



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

“Caracterización del extracto proteico del fruto de *Bromelia karatas* y su actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*”

PARA OPTAR AL GRADO DE:

Maestra en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología

PRESENTA:

Elva Avalos Flores

ASESOR:

Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez

Mérida, Yucatán, México

28/06/2019



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Mérida

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-290/19

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Mérida, Yucatán, 20/junio/2019

C. AVALOS FLORES ELVA
Pasante de la Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
PRESENTE

De acuerdo al fallo emitido por su directora la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez**, y el co-director **Dr. Denis Israel Magaña Ortiz**, y la comisión revisora integrada por la Dra. Marianne Soledad Luna Rivero, y el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO DEL FRUTO DE *Bromelia karatas* Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida albicans*, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*"

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica


M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MERIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALs/fja



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P.911
C.P. 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail: itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEORICO Y ANTECEDENTES	6
2.1. <i>Bromeliaceae</i>	6
2.1.1. <i>Bromelia karatas</i>	10
2.2. Proteasas	12
2.2.1. Proteasas vegetales	14
2.3. <i>Candida albicans</i>	17
2.4. Enfermedades transmitidas por alimentos	23
2.4.1. <i>Salmonella Typhimurium</i>	24
2.4.1.1. Infección por <i>Salmonella Tiphymurium</i>	27
2.4.1.2. Resistencia a fármacos	32
2.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	33
2.4.2.1. Infección por <i>Listeria monocytogenes</i>	34
2.4.2.2. Resistencia a fármacos	38
2.4.3. Mecanismos de resistencia por las bacterias	39
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	41
1.1. Objetivo general	41
1.2. Objetivos específicos.....	41
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1. Material biológico	42
2.2. Extracción proteica.....	42
2.3. Determinación de la concentración proteica.....	43
2.4. Determinación del perfil electroforético	43
2.5. Semi-purificación del extracto proteico soluble del fruto de <i>Bromelia karatas</i> por cromatografía de intercambio iónico	44
2.6. Determinación de la actividad proteolítica sobre el gel	45
2.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	46

2.7.1.... Evaluación de la actividad antifúngica mediante el método de difusión en disco	46
2.7.2.... Evaluación de la actividad antifúngica mediante el método de difusión en disco en presencia de EDTA	46
2.7.3.... Evaluación de la actividad antifúngica mediante el método de microdiluciones	47
2.7.4.... Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de.....	48
2.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de microdiluciones.....	49
2.9. Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de .	49
2.10. Caracterización del extracto proteico soluble del fruto de <i>Bromelia karatas</i> 50	
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
5.1. Determinación de la concentración proteica.....	52
5.2. Perfil electroforético del extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i> 53	
5.3. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	54
5.4. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco (EDTA) contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	56
5.5. Actividad antimicrobiana por el método de microdiluciones contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	58
5.6. Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i>	60
5.7. Actividad antimicrobiana y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), por el método de microdiluciones sobre <i>Salmonella</i> Tiphymurium ATCC 13311.....	63
5.8. Actividad antimicrobiana y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), por el método de microdiluciones sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313.....	67
5.9. Actividad antimicrobiana en presencia del inhibidor E-64 por el método de microdiluciones sobre <i>Salmonella</i> Tiphymurium ATCC 13311 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	70

5.9.1. Actividad antimicrobiana en presencia del inhibidor E-64, por el método de microdiluciones sobre <i>Salmonella</i> Tiphymurium ATCC 13311	71
5.9.2. Actividad antimicrobiana en presencia del inhibidor E-64, por el método de microdiluciones sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313.....	74
5.10. Separación de proteínas por cromatografía de intercambio iónico	76
5.10.1. Intercambiador catiónico (SP)	76
5.11. Determinación de la actividad proteolítica sobre el gel	79
5.12. Identificación del ES del fruto de <i>B. karatas</i>	80
5.13. Actividad antimicrobiana de la fracción 2, obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra <i>Salmonella</i> Tiphymurium ATCC 13311	82
5.14. Actividad antimicrobiana de la fracción 2 obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313.....	85
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	89
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies representativas de las subfamilias de <i>Bromeliaceae</i>	9
Figura 2. Ciclo infeccioso de <i>Candida albicans</i>	20
Figura 3. Estructura química de un imidazol.....	22
Figura 4. Diagrama representando la taxonomía del género <i>Salmonella</i>	25
Figura 5. Cambios inducidos en la célula hospedadora para la internalización de <i>S. Typhimurium</i>	30
Figura 6. Formación de la SCV e inducción del SST3 codificado en SPI-2 en el interior celular.....	31
Figura 7. Ciclo infectivo de <i>Listeria monocytogenes</i>	37
Figura 8. Perfil electroforético.....	53
Figura 9. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, empleando diversas concentraciones (100, 200, 400 y 600 µg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i>	55
Figura 10. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231: A) En presencia de buffer Tris-HCl con EDTA 2 mM (c*) y extracto proteico soluble con EDTA 2 mM (*) y B) En presencia de buffer Tris-HCl (c) y extracto proteico soluble con EDTA (*).....	57

