



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

**SINERGIA DE CELULASA, PAPAÍNA Y CITRAL PARA LA
INACTIVACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Staphylococcus aureus*
EN SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE**

Por:

Patricia Palafox Rivera

TESIS APROBADA POR LA

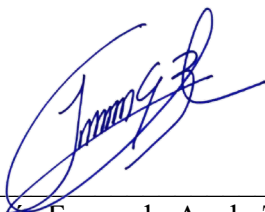
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Patricia Palafox Rivera la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias



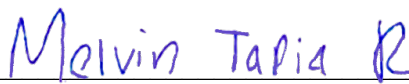
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Director de tesis



M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza
Integrante del comité de tesis



M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela
Integrante del comité de tesis



Dr. Melvin Roberto Tapia Rodríguez
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Sinergia de Celulosa, Papaína y Citral para la Inactivación de Biopelículas de *Staphylococcus aureus* en Superficies de Acero Inoxidable” 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 de la autora Patricia Palafox Rivera, 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 manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

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

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme realizar mis estudios de maestría y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

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

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), por darme la oportunidad de realizar mi proyecto y facilitarme equipos e instalaciones.

Quiero agradecer especialmente a mi director de tesis el Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, por ser mi guía en estos dos años y ayudarme en las revisiones de mis trabajos, brindarme su apoyo incondicional e impulsarme a dar lo mejor de mí. Además, le agradezco por su paciencia y por compartirme de su conocimiento y experiencia.

Agradezco también a los miembros de mi comité de tesis integrado por la M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza, el M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela y el Dr. Melvin Roberto Tapia Rodríguez por brindarme su tiempo, su apoyo y compartirme sus conocimientos para el desarrollo de mi proyecto.

DEDICATORIA

Primeramente, a mis padres, **Pedro Enrique Palafox Quintero** y **Bertha Rivera Vallejo †** Por la formación que me dieron, por enseñarme todos sus valores y hacerme una persona de bien y acompañarme siempre. Por enseñarme a valorar las cosas importantes de la vida y seguir adelante. Agradezco en especial a mi padre por siempre confiar en mí y apoyarme en cada momento. Gracias por ese apoyo incondicional, por darme todo lo que necesité y por ser mi ejemplo a seguir. ¡Este logro también es de ustedes!

A mis hermanos **Juan Enrique Palafox Rivera** y **Marco Antonio Palafox Rivera** por brindarme su cariño, su apoyo y por ser mi ejemplo de superación.

A mi gran maestro, el **Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala** por sus grandes valores como ser humano, su ética profesional, por su paciencia y disposición siempre presentes.

A los **M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza** y **Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela** por brindarme su amistad incondicional y sus consejos para ser mejor persona

A mis compañeros y amigos de laboratorio **Melvin, Thalía, Javier, Karen, Antonio, Luis y Melissa** por sus consejos y amistad. Muchas gracias por esos momentos de reflexión y de diversión que hicieron que en el Laboratorio de Tecnologías Emergentes me sintiera como en familia.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS.....	9
LISTA DE ECUACIONES.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> : Un Riesgo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos a Nivel Mundial.....	16
2.2. Síntesis de Sustancias Poliméricas que Componen las Biopelículas de <i>S. aureus</i>	18
2.3. Desventajas de los Antibacterianos Convencionales en la Desinfección de Biopelículas de <i>S. aureus</i>	22
2.4. Acción Sinérgica de Celulasa, Papaína y Citral contra las Biopelículas de <i>S. aureus</i>	26
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo General.....	37
4.2. Objetivos Específicos	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1. Etapa 1: Capacidad Antibacteriana Individual y Combinada de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas y Biopelículas de <i>S. aureus</i>	38
5.1.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas de <i>S. aureus</i>	38
5.1.2. Formación de Biopelículas Maduras de <i>S. aureus</i>	38
5.1.3. Biopelículas de <i>S. aureus</i> tratadas con Celulasa, Papaína y Citral	39
5.1.4. Cambios Microscópicos en las Biopelículas de <i>S. aureus</i> durante la Formación y Exposición a los Tratamientos con Celulasa, Papaína y Citral	40
5.1.5. Diseño Experimental.....	41
5.2. Etapa 2: Interacciones Moleculares entre Celulasa, Papaína y Citral como Indicadores de Estabilidad de su Combinación.....	41
5.2.1. Acoplamiento Molecular entre la Celulasa y la Papaína	41
5.2.2 Acoplamiento Molecular de los Complejos Celulasa-Citral y Papaína-Citral	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43

CONTENIDO (continuación)

6.1. Etapa 1: Capacidad Antibacteriana Individual de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas y Biopelículas de <i>S. aureus</i>	43
6.1.1. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas de <i>S. aureus</i>	43
6.1.2. Formación de Biopelículas Maduras de <i>S. aureus</i>	45
6.1.3. Inactivación de las biopelículas de <i>S. aureus</i> después de su exposición individual y combinada a celulasa, papaína y citral.	48
6.2. Etapa 2: Interacciones Moleculares entre Celulasa, Papaína y Citral como Indicadores de la Estabilidad de su Combinación	53
6.2.1. Acoplamiento Molecular entre la Celulasa y la Papaína	53
6.2.2. Acoplamiento Molecular entre la Celulasa y el Citral	56
6.2.3. Acoplamiento Molecular entre la Papaína y el Citral	59
7. CONCLUSIÓN	63
8. RECOMENDACIONES	64
9. REFERENCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Proceso de formación de biopelículas.....	17
2 Proceso de síntesis de polisacáridos que conforman la matriz extracelular de <i>S. aureus</i> regulados por el operón icaADBC..	19
3 Síntesis de proteínas de superficie de <i>S. aureus</i> mediante el factor SecYEG	20
4 Translocación de proteínas de superficie de <i>S. aureus</i> mediante la sortasa A.	21
5 Efecto de las uniones electroestáticas sobre la difusión de sanitizantes comunes.	25
6 Hidrólisis de polisacáridos que conforman las biopelículas de <i>S. aureus</i> utilizando celulasa.	28
7 Sitio activo y subsitios de unión de la celulasa.	28
8 Hidrólisis de las proteínas de membrana de <i>S. aureus</i> utilizando papaína.	30
9 Sitio activo de la papaína.	31
10 Actividad antibacteriana del citral contra las células sésiles de <i>S. aureus</i>	33
11 Sistema de estudio propuesto del efecto sinérgico de la combinación de celulasa, papaína y citral para la inactivación de biopelículas de <i>S. aureus</i>	35
12 Células planctónicas viables expuestas a diferentes concentraciones de citral durante 24 h a 37°C.....	44
13 a) Cambios en las células viables adheridas de <i>S. aureus</i> en superficies de acero inoxidable a diferentes tiempos de incubación. b) Microscopías ópticas de las células adheridas de <i>S. aureus</i> a diferentes tiempos.....	46
14 Células viables adheridas a acero inoxidable después del tratamiento con papaína y celulasa a diferentes concentraciones durante 1 h a 37°C.....	49
15 Células viables remanentes de <i>S. aureus</i> expuestas a la combinación de celulasa y papaína (0.125 + 0.06 mg/mL), y celulasa, papaína y citral (0.125 + 0.06+ 2 mg/mL).	50
16 Microscopías ópticas de las biopelículas maduras de <i>S. aureus</i> expuestas a celulasa, papaína y citral durante 1 h a 37°C.	53
17 Arreglo molecular de la celulasa y la papaína mediante el servidor ClusPro 2.0.	55
18 Acomodo molecular de la celulasa y el citral	57
19 Interacciones celulasa PNAG.....	58
20 Acomodo del citral dentro de la cavidad del sitio activo de la papaína.	60
21 Interacción del citral con el residuo catalítico His 159.A de la papaína.	61
22 Interacción de la lisina con la triada catalítica de la papaína.	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Desventajas de los antibacterianos comunes utilizados en la industria alimentaria	23
2 Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y de inactivación de biopelículas (CMIB) de sanitizantes comunes sobre las células planctónicas y biopelículas de diversas bacterias.....	23
3 Antimicrobianos naturales aplicados en células planctónicas de S. aureus	26
4 Enzimas utilizadas contra diferentes biopelículas bacterianas y sus puntos de corte ..	32
5 Concentración mínima de celulasa, papaína y citral para inactivar las biopelículas de S. aureus	48
6 Coeficientes de peso de la energía PIPER de los cuatro modelos de arreglo molecular	54

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Página
1 Concentración fraccional de inactivación de celulasa, papaína y citral	40
2 Suma de los coeficientes de peso de la energía PIPER.....	42
3 Suma de los coeficientes de peso de la energía PIPER para el arreglo molecular de la celulasa y la papaína	54

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un patógeno capaz de contaminar alimentos y de formar barreras de protección frente a la desinfección, estas barreras son llamadas biopelículas, las cuales son estructuras tridimensionales formadas por polisacáridos y proteínas. En el presente trabajo se evaluó la combinación de celulasa y papaína, para hidrolizar la matriz polimérica de la biopelícula, y exponer a las células de *S. aureus* al ataque antibacteriano del citral. El citral inhibió el crecimiento de células libres de *S. aureus* a una concentración de 0.025 mg/mL, y causó una pérdida de viabilidad celular aplicando 0.026 mg/mL, mientras que la celulasa y la papaína no presentaron efecto antibacteriano (>2 mg/mL). Durante el proceso de formación de biopelículas *S. aureus* mostró una adherencia de 3.5 Log UFC por cm² de acero inoxidable a las 1.5 h a 37 °C, continuando su crecimiento hasta alcanzar una carga celular máxima de 8 Log UFC/cm² a las 24 h, por esto se utilizaron las biopelículas preformadas durante 24 h a 37 °C para probar el efecto de las enzimas y del citral. La concentración necesaria de celulasa y papaína para reducir las biopelículas preformadas fue de 1 mg/mL para cada enzima; mientras que el citral aún en concentraciones >7 mg/mL no logró afectar las biopelículas. Sin embargo, al utilizar celulasa, papaína y citral de forma combinada se encontró un efecto sinérgico mediante el método del tablero de ajedrez (Σ FIC = 0.46) al combinar 0.12, 0.06 y 2 mg/mL, respectivamente. Esta mezcla logró inactivar las biopelículas preformadas de *S. aureus* después de una hora de exposición. Por lo cual, se concluye que a las concentraciones evaluadas únicamente citral tuvo un efecto antibacteriano contra las células en estado planctónico de *S. aureus*. Además, se obtuvo un comportamiento sinérgico por parte de los componentes logrando reducir en un 100% las células viables en las biopelículas.

Palabras clave: Factores de virulencia, degradación enzimática, seguridad alimentaria

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a pathogen capable of contaminating food and forming protective barriers against disinfection. These barriers are called biofilms, which are three-dimensional structures made up of polysaccharides and proteins. Therefore, the present work evaluated the combination of cellulase and papain, to hydrolyze the biofilm polymer matrix, and expose *S. aureus* cells to the antibacterial attack of citral. Citral inhibited the growth of free *S. aureus* cells at a concentration of 0.025 mg/mL and caused a loss of cell viability by applying 0.026 mg/mL, while cellulase and papain did not have a significant effect (> 2 mg/mL). *S. aureus* found an adherence of 3.5 Log UFC per cm² of stainless steel at 1.5 h at 37 °C, continuing its growth until reaching a maximum cell load of 8 Log UFC/cm² at 24 h, so it will be used in biofilms preformed for 24 h at 37 °C to test the effect of enzymes and citral. The necessary concentration of cellulase and papain to reduce the preformed biofilms was 1 mg/mL for each enzyme; while citral, even in concentrations > 7 mg/mL, failed to affect biofilms. However, a synergistic effect was found when combining cellulase, papain and citral at 0.12, 0.06 and 2 mg/mL, respectively. This mixture was able to inactivate the preformed *S. aureus* biofilms after one hour of exposure. Therefore, it is concluded that citral had an antibacterial effect against cells in the planktonic state of *S. aureus*. In addition, a synergistic behavior was obtained by combining citral with the enzymes, achieving 100% reduction of viable cells in the treated biofilms.

Keywords: Virulence factors, Enzymatic degradation, food safety

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de muerte a nivel internacional; anualmente, se han reportado más de 4,000,000 de casos (Soto-Estrada *et al.*, 2016). Dentro de estos, los brotes asociados a bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* ocasionaron en el 2019 más de 119,000 casos y al menos 20,000 muertes en Estados Unidos de América, Italia e Irán (Johler *et al.*, 2015; Hobbs *et al.*, 2019; Niloa Toasa *et al.*, 2020). Además, el tratamiento de enfermedades causadas por *S. aureus* genera grandes pérdidas económicas; en promedio, se reporta un costo de 11,668 y 12,425 dólares por paciente, solamente por reingreso a hospitales en una permanencia de 14 o 15 días (Olsen *et al.*, 2018). En general, los gastos de salud pública representan una carga anual de 13.6 billones de dólares solamente en Estados Unidos de América (Khan *et al.*, 2015; Hobbs *et al.*, 2019; Peralta Quito, 2019). Esta problemática se relaciona con el uso desmedido de sanitizantes dentro de la industria alimentaria que provocan la resistencia de la bacteria.

El uso inadecuado de sanitizantes como el hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio provocan la resistencia bacteriana (Lee *et al.*, 2018; Alvarez *et al.*, 2019). El hipoclorito de sodio es uno de los sanitizantes de uso común en la industria alimentaria por su eficacia contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* (Ozdemir *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, al ser un derivado clorado es causante de corrosión, incluso en superficies de acero inoxidable, además de ser causante de diversos daños a la salud, que pueden ir desde irritación en la garganta hasta la exposición a subproductos con propiedades carcinogénicas (Silva, 2017; Broncales & Vilchez, 2019). Dentro del proceso de sanitización se utiliza también el cloruro de benzalconio que en exposiciones mayores a 0.06% puede llegar a ser tóxico, además de generar corrosión en las superficies (NOM-243-SSA1-, 2010; Araújo *et al.*, 2011). La corrosión causada por los sanitizantes clorados provoca grietas en las superficies, lo que permite la incrustación de materia orgánica y promueve la proliferación de microorganismos, además, induce la activación de factores de virulencia como el desarrollo de biopelículas.

La formación de biopelículas es uno de los factores de virulencia que permite la supervivencia bacteriana ante condiciones ambientales desfavorables. Durante la primera etapa de formación la bacteria comienza a adherirse a las superficies de forma reversible. En la segunda etapa, las

adhesinas de la pared celular fijan la bacteria a la superficie y se activa la cascada de señalización para la comunicación intercelular (Yarwood *et al.*, 2004). Posteriormente, durante la tercera etapa se lleva a cabo la secreción de sustancias poliméricas (SPE), la multiplicación celular y la formación de microcolonias. Es en la cuarta etapa que los exopolímeros maduran incrementando la densidad de las capas que conforman las biopelículas y proporcionan mayor protección a las células embebidas (Kim *et al.*, 2017). Finalmente, en la quinta etapa se liberan exoenzimas que rompen las biopelículas y las células recubiertas son liberadas para colonizar nuevas áreas (Fleming *et al.*, 2017). Por lo anterior, es importante conocer la composición de la biopelícula para poder atacar el problema que representan.

Dentro de los constituyentes de las biopelículas de *S. aureus* se encuentran las proteínas de membrana que componen alrededor del 10% y se dividen en proteínas de agrupamiento (ClfA y ClfB), serin-aspartato (SdrC, SdrD, SdrE, SdrF y SasG), proteínas de unión al colágeno, bifuncionales de unión al fibrinógeno/fibronectina (fnbpA, fnbpB y AtlA) y proteínas de superficie reguladoras de hierro (IsdA, IsdB, IsdC, IsdH y la proteína A) (Muñoz *et al.*, 2019). Éstas tienen como función principal adherirse a la superficie para poder dar paso a la agrupación y formación de las biopelículas. Por otro lado, los polisacáridos componen un 90% de las biopelículas de *S. aureus* y poseen un papel fundamental en la integridad de las biopelículas contribuyendo en la agregación celular, retención de agua, estabilidad mecánica y como barrera para los sanitizantes (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Fleming *et al.*, 2017). Lo anterior evidencia a la barrera de polisacáridos y proteínas como un reto a vencer en el diseño de nuevos desinfectantes que puedan penetrar hasta las células embebidas en el interior de la biopelícula. Por lo cual, surge la siguiente pregunta de investigación ¿Cómo es posible eliminar la barrera de exopolímeros que conforman las biopelículas que protegen a *S. aureus* de la desinfección?

Se han probado tratamientos enfocados a la inactivación de biopelículas de *S. aureus* aplicando enzimas como la celulasa y la papaína, destinadas a hidrolizar a los polisacáridos y proteínas que dan estructura y fuerza al agregado, consiguiendo un porcentaje de inactivación entre 70 y 90% (Oliveira *et al.*, 2014). Pese a esto, su aplicación no provee un efecto antibacteriano integral por lo que es necesario adicionar un componente que actúe sobre las células liberadas de la matriz polimérica (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015). Uno de los compuestos naturales reconocidos por su capacidad antibacteriana es el citral, el cual es un terpeno lipofílico que al interaccionar con la membrana de la bacteria genera la apertura de poros y la muerte de la célula (Ortega-Ramírez *et*

al., 2017). Por lo anterior, se hipotetizó que la combinación de celulasa, papaína y citral actúa de manera sinérgica para inactivar a las biopelículas de *S. aureus* de superficies de acero inoxidable grado alimentario.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biopelículas de *Staphylococcus aureus*: Un Riesgo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos a Nivel Mundial

Las enfermedades infecciosas son una de las tres principales causas de muerte en México; anualmente se presentan más de 4,000,000 de casos (Soto-Estrada *et al.*, 2016). Dentro de estas, patógenos como *S. aureus* han provocado al menos 119,000 infecciones y 20,000 muertes en Estados Unidos de América, y cerca de 11,000 en Italia e Irán durante 2019, y en 2020 las cifras se han incrementado alcanzando los 80,000 casos (Johler *et al.*, 2015; Hobbs *et al.*, 2019). *S. aureus*, es causante de una gran cantidad de infecciones cutáneas, gastrointestinales, pleuropulmonares y osteoarticulares, las cuales causan enormes pérdidas económicas, reportándose un gasto promedio de 11,668 y 12,425 dólares por paciente; solamente por reingreso a hospitales (Gupta *et al.*, 2017; Olsen *et al.*, 2018; Hobbs *et al.*, 2019; Peralta Quito, 2019). Es por esto, que las enfermedades transmitidas por *S. aureus* se posicionan como una de las principales problemáticas que afectan tanto al sector salud como a la economía mundial.

S. aureus es un coco Gram-positivo, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , que se encuentra generalmente agrupado en forma de racimos de uvas, son bacterias no móviles cuyas colonias son lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros con una pigmentación que va de amarillo a dorado y es considerado anaerobio facultativo (Cervantes-García *et al.*, 2014). Se ha asociado a este patógeno con infecciones debido a la presencia de biopelículas en superficies de acero inoxidable en la industria alimentaria; además del consumo de toxinas preformadas en los alimentos (Mercado *et al.*, 2012). La formación de biopelículas se considera uno de los principales factores de virulencia de *S. aureus*, y se encuentra regulado por un sistema de comunicación intercelular o *Quorum sensing* mediante el cual las bacterias se organizan para la expresión de factores de virulencia (Kim *et al.*, 2017; Carmona-Torre & del Pozo, 2018).

S. aureus utiliza sistemas como *Agr* y *SarA* para regular la formación y adhesión de las biopelículas en superficies abióticas (Yarwood *et al.*, 2004; Malachowa & DeLeo, 2018). Cuando la bacteria detecta un ambiente estresante, libera péptidos auto inductores que activan la cascada de

señalización génica, dando inicio al proceso de formación de biopelículas. Durante la primera etapa, se lleva a cabo la adhesión de las células a la superficie de forma reversible y es mediada por interacciones hidrofóbicas. Posteriormente, durante la segunda etapa la bacteria se fija de forma permanente a la superficie mediante adhesinas de la pared celular y activan la cascada de señalización para la comunicación intercelular (Yarwood *et al.*, 2004). En la tercera etapa, se lleva a cabo la secreción de SPE, la multiplicación celular y la formación de microcolonias. Es en la cuarta etapa que los exopolímeros maduran incrementando la densidad de las biopelículas proporcionando mayor protección a las células embebidas (Kim *et al.*, 2017). Finalmente, en la quinta etapa se liberan exoenzimas que rompen las biopelículas y se liberan las células que se encontraban recubiertas para colonizar nuevas superficies (Figura 1) (Fleming *et al.*, 2017).

