué sitio exacto de la enzima se produce esta interacción. Por tanto, se requieren investigaciones adicionales que se centren en la relación entre estas moléculas y la enzima glucosiltransferasa para arrojar luz sobre los mecanismos subyacentes a esta interacción.

Dentro de los terpenos con mayor efectividad se encuentra el eugenol (Souza *et al.*, 2022). El eugenol es un fenilpropanoide extraído de tejidos como la canela y el clavo. Su tamaño molecular, naturaleza hidrofóbica y presencia de grupos hidroxilos le permite penetrar la membrana lipídica bacteriana y alterar su funcionalidad, lo que posteriormente resulta en la fuga de constituyentes intracelulares y causar la muerte (Su *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022). También se ha demostrado que el eugenol presenta actividad contra algunas enzimas bacterianas que incluyen algunas proteasas, histidina carboxilasa, amilasa, ATPasa y glucosiltransferasas importantes en el metabolismo y formación de biopelículas de las bacterias (Hyldgaard *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Por lo que en este trabajo se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Cómo el eugenol interactúa con la glucosiltransferasa para inhibir la síntesis de celulosa y por consecuencia la formación de biopelículas de *Salmonella Typhimurium*?

3. HIPÓTESIS

El eugenol inhibe la actividad de glucosiltransferasa, disminuyendo la síntesis de celulosa y la formación de biopelículas de *Salmonella* Typhimurium en superficies de acero inoxidable.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del eugenol sobre la formación de biopelículas de *Salmonella* Typhimurium, producción de celulosa y la actividad de glucosiltransferasa en superficies de acero inoxidable.

4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar el efecto del eugenol sobre la formación de biopelículas de *Salmonella* Typhimurium en superficies de acero inoxidable.
2. Cuantificar la producción de celulosa en biopelículas de *Salmonella* Typhimurium expuestas a eugenol en superficies de acero inoxidable.
3. Medir la actividad de la glucosiltransferasa en un extracto de *Salmonella* Typhimurium expuesta a eugenol.
4. Determinar las interacciones moleculares *in silico* del eugenol sobre la actividad de glucosiltransferasa de *Salmonella* Typhimurium.
5. Evaluar cambios en la expresión de *bcsA* de *Salmonella* Typhimurium expuestas a eugenol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Analizar el Efecto del Eugenol sobre la Formación de Biopelículas de *Salmonella* Typhimurium en Superficies de Acero Inoxidable

5.1.1. Efecto del Eugenol sobre el Crecimiento de *S. Typhimurium* en Estado Planctónico

La actividad antibacteriana del eugenol (Sigma-Aldrich) contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) en estado planctónico se determinó mediante el método de microdilución en placa (Bernal-Mercado *et al.*, 2018). El inóculo bacteriano se preparó a partir de cultivos en fase exponencial en caldo Mueller Hinton (MH) (Difco) ajustado a una concentración de 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Se disolvieron diferentes concentraciones de eugenol (0.1 – 0.7 mg/mL) en caldo MH con 5% de DMSO para obtener una solución homogénea. Sucesivamente, se agregaron 5 μ L de inóculo bacteriano ajustado y 295 μ L de las diluciones de eugenol a una microplaca estéril de 96 pocillos (Costar 96) hasta llegar a un inóculo final de 1×10^6 UFC/mL. La microplaca se incubó a 37 °C durante 24 h. La concentración inhibitoria mínima (CMI) de eugenol se determinó como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano visible. Se determinó la concentración bactericida mínima (CMB), sembrando la CMI y tres concentraciones superiores en agar MH e incubando a 37 °C durante 24 h. La CMI y la CMB se expresaron como mg/mL. Todo el experimento se repitió por triplicado.

5.1.2. Efecto del Eugenol sobre la Permeabilidad de la Membrana Bacteriana

La técnica de prueba del cristal violeta se utilizó para evaluar la permeabilidad de la membrana celular cuando las bacterias se trataron con eugenol (Khan *et al.*, 2017). Las bacterias se cultivaron en caldo MH durante 19 h a 37 °C, se recolectaron a $9300 \times g$ durante 5 min, luego se lavaron y

resuspendieron en solución salina para lograr una densidad óptica (DO) de 0.4 a 590 nm. Las suspensiones bacterianas se trataron con eugenol (0.1 – 0.7 mg/mL) durante 8 horas a 37°C, y la suspensión sin exposición a eugenol se empleó como control. Luego, las muestras se centrifugaron a $9300 \times g$ durante 5 min, el precipitado se resuspendió en solución de cristal violeta (10 µg/mL), diluida en solución salina y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a $13,400 \times g$ durante 15 min y la DO del sobrenadante se midió a 590 nm con un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMGLabtech). La DO de la solución de cristal violeta utilizada en el ensayo se utilizó como referencia (100%). El porcentaje de cristal violeta absorbido (CV) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$CV \text{ absorbido (\%)} = \frac{\text{Valor de DO de la muestra}}{\text{Valor de DO de la solución}} \times 100$$

Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de absorción de cristal violeta. El experimento se realizó por duplicado y cada determinación se realizó por triplicado.

5.1.3. Efecto del Eugenol en la Erradicación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

Para este ensayo, primero se formaron biopelículas de *S. Typhimurium* en cupones de acero inoxidable ($1.0 \times 1.0 \times 0.1$ cm) contenidos en tubos con 5 mL de caldo MH (Bernal-Mercado *et al.*, 2018). Los tubos se inocularon a partir de un cultivo en fase exponencial (19 h, 37 °C en caldo MH) para obtener una concentración final de bacterias de 1×10^6 UFC/mL y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, los cupones se lavaron con agua estéril y se expusieron durante 1 h a diferentes concentraciones de eugenol (0 – 1.8 mg/mL) diluido en solución salina con 5% de DMSO. Posteriormente, los cupones se lavaron, se colocaron en tubos con 5 mL de solución salina y se sometieron a un baño de ultrasonido (40 kHz, sonicador Branson 2510, CT) durante 5 min. Se realizaron diluciones seriadas a partir de estas suspensiones para determinar el número de bacterias viables en las biopelículas por unidad de área (Log UFC/cm²), se sembraron en placas de agar MH

y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB) se determinó como la concentración de eugenol que inactivó las células incrustadas en una biopelícula preformada por 24 h en cupones de acero inoxidable. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como Log UFC/cm².

5.1.4. Efecto del Eugenol en la Formación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

La concentración inhibitoria mínima de eugenol sobre la formación de biopelículas (CMIB) se determinó como la concentración que inhibe la adhesión bacteriana a los cupones de acero inoxidable (1.0 × 1.0 × 0.1 cm) (Silva-Espinoza *et al.*, 2020). Para este ensayo, se colocaron cupones estériles en tubos de ensayo con 5 mL de MH y diferentes concentraciones de eugenol (0 – 1.0 mg/mL). Los tubos se inocularon con cultivo de *S. Typhimurium* en fase exponencial (19 h, 37 °C) para lograr una concentración final de 1 × 10⁶ UFC/mL. Se determinó como control las bacterias sin exposición al eugenol. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, los cupones fueron retirados y lavados con solución salina estéril para eliminar las células débilmente adheridas. Los cupones se sumergieron en 5 mL de solución salina estéril y se sometieron a un baño ultrasónico (40 kHz, sonicador Branson 2510, CT) durante 5 min para separar las células firmemente adheridas. Las suspensiones bacterianas se diluyeron en serie, se sembraron en agar MH y se incubaron a 37 °C durante 24 h para determinar el número de células viables adheridas a cupones de acero inoxidable por unidad de área (Log CFU/cm²). Además, la CMIB y la mitad de esta concentración se usaron para cuantificar las células viables en biopelículas durante 24 horas de formación de biopelículas con muestreos a los 15 min, 3, 6, 12, 18 y 24 h. Así mismo, se realizaron diluciones de la suspensión planctónica y se contó el número de células viables en los momentos de muestreo para establecer que el efecto del eugenol era sobre la adhesión y no sobre la muerte bacteriana. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

5.1.5. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Se evaluó el efecto de las concentraciones de eugenol sobre la absorción de cristal violeta y el recuento de células bacterianas adheridas y en suspensión. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estimar diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), y se utilizó la prueba de Tukey Kramer para la comparación de medias ($p \leq 0.05$) utilizando el Number Cruncher Statistical Systems NCSS (2021).

5.2. Cuantificar la Producción de Celulosa en Biopelículas de *Salmonella* Typhimurium Expuestas a Eugenol en Superficies de Acero Inoxidable

5.2.1. Efecto del Eugenol sobre el Contenido de Celulosa en Biopelículas de *S. Typhimurium*

Se evaluó el contenido de sustancias poliméricas extracelulares en biopelículas de *S. Typhimurium* expuestas a diferentes concentraciones de eugenol (0.3 y 0.7 mg/mL) (Gutierrez-Pacheco *et al.*, 2018). La formación de biopelículas se realizó como se describe en la sección anterior. Los cupones se retiraron a los 15 min, 3, 6 y 12 h de incubación, se lavaron con agua estéril y se sumergieron en tubos que contenían 5 mL de solución salina. Posteriormente se adicionó a cada tubo 30 μ L de formaldehído (37%) a 4 °C por 1 h. Luego, se agregaron 2 mL de NaOH 1 M a 4 °C, y los tubos se sonicaron a 40 kHz por 10 min y se dejaron reposar por 3 h. Posteriormente, las soluciones se filtraron utilizando una membrana de 0.2 μ m para eliminar las células bacterianas. La diálisis se realizó durante 24 horas a 4 °C utilizando una membrana de celulosa (3500 Dalton) para separar los metabolitos de bajo peso molecular de las muestras de interés. Posteriormente, las muestras se liofilizaron y se almacenaron hasta su análisis. Los polisacáridos se cuantificaron por el método del ácido fenolsulfúrico con algunas modificaciones. Para ello, se mezclaron 100 μ L de cada muestra con 150 μ L de ácido sulfúrico y 30 μ L de fenol (5%), se colocaron en baño de agua caliente

a 90 °C por 5 min, y luego se enfrió a temperatura ambiente por 5 min. La absorbancia se leyó a 490 nm y los resultados se expresaron como μg de equivalentes de glucosa por área ($\mu\text{g GE}/\text{cm}^2$).

5.2.2. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Se evaluó el efecto de las concentraciones de eugenol sobre el contenido de polisacáridos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estimar diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), y se utilizó la prueba de Tukey Kramer para la comparación de medias ($p \leq 0.05$) utilizando el Number Cruncher Statistical Systems NCSS (2021).

5.3. Medir la Actividad de la Glucosiltransferasa en un Extracto de *Salmonella* Typhimurium Expuesta a Eugenol

Las enzimas glucosiltransferasas extracelulares y asociadas a células de *S. Typhimurium* se obtuvieron del cultivo en caldo LB a 37°C durante 24 h (Pourmoslemi *et al.*, 2023). El caldo de cultivo se centrifugó a 9300 x g durante 15 minutos para separar el sobrenadante y las células bacterianas. Posteriormente, se precipitó la proteína del sobrenadante añadiendo sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación del 50%, se agitó durante 1 hora y se recolectaron las glucosiltransferasas extracelulares mediante centrifugación a 9000 rpm durante 15 min. La enzima precipitada se disolvió en 10 mL de tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH=6.5).

La glucosiltransferasa asociadas con la membrana celular se obtuvo a partir de células de *S. Typhimurium* separadas del caldo de cultivo. Las células bacterianas se lavaron tres veces con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH = 6.5) mediante centrifugación, para eliminar el medio de cultivo restante. El sedimento centrifugado se dispersó en 30 mL de solución de urea 8 M como fluido de extracción y se mantuvo a 25 °C durante 1 h con agitación ocasional. Las células bacterianas se separaron mediante centrifugación a 9300 x g durante 15 minutos. La extracción se

repitió tres veces y se mezclaron los sobrenadantes. La glucosiltransferasa asociada a células se obtuvo mediante precipitación con sulfato de amonio con una saturación del 50% de la mezcla sobrenadante y posterior diálisis del precipitado frente a tampón fosfato de potasio 10 mM, pH = 6.5.

Para evaluar el efecto del eugenol sobre la actividad enzimática del extracto bacteriano, se realizaron dos diluciones de eugenol (0.3 y 0.7 mg/mL) en una solución conteniendo buffer de fosfato de sodio, dextrano y glucosa. La muestra control fue la reacción enzimática sin eugenol. Se combinaron 2 mL de cada solución se mezclaron con 2 mL del extracto enzimático y se incubaron a 37 °C por 18 h. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de Fehling para determinar azúcares reductores. Se agregó reactivo de Fehling a cada una de las muestras y se incubó durante 5 minutos a 100 °C en un baño de agua. La cuantificación de la glucosa residual para evaluar el efecto inhibitor del eugenol sobre la actividad glucosiltransferasa se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico. Se midió la absorbancia a 450 nm de cada muestra para cuantificar la concentración de azúcares reductores usando una curva de calibración. Se tomaron lecturas de absorbancia en múltiples intervalos y las concentraciones de glucosa correspondientes se calcularon basándose en una curva estándar. Estos valores luego se utilizaron para determinar la cantidad de glucosa reducida durante la reacción. El porcentaje de actividad restante para cada tratamiento se calculó en relación con la actividad enzimática de control sin eugenol. Estos datos se procesaron adicionalmente para determinar el porcentaje de inhibición de la actividad del eugenol, lo que permitió evaluar la eficacia del eugenol. Los datos se expresaron como la media \pm desviaciones estándar.

5.4. Determinar las Interacciones Moleculares *In Silico* del Eugenol sobre la Actividad de Glucosiltransferasa de *Salmonella Typhimurium*.