Figura 11. Radio de los halos de inhibición para los diferentes extractos obtenidos del fruto de <i>B. karatas</i> y el buffer de extracción con EDTA	58
Figura 12. Efecto de tres concentraciones (100, 200 y 250 µg/mL) de extracto proteico soluble contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	60
Figura 13. Efecto de tres concentraciones (100, 200 y 250 µg/mL) de extracto proteico soluble contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	60
Figura 14. Curva de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> ATCC13311.	61
Figura 15. Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313.	62
Figura 16. Efecto de tres concentraciones (2.0, 2.5 y 3.0 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i> contra <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 y determinación de MIC (3.0 mg/mL)	64
Figura 17. Porcentaje de inhibición de tres concentraciones (2.0, 2.5 y 3.0 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i> contra <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 y determinación de MIC (3.0 mg/mL)	65
Figura 18. Efecto del extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i> , a una concentración de 3000 µg/mL, contra <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	66
Figura 19. Efecto de tres concentraciones (1.6, 1.65 y 1.7 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i> contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313... ..	67
Figura 20. Porcentaje de inhibición de tres concentraciones (1.6, 1.65 y 1.7 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i> contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	68
Figura 21. Determinación del efecto del extracto proteico soluble del fruto <i>B. karatas</i> , a una concentración de 1.65 mg/mL, contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	70
Figura 22. Actividad antimicrobiana del ES (MIC = 3.0 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) sobre <i>S. Tiphymurium</i> ATCC 13311	72
Figura 23. Determinación del efecto del extracto proteico soluble del fruto <i>B. karatas</i> , a una concentración de 3.0 mg/mL, contra <i>S. Tiphymurium</i> ATCC 13311, en presencia de inhibidor E-64 2.5 µM.....	72
Figura 24. Porcentaje de inhibición del ES (MIC = 3.0 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) contra <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	73
Figura 25. Actividad antimicrobiana del ES (MIC = 1.65 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313.....	74
Figura 26. Determinación del efecto del extracto proteico soluble del fruto <i>B. karatas</i> , a una concentración de 1.65 mg/mL, contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313, en presencia de inhibidor E-64 2.5 µM.....	76

Figura 27. Porcentaje de inhibición del ES (MIC = 1.65 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	76
Figura 28. Separación de proteínas cargadas positivamente presentes en el extracto proteico soluble del fruto de <i>B. karatas</i>	78
Figura 29. Zimograma de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio catiónico.....	79
Figura 30. Identificación de los componentes del ES	82
Figura 31. Actividad antimicrobiana de la fracción 2, obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	83
Figura 32. Inhibición de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 por el ES semi-purificado en la fracción 2 (10 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico	84
Figura 33. Porcentaje de inhibición de la fracción 2 (5 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico sobre <i>S. Tiphymurium</i> ATCC 13311	85
Figura 34. Actividad antimicrobiana de la fracción 2, obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313.	86
Figura 35. Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313por el ES semi-purificado en la fracción 2 (10 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico	87
Figura 36. Porcentaje de inhibición de la fracción 2 (5 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Endopeptidasas	13
Tabla 2. Comparación de la secuencia aminoacídica N-terminal de la karatasina, papaína y bromelaína del tallo	16
Tabla 3. Taxonomía de <i>Candida albicans</i>	17