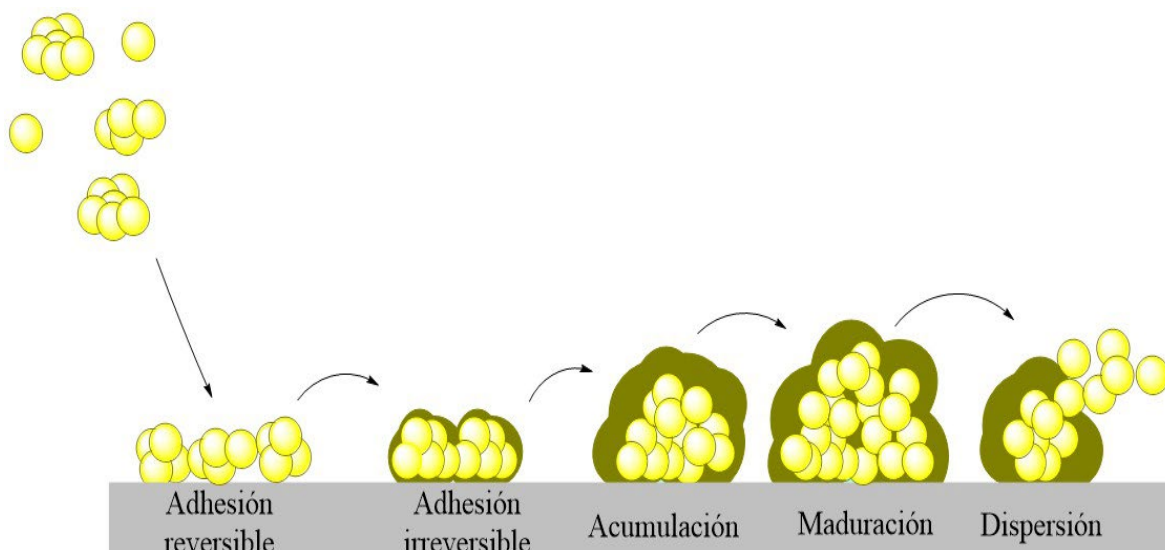


Figura 1. Proceso de formación de biopelículas. La formación de biopelículas se lleva a cabo mediante la adhesión reversible de las células a la superficie mediante interacciones hidrofóbicas. Subsecuentemente, esta adhesión se vuelve irreversible debido a la acción de proteínas de membrana y la liberación de SPE que conforman las microcolonias. Estas sustancias se acumulan hasta llegar a una etapa madura en la cual la resistencia de la bacteria se incrementa. Finalmente, se segregan enzimas que rompen la barrera de biopolímeros para continuar la colonización.

Durante la formación de biopelículas se liberan SPE; las cuales, generan microambientes conformados por proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos que forman la estructura tridimensional. Dichas sustancias, le permiten a la bacteria obtener nutrientes y agua para

alimentarse; además, facilitan el intercambio de iones, electrones, información genética y componentes bacterianos (Navarro, 2016). Aunado a esto, la formación de biopelículas se considera uno de los principales métodos utilizados por bacterias patógenas para asegurar su supervivencia ante agentes sanitizantes (McCarthy *et al.*, 2015). Este comportamiento se asocia con la cohesividad de los polisacáridos que componen las biopelículas y que incrementan la protección de las células ante el estrés ambiental (Navarro, 2016; Constanza Muñoz *et al.*, 2019). No obstante, la composición de las biopelículas suele variar dependiendo de la especie bacteriana y el ambiente en el que se desarrolle, por lo cual, es de gran importancia conocer los componentes principales con el fin de identificar puntos diana para atacar el problema que representan.

2.2. Síntesis de Sustancias Poliméricas que Componen las Biopelículas de *S. aureus*

Los polisacáridos componen un 90% de las biopelículas de *S. aureus*, estos poseen un papel fundamental en la integridad de las biopelículas al contribuir en la agregación celular, retención de agua, estabilidad mecánica, absorción y almacenamiento de nutrientes e iones (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015; Fleming *et al.*, 2017). Estas propiedades se atribuyen a la estructura de los polisacáridos de adhesión intracelular (PIA) y el poli N-acetil-glucosamina (PNAG). Éstos se componen por monómeros de N-acetil glucosamina unidos por enlaces β -1,6, los cuales poseen una fracción aniónica que cuenta con grupos fosfato y éster enlazados a succinato, y pocos residuos de D-glucosamina no N-acetilados que facilitan la adhesión de las biopelículas a la superficie (Muñoz *et al.*, 2019; Valle *et al.*, 2019).

La síntesis de este polisacárido es mediada por el operón *icaADBC*. Este proceso da inicio con el monómero de N-acetil-glucosamina parcialmente desacetilado en las uniones 1-6. Éste pasa a través de la proteína de membrana IcaA, y posteriormente, con ayuda de la proteína accesoria de membrana IcaD dan forma a la cadena que conforma el polímero de acetil glucosamina (PNAG). Una vez formado, el PNAG es exportado por la proteína de membrana IcaC hacia la IcaB desacetilasa, esta enzima elimina algunos de los grupos N-acetilo dándole al polímero un carácter catiónico (Otto, 2009). Una vez culminado el proceso se obtiene como resultado la parte polimérica de las biopelículas (Figura 2). Es mediante las propiedades catiónicas de este polímero que se lleva

a cabo la interacción electrostática con otros polímeros presentes en la superficie, lo que permite la formación de la matriz adhesiva de las biopelículas. No obstante, las proteínas de membrana actúan como coadyuvante para la adhesión intercelular y a las superficies.

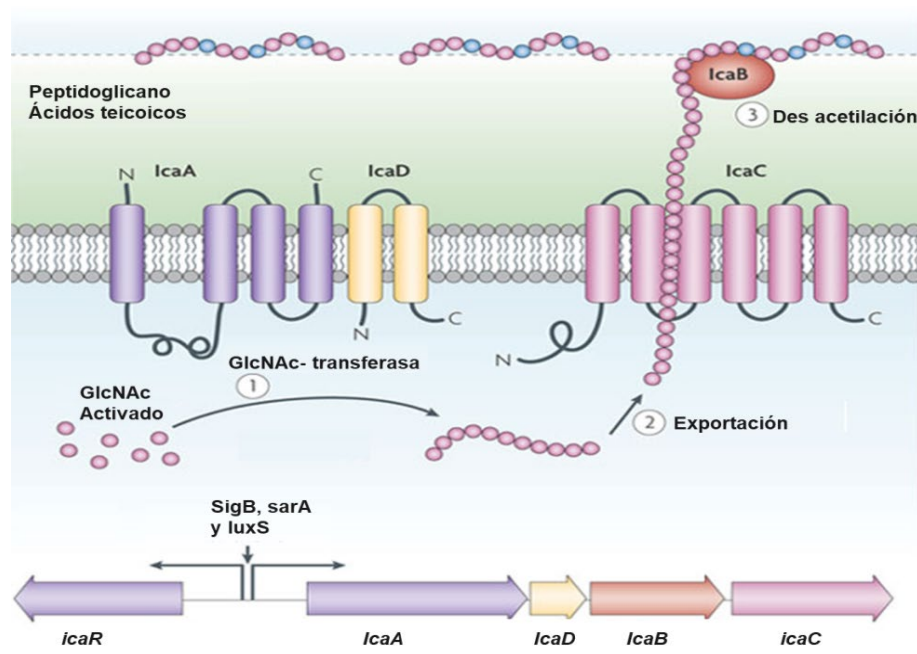


Figura 2. Proceso de síntesis de polisacáridos que conforman la matriz extracelular de *S. aureus* regulados por el operón *icaADBC*. 1) Se inicia el proceso con el monómero desacetilado de N-acetilglucosamina, que al interactuar con proteínas como IcaA e IcaD se convierte en el PNAG. 2) Posteriormente, la proteína es exportada hacia la proteína de membrana IcaC donde es excretada. 3) Finalmente, el PNAG se une a la IcaB desacetilasa que elimina algunos de los grupos N-acetilo permitiendo la unión a la superficie (Otto, 2009).

La síntesis de proteínas de membrana comienza en el citosol, éstas son transferidas hacia el factor SecYEG donde se lleva a cabo la translocación hacia la membrana, descrita en la Figura 3. El proceso da inicio cuando la proteína es reconocida por la chaperona SecB que la canaliza hacia el sitio de unión de la proteína de membrana SecA. Posteriormente, pasa al complejo heterotrimérico llamado SecYEG que actúa como “canal” para el movimiento de polipéptidos. Una vez terminado el proceso se lleva a cabo la liberación o plegamiento de la proteína en el espacio periplásmico (Mori & Ito, 2001). Tras la translocación, las proteínas de superficie se anclan a la pared celular bacteriana mediante un mecanismo que requiere una señal de clasificación C terminal con un

motivo LPXTG conservado (Figura 4). En este proceso se lleva a cabo una escisión con la sortasa A entre la treonina y la glicina del motivo LPXTG liberando el carboxilo de treonina para formar un enlace amida con el grupo amino del puente de pentaglicina, vinculando así el extremo C terminal de las proteínas de la superficie al peptidoglicano bacteriano (Ton-That *et al.*, 1999; Guimaraes *et al.*, 2013). Una vez las proteínas son ancladas a la superficie se activan funciones como la adhesión intercelular, a las superficies y la formación de aglomerados, mediados por diferentes grupos de proteínas.

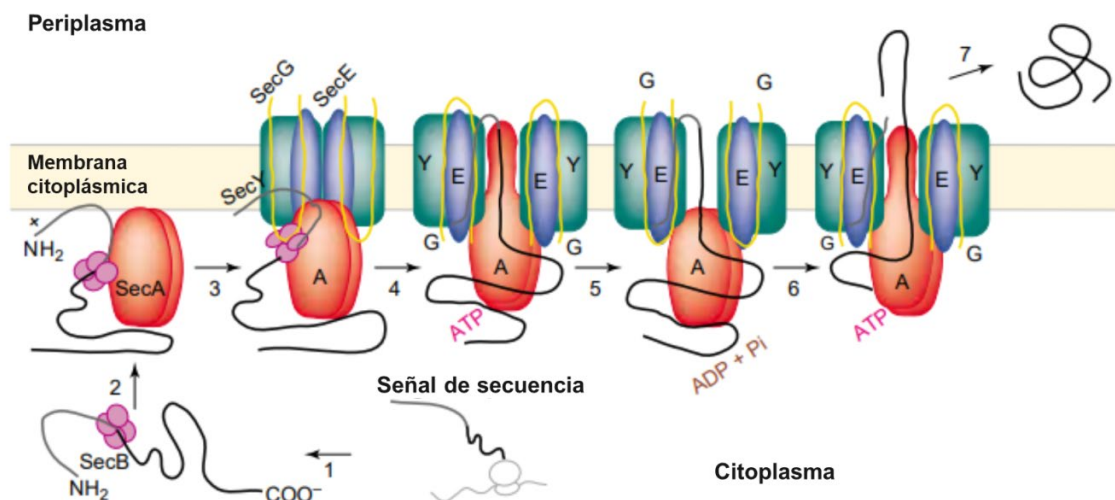


Figura 3. Síntesis de proteínas de superficie de *S. aureus* mediante el factor SecYEG. La proteína se une con la chaperona SecB que se encarga de canalizar la proteína hacia SecA. Posteriormente, se une al SecYEG donde es plegada y finalmente se transfiere hacia el periplasma (Mori & Ito, 2001).

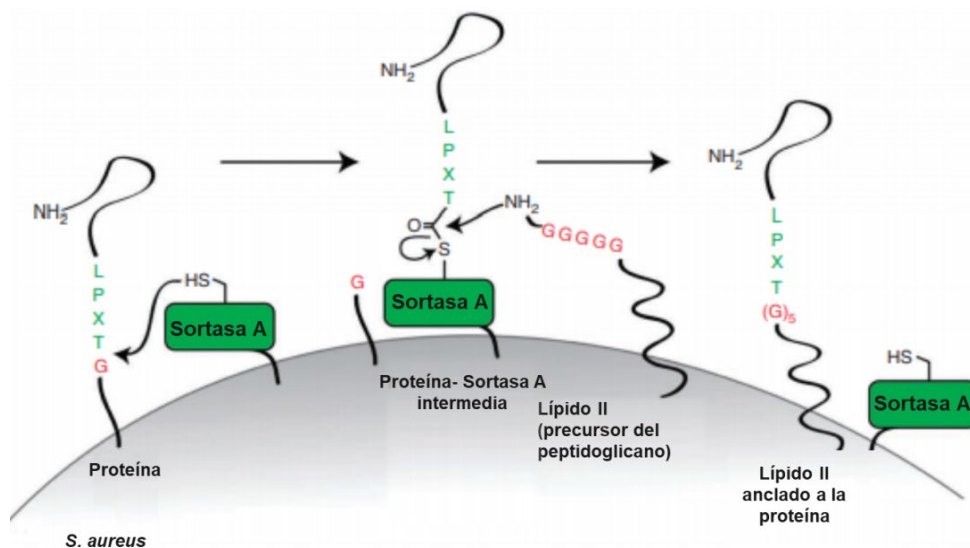


Figura 4. Translocación de proteínas de superficie de *S. aureus* mediante la sortasa A. El proceso da inicio con la unión de la proteína a la sortasa A donde al interactuar con el sitio activo se hace una incisión entre la treonina y glicina del motivo LPXTG que libera al carboxilo y vincula el extremo C terminal concluyendo en la unión de la proteína a la superficie (Guimaraes *et al.*, 2013).

Las proteínas de membrana conforman alrededor del 10% de las biopelículas de *S. aureus*. Existe un amplio grupo denominado MSCRAMM que se divide en varios subgrupos de acuerdo a su función. Primeramente, se encuentran las proteínas de agrupamiento (ClfA y ClfB), seguido por las serín-aspartato (SdrC, SdrD, SdrE, SdrF y SasG), proteínas de unión al colágeno, bifuncionales de unión al fibrinógeno/fibronectina (fnbpA, fnbpB y AtlA) y reguladoras de hierro (IsdA, IsdB, IsdC, IsdH y la proteína A) (Muñoz *et al.*, 2019). Durante la formación de biopelículas, la adhesión a la superficie es mediada principalmente por proteínas de agrupación (ClfA, ClfB), unión al fibrinógeno (Atla) y serín-aspartato (SasG). Éstas se adhieren a la superficie a través de interacciones hidrófobas, y una vez establecidas llevan a cabo el agrupamiento, acumulación y multiplicación celular (Corrigan *et al.*, 2007). Además, al unirse con el PNAG incrementan la resistencia de las biopelículas sobre los sanitizantes comunes.

2.3. Desventajas de los Antibacterianos Convencionales en la Desinfección de Biopelículas de *S. aureus*.

Los sanitizantes son definidos como sustancias o compuestos que inhiben el crecimiento o reproducción de los microorganismos (Sanginés Franchini, 2009). Estas sustancias son usadas en las industrias alimentarias para evitar la contaminación de las superficies de procesamiento debido a la proliferación de bacterias patógenas (Toro, 2013; Pinilla *et al.*, 2018; Alvarez *et al.*, 2019). Dentro de los más utilizados, se encuentran el hipoclorito de sodio y el cloruro de benzalconio; los cuales, se consideran como agentes antibacterianos altamente efectivos debido a que pueden dañar la pared bacteriana, la membrana citoplasmática, inhibir la síntesis de proteínas, la replicación del ADN y el metabolismo bacteriano (Esteve *et al.*, 2017). Por otra parte, sanitizantes como el hipoclorito de sodio son comúnmente utilizados en la industria alimentaria por su eficacia contra bacterias como *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* (Ozdemir *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2011) Sin embargo, la exposición a estas sustancias puede desencadenar daños en la salud del consumidor.

El uso de sanitizantes como el cloruro de benzalconio y el hipoclorito de sodio representan un riesgo inminente para la salud de los consumidores debido a que pueden ocasionar desde daños leves como enrojecimiento y ardor en la garganta, hasta problemas mayores como intoxicación o exposición a subproductos carcinogénicos (Cuadro 1) (Medicine, 2019). Además, su uso constante provoca corrosión incluso en las superficies de acero inoxidable; esto es asociado con su uso a pH ácidos debido a que aumenta su efectividad. Al aplicarlos en superficies de acero, provocan una reacción de óxido-reducción en el cual el metal se oxida formando iones metálicos y electrones libres (Popov, 2015). Por otro lado, su eficacia puede verse afectada cuando se encuentran en presencia de materia orgánica, debido a que al entrar en contacto con residuos de procesamiento suelen desactivarse a causa de interacciones electroestáticas que impiden su paso a través de las biopelículas (Silva, 2017). A pesar de estas desventajas, estos sanitizantes se siguen implementando de forma regular en concentraciones reguladas mediante el análisis de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y de inactivación de biopelículas (CMIB) tal y como se muestra en el Cuadro 2. En donde se ha determinado que, debido a la protección de las biopelículas, estos sanitizantes pierden su efecto a causa de las barreras de exopolímeros.

Cuadro 1. Desventajas de los antibacterianos comunes utilizados en la industria alimentaria

Sanitizante	Desventaja	Referencia
Cloruro de benzalconio	Tóxico a concentraciones mayores de 0.06%	NOM-243-SSA1-2010
Hipoclorito de sodio	- Alta toxicidad - Corrosión - Desactivación en contacto con materia orgánica	Silva-Barrera, 2017
Peróxido de hidrógeno	Poco efectivo a concentraciones menores de 2%	Moreno <i>et al.</i> , 2007

Como se puede observar en el Cuadro 2, sanitizantes como el hipoclorito de sodio y el cloruro de benzalconio no tienen efecto sobre las biopelículas ya formadas de bacterias como *S. aureus* y *S. Typhimurium*. Por otro lado, cuando la bacteria se encuentra descubierta permite la internalización de los sanitizantes lo que los hace efectivos hasta en un 99.9% (Espina *et al.*, 2017). No obstante, el uso recurrente de estos sanitizantes los convierte en los principales precursores de la resistencia de esta bacteria debido a características intrínsecas, adaptaciones genéticas o fenotípicas (Bridier *et al.*, 2011). A diferencia de sus contrapartes planctónicas, las células sésiles al estar recubiertas por las capas de biopolímeros aumentan su resistencia a los sanitizantes hasta 1000 veces, lo que vuelve más difícil su inactivación (Potera, 2010).

Cuadro 2. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y de inactivación de biopelículas (CMIB) de sanitizantes comunes sobre las células planctónicas y biopelículas de diversas bacterias

Compuesto	Bacteria	CMI (mg/mL)	CMIB (mg/mL)	Referencia
Cloruro de benzalconio	<i>S. Typhimurium</i>	0.08	Sin efecto	Fazlara y Ekhtelat, 2012
	<i>S. aureus</i>	0.0015	0.003	Khelissa, Abdallah, Jama, Gharsallaoui, & Chihib, 2019
Hipoclorito de sodio	<i>S. aureus</i>	1-4	Sin efecto	Kawamura <i>et al.</i> , 2019
	<i>S. Typhimurium</i>	0.25	Sin efecto	Corcoran <i>et al.</i> , 2014

La resistencia provocada por las biopelículas se atribuye a que las capas de biopolímeros impiden el paso de los sanitizantes lo que imposibilita el contacto con las células embebidas (Espina *et al.*, 2017). Además, cuando la biopelícula se encuentra en una etapa madura la densidad celular aumenta, lo que disminuye la cantidad de oxígeno presente en el microambiente, lo que activa la respiración anaerobia de esta bacteria (Araújo *et al.*, 2011). Al activar este mecanismo, las células liberan proteínas ribosomales, ácido fórmico, lactato y acetato que forman uniones electrostáticas con ácidos teicoicos de la pared celular, asparagina, glutamina y proteínas ribosomales que estabilizan las biopelículas. (Graf *et al.*, 2019). Durante este proceso también se libera ADN, que al unirse con superficies aniónicas aumenta la viscosidad de la matriz de exopolímeros (Bridier *et al.*, 2015). Todo esto incrementa la unión entre las proteínas de membrana y el PNAG dificultando su separación.

Las uniones electrostáticas que se establecieron durante este proceso tienen un papel fundamental en la desinfección. Estas barreras electrostáticas cargan a la biopelícula positivamente, lo que provoca un efecto repelente al entrar en contacto con antibacterianos catiónicos como el cloruro de benzalconio o el hipoclorito de sodio (Sadekuzzaman *et al.*, 2015). Igualmente, cuando se aplican sanitizantes catiónicos sobre biopelículas aniónicas, estos se unen fácilmente con los productos de fermentación lo que impide el paso de éstos a través de las biopelículas (Figura 5) (Bridier *et al.*, 2011). Debido a esto, se han buscado alternativas naturales que sean efectivas para inactivar las barreras de biopolímeros y que también sean una alternativa segura para el consumidor.