La estructura proteica inferida a partir de la homología de la enzima BcsA (UniProtKB - Q93IN2) se utilizó como modelo para identificar posibles interacciones con UDP-glucosa (Pubchem CID: 439156) y eugenol (PubChem CID: 3314). El análisis de acoplamiento se realizó utilizando la aplicación AutoDoc Vina en el software UCSF Chimera versión 1.16 (Resource for Biocomputing,

Visualization and Informatics) para obtener la energía de afinidad (kcal/mol) entre la enzima y los ligandos con la desviación cuadrática media de la raíz. El receptor inicial se simplificó eliminando todos los ligandos en la estructura usando Chimera. Las estructuras de receptor y ligando 3D (eugenol y UDP-glucosa) se optimizaron minimizando la energía estructural con Chimera. Los enlaces de hidrógeno, las longitudes de los enlaces y las interacciones hidrofóbicas entre BcsA y todos los ligandos se determinaron usando Chimera, y los programas Discovery Studio también se usaron para la inspección visual y las representaciones gráficas de los resultados del acoplamiento (Ortega-Ramirez *et al.*, 2020).

Las simulaciones de dinámica molecular para el eugenol y el UDP-glucosa contra BcsA se llevaron a cabo utilizando Groningen Machine for Chemical Simulation (GROMACS) versión 2023.4. El objetivo fue examinar la estabilidad y el comportamiento temporal de la interacción. Los parámetros topológicos para el ligando-proteína se generaron con el servidor CHARMM-GUI y los parámetros del campo de fuerza CHARMM. El sistema proteína-ligando se integró en una caja cúbica de 1 nm con el modelo de agua TIP3P. Se neutralizó el sistema agregando iones Na⁺ y Cl⁻ (0.15 M). Luego, se realizó una minimización inicial en dos fases a 30°C, seguida de una simulación de 100 ns bajo 1 atm de presión y condiciones de 30°C. Se examinó el comportamiento estructural de BcsA en ausencia y presencia de eugenol mediante el análisis de RMSD y RMSF utilizando el paquete Gromacs. Los gráficos se generaron con el software qtgrace (<https://sourceforge.net/projects/qtgrace/>) (Hadidi, 2022).

5.5. Evaluar Cambios en la Expresión de *BcsA* de *Salmonella* Typhimurium Expuestas a Eugenol

Primeramente, se diseñaron primers específicos para el gen *bcsA* mediante herramientas bioinformáticas. Como gen de referencia, se seleccionó el gen *fimY* F, cuya secuencia es AGGCTGATAACAAGGCTTCG y *fim Y* R TGTGGATTGAAA. Las secuencias de los primers diseñados fueron: *bcsA* F TTACGACTGGTGCAGGAC, *bcsA* R ATTCATCCAGCGGCTTACG. Para llevar a cabo el experimento, se expusieron cultivos de bacterias (19h, 37°C) a tratamientos con diferentes concentraciones de eugenol (0 mg/mL, 0.35 mg/mL y 0.7 mg/mL). La extracción de ARN se realizó utilizando el kit SV Total RNA Isolation

System de Promega, con una modificación en el buffer de lisis compuesto por Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 0.75 M y lisozima 2 mg/mL. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando GelRed como agente revelador. La cuantificación del ARN se llevó a cabo utilizando un NanoDrop 2000 de ThermoScientific.

Posteriormente, se procedió a la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN obtenido utilizando el kit SUPERSCRIPT III Reverse Transcriptase de Invitrogen. El ADNc obtenido se empleó como plantilla para llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real. Cada reacción se replicó por triplicado en placas de 48 pocillos en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System de Applied Biosystem Inc. En cada reacción se incorporaron 15 ng de ADNc, 1 µL de cada primer (a una concentración de 5 µM), 10 µL de iTaq Universal SYBR Green Supermix y la cantidad de agua necesaria para completar 20 µL de volumen total. La amplificación se desarrolló bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Luego de finalizar las reacciones de amplificación, se evaluaron las curvas de disociación con el fin de confirmar la presencia de un solo producto amplificado en cada reacción. En todas las corridas se incluyó un control negativo. La eficiencia de amplificación de cada gen utilizado en el ensayo de PCR en tiempo real se calculó mediante la fórmula $E = (10^{-1 \text{ slope}^{-1}}) \times 100$.

La validación del experimento, utilizando el gen *fimY* como control endógeno, se llevó a cabo a través de una serie de reacciones de amplificación con concentraciones de ADNc que oscilaron entre 0.16 y 100 ng para cada gen. La cuantificación relativa se realizó utilizando el método comparativo de los CT con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores promedio de las expresiones relativas se emplearon en un análisis de varianza para comparar el impacto del tratamiento y el tiempo en relación con el gen *bcsA*. Este análisis se efectuó utilizando el programa NCSS 2023, y la comparación de las medias se ejecutó mediante la Prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significación de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Analizar el Efecto del Eugenol sobre la Formación de Biopelículas de *Salmonella* Typhimurium en Superficies de Acero Inoxidable

6.1.1. Eugenol Inhibe el Crecimiento Planctónico de *S. Typhimurium*

Se llevó a cabo una evaluación de la actividad antibacteriana del eugenol frente a *S. Typhimurium* en su estado planctónico. La CMI de eugenol se determinó en 0.6 mg/mL, mientras que la CMB fue de 0.8 mg/mL. Es importante destacar que estudios previos han arrojado una variedad de valores de CMI para el eugenol. Por ejemplo, Miladi *et al.*, 2017, encontraron una CMI de 0.5 mg/mL frente *S. Typhimurium*. Por otro lado, Purkait *et al.*, 2020 reportaron valores de CMI de eugenol contra *S. Typhimurium* de 0.075 mg/mL, y también contra *L. monocytogenes* de 0.066 mg/mL. Sus hallazgos resaltaron al eugenol como el compuesto más efectivo para inhibir el crecimiento de patógenos bacterianos en comparación con el cinamaldehído y el β -cariofileno. Adicionalmente, Da Silva *et al.*, 2018, informaron una CMI de 1 mg/mL de eugenol contra diversas bacterias, como *P. aeruginosa*, *Streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus cereus*. Por último, Ashrafudoulla *et al.*, 2020, comunicaron que los valores de CMI del eugenol fueron de 1 mg/mL y 1.5 mg/mL frente a aislamientos clínicos y ambientales de *Vibrio parahaemolyticus*, respectivamente. Es importante señalar que estas variaciones en los valores de CMI del eugenol entre los estudios pueden atribuirse a las diferencias en los modelos bacterianos utilizados, así como a las distintas condiciones experimentales empleadas en cada investigación.

El eugenol se ha sugerido como una alternativa prometedora para las infecciones por *Salmonella*. Vimal *et al.*, 2018 describieron que el eugenol podría considerarse un candidato farmacológico altamente efectivo. Sus investigaciones, basadas en análisis de absorción, distribución, metabolismo y excreción, junto con estudios de acoplamiento molecular, indicaron que el eugenol podría inhibir la proteína L-asparaginasa de *Salmonella*, un factor clave para su supervivencia. Por su parte, Song *et al.*, 2020 encontraron que el eugenol tiene un efecto antibacteriano selectivo contra

Salmonella, ya que este terpeno combinado con probióticos puede actuar sinérgicamente para prevenir la infección por *Salmonella* en modelos murinos. Además, en otro estudio se encontró que el eugenol mejora la susceptibilidad de *S. Typhimurium* al antibiótico ácido nalidíxico (Miladi *et al.*, 2017). Estos resultados enfatizan la oportunidad de utilizar eugenol como un potente agente antibacteriano contra *Salmonella*.

La estructura del eugenol se relaciona directamente con su efecto antibacteriano debido a las características químicas específicas que posee. El eugenol es un compuesto fenólico con una estructura química que incluye un anillo bencénico y un grupo alilo. Los grupos fenólicos pueden interactuar con las membranas celulares de las bacterias formando enlaces de hidrógeno con componentes de la membrana celular bacteriana, lo que puede conducir al debilitamiento de la membrana y al daño en su integridad (Devi *et al.*, 2010). La cadena hidrocarbonada alifática del eugenol, que es lipofílica, puede disolverse en lípidos y grasas permitiendo penetrar eficazmente en las membranas celulares bacterianas, lo que aumenta su capacidad para dañarlas y alterar su permeabilidad. Por otro lado, el grupo alilo, puede participar en reacciones químicas con componentes celulares bacterianos, como proteínas y lípidos. Estas reacciones pueden llevar a la inhibición de enzimas, la generación de especies reactivas de oxígeno y la alteración de la función celular.

El eugenol requiere mayor concentración para causar la muerte de *S. Typhimurium* (0.8 mg/mL) que para inhibir el crecimiento (0.6 mg/mL) de la bacteria. La disparidad en las concentraciones requeridas de eugenol para inhibir el crecimiento y provocar la muerte de *S. Typhimurium* destaca la complejidad de los mecanismos de acción del terpeno. La capacidad del eugenol para interferir con la reproducción bacteriana, inhibiendo el crecimiento a concentraciones más bajas, sugiere un enfoque selectivo que permite la supervivencia de las bacterias presentes sin aumentar su población. Por otro lado, para lograr la muerte bacteriana, se precisa una concentración más alta, indicando la necesidad de afectar múltiples aspectos, como la integridad de la membrana celular, la inhibición de rutas metabólicas y la disrupción del sistema de transporte. Estos hallazgos resaltan la complejidad de los efectos del eugenol sobre *S. Typhimurium* y la importancia de comprender los diferentes puntos de acción para desarrollar estrategias efectivas contra esta bacteria patógena. Este estudio demuestra cómo el eugenol tiene una alta actividad antibacteriana en las células en estado planctónico. Sin embargo, sería interesante explorar los posibles mecanismos de esta molécula frente a la formación de biopelículas y factores de virulencia de *S. Typhimurium*.

6.1.2. Eugenol Afecta la Permeabilidad de la Membrana Bacteriana

La evaluación de la integridad de la membrana bacteriana, influenciada por el daño causado por el eugenol, se puede realizar mediante la capacidad de internalización del cristal violeta, como se muestra en la Figura 3. En ausencia de eugenol, la internalización de cristal violeta por *S. Typhimurium* fue del 27%. Sin embargo, esta cifra aumentó de manera dependiente de la dosis de eugenol, alcanzando el 46 - 57% ($p \leq 0.05$). Investigaciones previas han destacado la efectividad de los terpenos para incrementar la permeabilidad de la membrana utilizando el mismo ensayo. Por ejemplo, el carvacrol a concentraciones mínimas inhibitorias (200 y 450 $\mu\text{g/mL}$) logró tasas del 26% y 42%, respectivamente, de internalización de cristal violeta por *E. coli*, en comparación con el 4.8% observado en bacterias no tratadas. Estos resultados indican un aumento significativo en el daño de la membrana y, por ende, un cambio en la permeabilidad de la membrana (Khan *et al.*, 2017). De manera similar, el eugenol al 1% (v/v) y al 5% (v/v) provocó un aumento en la permeabilidad de la membrana, evidenciado por la internalización del 90% de cristal violeta por parte de *Proteus mirabilis* (Devi *et al.*, 2013).

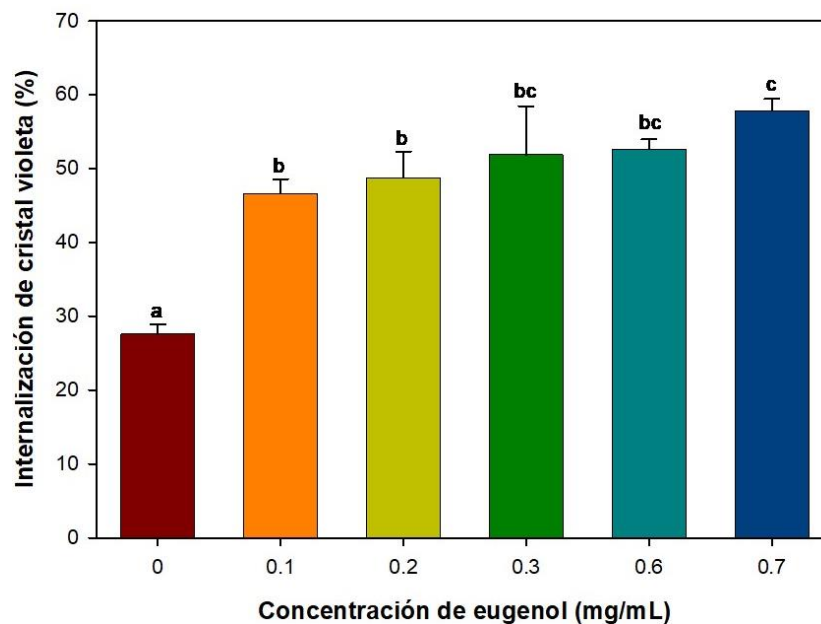


Figura 3. Internalización de cristal violeta en *S. Typhimurium* tratada con eugenol. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Los valores son medias \pm desviación estándar, $n = 3$.

El eugenol es capaz de inhibir el crecimiento y causar la muerte de *S. Typhimurium* en estado planctónica. Uno de los mecanismos asociados a estos efectos es su interacción con la membrana citoplasmática de la bacteria, provocando un debilitamiento en la integridad y aumento de la permeabilidad que libera componentes intracelulares, inhibir su crecimiento y, en definitiva, a la muerte celular (Jeyakumar y Lawrence, 2021). Se ha asociado la estructura del eugenol con dicho efecto. El eugenol es una molécula lipofílica lo cual facilita el contacto con los fosfolípidos de las membranas y permite insertarse en la bicapa de la membrana, debilitando su estructura y su capacidad para funcionar como una barrera impermeable. Además, la inserción del eugenol en la membrana puede perturbar la organización de los lípidos y las proteínas que se encuentren ahí (Devi *et al.*, 2010). Esto puede provocar la formación de canales en la membrana, aumentando la permeabilidad y la fuga de componentes celulares esenciales. La permeabilización de la membrana celular por el eugenol puede dar lugar a la pérdida de iones y otros solutos esenciales. Esto puede interrumpir la homeostasis iónica y llevar a cambios en la presión osmótica, lo que puede ser letal para la célula bacteriana. Otra de los mecanismos propuestos para causar la permeabilidad de la membrana por parte del eugenol, es la generación de estrés oxidativo. El eugenol puede generar especies reactivas de oxígeno dentro de la célula bacteriana (Liu *et al.*, 2023a). Estas especies reactivas de oxígeno pueden causar daño oxidativo en los lípidos de la membrana y las proteínas, lo que contribuye a la pérdida de la integridad de la membrana y a un aumento en la permeabilidad.