RESUMEN

Debido al creciente número de microorganismos resistentes a los antibióticos, el uso de productos naturales como fuente de nuevos compuestos bioactivos se ha considerado como una alternativa. Las plantas tienen compuestos con actividad biológica y en ciertas especies exhiben actividad antimicrobiana en sus extractos proteicos. En el presente trabajo proponemos el uso de un extracto proteico soluble (ES) obtenido del fruto de la bromeliaceae *Bromelia karatas*. Esta especie es comúnmente conocida en México como chichipo, chiyol, piñuela, aguama, timbiriche y cazuela. Esta planta se distribuye en el centro y sur del país, donde se ha utilizado tradicionalmente como alimento fresco o preparado para tratamientos antiparasitarios. En este trabajo, se evaluó el ES de *B. karatas* contra *Candida albicans* ATCC 10231, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. El ES del fruto de *B. karatas* mostró una concentración de proteína de 0.8934 mg/mL que contiene proteínas de un tamaño aproximado entre 75 y 61 kDa (ES no desnaturalizado) y 10 y 20 kDa (ES desnaturalizado), según el perfil SDS-PAGE. Por otro lado, establecimos que el ES no presenta actividad antimicrobiana contra *C. albicans* ATCC 10231; en contraste, el extracto mostró propiedades antibacterianas contra cepas patógenas como *S. Typhimurium* ATCC 13311 y *L. monocytogenes* ATCC 15313. Para *L. monocytogenes*, la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 1.65 mg/ml de proteína presente en el ES. A esta concentración se observó actividad bactericida. El valor de la CMI para *S. Typhimurium* fue de 3 mg/ml, con una actividad bacteriostática. El ES se evaluó en presencia del inhibidor E-64, lo que sugiere que

la actividad antimicrobiana está dada por la presencia de cistein proteasas. También fue posible fraccionar el ES mediante cromatografía de intercambio catiónico, obteniendo proteínas de aproximadamente 10, 14 y 20 kDa, las cuales se identificaron como una cistein proteasa llamada bromelaína. En base a los resultados obtenidos, se puede sugerir que el ES no presenta una actividad fungistática o fungicida, pero tiene actividad bactericida contra Gram-positivas y bacteriostática contra Gram-negativas, además de que esta actividad está dada por cistein proteasas.

ABSTRACT

Due to the increasing number of microorganisms resistant to antibiotics, the use of natural products as a source of new bioactive compounds has been considered as an alternative. Plants have compounds with biological activity and in certain species exhibit antimicrobial activity in their protein extracts. In the present work we propose the use of a soluble protein extract (SE) obtained from the fruit of the bromeliaceae *Bromelia karatas*. This species is commonly known in México as chichipo, chiyol, piñuela, aguama, timbiriche and cazuela. This plant is distributed in the Center and South of the country, where it has been used traditionally as fresh or prepared food for antiparasitic treatments. In this work, the SE of *B. karatas* was evaluated against *Candida albicans* ATCC 10231, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *B. karatas* fruit SE has showed a protein concentration of 9.5179 µg/µL containing proteins of approximate sizes between 75 and 61 kDa (non-denatured ES) and 10 and 20 kDa (ES denatured), according to SDS-PAGE profile. In the other hand, it we established that SE does not present

antimicrobial activity against *C. albicans* ATCC 10231; in contrast the extract showed antibacterial properties against pathogenic strains such as *S. Typhimurium* ATCC 13311 and *L. monocytogenes* ATCC 15313. For *L. monocytogenes* the minimum inhibitory concentration (MIC) was 1.65 mg/mL of protein present in SE. At this concentration, also bactericidal activity was observed. The value of MIC for *S. Typhimurium* was 3 mg/mL with a bacteriostatic activity. The SE was also evaluated in the presence of the inhibitor E-64, suggesting that the antimicrobial activity is given by presence of cysteine proteases. It was also possible to fractionate the SE using cation exchange chromatography, obtaining proteins of approximately 10, 14 and 20 kDa, which were identified as bromelain. Based on the results obtained, it can be suggested that SE does not present a fungistatic or fungicidal activity, but it has bactericidal activity against Gram-positive and bacteriostatic against Gram-negative species, besides that this activity is given by cysteine proteases.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Actualmente son varias las preocupaciones ocasionadas por los problemas de salud debidos a microorganismos resistentes a los fármacos. La presencia de este tipo de microorganismos ha ido en incremento, como consecuencia del mal uso y empleo indiscriminado de antibióticos (Adolfsson, Hagander, Mahjoubipour, & Larsson, 2017; Bautista *et al.*, 2017; OMS, 2017a).