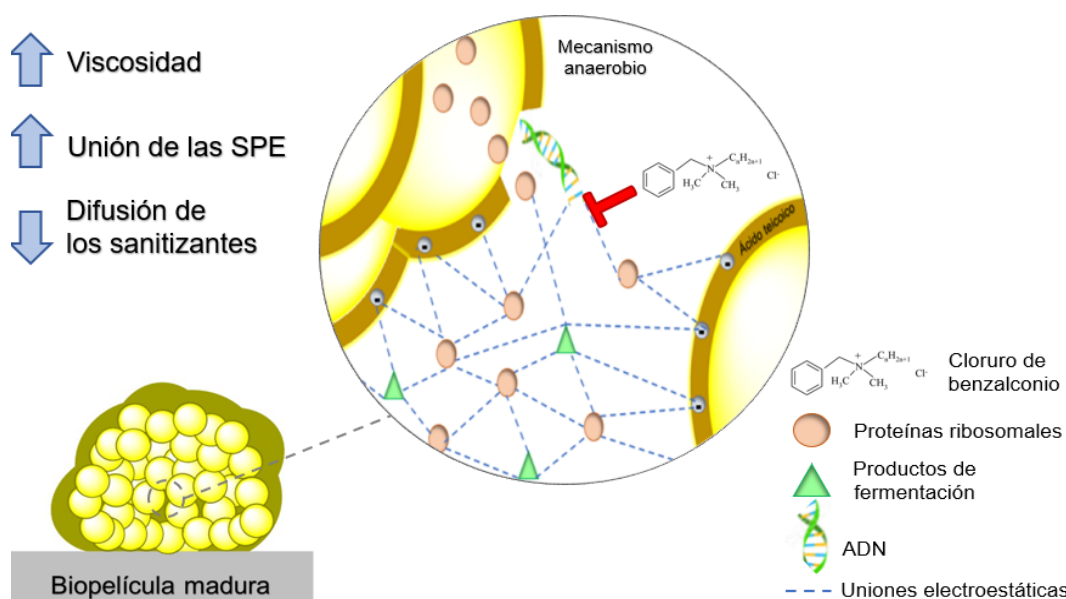


Figura 5. Efecto de las uniones electrostáticas sobre la difusión de sanitizantes comunes. Las proteínas ribosomales, productos de fermentación, y el ADN interaccionan con el ácido teicoico lo que genera una barrera electrostática que impide la difusión de los sanitizantes sobre las biopelículas mediante fuerzas de repulsión y atracción.

También, es habitual el uso de antibióticos para contrarrestar la actividad de este patógeno. Sin embargo, se ha demostrado que la presencia de biopelículas también puede afectar su acción (Singh *et al.*, 2016). Al igual que con los desinfectantes, la propagación de antibióticos está principalmente limitada por interacciones iónicas. Sin embargo, existen otros factores, como mutaciones intrínsecas o adquiridas, mediadas por la aplicación excesiva de estos compuestos (Singh *et al.*, 2010). Entre los mecanismos de resistencia adquiridos se encuentran la permeabilidad celular selectiva, la producción de β -lactamasas y las bombas de flujo. Estos factores tienen una influencia relevante en la difusión de algunos antibióticos β -lactámicos, por ejemplo, la producción excesiva de β -lactamasas permite que los antibióticos se degraden tan pronto como ingresan a este microambiente (Guo *et al.*, 2020). Esto demuestra que incluso los antibióticos más potentes suelen ser ineficaces cuando las bacterias están protegidas por biopelículas. Por ello, se sugiere el uso de enzimas hidrolíticas para reducir la resistencia provocada por las biopelículas, promoviendo así la eficacia de los desinfectantes y antibióticos.

Con el fin de prevenir la exposición del consumidor a compuestos dañinos además de prevenir el desarrollo de la resistencia bacteriana, se han implementado aceites esenciales y extractos de plantas como agentes antibacterianos (Bai *et al.*, 2019; Vázquez *et al.*, 2019). Con el fin de

establecer una concentración que afecte la viabilidad bacteriana se han determinado las CMI de extractos de plantas como: *Cinnamomun zeylanicum* (canela), *Backhousia citriodora* (mirto limón), *Cymbopogon citratus* (té de limón), *Lippia alba* (hierba negra) y *Laurus nobilis* (laurel), sobre las células planctónicas de *S. aureus* (Cuadro 3). En estos estudios se encontró que la mayoría de los extractos de plantas necesitan concentraciones más altas para afectar la viabilidad bacteriana a comparación de los sanitizantes comunes, a excepción de los extractos de mirto limón y té de limón donde su componente mayoritario es el citral (Espinoza *et al.*, 2017; Macassi *et al.*, 2017; Silva, 2017). El citral es un terpeno lipofílico que ha demostrado ser efectivo debido a su facilidad para atravesar la membrana bacteriana (Quintana Rojas, 2014; Aylas Canicela, 2017). No obstante, cuando *S. aureus* se encuentra recubierto por las biopelículas, las células planctónicas no son afectadas, lo que dificulta el proceso de desinfección. Puesto que la mayoría de los sanitizantes se encuentran enfocados en la inactivación de las células en estado planctónico y no en la inactivación de las biopelículas formadas, surge la siguiente pregunta de investigación, ¿Cómo es posible eliminar la barrera de exopolímeros que protege a *S. aureus* de la desinfección?

Cuadro 3. Antimicrobianos naturales aplicados en células planctónicas de *S. aureus*

Extractos de plantas		CMI	Referencia
Nombre científico	Nombre común	(mg/mL)	
<i>Backhousia citriodora</i>	Mirto limón	0.075	Gupta <i>et al.</i> ,2017
<i>Lippia alba</i>	Hierba negra	12	Rodríguez <i>et al.</i> ,2018
<i>Laurusnobilis</i>	Laurel	200	Espinoza <i>et al.</i> ,2017
<i>Cymbopogon citratus</i>	Té de limón	0.0893	Quintana <i>et al.</i> ,2014
<i>Cinnamomun zeylanicum</i>	Canela	448	Aylas <i>et al.</i> ,2017

2.4. Acción Sinérgica de Celulasa, Papaína y Citral contra las Biopelículas de *S. aureus*

Las enzimas son proteínas con propiedades catalíticas, que aumentan la velocidad de una reacción química y no se consumen durante este proceso (Singh *et al.*, 2019). Debido a estas propiedades, se han utilizado ampliamente en los procesos de producción de alimentos. Recientemente, las enzimas hidrolíticas se han posicionado como aditivos de gran importancia en la fabricación de

detergentes para ropa, lo que ha supuesto un cambio importante en estas industrias. Desde entonces, se han utilizado proteasas, lipasas y celulasas para eliminar diversos residuos en el área clínica y agroindustrial (Gutiérrez, 2019). Las celulasas y proteasas suelen ser más estables que las enzimas generales que operan a temperaturas relativamente altas, lo que aumenta su potencial biotecnológico (Sukumaran *et al.*, 2009). Por esta razón, estas enzimas se han implementado en la producción de detergentes y se han definido como mezclas estables (Panouillé *et al.*, 2006). Hasta ahora, la información sobre el comportamiento de estas enzimas en presencia de agentes antibacterianos es muy escasa, sin embargo, fue hasta 2016 que se comenzó a investigar su uso como coadyuvantes en procesos de desinfección.

La celulasa pertenece a la familia de la glucósido hidrolasa, y es secretada por varios microorganismos celulolíticos (Sukumaran *et al.*, 2009). Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces endo- β 1-4 y β 1-6-D-glicosídicos en celulosa, lignina, glucosamina y celotriosa (Brunecky *et al.*, 2013). La celulasa tiene una amplia gama de aplicaciones, algunas de las cuales son la producción de bioetanol, la fabricación de papel y recientemente aplicada en la extracción de compuestos bioactivos de plantas y el tratamiento de antibiopelícula (Rashmi *et al.*, 2017). Estudios llevados a cabo por Lim, Koo, Kim y Kim en 2019 y Wang *et al* en 2016 demostraron que la celulasa a 20 mg/ml ha sido eficaz para inactivar las biopelículas de *E. coli* O157: H7 en un 35% y un 85%. en *Salmonella spp.* Además, en estudios hechos por Fleming., *et al* en 2017 se demostró que las propiedades hidrolíticas de la celulasa inactivan la parte compuesta por polisacáridos hasta un 60% de las biopelículas maduras de *S. aureus*.

La hidrólisis de los carbohidratos se encuentra mediada por la interacción de la celulasa con los enlaces glucosídicos β -1,6 del PNAG, como se muestra en la Figura 6 (Fleming *et al.*, 2017). El sitio activo de la celulasa se encuentra conformado por los residuos catalíticos Glu116 y Glu204 así como varios subsitios mostrados en la Figura 7. Se hipotetiza que cuando la celulasa entra en contacto con el PNAG de las biopelículas de *S. aureus* se forma el complejo enzima-sustrato, en donde este polímero interacciona primeramente con los subsitios de la enzima mediante los grupos hidroxilo presentes en los anillos de glucosa que permiten el apilamiento del polímero. Una vez unido, el sitio activo y los subsitios llevan a cabo la hidrólisis de hasta seis unidades de glucosa (Khademi *et al.*, 2002). Mediante la hidrólisis del PNAG se logra debilitar la protección de las células. Sin embargo, las proteínas presentes en la matriz polimérica dificultan la liberación de las células embebidas.

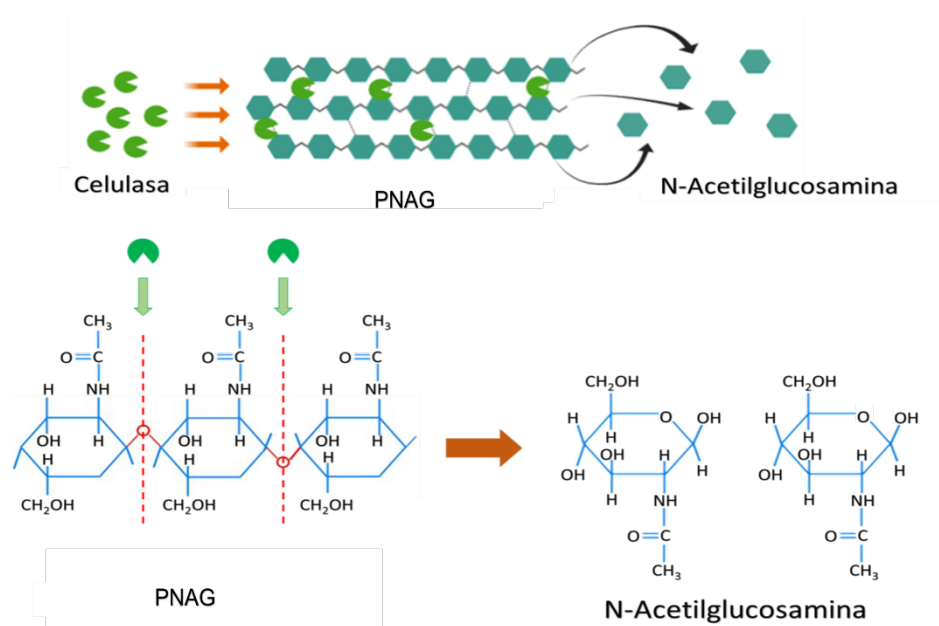


Figura 6. Hidrólisis de polisacáridos que conforman las biopelículas de *S. aureus* utilizando celulasa. La adición de la celulasa provocará la hidrólisis de los enlaces glucosídicos del PNAG presente en la matriz extracelular generando monómeros de N-acetilglucosamina.

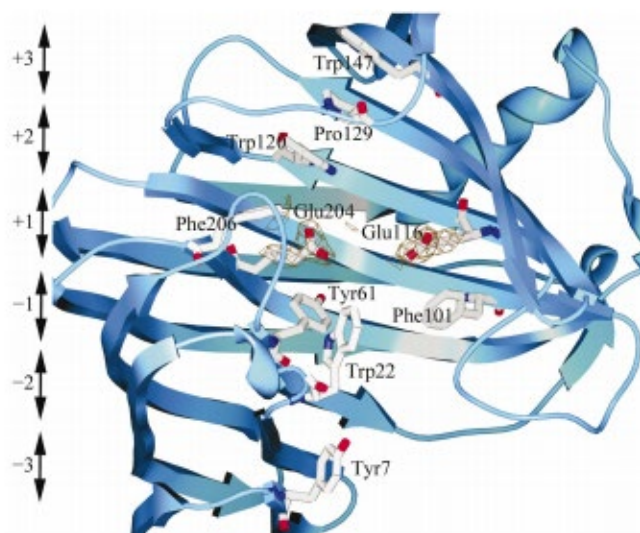


Figura 7. Sitio activo y subsitios de unión de la celulasa. El sitio catalítico de la celulasa está conformado por los residuos catalíticos Glu116 y Glu204. Los residuos aromáticos Tyr61 y Phe101 constituyen los subsitios de la enzima y se encargan de estabilizar los anillos de glucosa dentro de la enzima, mientras que los residuos Glu204, Glu158 y Trp22 contribuyen en la estabilización del PNAG para su hidrólisis (Khademi *et al.*, 2002).

Las enzimas proteolíticas como la papaína forman parte de la familia de las proteasas y se caracterizan por sus propiedades hidrolíticas sobre aminoácidos como la arginina y la lisina. Debido a esto, la papaína se ha utilizado como aditivo para ablandar la carne y elaborar vino blanco, entre otros procesos (Cheung *et al.*, 2008). Además, debido a su eficacia en la cicatrización de heridas, se le han atribuido propiedades antibacterianas. Sin embargo, en estudios posteriores se determinó que este comportamiento se debe al desbridamiento y la acción antiinflamatoria que ejerce la papaína sobre el tejido afectado, y no a las propiedades antibacterianas per se (Oliveira *et al.*, 2014). Aunque la papaína no es eficaz para inactivar las células, sus propiedades hidrolíticas la convierten en una opción frente a las capas de biopolímero formadas por proteínas de algunas bacterias.

La papaína se ha utilizado para la degradación de biopelículas compuestas de proteínas en *L. monocytogenes*. El uso de esta enzima ha sido eficaz, reduciendo hasta un 85% de estas exoproteínas (Nguyen & Burrows, 2014). También se ha comprobado su efectividad sobre las biopelículas de *S. aureus* en donde se ha logrado inactivar alrededor del 90% de las capas de proteína en las biopelículas de este patógeno (Oliveira *et al.*, 2014). Este mecanismo se atribuye a la hidrólisis de proteínas como las ClfA y ClfB que se encargan de la adhesión intercelular, y que son parte fundamental en el proceso de adhesión a las superficies; además de proteínas como SasG que se encargan directamente de la formación de biopelículas (Jan-Roblero *et al.*, 2017). Por lo cual, para interrumpir estas funciones se planteó la aplicación de la papaína sobre las biopelículas de *S. aureus* con el fin de hidrolizar las proteínas al interactuar con los aminoácidos lisina y arginina. Al degradar las uniones que dan estructura a estas proteínas, procesos como el agrupamiento o adhesión intercelular serían detenidos, lo que afectaría de forma significativa la estabilidad de las biopelículas en *S. aureus* (Figura 8).

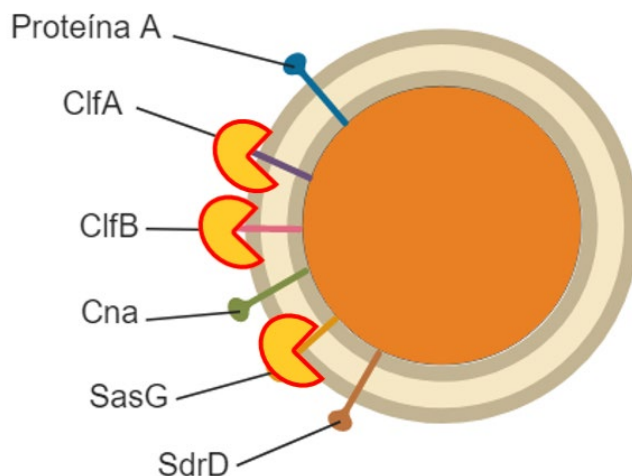


Figura 8. Hidrólisis de las proteínas de membrana de *S. aureus* utilizando papaína. La inactivación de las proteínas de membrana se lleva a cabo mediante la hidrólisis de los aminoácidos lisina y arginina presentes en la estructura de estas proteínas, lo que interrumpe la adhesión intercelular y a las superficies (Cervantes-García *et al.*, 2014).

El proceso por el cual se lleva a cabo la hidrólisis de estas proteínas se atribuye a la afinidad de la papaína con los aminoácidos arginina y lisina presentes en las proteínas de membrana de *S. aureus*; las cuales podrían actuar como sustrato para esta enzima. Cuando la papaína entra en contacto con las biopelículas de *S. aureus* podría unirse a la triada catalítica Cys-His-Asn provocando la unión no covalente de la enzima libre y el sustrato. Al formarse el complejo enzima-sustrato, el grupo tiol del sitio activo es desprotonado por un aminoácido adyacente con una cadena lateral básica como lo son la Arg y Lys (Morcelle *et al.*, 2009). Posteriormente, la enzima pasa por un proceso de acilación como resultado de un ataque nucleófilo por parte del azufre aniónico de cisteína desprotonado sobre el sustrato carbono carbonílico que se encuentra en Arg y Lys, y uno de los dos productos de la hidrólisis es liberado. Para la liberación del producto restante, se restaura el residuo de histidina a su forma desprotonada. Finalmente, se lleva a cabo un proceso de desacilación en el cual el enlace tioéster reacciona con una molécula de agua para liberar el segundo producto y de esta forma la enzima vuelve a su estado libre (Ndidi, 2013). El proceso anterior es repetido por la enzima sobre las proteínas de membrana logrando afectar la adhesión intercelular y a las superficies (Figura 9).

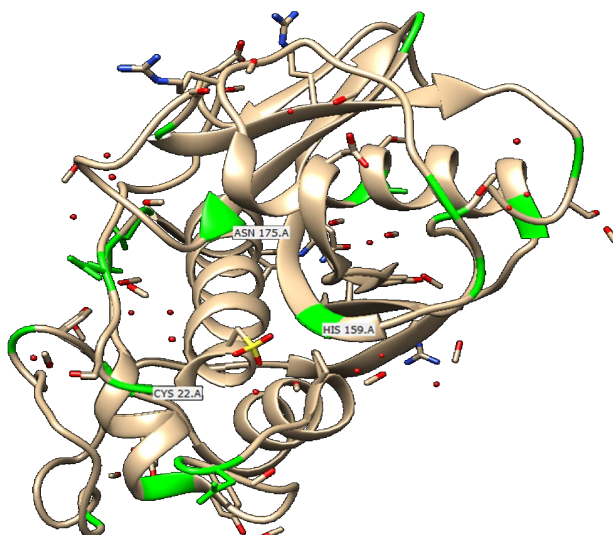


Figura 9. Sitio activo de la papaína. Los aminoácidos Cys 22.A, His159A y Asn175 A conforman el sitio activo de la papaína (ID: 9PAP). Es aquí donde el sustrato se une al grupo tiol, y el producto de la hidrólisis es liberado en dos partes: la primera mediante la deprotonación por el ataque nucleofílico y la segunda por la hidrólisis del enlace tioéster con una molécula de agua.

Algunos estudios han analizado la posibilidad de incluir enzimas como nueva tecnología en el área clínica. Como se muestra en el Cuadro 4, el uso de diferentes enzimas como DNasas, pectinasas y algunas proteasas se ha utilizado en la degradación de diferentes biopelículas de bacterias como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Ito *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2019). La serratiopeptidasa es una metaloproteasa que tiene afinidad por una amplia gama de aminoácidos, lo que aumenta su eficacia en diferentes sustratos en comparación con otras enzimas que requieren un sustrato más específico. Sin embargo, su efectividad puede verse fácilmente afectada dependiendo de los métodos de extracción y purificación (Gupte & Luthra, 2017). Adicionalmente, las enzimas cuyo método de acción es más selectivo, como la lisostafina, son efectivas contra las biopelículas de *S. aureus*, sin embargo, se ha registrado evidencia de resistencia bacteriana (Bastos *et al.*, 2010). Por otro lado, no hay evidencia de resistencia causada por la celulasa y la papaína.