6.1.3. Efecto del Eugenol en la Erradicación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

La Figura 4 muestra la eficacia del eugenol para erradicar biopelículas maduras (con 24 horas de antigüedad) de *S. Typhimurium* en acero inoxidable. Tras exponer las biopelículas a diversas concentraciones de eugenol durante 1 hora, se registró una reducción significativa en la cantidad de células viables incrustadas en las biopelículas preformadas ($p \leq 0.05$). Concentraciones inferiores a 1.5 mg/mL inactivaron menos del 40 % de las células dentro de las biopelículas; no obstante, la dosis de 1.8 mg/mL eliminó por completo la densidad celular en la superficie del cupón. En una investigación previa, se observó que el eugenol era capaz de eliminar el 50% de las biopelículas de diversas cepas de *S. Typhimurium* a concentraciones comprendidas entre 15 y 454

$\mu\text{g/mL}$ (Miladi *et al.*, 2017). De manera similar, se encontró que 100 μL de eugenol y cinamaldehído erradicaron el 51 % y el 55 %, respectivamente, de las biopelículas maduras de *S. Typhimurium* (Purkait *et al.*, 2020). Todos estos estudios resaltan la resistencia de las biopelículas a los agentes antibacterianos, ya que se requieren concentraciones más elevadas de compuestos antibacterianos para eliminar las biopelículas ya formadas. De igual manera, en este estudio se demuestra que se requieren 2.5 veces más eugenol para erradicar una biopelícula (1.8 mg/mL) ya formada en comparación con la cantidad necesaria para inhibir su crecimiento en estado planctónico (0.6 mg/mL). No obstante, es relevante señalar que muchos estudios sobre la erradicación de biopelículas no proporcionan información detallada sobre los mecanismos mediante los cuales los compuestos terpénicos llevan a cabo su acción.

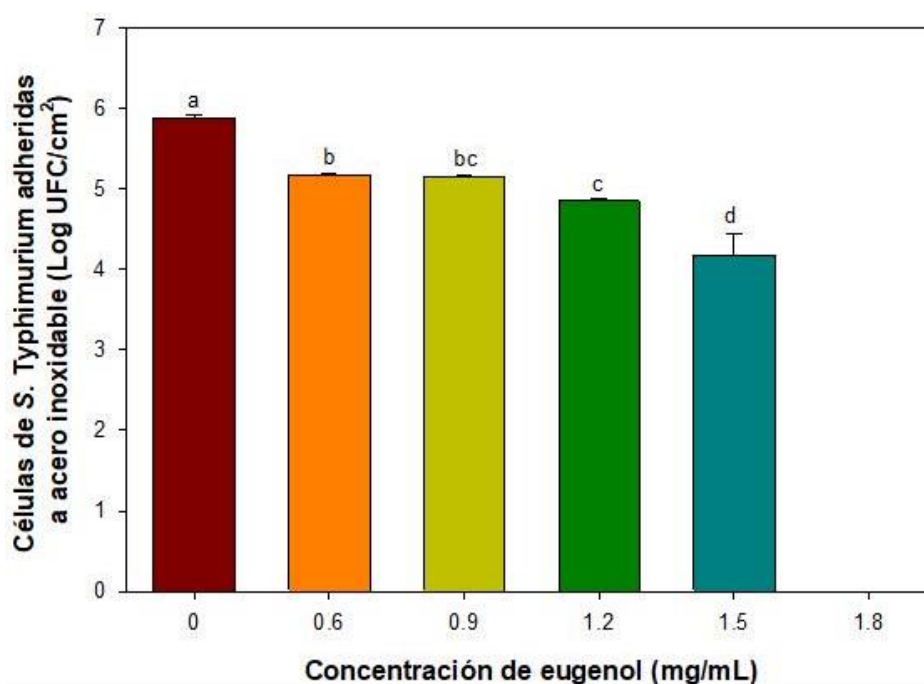


Figura 4. Viabilidad de *S. Typhimurium* en biopelículas preformadas expuestas durante 1 h a eugenol. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Los valores son medias \pm desviación estándar, $n = 3$.

La resistencia significativamente mayor observada en biopelículas ya establecidas se atribuye principalmente a la matriz de SPE que afecta la dispersión de agentes antimicrobianos. Estos compuestos ejercen su efecto antibacteriano al alterar el material genético, interferir con la

membrana celular, y coagular proteínas, entre otros mecanismos, cuando se enfrentan a células en estado planctónico. Sin embargo, en biopelículas, las concentraciones necesarias son más elevadas debido a la limitada difusión de los compuestos causada por la matriz de SPE atribuida a posibles interacciones con los componentes de la biopelícula. También puede aumentar la concentración necesaria debido a que generalmente las bacterias en una biopelícula pueden estar en diferentes estados metabólicos. Algunas bacterias pueden estar en división activa, mientras que otras pueden estar en estados de crecimiento más lento o incluso en reposo. Esto significa que se necesita una concentración más alta para abordar todas las bacterias en diferentes estados y fases del ciclo de vida.

Aunque algunos agentes pueden inducir la muerte bacteriana en biopelículas, eliminar por completo la matriz de SPE puede ser un desafío considerable, además de facilitar la posibilidad de recontaminación. Estrategias para eliminar SPE incluyen el uso de enzimas hidrolíticas que descomponen componentes de la biopelícula como proteínas o carbohidratos. A pesar de su efectividad potencial, esto podría representar un costo adicional para los procesos de desinfección en industrias alimentarias. Este fenómeno destaca la importancia de abordar estrategias de prevención y control más efectivas para combatir las biopelículas en diversas aplicaciones, reconociendo que la eliminación completa de la matriz de SPE puede no ser la solución más viable, y que la interrupción de las etapas iniciales de formación de biopelículas, como la adhesión, la producción de SPE, y la interferencia con los mecanismos de comunicación intercelular, puede ser una estrategia más efectiva y rentable en la lucha contra las biopelículas en entornos industriales y médicos.

La molécula de eugenol, al ser intrínsecamente hidrofóbica, desempeña un papel crucial en su eficacia como agente antimicrobiano. Específicamente, esta característica, combinada con una concentración significativa, facilita la penetración del eugenol a través de la matriz SPE en una biopelícula. Esto, a su vez, posibilita el acceso del eugenol a las células bacterianas, resultando en su eventual erradicación. Este descubrimiento subraya la importancia de considerar las propiedades físicas y químicas de los agentes antimicrobianos en relación con la matriz de SPE en biopelículas, lo que podría tener implicaciones sustanciales en el diseño de estrategias eficaces para el control de biopelículas en diversas aplicaciones. Además, sugiere que la hidrofobicidad del eugenol podría ser una característica valiosa para explorar en futuras investigaciones y aplicaciones dirigidas a combatir biopelículas bacterianas.

6.1.4. Efecto del Eugenol en la Formación de Biopelículas de *S. Typhimurium*

La Figura 5 ilustra el impacto de diversas concentraciones de eugenol en la adhesión de *S. Typhimurium* a cupones de acero inoxidable después de 24 horas a 37 °C. Todas las concentraciones evaluadas demostraron una reducción significativa de las células viables en las biopelículas adheridas a la superficie de acero inoxidable en comparación con el grupo de control ($p \leq 0.05$). La concentración mínima de eugenol que logró inhibir completamente la formación de biopelículas (CMIB) se determinó como 0.7 mg/mL.

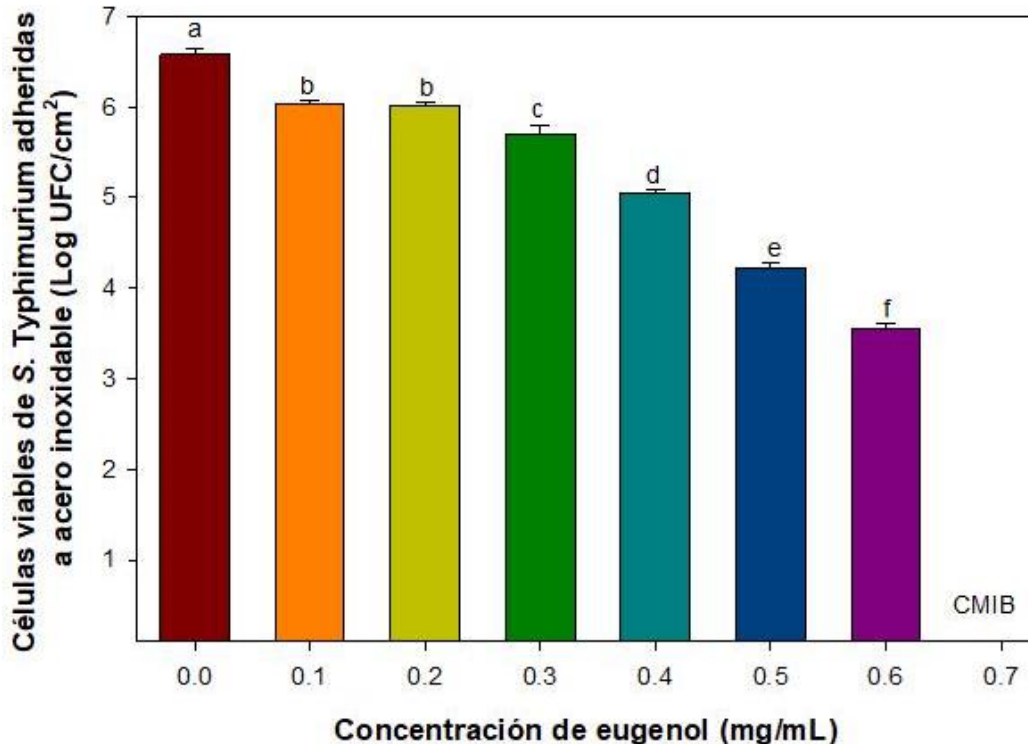


Figura 5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de eugenol sobre biopelículas de *S. Typhimurium*.

Por otra parte, se analizó el impacto del eugenol en la densidad celular de la biopelícula durante el desarrollo de *S. Typhimurium* a lo largo de 24 horas. Para este estudio, se seleccionaron las concentraciones de 0.7 mg/mL (MICB) y 0.3 mg/mL (0.5 x CMIB) de eugenol, evaluando los

cambios en las etapas tempranas (15 minutos, 3, 6 y 12 horas) y tardías (18 y 24 horas) de la formación de la biopelícula (Figura 6A). La población de bacterias en el grupo de control aumentó con el tiempo durante las 24 horas; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas significativas desde las 12 horas hasta el final del periodo de incubación. Las bacterias sin tratar se adherieron a la superficie desde los 15 min y durante todo el tiempo presentaron mayor densidad celular que las bacterias tratadas con eugenol con ambas concentraciones.

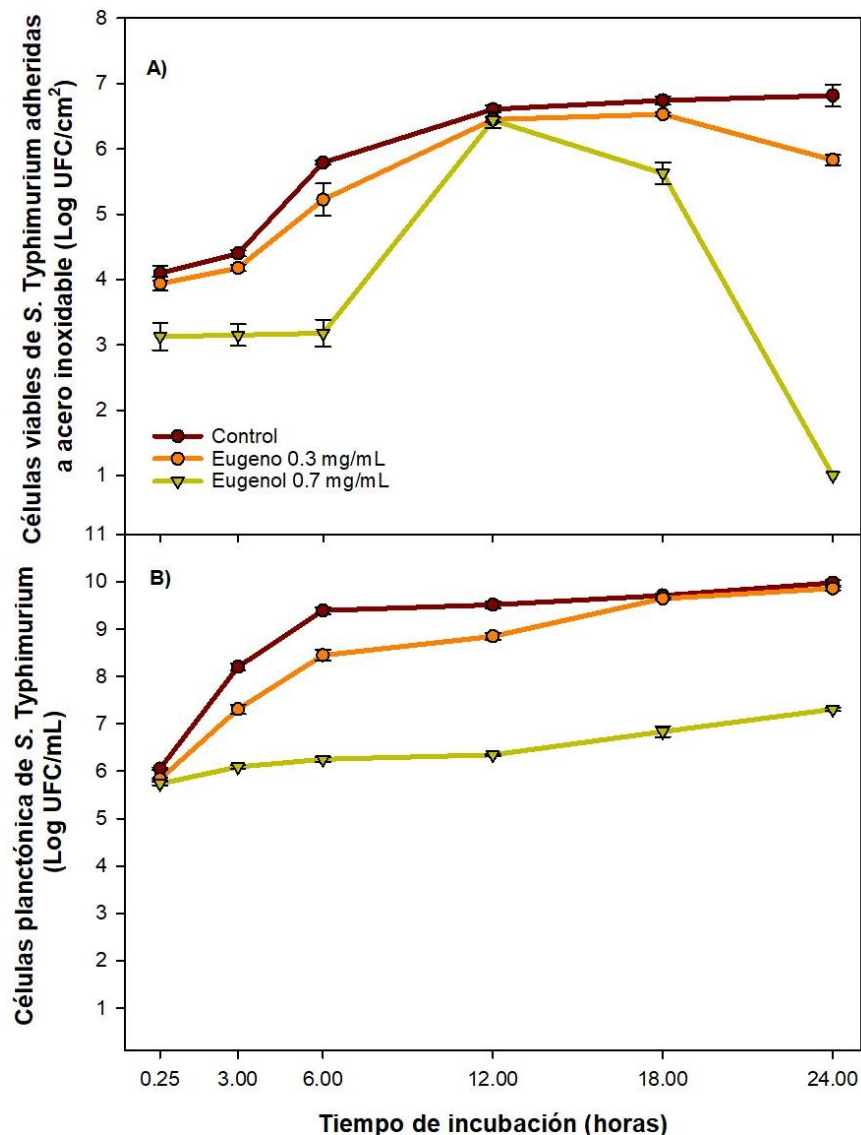


Figura 6. A) Cinética de formación de biopelículas de *S. Typhimurium* en superficies de acero inoxidable durante 24 horas de incubación expuestas a 0, 0.3 y 0.7 mg/mL de eugenol. B) Cuantificación de células planctónicas viables en el medio de cultivo de la formación de biopelículas.