Dentro de los microorganismos resistentes a los medicamentos se encuentran *Candida albicans*, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* (Adolfsson *et al.*, 2017; Bautista *et al.*, 2017; OMS, 2017b). Estos microorganismos ocasionan diferentes enfermedades, siendo *C. albicans* el principal hongo levaduriforme que causa infecciones vaginales (candidiasis vulvovaginal), así como otros padecimientos cutáneos y alérgicos, ocasionando síntomas como picazón y ardor (Wang *et al.*, 2017). *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, son microorganismos bacterianos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Las ETA son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y pueden ser causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o alimentos contaminados. Los patógenos de transmisión alimentaria pueden causar diarrea grave o infecciones debilitantes, como la meningitis, e incluso la muerte (OMS, 2017a). Los padecimientos ocasionados por *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* son la salmonelosis y listeriosis respectivamente; la salmonelosis puede ocasionar fiebre, dolores de cabeza, náuseas, vómitos, dolores abdominales y diarrea, y los alimentos asociados con los

brotes de salmonelosis son, por lo general, los huevos, la carne de ave y otros productos de origen animal; la listeriosis puede ocasionar diarreas e incluso la muerte, y se puede contraer por ingerir productos lácteos no pasteurizados y en diversos alimentos preparados y/o crudos, principalmente de origen cárnico (OMS, 2017a, 2017b).

Como se mencionó con anterioridad el número de microorganismos multirresistentes se han incrementado, esto puede ser debido a dos factores, los intrínsecos y los adaptativos; la resistencia intrínseca de una especie microbiana a un antibiótico particular es la capacidad de resistir la acción de ese antibiótico como resultado de características clonales, estructurales o funciones inherentes que destruyen al antibiótico, mientras que la resistencia adaptativa se da a través de mutaciones en los genes cromosómicos y por transferencia horizontal de genes en el microorganismo (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015).

Debido a esta razón se ha retomado el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades, dado que estas generan muy poca o nula resistencia en el microorganismo (Lagos, 2015).

CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEORICO Y ANTECEDENTES

2.1. *Bromeliaceae*

La primera referencia de una *Bromeliaceae* apareció poco después del descubrimiento de América en 1492, cuando Colombus describió la piña. La familia *Bromeliaceae* se basó en el género *Bromelia* L., que fue nombrado por primera vez por Charles Plumier en homenaje al médico y botánico sueco Olaf Bromel (Monteiro & Forzza, 2016).

La familia *Bromeliaceae*, está constituida de 1500 a 2800 especies incluidas en 51 a 56 géneros (Montes R. *et al.*, 2014; Natalucci *et al.*, 2009), con solo una especie en el oeste de África: *Pitcairnia Feliciania* (Errasti, 2013; Luther, 2012; Natalucci *et al.*, 2009). En México se han reportado entre 18 y 23 géneros y entre 326 y 342 especies (Espejo-Serna, López-Ferrari, & Ramírez-Morillo, 2010). En la Península de Yucatán se han registrado 31 especies de *Bromeliaceae*, de las cuales, 17 especies de 4 géneros le corresponden al estado de Yucatán. Sin embargo, la única especie endémica del estado es *Tillandsia maya*, la cual mayormente se encuentra en selvas bajas caducifolias y selvas bajas inundables (Morillo Ramírez, 2006).

La familia *Bromeliaceae* se ha dividido tradicionalmente en tres subfamilias, *Pitcairnioideae*, *Bromelioideae* y *Tillandsioideae*, sin embargo se ha propuesto una nueva clasificación en ocho subfamilias: *Tillandsioideae*, *Pitcairnioideae*, *Bromelioideae*, *Brocchinioideae*, *Lindmanioideae*, *Hechtioideae*, *Puyoideae*, y

Navioideae; debido a la incompatibilidad de la hipótesis en la clasificación tradicional con los resultados de los análisis filogenéticos, obtenidos a partir estudios moleculares y morfológicos (Belotto *et al.*, 2014; Errasti, 2013; Natalucci *et al.*, 2009).

A continuación se describirán las características de las diferentes subfamilias: en la subfamilia *Tillandisioideae*, se encuentran plantas mayormente epífitas (crecen sobre otro vegetal usándolo como soporte), que poseen margen foliar entero, ovario súpero, fruto capsular y semillas con un coma de pelos (Mondragón Chaparro, Ramírez Morillo, Flores Cruz, & García Franco, 2011). En el caso de la subfamilia *Pitcairnioideae* se incluye a las bromeliáceas más antiguas y muchas de sus especies recuerdan a la familia de las gramíneas (*Poaceae*), de la cual evolucionaron. La mayoría son terrestres contando con un sistema radicular extensivo para la obtención de humedad y nutrientes (Dahlgren, Clifford, & Yeo, 1985; Errasti, 2013). *Bromelioideae*, es la subfamilia que está representada por miembros tanto terrestres como epífitos, con margen foliar serrado, ovario ínfero, fruto tipo baya y semillas desnudas (Mondragón Chaparro *et al.*, 2011). La subfamilia *Brocchinioideae*, tiene especies con frutos capsulares; pétalos pequeños, regulares y libres; sépalos (cada una de las piezas que forman el cáliz (cubierta exterior de una flor formada por hojas duras) de una flor) cocleares (forma de cuchara); semillas con apéndices, ovario parcial o completamente inferior, posee inflorescencia racemosa o paniculada (conjunto de flores que nacen agrupadas de un mismo tallo); sus hojas son enteras y generalmente se presenta el estrellado tipo chlorenchyma (tejido parenquimatoso (fundamental tejido de plantas, compuesto de