Cuadro 4. Enzimas utilizadas contra diferentes biopelículas bacterianas y sus puntos de corte

Enzima	Tipo de enzima	Punto de corte	Biopelícula afectada	Referencia
Papaína	Proteasa	Arg- Lys	<i>S. aureus</i>	Shokhen, et al 2009
Celulasa	Hidrolasa	β 1-4	<i>S. aureus</i>	Fleming <i>et al</i> 2017
DNasa I	Desoxirribonucleasa	Enlace fosfodiéster en el esqueleto del ADN	<i>L. monocytogenes</i>	Rahman <i>et al</i> 2011
Pronasa	Proteasa	Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr.	<i>L. monocytogenes</i>	Sweeney & Walker 1993
Pectinasa	Depolimerasa	α -1,4-enlaces glucosídicos	<i>L. monocytogenes</i>	Singh & Pandey, (2019)
Serratio-peptidasa	Metaloproteasa	Asn-Gln, CysSO 3H-Gly, Arg-Gly, Tyr-tyr, His-Leu, Gly-Ala, Ala-Leu, Tyr-leu, Gly-Gly, Phen-Tyr y Tyr-Thr	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina	Garcia <i>et al</i> 2018; Gupte & Luthra 2017
Lisostafina	Endopeptidasa	Gly or pentaglicina	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina	Bastos <i>et al</i> (2010)
Subtilisina A	Endopeptidasa	Gln, His, Ser, Tyr, Cys, Phe, Lys, Leu, Ala	<i>P. aeruginosa</i>	Ito <i>et al</i> (1998)

Debido a que enzimas como la celulasa y la papaína no tienen propiedades antibacterianas, su uso sobre las biopelículas en ausencia de un agente bactericida solamente liberaría las células sésiles y aumentaría su proliferación. Por lo cual, se planteó el uso de citral dentro de esta combinación debido a sus propiedades antibacterianas sobre células en estado planctónico de *S. aureus*. El citral es una mezcla de dos isómeros geométricos; geranial y neral, que componen entre el 65 y 85% del aceite de *C. citratus* (PubChem, 2019). Debido a sus cualidades para interrumpir la reproducción de la bacteria y su efecto sobre la viabilidad de las células con cantidades menores a las de otros aceites, se seleccionó como el mejor candidato para inactivar las células sésiles tras la degradación enzimática de las biopelículas (Rodríguez & Segura, 2018). Estas cualidades son atribuidas a los grupos metilo presentes en su estructura; los cuales, le otorgan propiedades lipofílicas y le permiten atravesar la membrana de la célula lo que causa la depolarización de la bacteria y la muerte celular (Figura 10) (Shi *et al.*, 2016; Ortega-Ramirez *et al.*, 2017). Por lo cual, se establece que la

combinación de estos componentes en una mezcla podría ser una forma eficaz para la inactivación de las biopelículas de *S. aureus*.

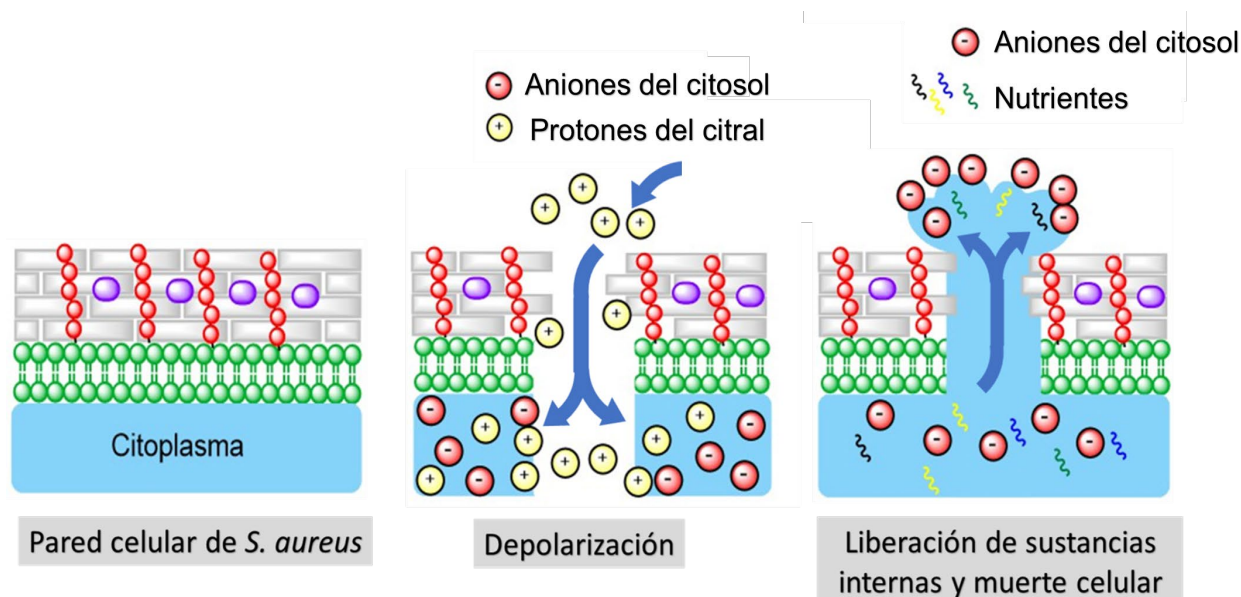


Figura 10. Actividad antibacteriana del citral contra las células sésiles de *S. aureus*. La interacción de los extremos lipofílicos del citral le permiten permear a través de la membrana lo que conlleva a un proceso de depolarización en donde se crean poros, lo que permite la liberación de los iones y nutrientes que se encontraban dentro de la célula causando la muerte (Shi *et al.*, 2016).

Además existe evidencia de que la adición de metabolitos secundarios de plantas a los detergentes enzimáticos no muestra un efecto antagónico (Panandiker, 1997). Tal es el caso de las celulasas que han sido utilizadas para la extracción de aceites esenciales de té de limón, lo que provocó el aumento del rendimiento de la extracción (Rashmi *et al.*, 2017). Además, la combinación de estos compuestos no interfirió con su actividad enzimática, lo que explica su uso en diversos productos. Sin embargo, es importante mencionar que el uso de algunos aceites esenciales en detergentes solo se ha contemplado para proporcionar un aroma agradable sin considerar sus propiedades antibacterianas.

Aunque el uso de aceites esenciales y compuestos naturales previene el desarrollo de resistencia bacteriana, se debe mencionar la posibilidad de que estos componentes interfieran con la actividad enzimática. Se sabe que algunos terpenos interfieren con la actividad enzimática, por ejemplo, el citral fue un inhibidor eficaz de las celulosa sintasas de bacterias como *E. coli* y *Cronobacter*

sakazakii (Shi *et al.*, 2017). Además, se ha descubierto que otros compuestos como la quercetina son eficaces para interrumpir la función de algunas quinasas como PrkA en *L. monocytogenes* (Vazquez-Armenta *et al.*, 2020). Sin embargo, la inhibición está determinada por el tipo y sitio de unión a enzimas como la papaína; algunos terpenos no podrían formar enlaces covalentes con el sitio activo y podrían considerarse inhibidores competitivos reversibles (Villafañe, 2008). Por lo tanto, es recomendable realizar análisis experimentales para establecer las posibles interacciones al combinar agentes antibacterianos vegetales con enzimas hidrolíticas, la estabilidad de su combinación y los posibles mecanismos de aplicación.

La combinación de enzimas con antibióticos fue estudiada por Hogan *et al.*, 2017 en donde se mostró un efecto sinérgico al combinar vancomicina y rifampicina con endopeptidasas y metalopeptidasas como la lisostafina y serratiopeptidasa contra biopelículas de *S. aureus* resistente a metilicina. Además, estudios realizados por Lefebvre *et al* en 2016 mostraron que la combinación de enzimas como Esperase® (endo-peptidasa), con Octenilin® (octenidina) y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) fue útil para inactivar las biopelículas de *P. aeruginosa*. Estos estudios atribuyeron el efecto anti-biopelícula a la capacidad de las enzimas para degradar el polímero de N-acetilglucosamina y las proteínas de unión, y a la acción antibacteriana de los antibióticos aplicados. Sin embargo, en estos estudios no se abordaron sus mecanismos de acción, interacciones moleculares, catálisis enzimática y la posible resistencia bacteriana a los antibióticos utilizados.

Los antibióticos o desinfectantes clorados en combinación con enzimas provocan en la mayoría de los casos efectos antagonistas, al inhibir la actividad enzimática (Rozemeijer *et al.*, 2015; Lefebvre *et al.*, 2016). Esto se atribuye al pH de estas sustancias que hace imposible su actividad hidrolítica, Por ejemplo, Fallon *et al* en 2019 afirmaron el uso de papaína, celulasas, lipasas y otras enzimas con antibióticos como vancomicina, metilicina o compuestos químicos como cloruro de benzalconio, peróxido de hidrógeno, alcoholes, metales pesados y sales podrían inactivar las biopelículas de *S. aureus*; sin embargo, no se mostraron resultados experimentales que prueben dicho comportamiento y tampoco se consideró el riesgo que provocan estos compuestos a la salud de los consumidores. Por otro lado, Manyak, Weiner, Carlson y Quintero en 2004 establecieron el uso de proteasas, lipasas e hidrolasas para la prevención de caries dental, enfermedad periodontal y fibrosis quística; sin reportar efectos antagónicos y considerando su aplicación como seguras para los consumidores. Lo anterior confirma el interés que ha generado la degradación de las biopelículas mediante una combinación de enzimas; no obstante, pocas de ellas se han dirigido a la industria alimentaria.

Por todo lo anterior se propuso el siguiente sistema de estudio ejemplificado en la Figura 11. Primeramente, se estableció el uso de la celulasa para hidrolizar los enlaces β -1-6 del PNAG afectando la estabilidad de las biopelículas. Posteriormente, se planteó el uso de la papaína con el fin de afectar la estructura y función de las proteínas de membrana al interaccionar con los aminoácidos arginina y lisina presentes en proteínas como ClfA, ClfB y SasG, lo que afecta la adhesión intercelular y a la superficie. Finalmente, para afectar la viabilidad de las células liberadas por el tratamiento enzimático se propuso el uso del citral como agente antibacteriano, que debido a sus propiedades hidrofóbicas le permite permear la membrana celular provocando la salida de nutrientes del interior de la célula y desencadenar la muerte de la bacteria sin afectar la actividad enzimática.

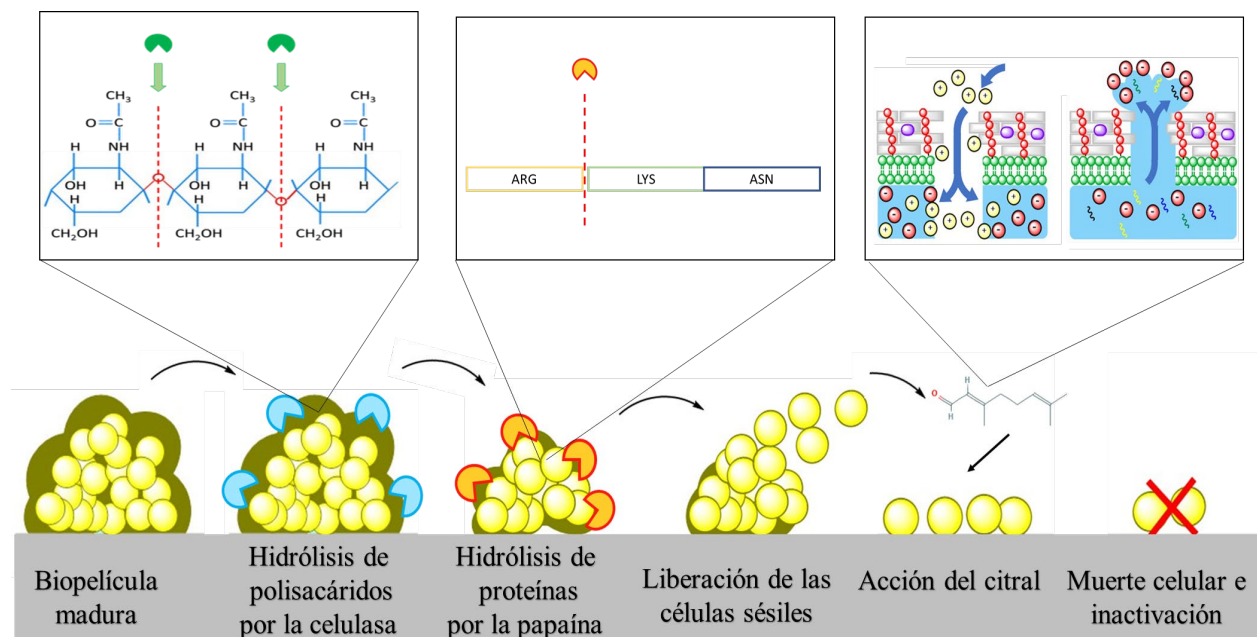


Figura 11. Sistema de estudio propuesto del efecto sinérgico de la combinación de celulasa, papaína y citral para la inactivación de biopelículas de *S. aureus*. La inactivación de las biopelículas se resume en la contribución de cada uno de los componentes en distintas partes de la biopelícula madura. 1) Primeramente, se planteó la hidrólisis de polisacáridos por parte de la celulasa al romper los enlaces glucosídicos β 1-6 del PNAG. 2) Seguido a esto, se estableció la posible interacción de la papaína con los aminoácidos Arg y Lys presentes en proteínas de membrana como ClfA, ClfB y SasG con el fin de afectar la adhesión intercelular y a las superficies. 3) Finalmente, se hipotetizó el ataque del citral sobre las células liberadas por la hidrólisis enzimática; debido a sus propiedades lipofílicas, el citral puede internarse dentro de las células, lo que provoca la depolarización de la membrana bacteriana causando la salida del contenido celular, logrando afectar la viabilidad de la bacteria y la inactivación de las biopelículas de *S. aureus*.

3. HIPÓTESIS

La combinación de celulasa, papaína y citral presentará un efecto sinérgico sobre la inactivación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* en superficies de acero inoxidable grado alimentario.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto desinfectante de la combinación de celulasa, papaína y citral para la inactivación de las biopelículas de *Staphylococcus aureus* en superficies de acero inoxidable grado alimentario.

4.2. Objetivos Específicos

Determinar la capacidad antibacteriana individual de celulasa, papaína y citral contra células planctónicas de *Staphylococcus aureus*.

Determinar la capacidad antibacteriana individual de celulasa, papaína y citral contra células viables en biopelículas preformadas de *Staphylococcus aureus*.

Evaluar el efecto antibacteriano de la combinación de celulasa, papaína y citral contra biopelículas de *Staphylococcus aureus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Etapa 1: Capacidad Antibacteriana Individual y Combinada de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas y Biopelículas de *S. aureus*

5.1.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas de *S. aureus*

Se determinó la capacidad antibacteriana de celulasa, papaína y citral (Sigma Aldrich, Toluca, México) contra *Staphylococcus subsp. aureus* Rosenbach (ATCC 6538) utilizando la técnica de microdilución en caldo (Vazquez-Armenta, 2019). El inóculo antibacteriano se preparó a partir de cultivos en fase exponencial de 18 h en caldo tripticasa de soya (TS) ajustando la carga bacteriana a 10^6 UFC/mL. Por separado se prepararon diferentes concentraciones en un rango de 0-2 mg/mL para ambas enzimas, y para citral de 0-1 mg/mL en caldo TS. Posteriormente, se colocaron 5 μ L del inóculo y 295 μ L de cada concentración de los compuestos en pozos de microplaca (Costar, 96-pozos, Sigma Aldrich, Toluca, México), y se dejaron en incubación durante 24 h a 37 °C. La concentración más baja de celulasa, papaína y citral que inhibió el crecimiento visible de *S. aureus* se consideró como la CMI (mg/mL). Mientras que la CMB se determinó sembrando alícuotas de la CMI y tres concentraciones más altas en agar sal-manitol (ASM) para el conteo de células viables, éstas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. La concentración más baja de cada uno de los compuestos en la cual la bacteria no fue capaz de crecer se consideró como la CMB (mg/mL). Este experimento consistió en tres réplicas biológicas con tres repeticiones técnicas (Tapia-Rodriguez *et al.*, 2019).

5.1.2. Formación de Biopelículas Maduras de *S. aureus*

El tiempo para obtener biopelículas completamente formadas en acero inoxidable se determinó

previo a la aplicación de los tratamientos. Se utilizaron cupones de acero inoxidable No. 304 (2.6 cm²) para simular la superficie y facilitar la adhesión bacteriana, éstos fueron colocados en tubos de ensayo con 5 mL de caldo TS y se les añadieron 83.3 µL del inóculo de *S. aureus* (10⁶ UFC/mL) para iniciar la formación de biopelículas. Se cuantificó el número de células viables adheridas por conteo en placa en un periodo de 48 h en los intervalos de 0, 1.5, 2, 4, 8, 24 y 48 h. Los resultados de células viables adheridas fueron expresados en Log UFC/cm² (Vázquez-Armenta *et al.*, 2017).

5.1.3. Biopelículas de *S. aureus* tratadas con Celulasa, Papaína y Citral

Las biopelículas fueron preformadas por 24 h en cupones de acero inoxidable como se menciona en el apartado 5.1.2. A continuación, se retiraron los cupones del caldo y se trasladaron a tubos con las diferentes concentraciones de enzimas (0-1 mg/mL) y citral (0-10 mg/mL), utilizando solución salina al 1% para el control; posteriormente, los tubos fueron homogenizados en un agitador (180 rpm a 37°C) durante 1 h. Después, para la liberación de las células débilmente adheridas los cupones fueron colocados en otro juego de tubos con solución salina y se agitaron durante 4 tiempos de 5 s utilizando un agitador orbital (IKA Vortex 2, NC, EUA). Posteriormente, se trasladaron a otro juego de tubos en las mismas condiciones y se trataron con un baño de ultrasonido (2410RDTH. BRANSON, Toluca, México) (40 kHz) durante 5 min para la cuantificación de las células viables remanentes en las superficies de acero inoxidable (LogUFC/cm²). Este experimento sirvió para conocer la concentración mínima de inactivación de biopelículas (CMIB) de los tratamientos individuales que fue efectiva para afectar las biopelículas preformadas de *S. aureus* (CMIB, mg/mL). El experimento se llevó a cabo por duplicado.

El efecto de la combinación de celulasa, papaína y citral contra las biopelículas pre formadas se determinó con la concentración fraccional de inactivación (CIF) mediante el método de tablero de ajedrez con algunas modificaciones (Bernal-Mercado *et al.*, 2018). Este método compara la eficacia en la combinación de los tratamientos en diferentes proporciones con respecto a su actividad individual. Primeramente, se llevaron a cabo mezclas binarias (celulasa + papaína, celulasa + citral, papaína + citral), combinando diferentes fracciones de sus valores individuales de CMIB (0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2x CMIB). La combinación binaria más efectiva fue seleccionada para su combinación con el tercer componente. Posteriormente, la combinación ternaria más

efectiva que tuviera la concentración más baja y la mayor actividad fue seleccionada como una combinación sinérgica. Las biopelículas preformadas fueron expuestas a los tratamientos, y las células viables adheridas fueron cuantificadas como se describió anteriormente. La CIF fue determinada por la sumatoria del efecto de cada compuesto en la combinación con respecto a su efecto individual, utilizando la siguiente ecuación:

$$\Sigma CIF = \frac{\text{CMIB A combinación}}{\text{CMIB A individual}} + \frac{\text{CMIB B combinación}}{\text{CMIB B individual}} + \frac{\text{CMIB C combinación}}{\text{CMIB C individual}} \quad (1)$$

Ecuación 1. Concentración fraccional de inactivación de celulasa, papaína y citral

Donde la CMIB_A, fue la concentración mínima de celulasa que se necesita para degradar las biopelículas formadas. La CMIB_B, fue la concentración mínima de papaína para degradar las biopelículas preformadas; y la CMIB_C, fue la concentración mínima de citral para degradar las biopelículas preformadas.

Las interacciones entre celulasa, papaína y citral se clasificaron de acuerdo con los valores de la CFI utilizando la siguiente escala:

Sinergia si el ΣCIF fue ≤ 0.5 .

Aditivo si el ΣCIF fue > 0.5 ó < 1 .

Indiferente si el ΣCIF fue ≥ 1 ó ≤ 4 ;

y antagonismo si el ΣCIF fue > 4 (Bernal-Mercado *et al.*, 2018).

5.1.4. Cambios Microscópicos en las Biopelículas de *S. aureus* durante la Formación y Exposición a los Tratamientos con Celulasa, Papaína y Citral

Los cambios microscópicos durante el proceso de formación de biopelículas y aquellos causados por los tratamientos sobre los agregados bacterianos fueron visualizados utilizando un microscopio óptico invertido Axio Vert 1, con una magnificación de 600x. Para este experimento se utilizaron

cubreobjetos de cristal para la adherencia bacteriana, en sustitución del acero inoxidable, para facilitar el paso de la luz que se necesita en este tipo de microscopía. Los cubreobjetos fueron retirados en los intervalos de tiempo previamente establecidos en la sección 5.1.2. Por otro lado, las biopelículas preformadas durante 24 h en las superficies del cubreobjetos fueron expuestas a los tratamientos durante 1 h en agitación constante como se describió en la sección 5.1.3. Estos experimentos se realizaron por duplicado (Vázquez-Armenta *et al.*, 2017). Posteriormente, los cubreobjetos fueron lavados con agua destilada y teñidos con cristal violeta durante 30 min previo a su visualización microscópica.