Respecto a las bacterias tratadas con 0.3 mg/mL, se observó un aumento en la densidad celular con el tiempo, pero a las 24 horas se evidenció una leve disminución ($p \leq 0.05$). En el caso de las bacterias tratadas con 0.7 mg/mL, se registró una mayor densidad celular a las 12 horas, seguida de una disminución significativa a partir de las 18 horas y la presencia de células no viables a las 24 horas ($p \leq 0.05$). Estos resultados eran los esperados, dado que esta concentración corresponde a la CMIB. En comparación con las bacterias sin tratamiento, la presencia de eugenol a 0.7 mg/mL interfirió con la adhesión bacteriana a la superficie de acero inoxidable desde los primeros 15 minutos, mostrando una reducción significativa de 0.97 Log UFC/cm² ($p \leq 0.05$). A las 3, 6 y 12 horas de incubación, la población tratada fue significativamente menor que la de las bacterias control, con reducciones en un rango de 0.22 a 2.61 Log CFU/cm² ($p \leq 0.05$). La densidad celular a las 18 y 24 h fue mayor para las bacterias control que para las bacterias tratadas ($p \leq 0.05$), lográndose una reducción de 1.0 y 6.81 Log UFC/cm² cuando las bacterias se expusieron a eugenol a 0.3 y 0.7 mg/mL, respectivamente.

En términos generales, se observó que las bacterias tratadas con 0.3 mg/mL presentaron una mayor densidad celular adherida en acero inoxidable en comparación con aquellas tratadas con 0.7 mg/mL. No obstante, la concentración de 0.3 mg/mL podría considerarse como un candidato prometedor para actuar como agente antibiopelícula, y esta dosis podría ser empleada para investigar el mecanismo de acción del compuesto. La población bacteriana alcanzó su máximo a las 12 horas en las bacterias tratadas, sugiriendo la posibilidad de que la producción máxima de SPE ocurra en este periodo, con cambios sutiles más allá de este punto. Por lo tanto, se decidió evaluar el mecanismo de acción del compuesto para reducir la formación de biopelículas a las 12 horas.

La Figura 6B muestra el recuento de bacterias en estado planctónico que permanecieron en el medio de cultivo donde se encontraban las biopelículas adheridas al cupón de acero inoxidable, con la finalidad de excluir cualquier efecto sobre la adhesión celular que pudiera surgir debido a la disminución en la viabilidad. Como era de prever, la densidad de células, tanto tratadas como no tratadas, aumentó durante las 24 horas de incubación ($p \leq 0.05$). Las bacterias sin tratar mostraron mayor densidad celular en comparación con las bacterias tratadas con eugenol. A una concentración de 0.3 mg/mL, el eugenol generó una ligera disminución en la densidad celular (0.1 Log UFC/cm²) al final del periodo de incubación en comparación con el control que no fue estadísticamente significativa. Mientras que el eugenol a 0.7 mg/mL indujo una reducción de 2.67

Log UFC/cm² en células planctónicas en suspensión a las 24 horas ($p \leq 0.05$). Estos resultados indican que, la reducción en la adhesión de las bacterias al acero inoxidable no debería atribuirse a la disminución en la viabilidad celular, ya que al final del tiempo las bacterias tratadas estuvieron presentes en mayor cantidad que el inoculo inicial. Por lo que la inhibición total de la adhesión bacteriana alcanzada a 0.7 mg/mL no puede atribuirse a la ligera reducción en la viabilidad celular de las células planctónicas. Este hallazgo sugiere que los procesos de adhesión o formación están siendo afectados, en lugar de influir únicamente en su viabilidad en suspensión.

S. Typhimurium posee la capacidad de adherirse y formar biopelículas en superficies en contacto con alimentos, lo cual presenta consecuencias significativas en la industria alimentaria. Las biopelículas, al ser resistentes a la erradicación, aumentan el riesgo de contaminación alimentaria y de infecciones bacterianas. Se ha propuesto que los antimicrobianos pudieran desempeñar un papel crucial al prevenir la unión inicial y, por ende, inhibir la formación de biopelículas. Investigaciones previas revelan que el eugenol redujo la unión a superficies de poliestireno y la formación de biopelículas de *S. Typhimurium* en un 59%, mientras que el cinamaldehído y el β -cariofileno mostraron reducciones del 52% y 19%, respectivamente (Purkait *et al.*, 2020). Estos compuestos exhibieron un mayor efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas que en su erradicación, subrayando la importancia de prevenir la adhesión bacteriana. En otro estudio, el aceite esencial de clavo a 1.2 mg/mL, predominantemente compuesto por eugenol, redujo en 1.8 log CFU/cm² la cantidad de *S. Typhimurium* adherido al acero inoxidable (Silva-Espinoza *et al.*, 2020). Además, Amaral *et al.*, 2015 demostraron que el carvacrol y el timol, en concentraciones subinhibitorias, redujeron en 1 a 2 log CFU/cm² las biopelículas de *S. Typhimurium* en superficies de polipropileno. Sin embargo, en gran medida, el mecanismo por el cual estos compuestos actúan para inhibir la formación de biopelículas rara vez se clarifica.

Nuestros resultados revelan que la biopelícula desempeña un papel defensivo, ya que las dosis requeridas de eugenol para inhibir la formación de biopelículas de *S. Typhimurium* fueron superiores a la CMI para las células en estado planctónico. Además, se necesitó 2.57 veces menos concentración de eugenol para inhibir la formación de biopelículas que para erradicar. Esto debido a que la formación de biopelículas crea un entorno protegido y una mayor densidad de bacterias, lo que requiere concentraciones más altas de agentes antimicrobianos para prevenir su formación en comparación con la erradicación de una biopelícula ya establecida. Esto indica que es una mejor alternativa evitar procesos de adhesión y síntesis de SPE para evitar la formación, que eliminar

células en las biopelículas las cuales están protegidas por la matriz de SPE o disrumpir los polímeros que se encuentran en la matriz de las biopelículas. Esta resistencia se atribuye principalmente a la matriz de la biopelícula, compuesta principalmente por celulosa. Por lo tanto, resulta interesante explorar los cambios en el contenido de la matriz de la biopelícula para evaluar posibles alteraciones en su arquitectura más allá de los efectos observados en las células bacterianas.

La acción antibiopelícula de los compuestos vegetales suele asociarse con la inhibición de mecanismos biológicos específicos, como la adhesión, la motilidad, la comunicación quórum y la producción de SPE. Estudios anteriores han demostrado que la alteración en la síntesis de SPE es uno de los mecanismos clave de los terpenos en otras bacterias. Por ejemplo, el carvacrol, a una concentración subinhibitoria de 1.33 mM durante 24 horas, inhibió el desarrollo de biopelículas en *P. carotovorum*, asociándose con la reducción en la producción de SPE (Gutierrez-Pacheco *et al.*, 2018). Este compuesto disminuyó los polisacáridos en la matriz de biopelículas de 22.94 a 9.11 mg GE/cm². Siguiendo esta línea, la cumarina inhibió la formación de biopelículas al reducir la motilidad y disminuir la producción de curli y celulosa, regulando a la baja los niveles de transcripción de genes clave en la formación de biopelículas, como *csgD*, *csgA* y *adrA*, en *S. Typhimurium* (Thakur *et al.*, 2020).

A una concentración de 0.7 mg/mL, el eugenol desencadena un aumento en la permeabilidad de la membrana citoplasmática de *S. Typhimurium*. Este fenómeno sugiere la posibilidad de que el eugenol pueda interactuar con componentes superficiales, como pilis y flagelos, así como con enzimas presentes en la membrana, como la glucosiltransferasa. Estas interacciones podrían tener un impacto significativo tanto en la adhesión de la bacteria a las superficies de acero inoxidable como en la producción de SPE, resaltando la complejidad de los mecanismos asociados al eugenol en este contexto. En este estudio, la disminución en la densidad celular podría atribuirse a la supresión de la producción de SPE, lo que potencialmente impide la retención de células adheridas a las superficies. Estos hallazgos resaltan importancia en aplicaciones industriales y de seguridad alimentaria, donde la prevención de la adhesión bacteriana a superficies es fundamental. Además, subrayan la relevancia de considerar el eugenol como una herramienta potencial en la lucha contra la formación de biopelículas, destacando la necesidad de futuras investigaciones y aplicaciones que exploren esta interesante interacción.

6.2. Cuantificar la Producción de Celulosa en Biopelículas de *Salmonella* Typhimurium Expuestas a Eugenol en Superficies de Acero Inoxidable

Los resultados obtenidos al estudiar el impacto del eugenol sobre los exopolisacáridos en las biopelículas de *S. Typhimurium* se presentan en la Figura 7. Se evaluaron las muestras solo hasta las 12 horas de formación debido a que, en experimentos previos, este momento mostró una mayor densidad celular, manteniéndose constante a las 18 y 24 horas en las bacterias de control. Se observó un incremento significativo en el contenido de carbohidratos, presumiblemente celulosa, a medida que transcurría el tiempo de incubación ($p \leq 0.05$). Este aumento fue detectado desde los primeros 15 minutos en todas las muestras. En comparación con las biopelículas no expuestas al eugenol, las bacterias de control presentaron mayores cantidades de carbohidratos durante las 12 horas de experimentación ($p \leq 0.5$). Notablemente, el eugenol a concentraciones de 0.3 mg/mL y 0.7 mg/mL mostró una reducción del 24% y 27% respectivamente, al final del tiempo de incubación. Estos hallazgos sugieren que el eugenol podría ejercer un efecto inhibitorio en la formación de biopelículas de *S. Typhimurium*, potencialmente a través de una alteración en la síntesis de carbohidratos extracelulares.

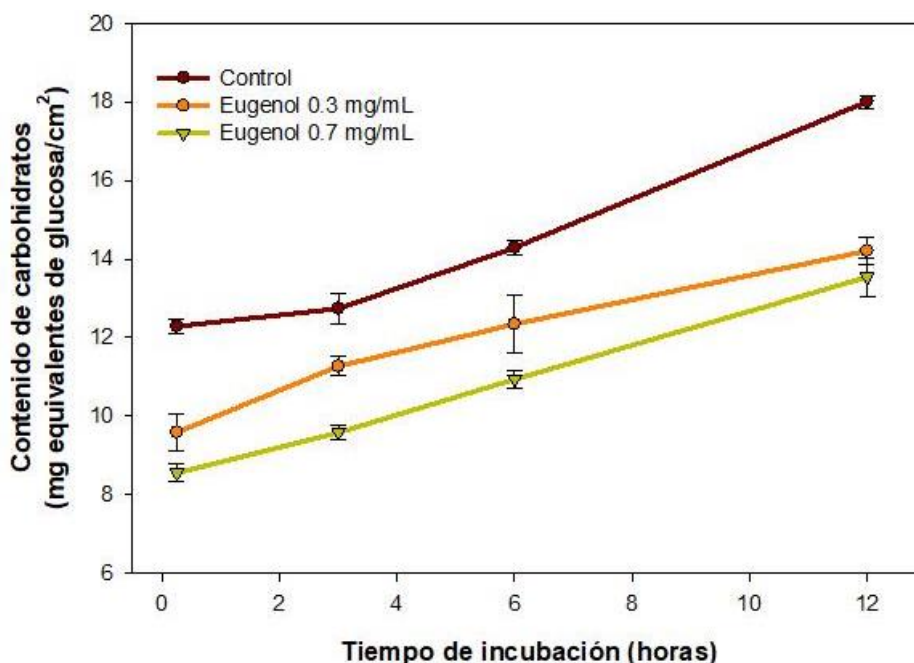


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de eugenol en el contenido de carbohidratos en biopelículas de *S. Typhimurium* adheridas a acero inoxidable durante 12 horas de incubación.

La celulosa, un componente esencial en las biopelículas de *Salmonella* juega un papel fundamental en la estabilidad, cohesión de estas comunidades microbianas y adhesión a superficies no biológicas (Sun *et al.*, 2018; Jonas *et al.*, 2007; Barak *et al.*, 2007; Solano *et al.*, 2002). Esta SPE actúa como el andamiaje estructural que sostiene y une las células, formando una matriz tridimensional resistente y protectora. La presencia de celulosa confiere a las biopelículas una mayor resistencia a agentes antimicrobianos, desinfectantes y condiciones ambientales adversas y que las cepas deficientes de celulosa son hasta mil veces más sensibles a los desinfectantes (Chylkova *et al.*, 2017). Un estudio demostró que *Salmonella* mutante en $\Delta csgD$ produjo poca cantidad de SPE y mostró una formación de biopelículas significativamente reducida en comparación con la tipo salvaje, con una disminución del número de células en un 76% y una disminución de la biomasa en un 72% (Dieltjens *et al.*, 2020). Esta mutante formó una capa delgada y no estructurada de células en comparación con la biopelícula más gruesa y estructurada del tipo salvaje. Además, la mutante $\Delta csgD$ mostró una sensibilidad aumentada al peróxido de hidrógeno y al ciprofloxacino, lo que indica una tolerancia reducida a los antimicrobianos en comparación con la tipo salvaje (Dieltjens *et al.*, 2020). Estos resultados destacan la importancia de la producción de SPE en la formación de biopelículas y la tolerancia antimicrobiana.

A la luz de estas observaciones, la inhibición de la síntesis de celulosa en *Salmonella* emerge como una estrategia prometedora para obstaculizar la formación de biopelículas y potenciar la eficacia de los procesos de desinfección dirigidos a *Salmonella*. Este enfoque podría representar una vía significativa para reducir la capacidad de adherencia y, por ende, disminuir la persistencia de esta bacteria en entornos diversos, desde contextos alimentarios hasta ambientes clínicos aportando así una mayor efectividad en las estrategias de control y prevención de infecciones por *Salmonella*.