paredes delgadas células capaces de dividirse) que contiene clorofila) (Givnish *et al.*, 2011). En la subfamilia *Lindmanioideae* se agrupan especies que poseen frutos encapsulados, pétalos desnudos y pequeños, sépalos convolutos (enrollados longitudinalmente hasta formar un tubo), semillas con apéndices, sus anteras (parte superior del estambre que contiene el polen) son del tipo basifijas (adherida por la base al filamento (parte estéril y filiforme (con forma de hilo) del estambre, que sostiene a la antera)) a equitantes (hojas conduplicadas (hoja que en la yema se halla doblada a lo largo del nervio medio) que envuelven las más jóvenes de la misma yema o vástago (tallo nuevo)), tienen estigmas (parte superior del pistilo destinada a recibir el polen) rectos, las hojas son enteras, dentadas o espinosas; esta subfamilia no tiene estrellado chlorenchyma. Las especies de la subfamilia *Hechtioideae* se identifican por poseer frutos capsulares, semillas aladas hasta casi desnudas, sus flores son de tipo dioico (flores unisexuales en tallos y troncos separados), tiene hojas espinosas o casi enteras y suculentas, no presenta el estrellado chlorenchyma (Givnish *et al.*, 2011). *Puyoideae* es la subfamilia caracterizada por especies que cuentan con frutos encapsulados, sus semillas son aladas, los sépalos son convolutos y sus pétalos son espirales después de la apertura de las flores (Givnish *et al.*, 2011). Finalmente esta la subfamilia *Navioideae*, la cual cuenta con especies cuyos frutos son también capsulares, semillas aladas hasta desnudas, pequeños pétalos, sépalos cocleares; almacenan agua únicamente en el tejido periférico, los tricomas (excrecencia de morfología variable, formada a partir de células epidérmicas (pelos)) se disponen irregularmente con poca superposición y su epidermis es suave; sus hojas son

espinosas y no son suculentas; está ausente el estrellado chlorenchyma (Givnish *et al.*, 2011).



Figura 1. Especies representativas de las subfamilias de Bromeliaceae. *BROCCHINIOIDEAE*: (A) *Brocchinia prismática*, Venezuela; (B) *B. reducta*, Venezuela y Guyana; (C) *B. micrantha*, Venezuela y Guyana. *LINDMANIOIDEAE*: (D) *Lindmania guianensis*, Venezuela y Guyana; (E) *Connellia augustae*, Venezuela y Guyana. *TILLANDSIOIDEAE*: (F) *Catopsis berteroniana*, Florida hasta Brasil; (G) *Guzmania lingulata*, América Central y América del Sur; (H) *Tillandsia dyeriana*, Ecuador; (I) *Tillandsia setacea* (arriba de la rama) y *T. usneoides* (bajo la rama); (J) *Vriesea heliconioides*, México hasta Bolivia; (K) *Tillandsia ionantha*, América Central. *HECHRIODEAE*: (L) *Hechtia mooreana*, México; (M) *H. roseae*, México. *NAVIOIDEAE*: (N) *Naviaaff. Láctea*, Venezuela; (O) *Sequencia serrata*, Colombia. *PITCAIRNIOIDEAE*: (P) *Pitcairnia holstii*, Venezuela; (Q) *P. undulata*, México; (R) *Deuterocohnia lotteae*, Bolivia; (S) *Encholirium spectabile*, Brasil; (T) *Dyckia lindevaldae*, Brasil; (W) *Fernseea bocainensis*, Brasil; (X) *Cryptanthus fosterianus*, Brasil; (Y) *Neoregelia eleutheropetala* var. *Bicolor*, América del Sur; (Z) *Canistrum alagoanum*, Brasil (Givnish *et al.*, 2011).