5.1.5. Diseño Experimental

Los datos extraídos del proceso de formación de biopelículas a diferentes tiempos de incubación (1.5, 2, 4, 8, 24 y 48 h) fueron analizados utilizando un diseño completamente al azar donde la variable de respuesta fueron las células viables adheridas (Log UFC/cm²). Por otro lado, el efecto individual y combinado de los tratamientos fue analizado utilizando un diseño completo al azar, tomando como variable de respuesta las células viables remanentes sobre el acero inoxidable (Log UFC/cm²). Para todas las pruebas se realizó un ANOVA ($p \leq 0.05$) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer utilizando el software estadístico NCSS 2012.

5.2. Etapa 2: Interacciones Moleculares entre Celulasa, Papaína y Citral como Indicadores de Estabilidad de su Combinación

5.2.1. Acoplamiento Molecular entre la Celulasa y la Papaína

Se utilizaron las estructuras tridimensionales de la celulasa y la papaína importadas desde la base

de datos Protein Data Bank (91KS5 y 9PAP, respectivamente) para llevar a cabo el arreglo molecular utilizando el servidor ClusPro 2.0 (Vajda *et al.*, 2017). Éste utilizó el algoritmo PIPER para seleccionar la conformación con una menor energía de interacción tomando en cuenta el potencial de repulsión basado en las fuerzas de van der Waals y el potencial DARS (Decoy As the Reference State) o señuelo como estado de referencia (Chuang; *et al.*, 2008). Mediante el cual, PIPER seleccionó 10 arreglos moleculares que se asemejaron a la estructura nativa, así como la ecuación 2 para establecer el tipo de modelo para explicar el comportamiento intermolecular.

$$E = w1_{Erep} + w2_{Eatr} + w3_{Eelec} + w4_{EDARS} \quad (2)$$

Ecuación 2. Suma de los coeficientes de peso de la energía PIPER

5.2.2 Acoplamiento Molecular de los Complejos Celulasa-Citral y Papaína-Citral

Los modelos tridimensionales de la celulasa y la papaína se utilizaron para realizar un análisis de acoplamiento molecular (*docking*) entre el sitio de unión de ambas enzimas con el citral utilizando el complemento AutoDock Vina del programa Chimera 1.14 (Trott y Olson, 2010). Se llevó a cabo el análisis de acoplamiento molecular entre ambas enzimas y sus respectivos ligandos naturales: la lisina para la papaína (ID: 5962) y el PNAG para la celulasa (ID: 24139). La estructura 3D de los ligandos fue tomada de la base de datos PubChem (citral ID: 638011, lisina ID: 5962, PNAG: 24139) mientras que las enzimas fueron tomadas de Protein Data Bank. La energía de las estructuras (celulasa, papaína, citral, lisina, PNAG) se minimizó y se agregaron átomos de hidrógeno y cargas parciales utilizando la función Dock Prep. El área para el análisis de acoplamiento molecular fue de 79x88x17 Å para la celulasa y de 27x69x12 Å para la papaína, en estas zonas se ubicó el sitio activo de ambas enzimas. Para cada ligando se generaron 8 poses de las cuales se seleccionaron aquellas con la menor energía de unión y de RSDM.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Etapa 1: Capacidad Antibacteriana Individual de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas y Biopelículas de *S. aureus*

6.1.1. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida de Celulasa, Papaína y Citral contra Células Planctónicas de *S. aureus*

En este análisis se encontró que el citral fue el único tratamiento que logró inhibir el crecimiento bacteriano utilizando una concentración de 0.025 mg/mL, y logró afectar la viabilidad de las células planctónicas con 0.026 mg/mL. Mientras, la celulasa y la papaína no mostraron un efecto bacteriostático o bactericida contra las células planctónicas de *S. aureus* en las concentraciones evaluadas (>2 mg/mL). La efectividad del citral como agente bactericida se atribuye a las características hidrofóbicas de los grupos metilo en su estructura que le permiten permear a través de la membrana e internalizarse en las células (Zhang *et al.*, 2014). Una vez el citral se encuentra dentro de la célula, provoca la depolarización de la membrana e induce la liberación de iones y nutrientes, afectando la viabilidad de la bacteria (Ortega-Ramirez, 2013; Shi *et al.*, 2016). Además, este compuesto puede impedir la adaptación de la bacteria al medio ambiente debido a su efecto sobre la absorción de nutrientes o la síntesis de proteínas de membrana esenciales para la multiplicación celular (Ortega-Ramirez *et al.*, 2017). Sin embargo, se necesitan estudios más profundos para comprender los mecanismos por los cuales el citral ejerce su efecto antibacteriano sobre células en estado planctónico (Figura 12).

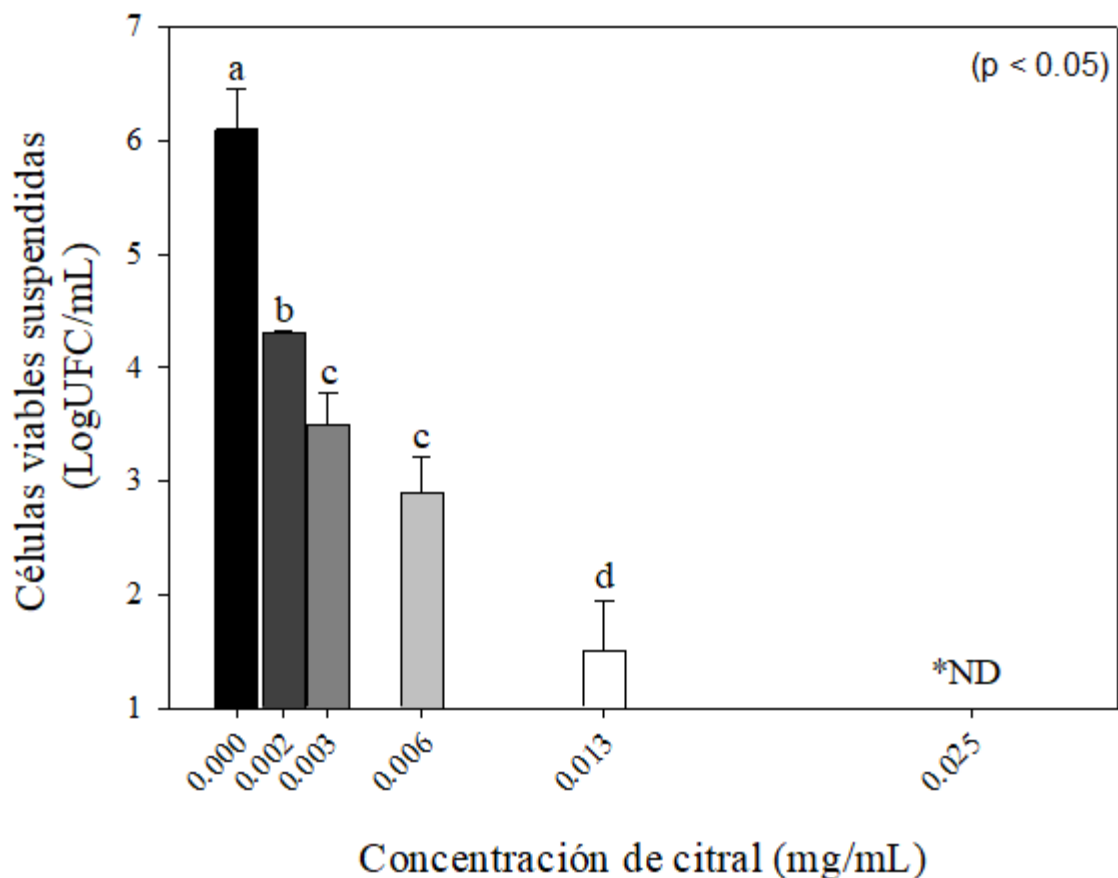


Figura 12. Células planctónicas viables expuestas a diferentes concentraciones de citral durante 24 h a 37°C. *Literales diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$. * ND: No detectado.

Debido al uso de la papaína en procesos de curación se le habían atribuido propiedades bactericidas. No obstante, estudios posteriores encontraron que sus propiedades de curación se deben al desbridamiento y la acción antiinflamatoria sobre el tejido afectado, y no a propiedades antibacterianas (Oliveira *et al.*, 2014). Esto fue confirmado por Watters *et al.*, en 2016 en donde describe que la papaína no tiene efecto antibacteriano sobre las células planctónicas de *S. aureus* en aislados clínicos. Lo anterior se puede atribuir a que la papaína no posee algún mecanismo que le permita afectar la conformación de las células, o la replicación celular. La capacidad hidrolítica de la papaína se limita a la interacción con proteínas que se encuentren de forma extracelular (Esti *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). Debido a que las proteínas de membrana de *S. aureus* no son sintetizadas por la célula hasta la etapa de adhesión a las superficies durante la formación de biopelículas, la papaína no cuenta con el sustrato necesario para llevar a cabo su actividad

hidrolítica (Otto, 2019).

Con relación a lo anterior, Fleming *et al.*, en 2017 utilizaron concentraciones de 0.025 mg/mL de celulasa para afectar las células planctónicas de *S. aureus* sin encontrar una respuesta positiva, lo cual se relacionó con una concentración muy baja del compuesto. Sin embargo, en el presente estudio se utilizaron concentraciones 10 veces mayores a las probadas anteriormente sin encontrar un efecto en la viabilidad de la bacteria. Esto se asocia a la ausencia de polisacáridos en las células libres, lo que impide la función hidrolítica de la celulasa. Debido a que la liberación de polisacáridos como PIA y PNAG se lleva a cabo una vez se inicia la formación de biopelículas, la celulasa no obtiene el sustrato necesario para llevar a cabo su función hidrolítica (Arbeleche, 2019). Finalmente, aunque ambas enzimas no presentaron un efecto antibacteriano, las concentraciones evaluadas sirvieron para establecer su contribución como agentes antibiopelícula. Además, es importante resaltar que el citral fue el único compuesto con propiedades antibacterianas contra las células planctónicas de *S. aureus*.

6.1.2. Formación de Biopelículas Maduras de *S. aureus*

La Figura 13a muestra el efecto del tiempo de incubación sobre la adhesión de *S. aureus* en superficies de acero inoxidable No. 304. Después de 1.5 h de incubación se observó una recuperación de 3.7 Log UFC/cm², después de 2 h de incubación se alcanzaron valores de 5.1 Log UFC/cm². Posteriormente, se observó un crecimiento de forma exponencial hasta las 24 h alcanzando los 8.13 Log UFC/cm², estos valores incrementaron ligeramente pasadas las 48 h de incubación hasta alcanzar los 8.7 Log UFC/cm², sin existir diferencias significativas ($p > 0.05$). Estos resultados muestran como *S. aureus* después de 1.5 h comienza la agregación celular y la formación de microcolonias (Figura 13b). Sucesivamente, la densidad celular incrementa de forma exponencial (2-8 h), hasta alcanzar la etapa de maduración donde la población bacteriana se establece en una fase estacionaria de 24-48 h. Lo anterior resalta la problemática que existe con la rápida formación de biopelículas de *S. aureus* en acero inoxidable, además se puede resaltar que el tiempo de incubación es un factor determinante en el proceso de maduración de biopelículas.

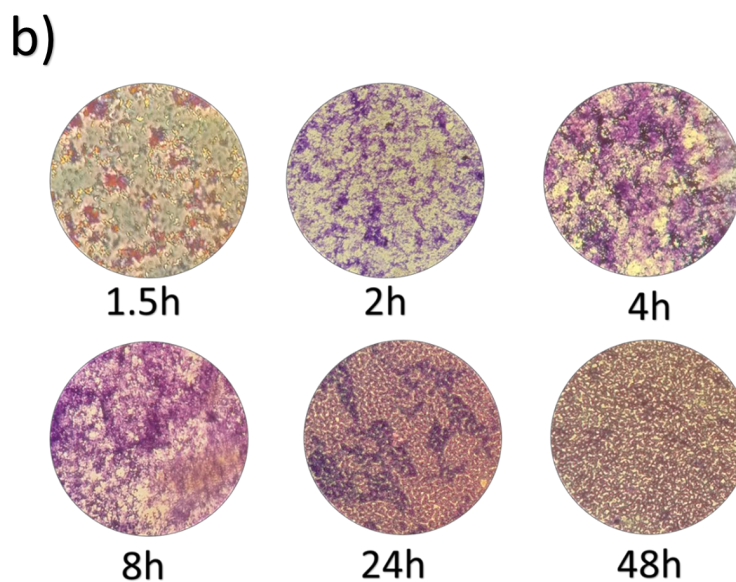
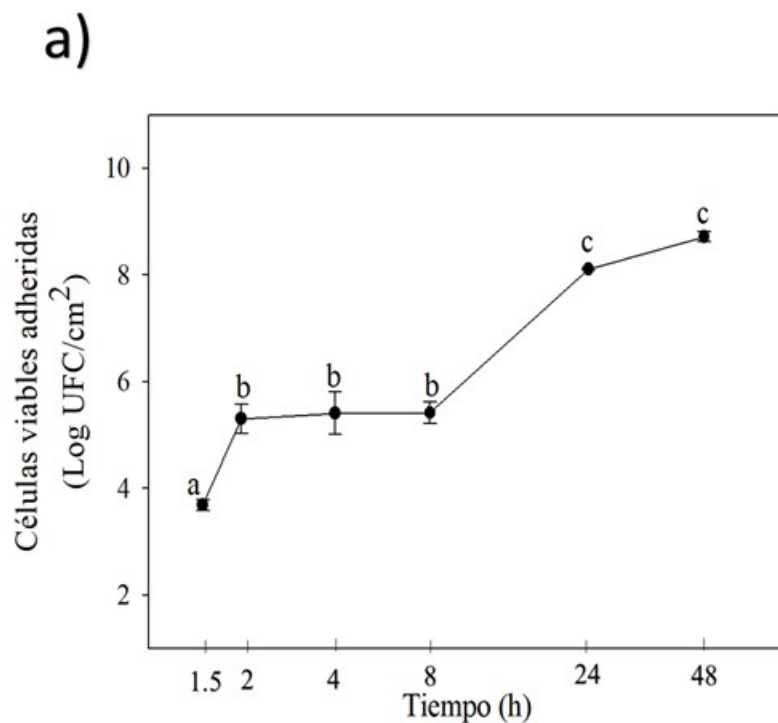


Figura 13. a) Cambios en las células viables adheridas de *S. aureus* en superficies de acero inoxidable a diferentes tiempos de incubación. Los datos mostrados son la media de dos réplicas, además, se observan las barras de error estándar para cada tratamiento. *las literales indican diferencias significativas a $p < 0.05$. b) Microscopías ópticas de las células adheridas de *S. aureus* a diferentes tiempos, las células fueron teñidas con cristal violeta y observadas en un microscopio Axio Vert 1 con una magnificación de 600x.

Cuando la biopelícula llega a una etapa de maduración, la resistencia de la bacteria a procesos de sanitización se multiplica hasta 1000 veces. En 2007, Chung ., *et al* evaluaron la rapidez con la que este patógeno se desarrollaba sobre utensilios médicos determinando que la madurez se alcanzaba después de 14 días. Esto se descartó en estudios hechos por Watters *et al.*, en 2016 que determinaron que la maduración de las biopelículas se lleva a cabo después de las 48 h de incubación. Sin embargo, en el presente estudio se encontró que la formación de biopelículas dio inicio después de 1.5 h después de la exposición a las superficies y que la etapa de maduración se lleva a cabo después de 24 h de incubación en un sistema que simula la industria alimentaria.

La rapidez con la que se forman las biopelículas de *S. aureus* se relaciona a su capacidad para unirse a las superficies debido a interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de la bacteria con la superficie de acero inoxidable, además del efecto de las proteínas de membrana en esta unión (Moormeier & Bayles, 2017). Este comportamiento se explica debido a que las condiciones en la industria alimentaria favorecen la aceleración del desarrollo de biopelículas (Shanks *et al.*, 2005). A diferencia de los aislados clínicos, cuando las biopelículas de *S. aureus* se desarrollan dentro de la industria alimentaria se llevan a cabo mediante un sistema dependiente del operón *Ica*, que induce la liberación del PIA y que estimula la producción de proteínas de membrana como ClfA, ClfB, AtlA, y SasG. Éstas actúan de forma conjunta reforzando la unión intercelular, lo que acelera la reproducción de la bacteria a diferencia de aislados clínicos independientes de *Ica* (Watters *et al.*, 2016). Para concluir, la determinación del tiempo de maduración logró contribuir de manera significativa al establecer un parámetro para la aplicación de los tratamientos con celulasa, papaína y citral.

El cristal violeta es un método bien establecido que permite una cuantificación indirecta del número de células sésiles; aun cuando las bacterias se encuentran en estado libre (Chavant *et al.*, 2007). La unión de este pigmento en los enlaces cruzados del ácido teicoico presentes en la pared celular de *S. aureus* generan la coloración violeta en esta bacteria (Forbes, 2009). Este proceso se lleva a cabo de la misma forma cuando la bacteria se adapta al medio y comienza la liberación de las SPE que conforman las biopelículas. La estructura de esta matriz extracelular se encuentra compuesta por polisacáridos, en los que el cristal violeta se une debido a que es una molécula cargada positivamente, lo cual le permite interactuar con la naturaleza aniónica de los polisacáridos (Forbes, 2009; Arbeleche, 2019). El uso de este método permite identificar los cambios en la morfología de las biopelículas de *S. aureus*, de las cuales no se tenía información previa, y permite

establecer un parámetro visual para identificar cambios en estudios posteriores.

6.1.3. Inactivación de las Biopelículas de *S. aureus* Después de su Exposición Individual y Combinada a Celulasa, Papaína y Citral.

El Cuadro 5 muestra el efecto individual y combinado de las concentraciones de celulasa, papaína y citral necesarias para la inactivación de las biopelículas de *S. aureus*. La celulasa y la papaína requirieron concentraciones de 1 mg/mL para reducir al máximo las biopelículas de la superficie de acero inoxidable (Figura 14), mientras que el citral aún en concentraciones >7 mg/mL no logró afectar las biopelículas de *S. aureus*. Por otro lado, el análisis de tablero de ajedrez indicó que al combinar celulasa, papaína y citral a $0.125 + 0.06 + 2$ mg/mL mostró un Σ FIC de 0.18 y por lo tanto se estableció como un efecto sinérgico de los componentes contra las biopelículas preformadas de *S. aureus*. Además, cabe resaltar que su efecto conjunto logró incrementar su efectividad a comparación del efecto individual.

Cuadro 5. Concentración mínima de celulasa, papaína y citral para inactivar las biopelículas de *S. aureus*

Compuesto	CMIB (mg/mL)
Celulasa	1
Papaína	1
Citral	>7
Combinación de celulasa, papaína y citral	$0.125 + 0.06 + 2$

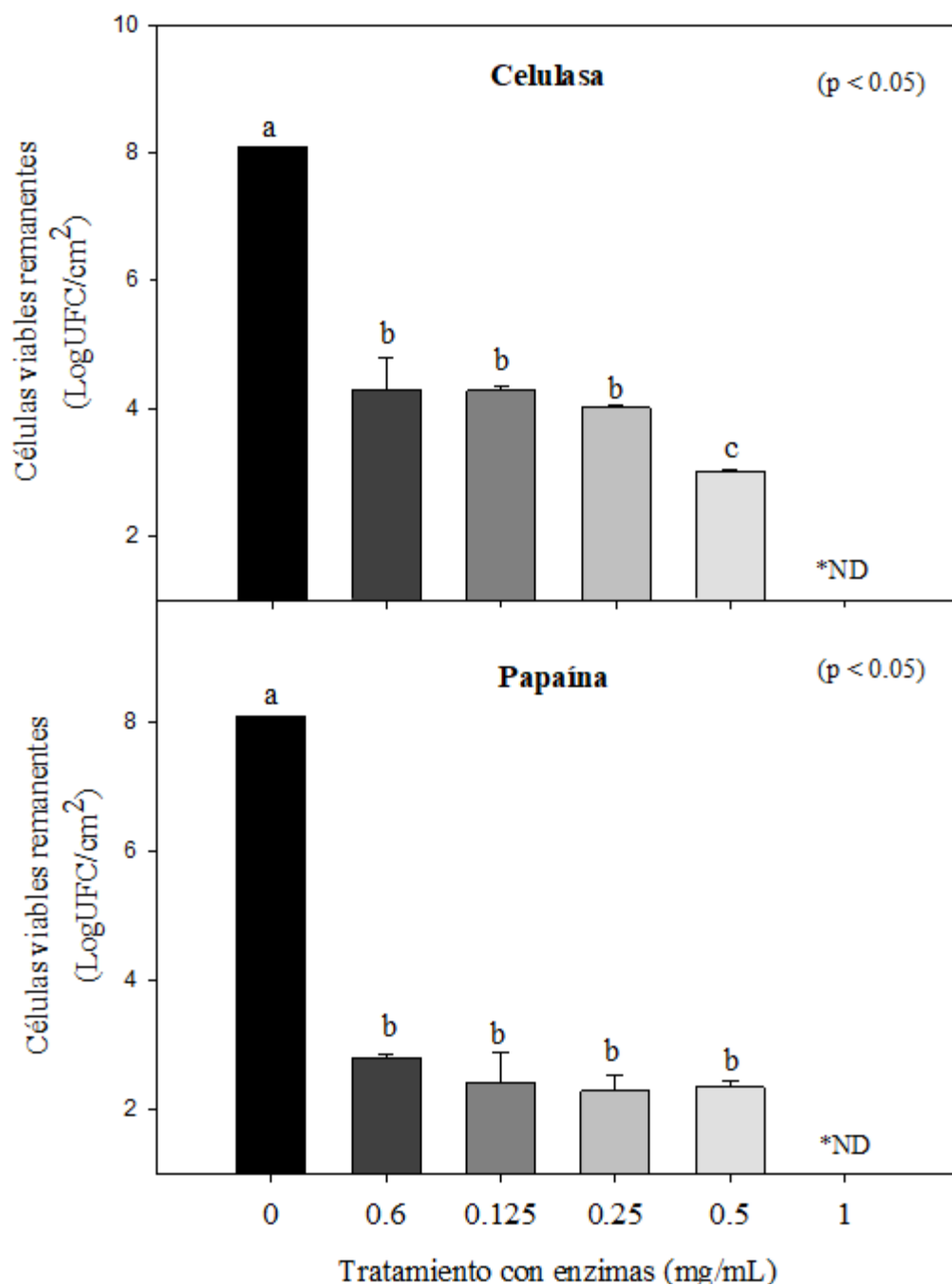


Figura 14. Células viables adheridas a acero inoxidable después del tratamiento con papaína y celulasa a diferentes concentraciones durante 1 h a 37°C. Los datos muestran la media de dos réplicas y las barras de error estándar. ND: No detectado* literales diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$.