Hasta ahora, no se ha documentado evidencia directa de alteraciones en el contenido de celulosa en biopelículas de *S. Typhimurium* debido a la exposición a terpenos. Sin embargo, investigaciones similares con otras bacterias han arrojado resultados prometedores. Por ejemplo, estudios como el de Li *et al.*, 2012, demostraron que el eugenol afecta la síntesis de glucano, un componente fundamental en las SPE producidas por *S. sobrinus*, reduciendo la formación de biopelículas en modelos de boca artificial. Asimismo, Gutierrez-Pacheco *et al.*, 2018 observaron una reducción de hasta el 60 % en los polisacáridos de biopelículas de *P. carotovorum* al utilizar carvacrol a una concentración de 0.01 mg/mL. En otros estudios, como el realizado por Liu *et al.*, 2020, se evidenció que el ácido fenilacético a concentraciones entre 1.25 y 2.50 mg/mL disminuye la

formación de biopelículas de *Enterococcus faecalis* al reducir la producción de exopolisacáridos, posiblemente mediante la regulación a la baja de la transcripción de genes como el polisacárido Epa (*epaABE*). Además, se ha reportado que aceites esenciales como los de bayas de pimienta, clavo y laurel, así como su componente principal, el eugenol a concentraciones de 0.0053 mg/mL, reducen las biopelículas de *E. coli* O157:H7. Este efecto se asoció con la regulación a la baja de genes como el responsable de la síntesis de celulosa, elementos cruciales para la formación de biopelículas. Los investigadores sugirieron que ciertas características químicas del eugenol, como la cadena de alquilo o alcano C-4 en el anillo de benceno, la unidad metoxi C-2 y el hidroxilo C-1, desempeñan un papel crucial en su acción antibiopelícula.

A pesar de que varios estudios resaltan la efectividad de los terpenos en la reducción del contenido de SPE, pocos detalles describen cómo ejercen esta acción. El mecanismo por el cual los terpenos disminuyen el contenido de SPE en las biopelículas sigue siendo poco explorado y no está concluido. Es probable que este efecto se deba a la regulación a la baja de genes implicados en la síntesis de SPE o a la interferencia con la detección de quórum, un proceso crucial en la producción de SPE y la formación de biopelículas. Además, considerando los resultados obtenidos en el experimento con cristal violeta, cabe plantear la hipótesis de que el eugenol, al dañar la membrana celular, podría afectar las proteínas transmembrana implicadas en la síntesis de SPE como por ejemplo la glucosiltransferasa que produce celulosa en *Salmonella*.

Nuestros resultados muestran los cambios en la producción de celulosa en biopelículas de *Salmonella* causados por eugenol. Estos hallazgos nos permiten continuar con la posible interacción del eugenol con la enzima glucosiltransferasa para reducir el contenido de celulosa y la consiguiente formación de biopelículas de *S. Typhimurium*.

6.3. Medir la Actividad de la Glucosiltransferasa en un Extracto de *Salmonella* Typhimurium Expuesta a Eugenol

El eugenol demostró ser efectivo en la inhibición de la actividad enzimática de la glucosiltransferasa en un extracto crudo de *S. Typhimurium*, utilizando CMIB y menores. El Cuadro 3 presenta el efecto del eugenol en la actividad de la glucosiltransferasa extraída de *S.*

Typhimurium, donde se observó que una concentración de 0.7 mg/mL de eugenol ocasionó una reducción del 69% en la actividad enzimática. Estos hallazgos complementan los resultados previos obtenidos en cuanto a la reducción del contenido de polisacáridos extracelulares y la formación de biopelículas, sugiriendo que este efecto podría estar asociado con la inhibición de la actividad de la glucosiltransferasa, la cual es responsable de la síntesis de celulosa y biopelículas de *S. Typhimurium*.

Cuadro 3. Efecto del eugenol en la inhibición de la actividad de glucosiltransferasa de *S. Typhimurium*.

Concentración de eugenol (mg/mL)	% inhibición
0.3	24.16 ± 4.45
0.7	69.32 ± 4.01

Escasos estudios se han llevado a cabo para evaluar el efecto de inhibidores de glucosiltransferasas relacionados con la síntesis de celulosa y la formación de biopelículas en bacterias enteropatógenas. La mayoría de las investigaciones se han centrado en el estudio de bacterias orales como *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus* que colonizan la superficie del diente e inician la formación de placa mediante la síntesis de glucano insoluble en agua a partir de sacarosa mediante glucosiltransferasas, lo que da como resultado una adhesión firme a la superficie del diente. Por ejemplo, se ha observado que el extracto de *Verbascum speciosum* aplicado en concentración cercana a su CMI ($IC_{50} = 160$ y $70 \mu\text{g/mL}$), posee actividad anticariogénica y actúa como inhibidor dosis-dependiente eficaz de la enzima glucosiltransferasa extracelular y de la enzima asociada a células de *S. mutans*, respectivamente (Pourmoslemi *et al.*, 2023). Los autores suponen los enlaces irreversibles entre los ingredientes activos del extracto y las enzimas glucosiltransferasa conducen a una disminución de la síntesis de glucano.

Un estudio destacó la eficacia de los compuestos naturales, especialmente los ácidos fenólicos presentes en extractos de plantas, como inhibidores de la actividad de glucosiltransferasa y la formación de biopelículas por *S. mutans* (Ham y Kim, 2020). El extracto de los frutos de *Rubus coreanus* demostró inhibir tanto la actividad de la glucosiltransferasa como la formación de biopelículas de *S. mutans* sin afectar el crecimiento celular. Se observaron patrones inhibitorios en la actividad de la glucosiltransferasa, con valores de KM y V_{max} más bajos en comparación con

el control. Los ácidos ferúlico, salicílico y vanílico presentes en el extracto fueron identificados como inhibidores de la actividad de la glucosiltransferasa, actuando mediante diferentes mecanismos de inhibición (competitivo, no competitivo y no competitivo). El estudio indica que el ácido ferúlico actúa como un inhibidor competitivo al interferir con la unión de sacarosa o glucano, que son sustratos de la glucosiltransferasa. El ácido salicílico actúa como un inhibidor no competitivo, afectando la velocidad máxima de reacción (V_{max}) sin alterar significativamente el valor de la constante de Michaelis-Menten (KM). El ácido vanílico actúa como un inhibidor no competitivo, reduciendo tanto los valores de V_{max} como de KM en comparación con el control. Estos ácidos fenólicos afectan sitios específicos en la enzima, interfiriendo con su función y, en última instancia, inhibiendo la síntesis de glucano insoluble en agua a partir de sacarosa, crucial para la formación de biopelículas por *S. mutans* (Ham y Kim, 2020).

Otro estudio demostró que la fracción 4 de un extracto crudo metanólico de la corteza de *Acacia nilotica* a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ inhibió de manera notable la glucosiltransferasa secretada por *S. sobrinus* con más del 92% de inhibición y con valor de IC_{50} de 3.9 $\mu\text{g/mL}$ (Muddathir *et al.*, 2020). A una concentración de 0.1 mg/mL , compuestos fenólicos como el galato de epigallocatequina, la epigallocatequina, el ácido tánico y el catecol demostraron una eficacia del 73.1%, 68.5%, 68% y 67.6%, respectivamente, en la inhibición de la actividad de glucosiltransferasa de un extracto de *S. mutans* (Kim *et al.*, 2017). Por su parte, Ortega-Ramirez *et al.*, 2020 mostraron que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, así como el citral y el geraniol a una concentración de 2 mg/mL presentaron una inhibición del 85%, 85% y 48%, respectivamente, en la actividad de la glucosiltransferasa en un extracto crudo de *E. coli*, sin afectar su viabilidad. Por otro lado, cuando se evaluó el efecto de los terpenos sobre la actividad de la enzima purificada, se observó un IC_{50} de 5.8 μM y 5.6 μM para el citral y el geraniol, respectivamente. Se observó además que concentraciones mayores de citral y geraniol (8 y 10 μM) resultaron en valores más bajos de K_m y V_{max} , lo que sugiere un mecanismo de inhibición acompetitiva de la glucosiltransferasa.

Pocos de estos estudios han señalado el sitio exacto donde los compuestos inhibidores actúan. Para complementar los estudios de actividad enzimática de la glucosiltransferasa, se pueden llevar a cabo análisis de acoplamiento molecular para investigar las posibles interacciones entre el eugenol y los aminoácidos de la enzima. Este análisis permitirá identificar los sitios potenciales de unión del eugenol en la estructura tridimensional de la glucosiltransferasa, así como las interacciones

específicas que podrían estar involucradas en su actividad inhibitoria. Mediante este enfoque, se obtendrá información valiosa sobre los posibles mecanismos de acción del eugenol en la inhibición de la síntesis de celulosa y la formación de biopelículas en *S. Typhimurium*.

6.4. Determinar las Interacciones Moleculares *In Silico* del Eugenol sobre la Actividad de Glucosiltransferasa de *Salmonella Typhimurium*.

Se llevó a cabo un análisis de acoplamiento molecular con el propósito de identificar los residuos de la glucosiltransferasa que posiblemente interactúan con el eugenol. La Figura 8 ilustra la superposición más destacada entre BcsA y el sustrato UDP-glucosa, mostrando una afinidad energética de -8.7 kcal/mol. Por otro lado, la Figura 9A exhibe la superposición más favorable entre BcsA y el eugenol, con una afinidad energética de -8.5 kcal/mol. Un análisis más detallado en la Figura 9B revela que el eugenol ocupa la misma cavidad donde interactúa la UDP-glucosa, el sustrato de la glucosiltransferasa. Se identificaron posibles interacciones del eugenol en esta cavidad, tales como enlaces de hidrógeno con su grupo hidroxilo y el residuo ASP311, interacciones de naturaleza hidrofóbica con HIS244, PHE269 y TRP351, y en todos los casos se observaron interacciones Pi-Alkil. Además, se encontró una interacción Pi-Pi apilada con TRP351 (Figura 9C). Resulta relevante destacar que estas interacciones se repiten en la interacción BcsA-UDP-glucosa (Figura 8), lo que sugiere un posible efecto, ya sea directo o indirecto, en la cavidad del sitio activo. Estos hallazgos apuntan al potencial efecto inhibitorio del eugenol.

La Figura 10A muestra la simulación de dinámica molecular del sistema eugenol-BcsA a lo largo del tiempo, midiendo el RMSD de los átomos de BcsA. El RMSD es una métrica comúnmente utilizada para la estabilidad de las proteínas y los cambios estructurales durante la simulación. La Figura 10A muestra que el RMSD tanto para UDP como para eugenol permanece relativamente estable durante toda la simulación, lo que indica que la estructura general de la proteína no experimenta cambios conformacionales significativos una vez que se ha establecido en su configuración inicial después de unirse a cualquiera de los ligandos. Posteriormente, la Figura 10B muestra 100 ns de una simulación de dinámica molecular que sigue el movimiento de un ligando (UDP-glucosa o Eugenol) unido a la proteína BcsA. En esta simulación, UDP-glucosa (línea negra)

tiene un RMSD continuamente bajo, lo que indica que mantiene una conformación estable con poco cambio desde la estructura inicial durante una escala de tiempo de 100 ns. Por otro lado, el eugenol (línea roja) tiene valores de RMSD más grandes y variaciones más notables, incluyendo algunos picos destacados, lo que indica que su interacción con BcsA es más dinámica. Sin embargo, el efecto de estas variaciones en la posición del ligando refleja movimientos menores dentro del sitio activo, lo que refleja la estabilidad del UDP-glucosa (Figura 11) o del eugenol y su potencial inhibición de la actividad de BcsA (Figura 12). Estas observaciones contribuyen a nuestra comprensión de los cambios conformacionales inducidos por los ligandos y la estabilidad en proteínas, especialmente enzimas como BcsA. La estabilidad del eugenol dentro del sitio activo, a pesar de su interacción dinámica, proporciona implicaciones valiosas para su papel potencial como inhibidor de la actividad de BcsA.

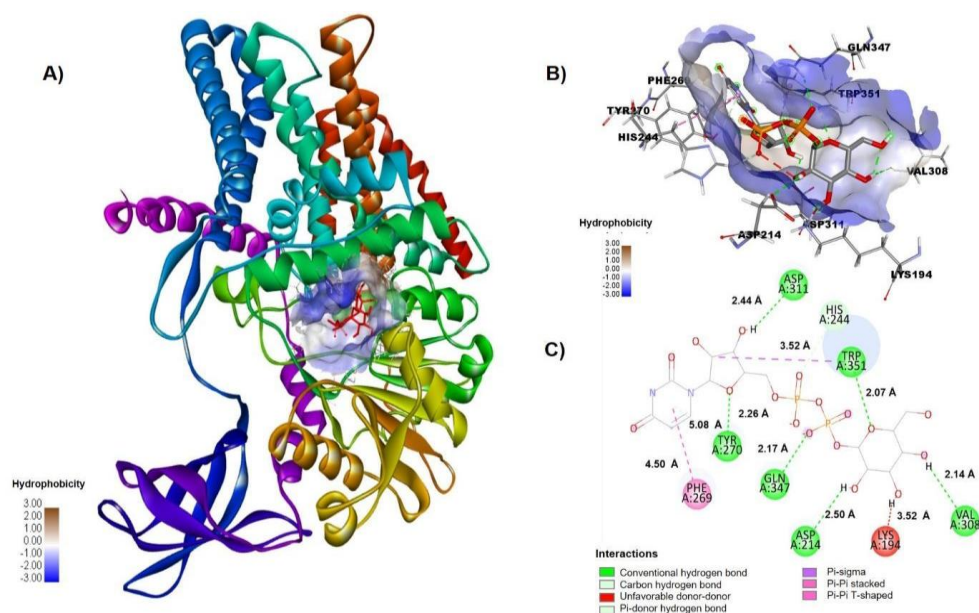


Figura 8. A) Acoplamiento molecular de UDP-glucosa con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. B) Una mirada más cercana al acoplamiento molecular de UDP-glucosa con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA C) Interacciones moleculares de UDP-glucosa con residuos de aminoácidos de la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. Las estructuras se generaron con el software Discovery Studio.