2.1.1. *Bromelia karatas*

El género *Bromelia* L. originalmente incluía cinco especies, pero de estas cinco especies descritas por Linnaeus solo dos permanecen en el género *Bromelia*, estas son: *Bromelia pinguin* L. y *Bromelia karatas* L. (Monteiro & Forzza, 2016).

Bromelia karatas es también conocida como *Bromelia plumieri* o *Karatas plumieri* (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013). Se encuentra de manera silvestre distribuida en México, el Caribe, Centro y Norte de Sudamérica. En México se puede encontrar en Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Veracruz y Yucatán (CICY, 2010). En México es también conocida como chichipo, chiyol, piñuela, aguama, timbiriche y cazuela (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013).

B. karatas es una *Bromeliaceae* nativa del bosque seco tropical, expuesta a déficit de agua, alta temperatura y alto flujo de fotones fotosintéticos (Moyano *et al.*, 2012); está distribuida a 400 y 1500 m de altura y consta de hojas alargadas, gruesas y espinosas a lo largo de sus márgenes, además contiene inflorescencia sin pedúnculo (tallo de una hoja, fruto o flor por el cual se une al tallo de la planta) a nivel del suelo (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013); esta floración se puede encontrar entre los meses de mayo y octubre, en Yucatán por lo general se presenta en el mes de julio (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013; CICY, 2010). El fruto de *B. karatas* tienen aspecto de bayas con forma elipsoide, su tamaño varía de 5-10 cm de largo y 1-2 cm de diámetro (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013;

Parada & Duque, 1998), poseen una cascara fibrosa de color rosado o rojizo e incluso café o blanco amarillento, dependiendo el nivel de maduración del fruto; su pulpa es blanca y carnosa con características especiales de acidez y aroma, con dos series de semillas de placentación parietal, ubicadas alternamente hacia el centro; el fruto se puede encontrar durante los meses de julio a noviembre (el ciclo productivo de *B. karatas* es anual) (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013; CICY, 2010; Montes, *et al.*, 2014).

B. karatas posee variedad y diversidad de metabolitos antioxidantes; además de actividad antidiabética y de proteasa, entre otras (Moyano *et al.*, 2012). Ha sido empleada por los agricultores como cercos vivos por su capacidad resistente (sequias, plagas y enfermedades), también se ha consumido como alimento, ya sea fresco o preparado en bebidas y/o mermeladas, en la antigüedad también fue empleado en el tratamiento de algunas enfermedades (Parada & Duque, 1998).

Actualmente no es aprovechada en la región porque se desconocen sus usos y potencialidades como recurso promisorio. Es notable la pérdida de calidad en el recurso genético de *B. karatas* donde se observa una continua disminución de las poblaciones ya sea por adopción de nuevas tecnologías como: cercas de alambre espigado, introducción de nuevas especies o la habilitación de tierras para las labores agrícolas y ganaderas, y por la invasión de nuevos colonos en las zonas donde crecía en forma silvestre. Lo anterior, ha causado la pérdida de conocimiento tradicional de esta especie. Con el fin de valorar la especie y poder sugerir alternativas de uso y aprovechamiento, se han realizado algunos estudios como el

llevado a cabo en 1990 por Montes, Amador, Cuevas, & Cordoba, en el que establecieron la presencia de karatasina en los frutos de *B. karatas* y estudiaron las subunidades estructurales de esta cistein peptidasa. Después, Parada *et al.*, en 1996 y 1998, estudiaron los compuestos volátiles que le otorgan el aroma característico al fruto de esta bromelia, así como la caracterización de algunos glucoconjugados como precursores del aroma. Otro estudio fue realizado en el 2010 por González Salvatierra *et al.*, quien evaluó el efecto de la disponibilidad de agua y las condiciones de exposición a la luz sobre la actividad antioxidante de extractos foliares obtenidos de dos especies de bromelias (*Tillandsia brachycaulos* y *B. karatas*) obteniéndose que la mayor actividad antioxidante se da en condiciones de sequía y bajo una exposición a la luz alta, es decir en condiciones de estrés. En el 2013 Andrade Cetto y Medina Hernández, evaluaron el efecto hipoglucémico de un extracto acuoso y un extracto acuoso de etanol obtenidos de la planta de *B. karatas* sobre ratas diabéticas, demostrándose un efecto hipoglucémico efectivo. También en el 2017 Osorio *et al.*, evaluaron las propiedades reológicas y funcionales del fruto de la piñuela, mostrando que *B. karatas* produce un fruto rico en metabolitos secundarios y actividad antioxidante, lo cual ha sido asociado a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides.