El efecto combinado de los tratamientos sobre las células remanentes se muestra en la Figura 15. Al combinar los compuestos fue posible reducir completamente las células viables que quedan en

los cupones de acero inoxidable, estos resultados se atribuyeron al efecto sinérgico de los componentes. La combinación de agentes dispersantes y antibacterianos es una alternativa para reemplazar los desinfectantes comunes que han demostrado una falta de eficacia contra las biopelículas bacterianas. Enzimas como la celulasa y la papaína tienen diferentes puntos de acción para degradar los componentes de las biopelículas de *S. aureus*, y el citral puede dañar la membrana bacteriana debido a estas propiedades antibacterianas (Shi *et al.*, 2016; Watters *et al.*, 2016; Fleming *et al.*, 2017). La acción conjunta de los componentes se considera un efecto de sinergia porque los compuestos aumentan su efectividad contra las biopelículas de *S. aureus*, en comparación con los agentes individuales (Pemovska *et al.*, 2018; RAE, 2020).

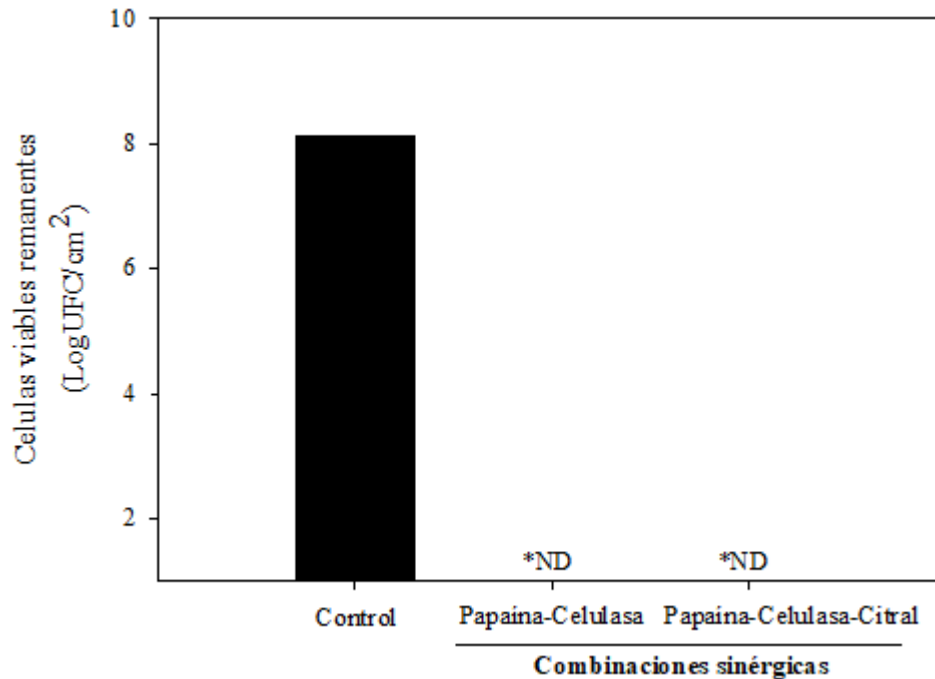


Figura 15. Células viables remanentes de *S. aureus* expuestas a la combinación de celulasa y papaína (0.125 + 0.06 mg/mL), y celulasa, papaína y citral (0.125 + 0.06 + 2 mg/mL). Los datos muestran la media de dos réplicas y las barras de error estándar. *ND: No detectado

Este comportamiento es atribuido primeramente a la acción hidrolítica de la celulasa sobre los enlaces glucosídicos β -1,6 del PNAG, que compone la mayor parte de las biopelículas de *S. aureus*. Al unirse el PNAG al sitio activo de la enzima es hidrolizado, generando un cambio en la estructura de las biopelículas debilitando su estabilidad debido a la pérdida de reservas de agua, iones y

nutrientes que induce la liberación de las células sésiles (Fleming *et al.*, 2017; Cherny & Sauer, 2020). En 2017 estudios hechos por Fleming *et al* encontraron una reducción del 60% de las SPE de *S. aureus* utilizando celulasa (0.025 mg/mL) mediante la técnica de tinción por cristal violeta. Estos resultados fueron mayores a los del presente estudio, esto se puede deber al uso de un método colorimétrico para su medición que al no ser una técnica restrictiva afecta su precisión de forma determinante.

Por otro lado, debido a que las biopelículas de *S. aureus* no se componen únicamente por polisacáridos, se adicionó la papaína con el fin de degradar las proteínas y afectar la estabilidad tanto de la matriz polimérica como de los agregados bacterianos. Se hipotetiza que la papaína logró afectar de forma significativa la acción de proteínas como ClfA, ClfB y SasG teniendo un efecto sobre propiedades como la adhesión intercelular, el anclaje en la superficie y la liberación de exopolisacáridos (Jan-Roblero *et al.*, 2017). Este comportamiento se atribuye a la posible interacción del sitio activo de la papaína con los aminoácidos arginina y lisina presentes en la estructura de estas proteínas.

En 2016, Watters *et al*, obtuvieron una degradación del 94% sobre las biopelículas de *S. aureus* utilizando una concentración de 0.025 mg/mL, este resultado se relaciona con que las biopelículas que se desarrollan en aislados clínicos contienen un mayor porcentaje de proteínas (Valle *et al.*, 2019). Debido a que actualmente los sanitizantes a base de enzimas no han sido utilizados en la industria alimentaria, no existe información acerca de su comportamiento en combinación con antibacterianos como el citral. Si bien el citral resulta efectivo para inhibir la formación de biopelículas, se ha demostrado que al entrar en contacto con las SPE su efectividad se pierde (Shi *et al.*, 2016). Lo anterior fue comprobado por Espina *et al* en 2017, que al utilizar citral para inactivar las biopelículas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*; sin obtener resultados favorables debido a la presencia de exopolímeros que impidieron la difusión del citral. Esto se atribuyó a la activación del mecanismo anaerobio de *S. aureus* provocado por el aumento en la densidad celular dentro de las biopelículas maduras (Guiot *et al.*, 2002).

Cuando las biopelículas alcanzan una etapa madura, la población bacteriana continúa en aumento, lo que disminuye el oxígeno disponible para la bacteria. Este mecanismo desencadena la liberación de proteínas ribosomales, ADN y productos de fermentación que le permiten crear una barrera electrostática y aumentan la viscosidad proporcionando mayor estabilidad a la biopelícula, lo que impide la difusión de los sanitizantes (Bridier *et al.*, 2011). Aunado a esto, el ambiente hidrofílico

dentro de las biopelículas impide el paso de compuestos hidrofóbicos como el citral. Por lo cual, su aplicación individual no resulta efectiva contra biopelículas. No obstante, al combinarse con la celulasa y la papaína su efectividad como agente bactericida lo convirtió en un coadyuvante esencial para la inactivación de las biopelículas debido a que la acción hidrolítica le permite internalizarse en las células de *S. aureus*. Sin embargo, la concentración necesaria para inactivar las células sésiles fue mayor a la establecida para sus contrapartes planctónicas, esto puede deberse a alteraciones fenotípicas que ocurren cuando la bacteria se encuentra dentro de las biopelículas, lo que incrementa la resistencia de la bacteria ante agentes antibacterianos (Bridier *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Espina *et al.*, 2017). Sin embargo, aún con estas alteraciones el citral fue capaz de afectar la viabilidad celular de *S. aureus*.

El citral no sólo afecta la viabilidad celular debido a su internalización, sino que también el citral parece afectar la síntesis de adhesinas que están involucradas en la morfología característica de *S. aureus* en forma de racimos (Shi *et al.*, 2017). Su acción provoca el cambio en la morfología de *S. aureus* logrando separar los cocos, lo que afecta en la forma de vida de la bacteria. Esto se debe a que el citral puede interrumpir la expresión del gen *LuxS*, responsable del *QS* y que regula la producción del autoinductor 2 (AI-2), el cual, se encarga de la síntesis de proteínas de membrana que actúan como adhesinas intercelulares (Zhao *et al.*, 2010; Watters *et al.*, 2016). No obstante, esta acción es posible debido a la acción hidrolítica de la celulasa y la papaína debido a que cuando la célula se encuentra recubierta se dificulta la interrupción de la comunicación intercelular.

Aunado a esto se ha establecido que la combinación de estos componentes logra potenciar el efecto antiadherente de la papaína sobre las superficies. Se ha hipotetizado que la papaína logra desestabilizar las proteínas existentes y al mismo tiempo, el citral logra impedir la síntesis de nuevas proteínas de membrana afectando tanto la adhesión intercelular como a las superficies de acero inoxidable. Por lo anterior, se determinó que la combinación de estos compuestos puede proporcionar un efecto contundente sobre las biopelículas maduras (Figura 16). Por otro lado, se ha comprobado que estos compuestos son seguros para su uso en la industria alimentaria debido a que no propician la resistencia de la bacteria.

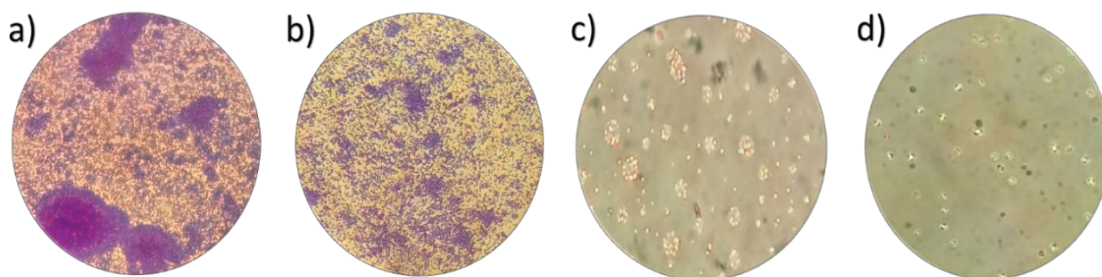


Figura 16. Microscopías ópticas de las biopelículas maduras de *S. aureus* expuestas a celulasa, papaína y citral durante 1 h a 37°C. a) control, b) 7mg/mL de citral, c) 0.125 de celulasa y 0.06 mg/mL de papaína, d) 0.125, 0.06, y 2 mg/mL de celulasa, papaína y citral, respectivamente. Las células fueron teñidas con cristal violeta y observadas en un microscopio Axio Vert 1 con una magnificación de 600x.

En estudios hechos por Hogan *et al.*, 2017 se utilizaron enzimas como la lisostafina, y serratiopeptidasa; en combinación con vancomicina (1 + 5 + 0.064 mg/mL) para degradar biopelículas maduras de *S. aureus*, en donde se encontró una dispersión de las biopelículas en un 90%. Esta combinación mostró ser menos efectiva a la utilizada en el presente estudio, asociándola con que tanto la lisostafina como la vancomicina desencadenan la resistencia de este microorganismo; además de ser perjudiciales para el consumidor puesto que su uso prolongado puede desencadenar enfermedades renales (Bastos *et al.*, 2010). A diferencia de la celulasa, la papaína y el citral que son considerados como seguros para el consumo humano (GRN 703, SCOGS: PB274174, EAFUS 182.60) (FDA, 2020). No obstante, la combinación de agentes dispersantes y antibacterianos naturales es aún un territorio poco explorado, por lo cual se deben establecer parámetros básicos al momento de seleccionar los componentes para no poner en riesgo la salud del consumidor, así como asegurar un proceso de sanitización efectivo tomando en cuenta la estabilidad de los componentes.

6.2. Etapa 2: Interacciones Moleculares entre Celulasa, Papaína y Citral como Indicadores de la Estabilidad de su Combinación

6.2.1. Acoplamiento Molecular entre la Celulasa y la Papaína

Con base en los valores obtenidos de la ecuación 3 se seleccionó el modelo predeterminado por los

coeficientes de energía de PIPER que se muestran en el Cuadro 6. Primeramente, para el modelo balanceado todos los coeficientes influyen de forma significativa en la energía de interacción lo que aporta un balance y neutraliza la atracción de los componentes (Kozakov *et al.*, 2017). En el caso del modelo favorecido electroestáticamente, se establece que son estas fuerzas las que establecen la unión de ambas proteínas. También, está el modelo favorecido hidrofóbicamente, en el cual el potencial DARS establece que la unión entre ambas proteínas esta mediada por interacciones hidrofóbicas. por otro lado, el modelo Van der Waals + electrostático excluye las interacciones hidrofóbicas y considera que las interacciones estan mediadas únicamente por fuerzas de Van der Waals y uniones electrostáticas (Vajda *et al.*, 2017).

$$E = 0.40_{Erep} + -0.40_{Eatr} + 600_{Eelec} + 1.00_{EDARS} \quad (3)$$

Ecuación 3. Suma de los coeficientes de peso de la energía PIPER para el arreglo molecular de la celulasa y la papaína.

Cuadro 6. Coeficientes de peso de la energía PIPER de los cuatro modelos de arreglo molecular

Coeficientes	Términos de energía para el coeficiente de peso			
	<i>E rep</i>	<i>E atr</i>	<i>E ele</i>	<i>E DARS</i>
Balanceado	0.40	-0.40	600.0	1.0
Favorecido electroestáticamente	0.40	-0.40	1200.0	1.0
Favorecido hidrofóbicamente	0.40	-0.40	600.0	2.0
Van der Walls + electroestáticamente	0.40	-0.40	600.0	0.0

Mediante estos modelos se determinó el comportamiento del arreglo molecular entre la proteína ligando y la receptora. Tal como se muestra en la ecuación 3, para este estudio se encontró un modelo balanceado, el cual determinó que existe el mismo tipo de energía de atracción y repulsión entre la papaína y la celulasa. Esta clase de modelo se puede interpretar como un comportamiento neutral entre los componentes; es decir, la energía que los atrae es la misma que causa su repulsión y por ende impide la interacción entre ambas (Vajda *et al.*, 2017). Tal como se observa en la Figura 17, ambas enzimas no muestran algún tipo de unión, lo cual concuerda con lo establecido por

PIPER; por lo cual, se puede inferir que la combinación de éstas no interfiere con su actividad individual. Este fenómeno se puede explicar debido a la especificidad de ambas enzimas; por un lado la celulasa solo interactúa con enlaces glucosídicos, en cambio, la papaína si hidroliza proteínas (Shokhen *et al.*, 2009) No obstante, esta enzima es altamente restrictiva y actúa únicamente en presencia de residuos como la arginina y lisina, los cuales no se encuentran presentes en la celulasa (ExPASy, 2020). Por lo cual, el proceso de hidrólisis no puede llevarse a cabo.

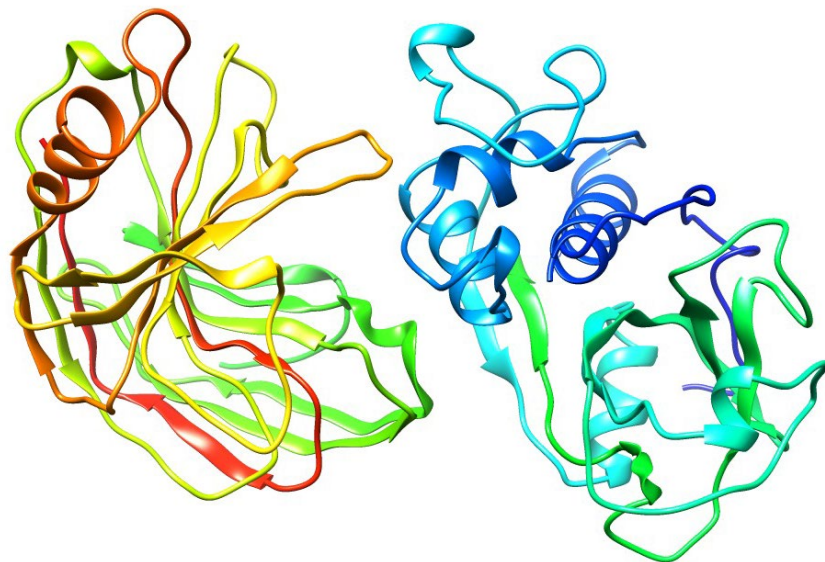


Figura 17. Arreglo molecular de la celulasa y la papaína mediante el servidor ClusPro 2.0. No se detectaron interacciones entre las enzimas.

Las enzimas se han utilizado en la producción de detergentes para facilitar la eliminación de residuos de materia orgánica de diferentes textiles; dentro de este mercado se han aplicado diversos tipos de enzimas como lo son las proteasas, celulasas y lipasas (Panouillé *et al.*, 2006). Estas combinaciones se han definido como mezclas estables dentro de esta industria, y se ha reportado que al estar enfocadas a diferentes puntos diana resultan ser efectivas como aditivos en detergentes. No obstante, las interacciones que pueden tener al estar en una mezcla no han sido establecidas, además, existe muy poca información sobre su aplicación como agentes desinfectantes o complementos de éstos (Man *et al.*, 2009).

Lo establecido por Zhang, y Fernie, 2020 concuerda con el presente estudio, en su revisión se

establece que la interacción enzima-enzima es muy poco común, a excepción de complejos de enzimas multiméricas y el caso de algunos conjuntos enzimáticos involucrados en rutas metabólicas (metabolismo de aminoácidos y la oxidación de ácidos grasos). Además, se ha establecido que la unión entre dos enzimas generalmente se establecen uniones débiles, por lo cual este tipo de complejos suelen ser muy inestables y separarse con facilidad (Hess & Boiteux, 1972). Como se puede observar, el resultado del presente estudio representa el comportamiento natural de este tipo de enzimas, y al no existir interacción entre ambas sus parámetros cinéticos podrían no verse afectados (Sauro & Kacser, 1990). Todo lo anterior establece información reelevante para el campo de estudio al determinar que la mezcla de enzimas como la celulasa y la papaína serían una mezcla que podría permanecer estable durante el almacenamiento. Sin embargo, es recomendable realizar estudios cinéticos para comprobar tal efecto.

6.2.2. Acoplamiento Molecular entre la Celulasa y el Citral

Se evaluó la posible interacción de la celulasa con el citral utilizando el software de acoplamiento molecular UCSF Chimera versión 1.14, siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.3.2. Se obtuvieron 6 poses para el ligando evaluado y se consideró como la más asertiva aquella con la menor energía de afinidad (Vazquez-Armenta, 2019). En este ensayo se obtuvo una energía de afinidad de -4.5 kcal/mol la cual no se considera como relevante debido a que es menor a la obtenida por un ligando natural para esta enzima. Tal como se muestra en la Figura 18 dentro del acoplamiento no se detectaron uniones con los residuos catalíticos del sitio activo (Glu116 y Glu204) o alguno de los subsitios de la celulasa (Trp 147.A, Trp 120.A, Trp 22.A, Tyr 7.A, Tyr 61.A, Phe 206.A, Phe 101.A, Glu 204.A, Glu 116.A y Pro 129.A).