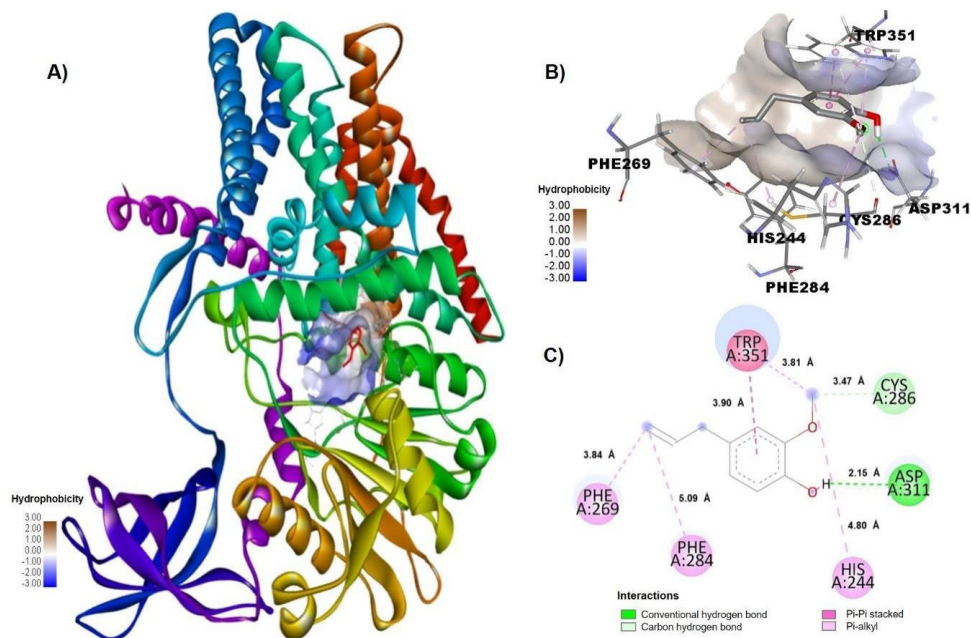


Figura 9. A) Acoplamiento molecular de eugenol con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. B) Una mirada más cercana al acoplamiento molecular del eugenol con la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. C) Interacciones moleculares de eugenol con residuos de aminoácidos de la cavidad del sitio activo de la subunidad BcsA. Las estructuras se generaron con el software Discovery Studio.

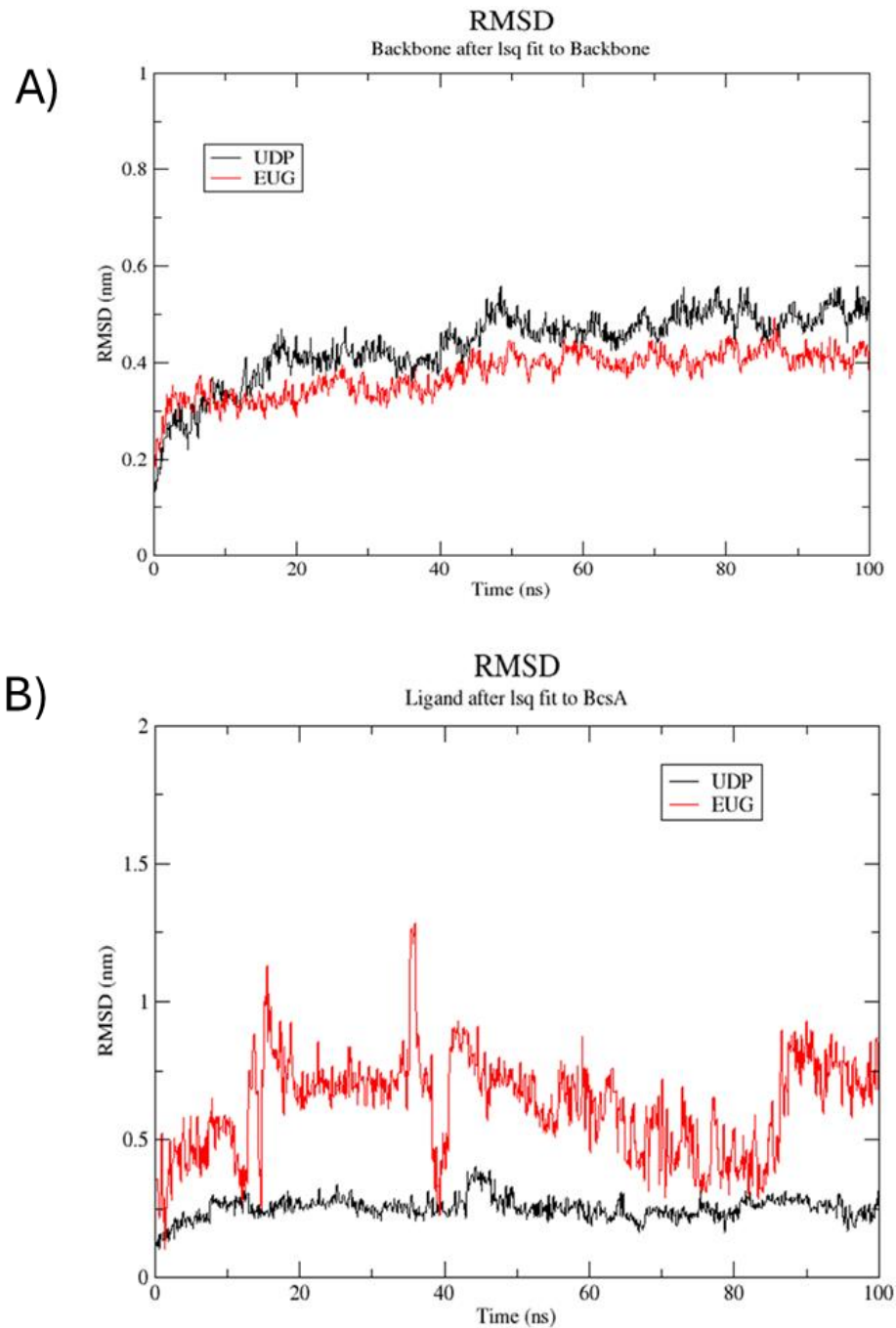


Figura 10. A) Comparación de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) en BcsA tratada con UDP-glucosa y Eugenol durante una simulación dinámica molecular de 100 ns. B) Evaluación de la estabilidad dinámica de los ligandos UDP-glucosa y Eugenol unidos a BcsA durante una simulación dinámica molecular de 100 ns.

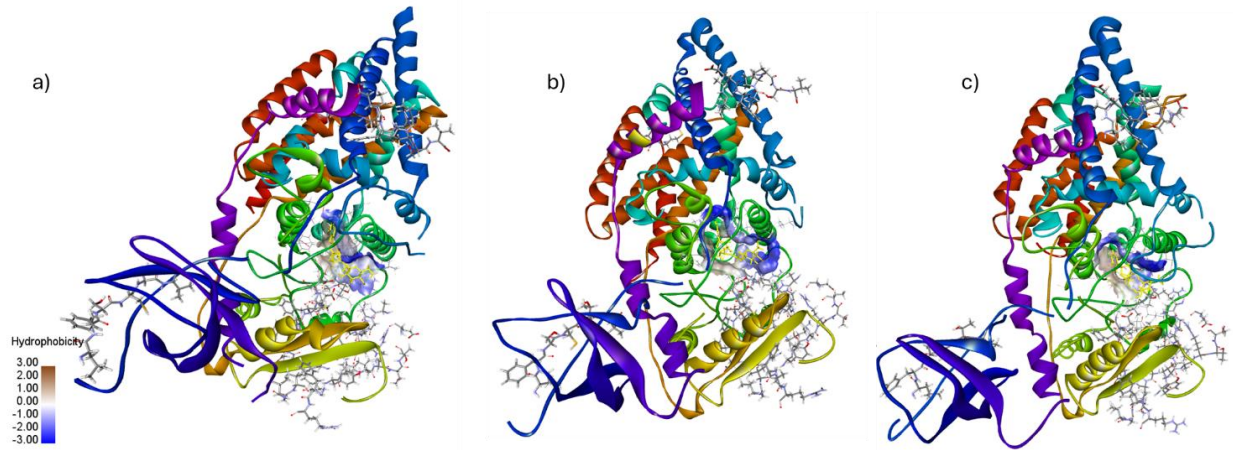


Figura 11. Secuencia temporal a) 0 ns b) 50 ns y c) 100 ns de la interacción de la proteína BcsA con el ligando (amarillo = UDP-glucosa) en simulaciones de GROMACS.

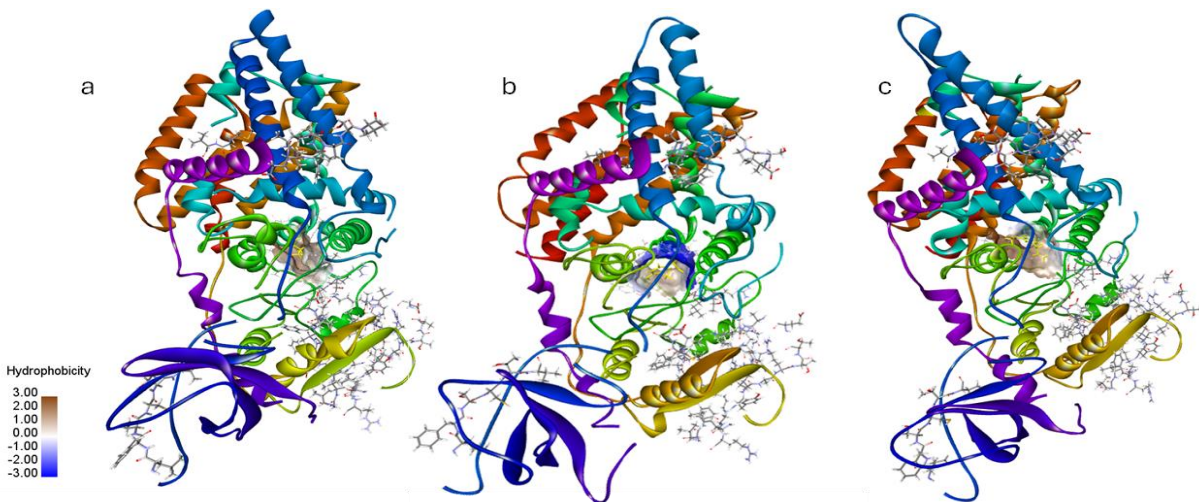


Figura 12. Secuencia temporal a) 0 ns b) 50 ns y c) 100 ns de la interacción de la proteína BcsA con el ligando (amarillo = eugenol) en simulaciones de GROMACS.

Hasta donde sabemos, no se han llevado a cabo investigaciones que utilicen eugenol específicamente para inhibir la actividad de la glucosiltransferasa en *Salmonella*. No obstante, se han emprendido estudios similares con otros compuestos vegetales, analizando su efecto contra diferentes bacterias. Por ejemplo, Ortega-Ramirez *et al.*, 2020 descubrieron que el citral y el geraniol actuaban como inhibidores no competitivos de la glucosiltransferasa, destacando su potencial para interactuar dentro de la cavidad hidrofóbica del sitio de acción de esta enzima. A

pesar de estos hallazgos, no se describen en detalle las posibles interacciones en este estudio específico. Además, Tsai *et al.*, 2007 encontraron que los extractos acuosos y metanólicos de romero tenían la capacidad de inhibir la producción de glucano insoluble en agua al interferir con la glucosiltransferasa en *S. sobrinus*. Los extractos acuoso y metanólico presentaron dosis inhibitorias al 50% de 1.42 mg/mL y 0.34 mg/mL, respectivamente. En otra investigación, Koo *et al.*, 2002, informaron que la apigenina a 1.33 mM mostraba una inhibición del 90-95 % de la actividad de la glucosiltransferasa de *S. sobrinus*, reduciendo tanto la viabilidad de la biopelícula como el desarrollo de caries en ratas. No obstante, ninguno de estos estudios profundiza en cómo interactúan los compuestos activos con la enzima para lograr dicha inhibición. Es relevante señalar que muchos de estos estudios se centran en bacterias patógenas orales, y son menos los que se enfocan en patógenos transmitidos por alimentos. Esta diferencia en el enfoque resalta la necesidad de investigar y comprender mejor los mecanismos de acción de estos compuestos contra patógenos alimentarios como *Salmonella*.

La investigación sobre el eugenol, específicamente su capacidad para interactuar con enzimas y su potencial impacto en procesos biológicos clave, ha despertado un interés considerable. La comprensión de cómo el eugenol puede afectar las actividades enzimáticas es fundamental, ya que podría tener aplicaciones potenciales en diversos campos, desde la medicina hasta la biotecnología, lo que subraya la relevancia de investigaciones más detalladas sobre sus interacciones moleculares con proteínas específicas. Estudios recientes han explorado cómo el eugenol puede bloquear canales hidrofóbicos en enzimas, similar a ciertos fármacos conocido como el diclofenaco y la aspirina (das Chagas Pereira de Andrade y Mendes, 2020). Por ejemplo, se ha observado que el eugenol puede interactuar con la enzima ciclooxigenasa, una proteína central en la generación de ciertas señales moleculares en el cuerpo humano. A través del acoplamiento molecular se detectó que estas interacciones incluyen enlaces de hidrógeno con residuos SER530 y contactos hidrofóbicos con TYR385, residuos específicos en el sitio activo de la enzima, que permite convertir el ácido araquidónico en prostaglandina G2 al transferir un electrón al hemo desde TYR385 de la proteína, lo que genera un radical tirosilo en el sitio activo de la ciclooxigenasa (das Chagas Pereira de Andrade y Mendes, 2020).

Este tipo de comprensión a nivel molecular sobre cómo el eugenol interactúa con enzimas clave es fundamental. No solo permite dilucidar posibles mecanismos de acción del compuesto, sino que también abre puertas a aplicaciones potenciales en el diseño de nuevos fármacos o en la

optimización de terapias existentes. Estos descubrimientos subrayan la importancia de investigaciones más detalladas sobre las interacciones moleculares entre el eugenol y proteínas específicas, lo que podría tener un impacto significativo en múltiples campos científicos y médicos. Este tipo de análisis molecular puede aportar valiosas pistas sobre los posibles mecanismos de acción, proporcionando una primera visión de las interacciones moleculares entre el ligando (eugenol) y la proteína receptora (BcsA).