2.2. Proteasas

Las proteasas de origen animal (quimosina, pepsina y tripsina), microbiano (*Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Aspergillus* sp. y *Rhizomocur* sp.) y vegetal (papaína, bromelaína, cardosina y cinarasa) han sido ampliamente utilizadas en la industria

alimentaria, de detergentes y biotecnológica, y recientemente en el campo de la medicina y/o salud (Chen *et al.*, 2016; González-Rábade, Badillo-Corona, Aranda-Barradas, & Oliver-Salvador, 2011; Moreno-Hernández *et al.*, 2015).

Las proteasas o peptidasas, son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos e isopeptídicos que unen aminoácidos dentro de las proteínas (proteólisis) (González-Rábade *et al.*, 2011; Nature, 2017). Estas se encuentran clasificadas en exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas se diferencian de acuerdo con su especificidad hacia el sustrato como aminopeptidasas y carboxipeptidasas, las primeras son capaces de romper el enlace peptídico en el extremo N-terminal, y las segundas, separan los péptidos en el extremo C-terminal (González-Rábade *et al.*, 2011; Gupta, Shah, & Chaphalkar, 2016). Las endoproteasas separan los péptidos distantes a los extremos terminales del sustrato, son clasificadas según su grupo funcional en cuatro tipos, serin-proteasa, aspártico-proteasas, cistein-proteasas y metaloproteasas (Tabla 1), y basándose en el pH las proteasas son llamadas proteasas acidas, alcalinas o neutras (Gupta *et al.*, 2016; Müller Esterl & Brandt, 2008).

De acuerdo con The MEROPS Database se consideran siete familias de proteasas: Aspartato, Cistein, Glutamin, Metalo, Asparagin, Serin y Treonin proteasas. De las cuales cinco se han encontrado en plantas: Serin, Cistein, Aspartato, Metalo y Treonin proteasas (González-Rábade *et al.*, 2011).

Tabla 1. Endopeptidasas (Müller Esterl & Brandt, 2008).

Clase de enzima	Resto catalítico	Representante típico
Serin-proteasas	Ser, His, Asp	Digestión: tripsina, quimotripsina, elastasa Coagulación sanguínea: trombina, plasmina, activador del plasminógeno tisular, factor VH Enzimas del sistema del complemento: C1r, C1s, C2b, Bb, D
Aspartato-proteasas	Asp	Presión sanguínea, economía de sodio: renina Digestión: pepsina Enzimas virales: proteasa del VIH
Cistein-proteasas	Cys, His	Muerte celular programada: caspasas Descomposición proteica lisosomal: catepsina B, H, I
Metalo-proteasas	Zn ²⁺ , coordinado por dos His, Glu	Presión sanguínea, economía del sodio: enzima convertidora de la angiotensina (ECA) Digestión: carboxipeptidasa A, B Reconstitución de tejidos: metaloproteasa de matriz (MMP)

2.2.1. Proteasas vegetales

Las proteasas vegetales han atraído la atención de los campos biotecnológicos y medicinales, debido a su actividad en un amplio rango de temperatura y pH. Las proteasas vegetales mayormente empleadas son la papaína (*Carica papaya*), bromelaína (*Ananas comosus*) y ficina (*Ficus carica*) (Chen *et al.*, 2016).

Los miembros de la familia *Bromeliaceae* producen gran variedad de proteasas (cistein proteasas) sin función aparente en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El papel biológico de estas cistein proteasas aun es incierto, pero de acuerdo a la amplia especificidad de sustrato que muestran estas enzimas, se ha sugerido que podrían proteger las frutas en maduración contra patógenos de plantas,