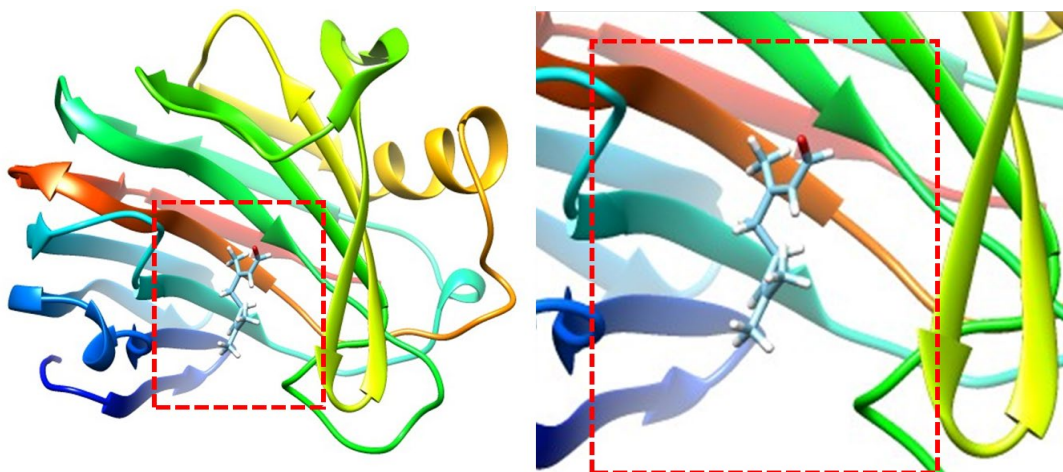


Figura 18. Acomodo molecular de la celulasa y el citral en el cual no se presentaron interacciones con el sitio activo y/o subsitios (línea punteada).

Como se muestra en la Figura 18, el citral no mostró interacciones con el sitio catalítico o alguno de los subsitios de la celulasa, este comportamiento puede explicarse debido a que la celulasa, como la mayoría de las glicosil hidrolasas se consideran enzimas con un alto grado de especificidad. Este tipo de enzima interacciona únicamente con los enlaces glucosídicos de polímeros como la celulosa o el PNAG debido a los residuos aromáticos presentes en la hendidura del sitio activo. Dichos residuos se unen a las caras hidrofóbicas de los anillos de piranosido, lo que restringe su interacción a moléculas que posean una estructura similar (Fleming *et al.*, 2017). Moléculas como el citral no poseen las condiciones necesarias para interactuar con el sitio activo de esta enzima; el citral, a diferencia de compuestos como el paladio que han sido utilizados para inhibir la actividad enzimática no puede formar enlaces covalentes con aminoácidos como Glu 206, Glu 116 y Met118 que forman parte del proceso catalítico (Khademi *et al.*, 2002). Este comportamiento se debe a que metales como el paladio forman enlaces covalentes coordinados con el azufre presente en aminoácidos como la metionina (Castro, 2015). En el caso del citral, se observó que esta molécula se puede ubicar dentro de la cavidad del sitio activo posiblemente atraído por interacciones hidrofóbicas proporcionadas por la fenilalanina (Ortega-Ramirez *et al.*, 2020). Sin embargo, no se detectaron uniones covalentes o no covalentes con la enzima; por lo cual se puede hipotetizar que este compuesto no interfiere con la catálisis, puesto que, puede separarse fácilmente de la cavidad de la enzima. Además, con el fin de corroborar si el sustrato tiene una mayor energía de actividad que consiga desplazar al citral, se llevó a cabo el arreglo molecular

entre la enzima y el PNAG presente en las biopelículas de *S. aureus*.

Dentro de este análisis se encontró una energía de afinidad de -6.0 kcal/mol lo que muestra una atracción mayor de la enzima por el PNAG, esto se puede atribuir a las interacciones con los aminoácidos Gly 65. A, Val 66. A, Thr 110.A y A. Ser 16.A Gln 200.A (Figura 19) (Pettersen *et al.*, 2004). Si bien estos residuos no forman parte del sitio activo, pueden contribuir en el acomodo de esta molécula dentro del sitio activo mediante la formación de puentes de hidrógeno (Atkins & Jones, 2006). Debido a las características del PNAG es probable que su unión con estos residuos se deba a la reacción entre los grupos hidroxilo y el oxígeno presente en estas moléculas que al formar enlaces covalentes dificultan la disociación de este complejo.

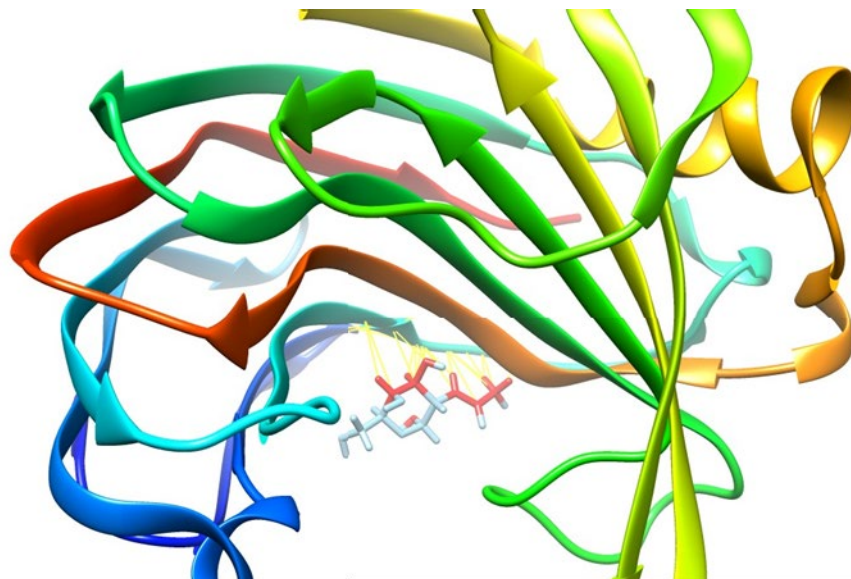


Figura 19. Interacciones celulasa PNAG. Enlaces covalentes entre el PNAG y los aminoácidos Gly 65. A, Val 66. A, Thr 110.A y A. Ser 16.A Gln 200.A.

A diferencia del complejo celulasa-citral, la unión de la celulasa con el PNAG ya había sido probado anteriormente, no obstante, su arreglo molecular no había sido identificado, por lo cual, este análisis proporciona información adicional al campo de estudio. Anteriormente se ha establecido que algunas celulasas extraídas de hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, y algunas bacterias como *L. monocytogenes* y *E. coli* son efectivas para hidrolizar las biopelículas de bacterias como *S. aureus*. Su efectividad se asocia directamente a la actividad de la enzima en la escisión de carbohidratos mediante las uniones glucosídicas. No obstante, su

interacción con terpenos no ha sido establecida previamente.

La información sobre el comportamiento de estas enzimas en presencia de agentes antibacterianos es muy escasa. Aunque la adición de aceites esenciales en estos productos se ha utilizado desde 1997 sin efectos secundarios, las propiedades antibacterianas de estos aceites no habían sido consideradas (Panandiker, 1997). Se sabe que algunos terpenos pueden interferir con la actividad enzimática según lo descrito por Ortega-Ramirez *et al* en 2020, donde se utilizó citral como inhibidor de la celulosa sintasa de *E. coli*. Sin embargo, la inhibición de la enzima está determinada por el tipo y el sitio de unión con la enzima; Existen moléculas que debido a sus características hidrofóbicas no forman enlaces covalentes con la enzima, lo que los convierte en inhibidores competitivos reversibles que no se unen definitivamente a la enzima (Villafañe, 2008). Por lo anterior, el presente estudio contribuye dentro del campo de investigación al establecer que componentes como el citral no interfieren con la actividad de enzimas como la celulasa por lo que se puede considerar como una nueva tecnología dentro de los sanitizantes. Sin embargo, estas estimaciones deben confirmarse mediante ensayos cinéticos de inhibición.

6.2.3. Acoplamiento Molecular entre la Papaína y el Citral

Se llevó a cabo un análisis de acoplamiento molecular entre la enzima papaína y el citral con el fin de detectar posibles interacciones que pudieran interferir en la actividad enzimática. En la Figura 20 se muestra la interacción entre los componentes, los cuales presentaron una energía de afinidad de -4.5 kcal/mol la cual no se considera como relevante debido a que es menor a la obtenida por un ligando natural para esta enzima (Grosdidier *et al.*, 2011). En esta figura se puede observar que el citral se encuentra dentro de la cavidad que pertenece al sitio activo de esta enzima, lo cual podría indicar la posibilidad de que el citral interfiera con la actividad hidrolítica de la papaína. No obstante, esto se contrapone con lo establecido previamente mediante experimentación mostrado en el apartado 6.2.1.

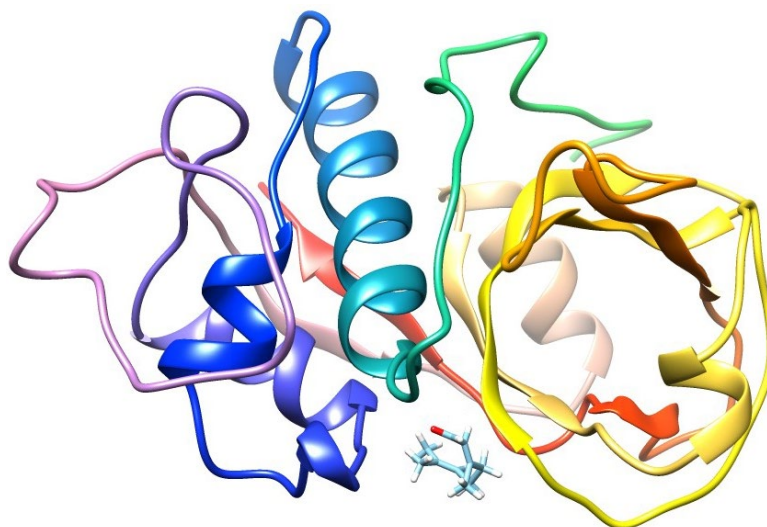


Figura 20. Acomodo del citral dentro de la cavidad del sitio activo de la papaína. Unión del citral dentro de la cavidad de la papaína mediante uniones no covalentes

Este comportamiento en el acoplamiento molecular puede deberse a la acción del citral como un inhibidor reversible competitivo que puede interaccionar de forma no covalente con la enzima (Villafañe, 2008). Su unión con la histidina 159.A que compone la triada catalítica de la papaína puede deberse a que el carbono carbonílico presente en el citral puede reaccionar con el nucleófilo que se encuentra en el grupo amino de la histidina mediante adición o sustitución causando una reacción de óxido reducción (Figura 21) (Aldabe & Aramendia, 2004). Cuando el citral se une parcialmente al sitio activo puede formar el complejo enzima-inhibidor (EI), interfiriendo con la formación del complejo enzima-sustrato (ES); no obstante, este efecto dependerá directamente de la concentración de estos componentes. Por ejemplo, si la cantidad de sustrato presente en la reacción es mayor a la del inhibidor el efecto inhibitorio será imperceptible puesto que es más probable que la enzima colisione con el sustrato. Al competir por el sitio activo, podría reducir la actividad de la enzima pero no modifica la velocidad máxima reacción de la papaína (Martínez Guerra, 2014). Por lo tanto, el citral puede competir por el sitio activo de la enzima sin afectar directamente la velocidad de hidrólisis.

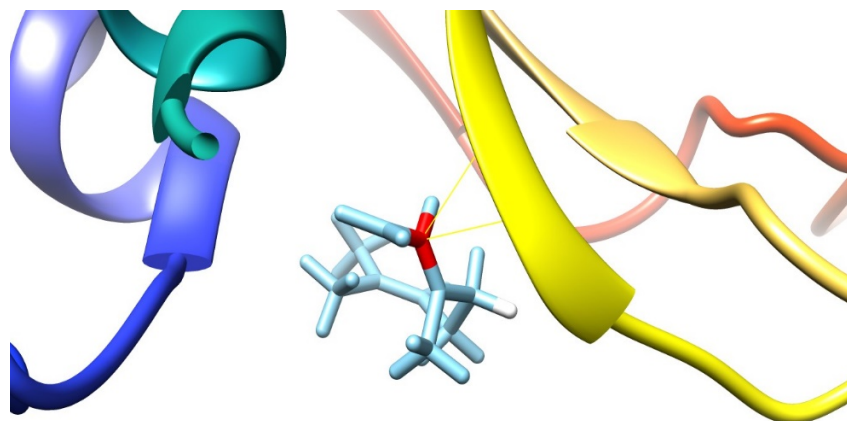


Figura 21. Interacción del citral con el residuo catalítico His 159.A de la papaína. Interacción no covalente entre el citral y el residuo His 159.A que conforma la triada catalítica de la papaína.

En comparación con otros inhibidores de la actividad enzimática de la papaína el citral no tiene los componentes necesarios para unirse de forma covalente a la enzima. Según lo reportado por LaLonde , *et al.*, 1998 se establece que para que se lleve a cabo una unión covalente entre el inhibidor y la papaína dentro es preferible la presencia de anillos aromáticos. En presencia de estos se llevan a cabo interacciones entre anillo-anillo y anillo-oxígeno que facilitan el apilamiento y dirección del inhibidor. Por otro lado, estudios hechos por Janowski *et al.*, en 2004 mencionan que la interacción de los grupos carbonilo puede intervenir en la formación del complejo ES. La unión del inhibidor debido a los grupos carbonilo facilitan el anclaje primario del inhibidor en la hendidura catalítica. Por lo anterior, se puede inferir que el grupo carbonilo presente en la estructura del citral puede facilitar su acción como inhibidor del sitio activo; no obstante, la ausencia de anillos aromáticos dentro de este compuesto podría hacer que sea un inhibidor reversible, aunado a los valores de energía de unión relativamente bajos.

También se comparó el comportamiento de la papaína con un ligando natural que es el aminoácido lisina (Figura 22), obteniendo una energía de interacción de -5.1 kcal/mol lo cual indica una unión más fuerte entre la lisina y la papaína a diferencia de su unión con el citral. La lisina es uno de los aminoácidos con los que la papaína interactúa como sustrato para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas como ClfA y ClfB; esta molécula interactúa con la papaína de forma covalente debido a la presencia de varios grupos carbonilo disponibles en su estructura. Además, la orientación de sus grupos funcionales promueven un acomodo conformacional único para esta molécula dentro del sitio activo facilitando su interacción (Vasudevan & Sreekumari, 2012). Aunado a esto, la unión

de la lisina con aminoácidos como Asn 175.A e His 159.A pueden proveer una mayor estabilidad para el proceso de hidrólisis; este comportamiento es atribuido a que la unión con cualquiera de estos proporciona una orientación favorable con el anillo de imidazol que facilita su interacción mediante enlaces de hidrógeno (Cstorer & Ménard, 1994).

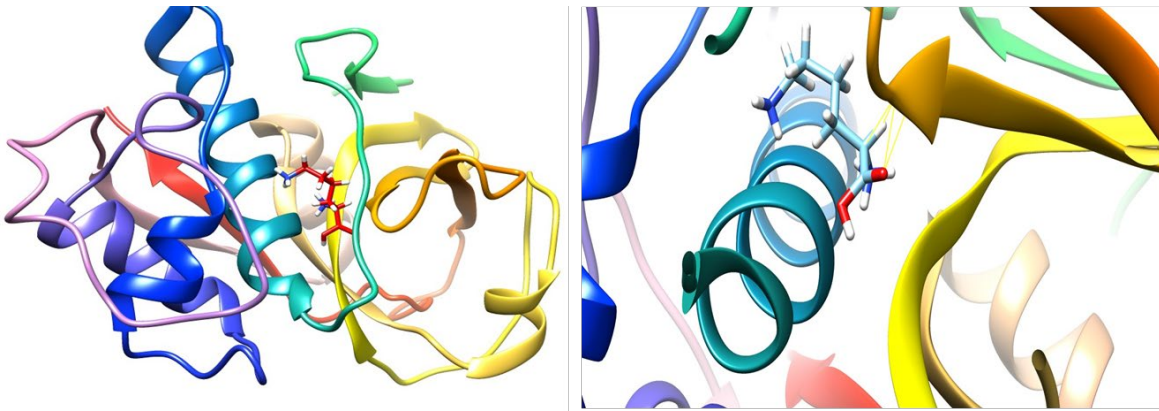


Figura 22. Interacción de la lisina con la triada catalítica de la papaína. Unión de la lisina mediante enlaces covalentes con el aminoácido Asn 175.A. perteneciente a la triada catalítica del sitio activo de la enzima.

Al comparar la estabilidad de ambos ligandos se puede inferir que la unión del citral como inhibidor de la papaína es más débil en comparación con la interacción que se puede obtener con un sustrato como la lisina. De igual forma, con este comportamiento se puede deducir que la acción del citral como inhibidor enzimático no es lo suficientemente fuerte o estable como para impedir la hidrólisis de proteínas en las biopelículas de *S. aureus*. Además, la caracterización de estos componentes de forma molecular contribuye en la predicción del comportamiento *in vitro* de éstos en condiciones de almacenamiento. Este análisis nos permite inferir que la mezcla de papaína con el citral puede ser estable durante el almacenamiento. No obstante, se podría sugerir realizar la aplicación del citral posterior al tratamiento enzimático. Esto se establece con base en que la acción de los tres compuestos resulta eficaz para inactivar las biopelículas de *S. aureus*. Sin embargo, su vida de anaquel podría verse afectada debido a la interacción del citral con la papaína, por lo cual se recomienda como estudios futuros.

7. CONCLUSIÓN

Se estableció que de los compuestos estudiados únicamente el citral tiene efecto antibacteriano ante las células en estado planctónico de *S. aureus*. Además, se obtuvo un efecto sinérgico en la combinación de los componentes y se logró establecer una combinación efectiva para inactivar las biopelículas de *S. aureus* en superficies de acero inoxidable, al lograr afectar las células remanentes en un 100% después de una hora de exposición. Finalmente, el análisis molecular estableció que la combinación de celulasa, papaína y citral podría considerarse una mezcla estable.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar factores como el tiempo y la concentración de los componentes para optimizar la inactivación de las biopelículas, además determinar si la combinación de agentes logra un efecto similar sobre otros patógenos alimentarios. Adicionalmente, se sugiere llevar a cabo la medición de la actividad enzimática y su efecto sobre la constitución de las SPE de las biopelículas. Aunado a esto, se recomienda la evaluación experimental de la vida de anaquel de la combinación en solución. Finalmente, se recomienda la caracterización de SPE (Carbohidratos, Proteínas y ADN extracelular) de las biopelículas.

9. REFERENCIAS

- Aldabe, S., Aramendía, P., Bonazzola, C., Lacreu, & Lacreu, L. (2004). Química 2. Química en acción. Ediciones Colihue, Buenos Aires, Argentina, 400p
- Alvarez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., & Cotter, P. D. 2019. "Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities." *Annual review of food science and technology* 10: 2.
- Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. 2011. "Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms." *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 2: 826-834.
- Arbeleche, N. A. 2019. "Evaluación de la capacidad de formación de biofilm por microorganismos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos."
- Atkins, P. W., & Jones, L. (2006). Principios de química: los caminos del descubrimiento
- Aylas Canicela, R. E. 2017. "Evaluación de la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto) y *Minthostachys* sp.(Muña), frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231."
- Bai, J.-R., Wu, Y.-P., Elena, G., Zhong, K., & Gao, H. 2019. "Insight into the effect of quinic acid on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*." *RSC Advances* 9(7): 3-4.
- Bastos, M. d. C. d. F., Coutinho, B. G., & Coelho, M. L. V. 2010. "Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications." *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland) 3(4): 1139-1161.
- Bernal-Mercado, A. T., Vazquez-Armenta, F. J., Tapia-Rodriguez, M. R., Islas-Osuna, M. A., Mata-Haro, V., Gonzalez-Aguilar, G. A., et al, 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(11): 6.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. 2011. "Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review." *Biofouling* 27(9): 1017-1032.
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naitali, M., & Briandet, R. 2015. "Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens." *Food microbiology* 45: 167-178.
- Broncales, J. W., & Vilchez, J. M. A. 2019. Influencia de la densidad de corriente y dosis de hipoclorito de sodio sobre la resistencia a la corrosión del acero inoxidable aisi 304 protegido catódicamente con corriente impresa, expuesto en agua de mar natural contaminada con hipoclorito. (Ingeniería de materiales), Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru.
- Brunecky, R., Alahuhta, M., Xu, Q., Donohoe, B. S., Crowley, M. F., Kataeva, I. A., et al, 2013. "Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA." *Science* 342(6165): 1513-1516.