6.5. Evaluar Cambios en la Expresión de Bcsa de *Salmonella Typhimurium* Expuesta a Eugenol

Se extrajo ARN intacto de las bacterias tratadas y no tratadas, asegurando una síntesis precisa de ADNc. Estos ADNc se emplearon para verificar la especificidad de los primers diseñados para el gen de BcsA, revelando la obtención de un solo producto de reacción. Se confirmó la eficacia de la amplificación tanto para el gen de BcsA como para el gen de FimY, alcanzando niveles de eficiencia del 99-101%. Además, se llevó a cabo una validación experimental entre estos dos genes, utilizando concentraciones de ADNc que variaban desde 0.16 hasta 100 ng.

Durante el análisis de la expresión génica, se observó un aumento en la expresión del gen *bcsA* en relación con el tiempo y la concentración de eugenol aplicada (Figura 13). A las 3 horas, no se detectaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de eugenol en las bacterias. Sin embargo, a las 6 horas, la concentración más alta de eugenol (0.7 mg/mL) mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de BcsA. A una concentración de 0.35 mg/mL, aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas, se notó una tendencia al aumento en la expresión de este gen. Estos resultados nos indican que el efecto que se lleva a cabo es postranscripcional.

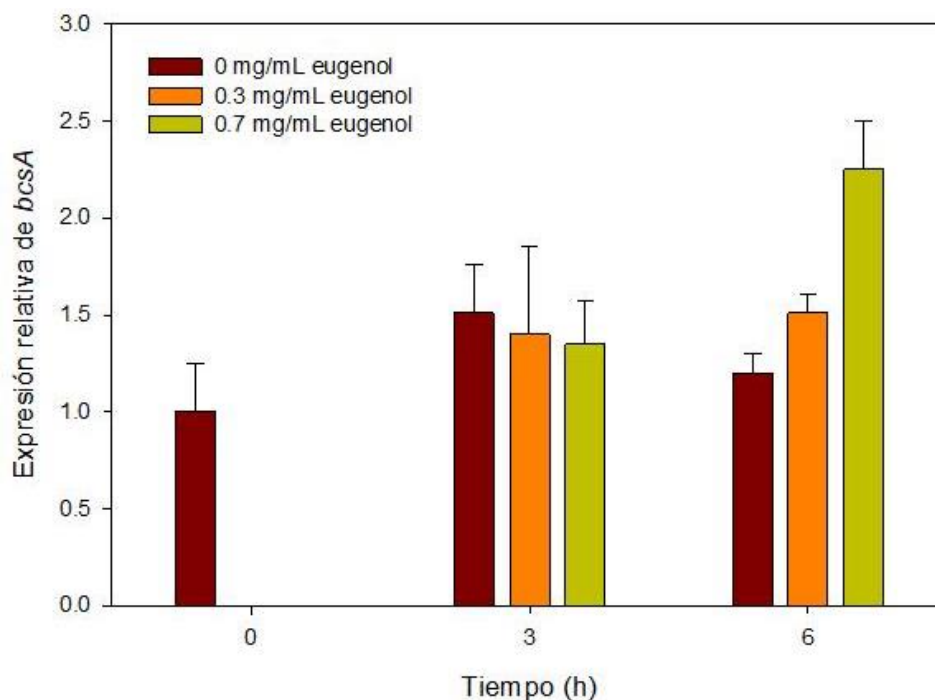


Figura 13. Expresión relativa de BcsA. Las gráficas representan el promedio \pm desviación estándar. Diferentes literales significan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

La síntesis de celulosa en *S. Typhimurium*, mediada por la enzima glucosiltransferasa BcsA, es un proceso complejo que implica la expresión de varios genes relacionados. La regulación de estos genes se lleva a cabo a nivel transcripcional y post-transcripcional. En primer lugar, la expresión del gen *bcs* operón, que codifica para las subunidades de la celulosa sintasa, está regulada por varios factores, incluidos los sistemas de dos componentes, como BcsA/BcsB, y el regulador global CsgD. Este regulador puede influir en la expresión del operón *bcs* en respuesta a señales ambientales y condiciones específicas del nicho. La producción de celulosa se produce mediante la activación transcripcional de la diguanilato ciclasa AdrA, que a su vez produce el segundo mensajero c-di-GMP que alivia la autoinhibición de la celulosa sintasa BcsAB.

La expresión de los genes del operón *bcs* es controlada por promotores específicos que se activan en diferentes etapas del crecimiento bacteriano y en diferentes entornos. La activación de estos promotores puede estar sujeta a la presencia de señales externas, como la disponibilidad de nutrientes o la presión selectiva ambiental.

Una vez transcritos, los ARNm del operón *bcs* se traducen en proteínas funcionales, incluida la subunidad BcsA que actúa como glucosiltransferasa en la síntesis de celulosa. La actividad de la

enzima BcsA está influenciada por la disponibilidad de sustratos, como la UDP-glucosa, y por la presencia de cofactores y modificadores postraduccionales. Además de la regulación transcripcional, la actividad de la enzima glucosiltransferasa y, por lo tanto, la producción de celulosa, también pueden ser reguladas a nivel post-transcripcional mediante mecanismos como la modulación de la estabilidad del ARNm o la actividad enzimática por proteínas reguladoras específicas.

Estudios previos han reportado la efectividad de algunos compuestos en la modulación de la expresión de genes de glucosiltransferasa de *S. mutans*, que como ya se mencionó anteriormente es de las bacterias más estudiadas en este campo. El cinamaldehído, un aldehído aromático α , β -insaturado presente en el aceite de canela, tuvo un efecto inhibitorio sobre la expresión de *vicR*, una parte de *vicRKX*, un sistema de transducción de señales de dos componentes en *S. mutans*, que actúa como "interruptores de moléculas" para modular la expresión de los genes correspondientes y, en consecuencia, controlar diversos procesos metabólicos y de señalización, incluida la detección de quórum sensing, la esporulación, la producción de antibióticos/bacteriocinas y quimiotaxis en respuesta a diferentes estímulos internos y externos (He *et al.*, 2019). Como resultado, se redujo la expresión de *gtfB/C/D*. Los resultados indicaron que 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ de cinamaldehído disminuyó significativamente la expresión de *gtfD* en biopelículas de *S. mutans* en 0.0421 y 0.00380 veces, respectivamente. Además, los niveles de expresión de otros genes asociados con la formación de biopelículas se redujeron en el rango de 0.17 a 0.0819 veces con 250 $\mu\text{g/mL}$ y de 0.273 a 0.00483 veces con 500 $\mu\text{g/mL}$ (He *et al.*, 2019).

Además de dirigirse a vías de señalización o genes aguas arriba como el estudio anterior, los agentes terapéuticos pueden modular directamente la expresión de *gtfs* a nivel de transcripción, lo cual ha sido documentado ampliamente en *S. mutans*. Estos agentes terapéuticos se han encontrado principalmente en productos naturales o sus derivados. Por ejemplo, el aceite de limón cítrico, un producto natural, tiene efectos inhibitorios sobre la adherencia de *S. mutans* a superficies de esmalte de vidrio y saliva a través de la inhibición de la transcripción de *gtfB/D* y *gtfC* en un 95% y 80%, respectivamente (Liu *et al.*, 2013). Por otro lado, la apigenina, una 4',5,7-trihidroxiflavona comúnmente identificada en alimentos de origen vegetal y propóleos, disminuye la expresión de *gtfs*, especialmente *gtfB* y *gtfC* en un 50% a una concentración de 0.1 mmol/L en comparación con el control (Koo *et al.*, 2006).

A diferencia de estos estudios, nuestra investigación indica que el efecto de reducción de formación

de biopelículas se debe a una disminución en la producción de celulosa por la interacción del eugenol con la enzima glucosiltransferasa y se descarta que sea un efecto en la inhibición de la expresión de genes relacionados con la enzima.

7. CONCLUSIÓN

Los resultados muestran el mecanismo complejo por el cual el eugenol podría ejercer sus efectos antimicrobianos contra las biopelículas de *S. Typhimurium*. Nuestros hallazgos revelan que el eugenol no es simplemente un inhibidor del crecimiento bacteriano en su estado planctónico, sino también un disruptor potente de la formación de biopelículas en superficies de acero inoxidable. Además, se encontró que el eugenol reduce el contenido de celulosa en las biopelículas de *S. Typhimurium* sin disminuir la expresión del gen *bcsA* responsable de su síntesis. Esto sugiere que el impacto del eugenol en la arquitectura de las biopelículas puede involucrar un mecanismo post-transcripcional, posiblemente al obstaculizar la acción de las enzimas glucosiltransferasas involucradas en la producción de celulosa. Los análisis *in silico* proporcionan más evidencia que respalda la hipótesis de que el eugenol puede interactuar directamente con el sitio catalítico de la enzima glucosiltransferasa, obstruyendo así su función. Las investigaciones futuras deberían centrarse en la sobreexpresión y purificación de las enzimas objetivo para cristalizarlas y examinar la cinética de inhibición, lo que solidificaría nuestra comprensión de los mecanismos inhibidores del eugenol. Las aplicaciones prácticas, especialmente en el manejo de biopelículas industriales, son prometedoras y merecen ser exploradas.

8. RECOMENDACIONES

Para ampliar el conocimiento sobre la interacción entre el eugenol y la enzima glucosiltransferasa en *Salmonella* Typhimurium, se recomiendan los siguientes estudios específicos:

- Profundizar en los mecanismos moleculares exactos por los cuales el eugenol inhibe la actividad de la glucosiltransferasa y la formación de biopelículas utilizando técnicas avanzadas de biología molecular y modelado estructural.
- Realizar microscopía confocal, electrónica de transmisión (TEM), electrónica de barrido (SEM) y/o de Fuerza Atómica para visualizar la arquitectura tridimensional de las biopelículas y evaluar la distribución de los componentes de los SPE en presencia y ausencia de eugenol.
- Determinar los cambios en la producción de otras sustancias poliméricas extracelulares como proteínas, ADN y lípidos.
- Sobreexpresar, purificar y cristalizar las subunidades BcsA y BcsB de glucosiltransferasa para estudiar su estructura tridimensional por difracción de rayos X en presencia y ausencia del eugenol.
- Realizar estudios cinéticos con la proteína purificada para evaluar cómo el eugenol afecta la actividad enzimática de la glucosiltransferasa e identificar cambios en la afinidad de la enzima por sus sustratos en presencia de eugenol.
- Utilizar GROMACS para simulaciones de dinámica molecular por mayor tiempo de interacción y mejorar el modelo de simulación incluyendo parámetros realistas de concentración, temperatura y otras condiciones que reflejen los ambientes biológicos en los que actúa la enzima.
- Realizar estudios de resistencia a largo plazo para evaluar si el uso constante de eugenol puede llevar al desarrollo de resistencia en *S. Typhimurium*.
- Estudiar cómo incorporar el eugenol en los procesos de higiene y desinfección de la industria alimentaria.

9. REFERENCIAS

- Abdallah, F. B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., and Bakhrouf, A. 2009. Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Braz. J. Microbiol.* 40: 394-398.
- Ahmad, I., Cimdins, A., Beske, T., and Römling, U. 2017. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of *csgD* expression in *Salmonella typhimurium*. *BMC Microbiol.* 17: 1-12.
- Amaral, V. C., Santos, P. R., da Silva, A. F., dos Santos, A. R., Machinski Jr, M., and Mikcha, J. M. G. 2015. Effect of carvacrol and thymol on *Salmonella* spp. biofilms on polypropylene. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50: 2639-2643.
- Ashrafudoulla, M., Mizan, M. F. R., Ha, A. J.-w., Park, S. H., and Ha, S.-D. 2020. Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiol.* 91: 103500.
- Barak, J. D., Jahn, C. E., Gibson, D. L., and Charkowski, A. O. 2007. The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1083-1091.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., and Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 12: 2385-2397.
- Bernal-Mercado, A. T., Vazquez-Armenta, F. J., Tapia-Rodriguez, M. R., Islas-Osuna, M. A., Mata-Haro, V., Gonzalez-Aguilar, G. A., . . . Ayala-Zavala, J. F. 2018. Comparison of single and combined use of catechin, protocatechuic, and vanillic acids as antioxidant and antibacterial agents against uropathogenic *Escherichia coli* at planktonic and biofilm levels. *Molecules.* 23: 2813.
- Bhowmick, P. P., Devegowda, D., Ruwandepika, H. D., Fuchs, T. M., Srikumar, S., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. 2011. *gcpA* (*stm1987*) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium. *Microb. Pathog.* 50: 114-122.
- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R., and Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2465-2467.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Kokić, B., Milanov, D., and Pezo, L. 2019. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. *Biofouling* 35: 361-375.
- CDC. (2013). Infection with *Salmonella*. Retrieved from https://www.cdc.gov/training/SIC_CaseStudy/Infection_Salmonella_ptversion.pdf
- CDC. (2023a). Reports of Selected *Salmonella* Outbreak Investigations. Retrieved from <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>

- CDC. (2023b). *Salmonella* home page. Retrieved from <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
- Chylkova, T., Cadena, M., Ferreiro, A., and Pitesky, M. 2017. Susceptibility of *Salmonella* biofilm and planktonic bacteria to common disinfectant agents used in poultry processing. *J. Food Prot.* 80: 1072-1079.
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., and Lin, L. 2019. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Ind. Crops Prod.* 139: 111498.
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., and Lin, L. 2020. Inhibition mechanism of cardamom essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *LWT* 122: 109057.
- Da Silva, F. F. M., Monte, F. J. Q., de Lemos, T. L. G., Do Nascimento, P. G. G., de Medeiros Costa, A. K., and De Paiva, L. M. M. 2018. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. *Chem. Cent. J.* 12: 1-9.
- Dantas, S. T., Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C., Castilho, I. G., Hernandez, R. T., Fernandes, A., and Rall, V. L. 2018. Cross-contamination and biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on various cutting boards. *Foodborne Pathog. Dis.* 15: 81-85.
- das Chagas Pereira de Andrade, F., and Mendes, A. N. 2020. Computational analysis of eugenol inhibitory activity in lipoxygenase and cyclooxygenase pathways. *Sci. Rep.* 10: 16204.
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., and Pandian, S. K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* 130: 107-115.
- Devi, K. P., Sakthivel, R., Nisha, S. A., Suganthi, N., and Pandian, S. K. 2013. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*. *Arch. Pharm. Res.* 36: 282-292.
- Dieltjens, L., Appermans, K., Lissens, M., Lories, B., Kim, W., Van der Eycken, E. V., . . . Steenackers, H. P. 2020. Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nat. Commun.* 11: 107.
- Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., and Jaiswal, S. 2021. *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods* 10: 907.
- El Hag, M., Feng, Z., Su, Y., Wang, X., Yassin, A., Chen, S., . . . Liu, X. 2017. Contribution of the *csgA* and *bcsA* genes to *Salmonella enterica* serovar Pullorum biofilm formation and virulence. *Avian Pathol.* 46: 541-547.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 563-575.
- Galie, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., and Lombó, F. 2018. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* 9: 898.
- Gill, A., and Holley, R. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 1-9.
- Gutierrez-Pacheco, M., Gonzalez-Aguilar, G., Martinez-Tellez, M., Lizardi-Mendoza, J., Madera-Santana, T., Bernal-Mercado, A., . . . Ayala-Zavala, J. 2018. Carvacrol inhibits biofilm

formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Food Control 89: 210-218.

- Hadidi, S. 2022. Evaluation of the inhibitory activities of thyme compounds against coronavirus disease-19 (COVID-19) by molecular docking and molecular dynamic simulation. Trends Pharmacol. Sci. 8: 95-106.
- Hakimi Alni, R., Ghorban, K., and Dadmanesh, M. 2020. Combined effects of *Allium sativum* and *Cuminum cyminum* essential oils on planktonic and biofilm forms of *Salmonella typhimurium* isolates. Biotech. 10: 1-10.
- Ham, Y., and Kim, T.-J. 2020. Inhibitory effect of phenolic acids in *Rubus coreanus* on glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. Curr. Microbiol. 77: 3695-3703.
- He, Z., Huang, Z., Jiang, W., and Zhou, W. 2019. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde on *Streptococcus mutans* biofilms. Front. Microbiol. 10: 471115.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front. Microbiol. 3: 1-24.
- Izadi, P., Izadi, P., and Eldyasti, A. 2021. Holistic insights into extracellular polymeric substance (EPS) in anammox bacterial matrix and the potential sustainable biopolymer recovery: A review. Chemosphere 274: 129703.
- Jahan, F., Chinni, S. V., Samuggam, S., Reddy, L. V., Solayappan, M., and Su Yin, L. 2022. The complex mechanism of the *Salmonella typhi* biofilm formation that facilitates pathogenicity: a review. Int. J. Mol. Sci. 23: 6462.
- Jeyakumar, G. E., and Lawrence, R. 2021. Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*. Journal of Herbal Medicine 26: 100406.
- Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L. M., and Melefors, Ö. 2007. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. BMC Microbiol. 7: 1-9.
- Keelara, S., Thakur, S., and Patel, J. 2016. Biofilm formation by environmental isolates of *Salmonella* and their sensitivity to natural antimicrobials. Foodborne Pathog. Dis. 13: 509-516.
- Khan, I., Bahuguna, A., Kumar, P., Bajpai, V. K., and Kang, S. C. 2017. Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation. Front. Microbiol. 8: 1-9.
- Kim, S.-H., Jyung, S., and Kang, D.-H. 2022. Comparative study of *Salmonella typhimurium* biofilms and their resistance depending on cellulose secretion and maturation temperatures. LWT 154: 112700.
- Kim, Y.-G., Lee, J.-H., Gwon, G., Kim, S.-I., Park, J. G., and Lee, J. 2016. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157: H7. Sci. Rep. 6: 1-11.
- Kim, Y., Jang, S.-J., Kim, H.-R., and Kim, S.-B. 2017. Deodorizing, antimicrobial and glucosyltransferase inhibitory activities of polyphenolics from biosource. Korean J. Chem. Eng. 34: 1400-1404.

- Koo, H., Pearson, S., Scott-Anne, K., Abranches, J., Cury, J., Rosalen, P., . . . Bowen, W. 2002. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol. Immun.* 17: 337-343.
- Koo, H., Seils, J., Abranches, J., Burne, R. A., Bowen, W. H., and Quivey Jr, R. G. 2006. Influence of apigenin on gtf gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 542-546.
- Kosznik-Kwaśnicka, K., Podlacha, M., Grabowski, Ł., Stasiłojć, M., Nowak-Zaleska, A., Ciemińska, K., . . . Mantej, J. 2022. Biological aspects of phage therapy versus antibiotics against *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection of chickens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12: 941867.
- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., and Nag, M. 2019. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *J. Biosci.* 44: 1-19.
- Li, M., Lai, G., Wang, J., and Ye, D. 2012. The inhibition of eugenol on glucan is essential for the biofilm eradication effect on caries-related biofilm in an artificial mouth model. *Nat. Prod. Res.* 26: 1152-1155.
- Li, Q. 2022. Mechanisms for the invasion and dissemination of *Salmonella*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 2022.
- Lira, M. C., Rodrigues, J. B., Almeida, E. T. d. C., Ritter, A. C., Tondo, E., Torres, S. M., . . . Magnani, M. 2020. Efficacy of oregano and rosemary essential oils to affect morphology and membrane functions of noncultivable sessile cells of *Salmonella* Enteritidis 86 in biofilms formed on stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* 128: 376-386.
- Liu, D., Huang, Q., Gu, W., and Zeng, X.-A. 2022. A review of bacterial biofilm control by physical strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62: 3453-3470.
- Liu, F., Jin, P., Sun, Z., Du, L., Wang, D., Zhao, T., and Doyle, M. P. 2021. Carvacrol oil inhibits biofilm formation and exopolysaccharide production of *Enterobacter cloacae*. *Food Control* 119: 1-9.
- Liu, F., Sun, Z., Wang, F., Liu, Y., Zhu, Y., Du, L., . . . Xu, W. 2020. Inhibition of biofilm formation and exopolysaccharide synthesis of *Enterococcus faecalis* by phenyllactic acid. *Food Microbiol.* 86: 103344.
- Liu, W., Chen, G., Dou, K., Yi, B., Wang, D., Zhou, Q., and Sun, Y. 2023a. Eugenol eliminates carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* via reactive oxygen species mechanism. *Front. Microbiol.* 14: 1090787.
- Liu, X., Yao, H., Zhao, X., and Ge, C. 2023b. Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules* 28: 2432.
- Liu, Y., Zhang, X., Wang, Y., Chen, F., Yu, Z., Wang, L., . . . Guo, M. 2013. Effect of citrus lemon oil on growth and adherence of *Streptococcus mutans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 1161-1167.
- Luna-Solorza, J. M., Ayala-Zavala, J. F., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Bernal-Mercado, A. T., Gutierrez-Pacheco, M. M., and Silva-Espinoza, B. A. 2023. Oregano essential oil versus conventional disinfectants against *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms and damage to stainless-steel surfaces. *Pathogens* 12:

1245.

- MacKenzie, K. D., Palmer, M. B., Köster, W. L., and White, A. P. 2017. Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic *Salmonella* strains to colonize multiple host species. *Front. Vet. Sci.* 4: 138.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Coppo, E., Barbieri, R., Barreca, D., Chebaibi, S., . . . Daglia, M. 2018. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: Mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling* 34: 630-656.
- Maruzani, R., Sutton, G., Nocerino, P., and Marvasi, M. 2019. Exopolymeric substances (EPS) from *Salmonella enterica*: polymers, proteins and their interactions with plants and abiotic surfaces. *J. Microbiol.* 57: 1-8.
- Merino, L., Procura, F., Trejo, F. M., Bueno, D. J., and Golowczyc, M. A. 2019. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Res. Int.* 119: 530-540.
- Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., and Chaieb, K. 2017. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microb. Pathog.* 104: 56-63.
- Moraes, J. O., Cruz, E. A., Pinheiro, Í., Oliveira, T. C., Alvarenga, V., Sant'Ana, A. S., and Magnani, M. 2019. An ordinal logistic regression approach to predict the variability on biofilm formation stages by five *Salmonella enterica* strains on polypropylene and glass surfaces as affected by pH, temperature and NaCl. *Food Microbiol.* 83: 95-103.
- Moraes, J. O., Cruz, E. A., Souza, E. G., Oliveira, T. C., Alvarenga, V. O., Peña, W. E., . . . Magnani, M. 2018. Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 281: 90-100.
- Morgan, J. L., McNamara, J. T., and Zimmer, J. 2014. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21: 489-496.
- Morgan, J. L., Strumillo, J., and Zimmer, J. 2013. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 493: 181-186.
- Muddathir, A. M., Mohieldin, E. A. M., and Mitsunaga, T. 2020. In vitro activities of *Acacia nilotica* (L.) Delile bark fractions against oral bacteria, glucosyltransferase and as antioxidant. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 20: 1-9.
- Nazari Moghadam, M., Rahimi, E., Shakerian, A., and Momtaz, H. 2023. Prevalence of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry meat: virulence and antimicrobial-resistant genes. *BMC Microbiol.* 23: 168.
- Obe, T., Richards, A. K., and Shariat, N. W. 2022. Differences in biofilm formation of *Salmonella* serovars on two surfaces under two temperature conditions. *J. Appl. Microbiol.* 132: 2410-2420.
- Oh, S., Yun, W., Lee, J., Lee, C., Kwak, W., and Cho, J. 2017. Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci. Technol.* 59: 1-5.

- Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mérida, H., Mazur, O., Bulone, V., and Zimmer, J. 2013. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 17856-17861.
- Ortega-Ramirez, L. A., Gutiérrez-Pacheco, M. M., Vargas-Arispuro, I., González-Aguilar, G. A., Martínez-Téllez, M. A., and Ayala-Zavala, J. F. 2020. Inhibition of glucosyltransferase activity and glucan production as an antibiofilm mechanism of lemongrass essential oil against *Escherichia coli* O157: H7. *Antibiotics* 9: 102.
- Pourmoslemi, S., Larki-Harchegani, A., Daneshyar, S., Dastan, D., Nili-Ahmadabadi, A., and Jazaeri, M. 2023. Antibacterial and anti-glucosyltransferase activity of *Verbascum speciosum* against cariogenic Streptococci. *J. Pharmacopuncture* 26: 139.
- Powell, L. C., Pritchard, M. F., Ferguson, E. L., Powell, K. A., Patel, S. U., Rye, P. D., . . . Copping, J. M. 2018. Targeted disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate oligosaccharides. *NPJ Biofilms Microbiomes* 4: 1-10.
- Purkait, S., Bhattacharya, A., Bag, A., and Chattopadhyay, R. 2020. Evaluation of antibiofilm efficacy of essential oil components β -caryophyllene, cinnamaldehyde and eugenol alone and in combination against biofilm formation and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 71: 195-202.
- Qi, X., Li, P., Xu, X., Yuan, Y., Bu, S., and Lin, D. 2019. Epidemiological and molecular investigations on *Salmonella* responsible for gastrointestinal infections in the southwest of Shanghai from 1998 to 2017. *Front. Microbiol.* 10: 2025.
- Römling, U., and Galperin, M. Y. 2015. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol.* 23: 545-557.
- Rumbaugh, K. P., and Sauer, K. 2020. Biofilm dispersion. *Nat. Rev. Microbiol.* 18: 571-586.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M., and Ha, S. 2015. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14: 491-509.
- SENASICA. (2020). *Panorama nacional de salmonelosis. Análisis Estratégico de Riesgos Sanitarios*
- Silva-Espinoza, B. A., Palomares-Navarro, J. J., Tapia-Rodríguez, M. R., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Silva-Campa, E., . . . Ayala-Zavala, J. F. 2020. Combination of ultraviolet light-C and clove essential oil to inactivate *Salmonella Typhimurium* biofilms on stainless steel. *J. Food Saf.* 40: e12788.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., and Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43: 793-808.
- Souza, V. V. M. A., Almeida, J. M., Barbosa, L. N., and Silva, N. C. C. 2022. Citral, carvacrol, eugenol and thymol: Antimicrobial activity and its application in food. *J. Essent. Oil Res.* 34: 181-194.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45: 502-531.
- Su, R., Bai, X., Liu, X., Song, L., Liu, X., Zhan, X., . . . Shi, C. 2022. Antibacterial mechanism of

- eugenol against *Shigella sonnei* and its antibacterial application in lettuce juice. *Foodborne Pathog. Dis.* 19: 779-786.
- Sun, L., Vella, P., Schnell, R., Polyakova, A., Bourenkov, G., Li, F., . . . Galperin, M. Y. 2018. Structural and functional characterization of the BcsG subunit of the cellulose synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 430: 3170-3189.
- Thakur, S., Ray, S., Jhunjhunwala, S., and Nandi, D. 2020. Insights into coumarin-mediated inhibition of biofilm formation in *Salmonella Typhimurium*. *Biofouling* 36: 479-491.
- Trevisan, D. A. C., Silva, A. F. d., Negri, M., Abreu Filho, B. A. d., Machinski Junior, M., Patussi, E. V., . . . Mikcha, J. M. G. 2018. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Braz. J. Pharm. Sci.* 54: 1-8.
- Tsai, P.-J., Tsai, T.-H., and Ho, S.-C. 2007. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem.* 105: 311-316.
- USDA. (2021). Cost estimates of foodborne illnesses. Retrieved from <https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/>
- Van Houdt, R., and Michiels, C. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1117-1131.
- Vimal, A., Jha, A., and Kumar, A. 2018. Eugenol derivatives prospectively inhibit l-asparaginase: A heady target protein of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* 114: 8-16.
- Yan, Z., Yin, M., Chen, J., and Li, X. 2020. Assembly and substrate recognition of curli biogenesis system. *Nat. Commun.* 11: 1-10.
- Yaron, S., and Römling, U. 2014. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microb. Biotechnol.* 7: 496-516.
- Zhang, C., Li, C., Abdel-Samie, M. A., Cui, H., and Lin, L. 2020. Unraveling the inhibitory mechanism of clove essential oil against *Listeria monocytogenes* biofilm and applying it to vegetable surfaces. *LWT* 134: 110210.
- Zhao, X., Zheng, S., Wei, S., Tian, Q., Tao, Y., Bo, R., . . . Li, J. 2022. The protective effect and potential mechanisms of eugenol against *Salmonella* in vivo and in vitro. *Poult. Sci.* 101: 101801.