- Carmona-Torre, F., & del Pozo, J. L. 2018. "Tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus*." *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 12(49): 218-223.
- Castro, L. C. M. 2015. "Síntesis vía microondas del prolígando bidentado ácido N-bencil-2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico y estudio de su química de coordinación frente a: Cobalto (II), Níquel (II), Cobre (II) y Paladio (II)."
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. 2014. "General characteristics of *Staphylococcus aureus*." *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio* 61(1): 28-40.
- Constanza Muñoz, L., Pinilla, G., & Navarrete, J. 2019. "Biopelícula en *Staphylococcus* spp.: estructura, genética y control." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 37(1): 18-29.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'connor, J., Lalor, P., Dockery, P., et al, 2014. "Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials." *Applied and environmental microbiology* 80(4): 1507-1514.
- Corrigan, R. M., Rigby, D., Handley, P., & Foster, T. J. 2007. "The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation." *Microbiology* 153(8): 2435-2446.
- Cstorer, A., & Ménard, R. 1994. [33] Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases *Methods in enzymology* (Vol. 244, pp. 486-500): Elsevier.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., & Bernardi, T. 2007. "A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria." *Journal of Microbiological Methods* 68(3): 605-612.
- Cherny, K. E., & Sauer, K. 2020. "Untethering and Degradation of the Polysaccharide Matrix Are Essential Steps in the Dispersion Response of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms." *J Bacteriol* 202(3): e00575-00519.
- Cheung, A. L., Nishina, K. A., Trottonda, M. P., & Tamber, S. 2008. "The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*." *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(3): 355-361.
- Chuang, G.-Y., Kozakov, D., & Vajda, S. 2008. "DARS (Decoys As the Reference State) Potentials for Protein-Protein Docking." *Biophysical Journal*.
- Chung, K. K., Schumacher, J. F., Sampson, E. M., Burne, R. A., Antonelli, P. J., & Brennan, A. B. 2007. "Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*." *Biointerphases* 2(2): 1-3.
- Da Silva, P. M. B., Acosta, E. J. T. R., de Rezende Pinto, L., Graeff, M., Spolidorio, D. M. P., Almeida, R. S., et al, 2011. "Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments." *Mycoses* 54(6): 712-717.
- Espina, L., Berdejo, D., Alfonso, P., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. 2017. "Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling." *Food Control* 82: 256-265.
- Espinoza, S. R., Ortiz, P. R., & López, A. H. M. 2017. "Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Laurusnobilis* y *Thymusvulgaris*." *Revista Ciencia UNEMI* 10(24): 46-50.

- Esteve, E. P., Puigdollers, M. C. B., & Gómez, M. L. C. 2017. "Métodos para la desinfección en la industria alimentaria." *Universidad Técnica de Valencia* 1: 4-5.
- Esti, M., Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K., & Garzillo, A. M. V. 2013. "Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic–acidic buffer for wine application." *Food and Bioproducts Processing* 91(4): 595-598.
- ExPASy. (2020). Cellulase. <https://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.4>
- Fallon, James J. (2019). Australia Patent No. 2017239486 B2 Australian Patent Office.
- Fazlara, A., & Ekhtelat, M. 2012. "The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens." *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 12(1): 23-29.
- FDA. (2020). GRAS Notices. <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>
- Fleming, D., Chahin, L., & Rumbaugh, K. 2017. "Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(2): 3-7.
- Forbes, B. A. (2009). Diagnóstico microbiológico
- Garcia, C. J., Pericleous, A., Elsayed, M., Tran, M., Gupta, S., Callaghan, J. D., et al, 2018. "Serralyisin family metalloproteases protects *Serratia marcescens* from predation by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus*." *Scientific Reports* 8(1): 14025.
- Graf, A. C., Leonard, A., Schäuble, M., Rieckmann, L. M., Hoyer, J., Maass, S., et al, 2019. "Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity." *Molecular & Cellular Proteomics* 18(6): 1036-1053.
- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. 2011. "SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS." *Nucleic Acids Res* 39(Web Server issue): W270-277.
- Guimaraes, C. P., Witte, M. D., Theile, C. S., Bozkurt, G., Kundrat, L., Blom, A. E., et al, 2013. "Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions." *Nat Protoc* 8(9): 1787-1799.
- Guiot, E., Georges, P., Brun, A., Fontaine-Aupart, M. P., Bellon-Fontaine, M. N., & Briandet, R. 2002. "Heterogeneity of Diffusion Inside Microbial Biofilms Determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy Under Two-photon Excitation¶." *Photochemistry and Photobiology* 75(6): 570-578.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. 2020. "Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10(107).
- Gupta, P., Patel, D. K., Gupta, V. K., Pal, A., Tandon, S., & Darokar, M. 2017. "Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*." *Phytomedicine* 34: 85-96.
- Gupte, V., & Luthra, U. 2017. "Analytical techniques for serratiopeptidase: A review." *Journal of pharmaceutical analysis* 7(4): 203-207.
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. 2015. "Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos."

Revista Iberoamericana de Micología 32(1): 1-12.

- Gutiérrez, T. J. 2019. Antibiofilm Enzymes as an Emerging Technology for Food Quality and Safety Enzymes in Food Biotechnology (pp. 321-342): Elsevier.
- Hess, B., & Boiteux, A. 1972. Heterologous enzyme-enzyme interactions Protein-Protein Interactions (pp. 271-297): Springer.
- Hobbs, C. V., Inagaki, K., Lucar, J., & Blackshear, C. 2019. "Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia – Nationwide Estimates of 30-day Readmission, In-hospital Mortality, Length of Stay, and Cost in the US." *Clinical Infectious Diseases* 69(11): 4-5.
- Hogan, S., Zapotoczna, M., Stevens, N., Humphreys, H., O'Gara, J., & O'Neill, E. 2017. "Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections." *Journal of Hospital Infection* 96(2): 177-182.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., & Hatada, Y. 1998. "Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures." *Extremophiles* 2(3): 185-190.
- Jan-Roblero, J., García-Gómez, E., Rodríguez-Martínez, S., Cancino-Díaz, M. E., & Cancino-Díaz, J. C. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. Vol. 1 Intech open science Rijeka, Croacia.170
- Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., & Jaskolski, M. 2004. "Two polymorphs of a covalent complex between papain and a diazomethylketone inhibitor." *The Journal of peptide research* 64(4): 141-150.
- Johler, S., Giannini, P., Jermini, M., Hummerjohann, J., Baumgartner, A., & Stephan, R. 2015. "Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins." *Toxins* 7(3): 1-2.
- Kawamura, M., Fujimura, S., Tokuda, K., Aoyagi, T., Endo, S., Kanamori, H., et al, 2019. "Mutant selection window of disinfectants for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 17: 316-320.
- Khademi, S., Zhang, D., Swanson, S. M., Wartenberg, A., Witte, K., & Meyer, E. F. 2002. "Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 58(4): 660-667.
- Khademi, S., Zhang, D., Swanson, S. M., Wartenberg, A., Witte, K., & Meyer, E. F. 2002. "Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride." 1foldr Import 2019-10-08 Batch 3.
- Khan, B. A., Yeh, A. J., Cheung, G. Y., & Otto, M. 2015. "Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections." *Expert opinion on investigational drugs* 24(5): 689-704.
- Khelissa, S. O., Abdallah, M., Jama, C., Gharsallaoui, A., & Chihib, N.-E. 2019. "Comparative study of growth temperature impact on the susceptibility of biofilm-detached and planktonic *Staphylococcus aureus* cells to benzalkonium chloride." *Annals of Microbiology* 69(3): 291-298.

- Kim, M. K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z. Z., Muir, T. W., Stone, H. A., et al, 2017. "Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development." *Nature Microbiology* 2(17080): 4-5.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., et al, 2017. "The ClusPro web server for protein-protein docking." *Nature Protocols* 12(2): 255-278.
- LaLonde, J. M., Zhao, B., Smith, W. W., Janson, C. A., DesJarlais, R. L., Tomaszek, T. A., et al, 1998. "Use of Papain as a Model for the Structure-Based Design of Cathepsin K Inhibitors: Crystal Structures of Two Papain– Inhibitor Complexes Demonstrate Binding to S '–Subsites." *Journal of medicinal chemistry* 41(23): 4567-4576.
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., et al, 2018. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Nature Reviews Disease Primers* 4(18033): 4-5.
- Lefebvre, E., Vighetto, C., Di Martino, P., Garde, V. L., & Seyer, D. 2016. "Synergistic antibiofilm efficacy of various commercial antiseptics, enzymes and EDTA: a study of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms." *International journal of antimicrobial agents* 48(2): 181-188.
- Lim, E. S., Koo, O. K., Kim, M.-J., & Kim, J.-S. 2019. "Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157: H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite." *Scientific Reports* 9(1): 1-10.
- Macassi, C., Milagros, K., & Huamán Torres, C. F. 2017. "Actividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “Canela” frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* inducidas in vitro sobre lentes de contacto blandos”."
- Malachowa, N., & DeLeo, F. R. 2018. "Host Response to *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing Is NO." *Cell Host & Microbe* 23(5): 578-580.
- Man, V. F., Lentsch, S. E., Peitersen, N. D., McBroom, A. B., Schacht, P. F., Ruhr, R. O., et al, 2009. Stable liquid enzyme compositions, Google Patents.
- Manyak, D. M., Weiner, R. M., Carlson, P. S., & Quintero, E. J. (2004). College Park, MD (US) Patent No. USOO675904OB1. United States Patents.
- Martínez Guerra, J. J. Libro electrónico de bioquímica. Vol. 1 Capítulo 6: Enzimas: Inhibidores enzimáticos U. A. d. aguascalientes.
- McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., O'Neill, E., & O'Gara, J. P. 2015. "Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5(1).
- Medicine, U. S. N. L. o. (2019). Intoxicación con hipoclorito de sodio. from medlineplus <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002488.htm>
- Mercado, M., Ávila, J., Rey, M., Montoya, M., Gamboa, A., Carrascal, A. K., et al, 2012. "Brotos por *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo." *Biomédica* 32(3).
- Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. 2017. "*Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism." *Molecular Microbiology* 104(3): 365-376.

- Morcelle, S., Gomes, M., & Vairo Cavalli, S. 2009. Caracterización bioquímica y estructural de proteasas (pp. 163-176).
- Moreno, J. C., Sarria, V. M., Polo, Á. D., & Giraldo, L. 2007. "Evaluación del peróxido de hidrógeno en la oxidación de fenol con hierro soportado sobre tela de carbón activado." *Información tecnológica* 18(2): 67-72.
- Mori, H., & Ito, K. 2001. "The Sec protein-translocation pathway." *Trends in Microbiology* 9(10): 494-500.
- Muñoz, L., Pinilla, G., & Navarrete, J. 2019. "Biopelícula en *Staphylococcus* spp.: estructura, genética y control." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 37(1): 18-29.
- Navarro, J. J. 2016. Aceite esencial de clavo *Syzygium aromaticum* en combinación con irradiación UV-C para la erradicación de biopelículas de *Salmonella Typhimurium*. (Maestría en Ciencias), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Hermosillo, Sonora.
- Ndidi, U. (2013). Characterisation of Cysteine Protease from *Allium cepa* L. Bulb
- Nguyen, U. T., & Burrows, L. L. 2014. "DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms." *International Journal of Food Microbiology* 187: 26-32.
- Niloa Toasa, A. G., Medina Montoya, F. A., Archundia Archundia, G. M., & Bolívar, P. C. J. 2020. "Meticilin -resistant *Staphylococcus aureus*." *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento (RECIMUNDO)*: 94-101.
- NOM-243-SSA1- 2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, Diario Oficial de la Federación México.
- Oliveira, H. L. d. C. D. d., Fleming, M. E. C. K., Silva, P. V., Paula, G. R. d., Futuro, D. O., Velarde, G. C., et al, 2014. "Influence of papain in biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50: 6-7.
- Olsen, N. M. C., Thiran, E., Hasler, T., Vanzielegem, T., Belibasakis, G. N., Mahillon, J., et al, 2018. "Synergistic Removal of Static and Dynamic *Staphylococcus aureus* Biofilms by Combined Treatment with a Bacteriophage Endolysin and a Polysaccharide Depolymerase." *Viruses* 10(8): 6-7.
- Ortega-Ramirez, L. A. 2013. Sinergismo antibacteriano entre compuestos terpénicos de *Cymbopogon citratus* y azufrados de *Allium cepa*.
- Ortega-Ramirez, L. A., Gutiérrez-Pacheco, M. M., Vargas-Arispuro, I., González-Aguilar, G. A., Martínez-Téllez, M. A., & 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(3): 102.
- Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., Vargas-Arispuro, I., Gonzalez-Aguilar, G. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Nazzaro, F., et al, 2017. "Combination of *Cymbopogon citratus* and *Allium cepa* essential oils increased antibacterial activity in leafy vegetables." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(7): 2166-2173.

- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—The “accidental” pathogen. 555-567
- Otto, M. 2019. "Staphylococcal biofilms." *Gram-Positive Pathogens*: 699-711.
- Ozdemir, H. O., Buzoglu, H. D., Calt, S., Stabholz, A., & Steinberg, D. 2010. "Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study." *Journal of endodontics* 36(5): 1-2.
- Panandiker, R. K. (1997). Cincinnati, Ohio Patent No. USOO5614484A. United States Patents.
- Panouillé, M., Thibault, J.-F., & Bonnin, E. 2006. "Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(23): 8926-8935.
- Pemovska, T., Bigenzahn, J. W., & Superti-Furga, G. 2018. "Recent advances in combinatorial drug screening and synergy scoring." *Current opinion in pharmacology* 42: 102-110.
- Peralta Quito, S. G. 2019. Factores asociados a infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, Hospital Vicente Corral Moscoso. Cuenca, 2016-2018. (Especialista Médico en Rehabilitación Oral), Universidad de las Américas, Ecuador.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., et al, 2004. "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." *J Comput Chem* 25(13): 1605-1612.
- Pinilla, A., Pacheco, J. E., & Quecan, L. M. 2018. "Aplicación del análisis del riesgo para un caso de intoxicación alimentaria estafilocócica en canelones de verdura."
- Popov, B. N. (2015). *Corrosion engineering: principles and solved problems*. 75
- Potera, C. 2010. "Resistencia a los antibióticos: agente dispersor de biopelículas rejuvenece antiguos antibióticos." *Salud Pública de México* 52: 478-479.
- PubChem, D. (2019). Citral, CID=638011. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638011>
- Quintana Rojas, A. E. 2014. "Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de *Citrus limon* en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*."
- RAE. (2020). sinergia. from <http://lema.rae.es/dpd/srv/search?key=sinergia>
- Rahman, N. M., Maskell, N. A., West, A., Teoh, R., Arnold, A., Mackinlay, C., et al, 2011. "Intrapleural use of tissue plasminogen activator and DNase in pleural infection." *The New England journal of medicine* 365(6): 518-526.
- Rashmi, Bhardwaj, S., & Gupta, P. 2017. "A Comparative Study of *Cymbopogon citratus* Volatile Oil by Conventional Method Versus Enzyme Pre-Treatment." *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 20(3): 744-751.
- Rodríguez, J. J., & Segura, A. D. 2018. "Efecto in vitro del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* “pampa orégano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*."
- Rozemeijer, W., Fink, P., Rojas, E., Jones, C. H., Pavliakova, D., Giardina, P., et al, 2015. "Evaluation of approaches to monitor *Staphylococcus aureus* virulence factor expression during human disease." *PLoS One* 10(2): e0116945.

- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. 2015. "Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14(4): 491-509.
- Sanginés Franchini, M. C. (2009). *El Servicio de Limpieza / Cleaning Services: Ciencia y Administracion México*
- Sauro, H. M., & Kacser, H. 1990. "Enzyme-enzyme interactions and control analysis." *European Journal of Biochemistry* 187(3): 493-500.
- Shanks, R. M., Donegan, N. P., Graber, M. L., Buckingham, S. E., Zegans, M. E., Cheung, A. L., et al, 2005. "Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation." *Infection and immunity* 73(8): 4596-4606.
- Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., et al, 2016. "Antimicrobial Activity and Possible Mechanism of Action of Citral against *Cronobacter sakazakii*." *PLoS One* 11(7): 9.
- Shi, C., Sun, Y., Liu, Z., Guo, D., Sun, H., Sun, Z., et al, 2017. "Inhibition of *Cronobacter sakazakii* virulence factors by citral." *Scientific Reports* 7: 43243.
- Shokhen, M., Khazanov, N., & Albeck, A. 2009. "Challenging a paradigm: Theoretical calculations of the protonation state of the Cys25-His159 catalytic diad in free papain." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77(4): 916-926.
- Silva-Barrera, T. E. 2017. *Evaluación en microscopía electrónica de barrido de la dentina superficial, media y profunda después de la aplicación del hipoclorito de sodio con diferentes concentraciones y tiempo*. Quito: Universidad de las Américas, 2017.
- Silva, T. E. 2017. *Evaluación en microscopia electrónica de barrido de la dentina superficial, media y profunda después de la aplicación del hipoclorito de sodio con diferentes concentraciones y tiempo*. (Medico de rehabilitación oral), Universidad de las Américas, 2017, Quito.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. 2010. "Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(9): 1955-1958.
- Singh, R., Sahore, S., Kaur, P., Rani, A., & Ray, P. 2016. "Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences." *Pathogens and Disease* 74(6).
- Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. 2019. Chapter 1 - Microbial Enzymes—An Overview. In R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey y C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 1-40): Elsevier.
- Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., & Pahua Díaz, D. 2016. "Epidemiological overview of Mexico's leading causes of morbidity and mortality." *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 59(6): 2-8.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., Mathew, G. M., & Pandey, A. 2009. "Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production." *Renewable energy* 34(2): 421-424.
- Sweeney, P. J., & Walker, J. M. 1993. *Pronase (EC 3.4. 24.4) Enzymes of molecular biology* (pp. 271-276): Springer.

- Tapia-Rodriguez, M. R., Bernal-Mercado, A. T., Gutierrez-Pacheco, M. M., Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., et al, 2019. "Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to carvacrol: alterations of the Quorum sensing at enzymatic and gene levels." *Journal of Cell Communication and Signaling* 13(4): 531-537.
- Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S. K., Faull, K. F., & Schneewind, O. 1999. "Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(22): 12424-12429.
- Toro, L. L. 2013. Eficacia de un desinfectante biodegradable a base de cítricos en el control del crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (Ingeniera en Industrias Alimentarias), Universidad Nacional del Centro del Perú Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.
- Vajda, S., Yueh, C., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., et al, 2017. "New additions to the C lus P ro server motivated by CAPRI." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 85(3): 435-444.
- Valle, J., Echeverz, M., & Lasa, I. 2019. " σ B inhibe la síntesis de exopolisacáridos PNAG y la formación de biopelículas en *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 186(6): 2-3.
- Vásquez, M. J. B., Chinchilla, F. G., & Molina, A. 2019. "Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*." *Agronomía Mesoamericana* 30(1): 147-163.
- Vasudevan, D. M., & Sreekumari, S. Texto de bioquímica para estudiantes de medicina. Vol.
- Vazquez-Armenta, F. J. 2019. Quercetina como inhibidor de la Prka para el control de biopelículas y virulencia de *Listeria monocytogenes*. (Doctor en Ciencias), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. , Hermosillo, Sonora.
- Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Oñate, M. A., Martinez-Tellez, M. A., Lopez-Zavala, A. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., et al, 2020. "Quercetin repressed the stress response factor (sigB) and virulence genes (prfA, actA, inlA, and inlC), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*." *Food microbiology* 87: 103377.
- Vázquez-Armenta, F. J., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Nazzaro, F., Fratianni, F., et al, 2017. "Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables." *Journal of Food Science and Technology* 54(10): 4-5.
- Villafañe, H. H. M. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2
- Wang, H., Wang, H., Xing, T., Wu, N., Xu, X., & Zhou, G. 2016. "Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme." *LWT - Food Science and Technology* 66: 298-304.
- Watters, C. M., Burton, T., Kirui, D. K., & Millenbaugh, N. J. 2016. "Enzymatic degradation of in vitro *Staphylococcus aureus* biofilms supplemented with human plasma." *Infection and Drug Resistance* 9: 71-78.
- Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M., & Greenberg, E. P. 2004. "Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms." *J Bacteriol* 186(6): 8-9.

- Zhang, H., Zhou, W., Zhang, W., Yang, A., Liu, Y., Jiang, Y., et al, 2014. "Inhibitory Effects of Citral, Cinnamaldehyde, and Tea Polyphenols on Mixed Biofilm Formation by Foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*." *Journal of Food Protection* 77(6): 927-933.
- Zhao, L., Xue, T., Shang, F., Sun, H., & Sun, B. 2010. "Staphylococcus aureus AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence." *Infection and immunity* 78(8): 3506-3515.