especialmente hongos e insectos (Vallés, Furtado, & Cantera, 2007). Algunas de las proteasas de esta familia de plantas son: la bromelaína, ananina y comosaina, obtenidas de tallos y frutas de piña (*Ananas comosus*), siendo la bromelaína la proteasa más reconocida de la familia, y una de las proteasas más estudiadas, con un peso molecular de 25 kDa. Además, las proteasas de frutas de otras especies de *Bromeliaceae* han sido estudiadas, como el caso de *Bromelia pinguin* (pinguinaina), *B. plumieri* (*B. karatas*) (karatasina), *B. hemispherica* (hemisfericina), *B. palmen* (palmerina), *B. sylvestris* (silvestrisina), *B. balansae*, *B. laciniosa*, *B. serra* y *B. hieronymi* y *Pseudonanas macrodentes* (Montes *et al.*, 1990; Natalucci, Brullo, López, Hilal, & Caffini, 1996; Pardo *et al.*, 2000). Gran parte de estas proteinasas, son ampliamente utilizadas en muchas industrias, como es el caso de la industria alimentaria como ablandador de carne (para separar parcialmente los tejidos conectivos), en la elaboración de cerveza (para solubilizar proteínas de grano y estabilizar la cerveza) y en el horneado de galletas (para mejorar la nitidez), así como para producir hidrolizados de proteínas. Además, actualmente se han empleado para producir muchos alimentos en los que las enzimas pueden reemplazar sustancias químicas potencialmente cancerígenas o dañinas. Otras aplicaciones son en las industrias del cuero y textiles, para eliminar el vello, la lana y suavizar las pieles. Las aplicaciones farmacéuticas de la bromelaína como un compuesto terapéutico se realizaron en 1957: sus acciones incluyen propiedades antitumorales, modulación de la inmunidad, asistencia digestiva, curación mejorada de heridas y mejoría cardiovascular y circulatoria, entre otras. Por su acción como agentes antiinflamatorios y en el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a los nutrientes y agentes terapéuticos, las cisteínas proteasas

de plantas, especialmente la bromelaína y la papaína, han demostrado ciertas ventajas en aplicaciones *in vivo* en pacientes con Alzheimer (Vallés *et al.*, 2007).

En cuanto a *B. plumierie* también llamada *B. karatas*, la proteasa que se ha logrado aislar y caracterizar de esta *Bromeliaceae* es una proteasa cisteínica llamada karatasina, la cual ha sido encontrada en el fruto de la mencionada planta y lograda extraer a través de membranas Spectrapore (13 kDa) pero no a través de Spectrapore con diámetro de poro promedio de 3.5 kDa. Esta proteasa consta de un peso aproximado de 24.868 kDa (Montes *et al.*, 1990).

La karatasina nativa presente en el jugo de fruta de *B. karatas* parece ser el resultado de la asociación de subunidades de masa molecular pequeña, unidas por enlaces disulfuro y fuerzas electrostáticas. Además, La composición de aminoácidos y la secuencia parcial de la karatasina hasta la posición 14 desde el extremo amino tienen analogías discretas con papaína y bromelaína, otras cistein proteasas presentes en la papaya (papaína) y piña (bromelaína), teniendo la mayor homología con la bromelaína del tallo dado a que pertenecen a la misma familia de plantas, las *Bromeliaceas* (Tabla 2) (Montes *et al.*, 1990).

Tabla 2. Comparación de la secuencia aminoacídica N-terminal de la karatasina, papaína y bromelaína del tallo (Montes *et al.*, 1990).

Karatasina	<div style="display: flex; justify-content: space-between; margin: 0 10px;"> 5 10 15 </div> Val-Pro-Glu-Thr-Trp-Asp-X-X-Asp Tyr-Gly-Ala-Gln Thr-X- (Val)
Papaina	Ile-Pro-Glu-Tyr-Val-Asp-Trp-Arg-Gln-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-

2.3. *Candida albicans*

El género *Candida* incluye aproximadamente a 150 especies (Lopez-Ávila, Dzul-Rosado, Lugo-Caballero, Arias-León, & Zavala-Castro, 2016), entre ellas, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. dubliniensis*, *C. norvegensis* y *C. albicans*, las cuales son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos, siendo *C. albicans* la más relevante en términos de patogenicidad (Sanguinetti, Posteraro, & Lass-Flörl, 2015).

De acuerdo a la taxonomía, *Candida albicans* se coloca en el phylum *Ascomycota*, orden *Endomycetales*, a la que la familia *Saccharomycetaceae* también pertenece (Cruz Quintana *et al.*, 2017). En la Tabla 3 se muestra la taxonomía de *C. albicans* desde phylum hasta género.

Tabla 3. Taxonomía de *Candida albicans* (Aguilera, 2010; Cruz Quintana *et al.*, 2017).

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Ascomycotina</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>

Orden	<i>Saccaromycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genero	<i>Candida</i>

C. albicans es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 30°C (Nagao & Udey, 2015).

En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio (Mayer, Wilson, & Hube, 2013; Tanaka, 2012).

El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped.

Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas, se reproduce de forma asexual por gemación (Tanaka, 2012), y su ciclo infeccioso consta de cuatro etapas (Figura 2): *C. albicans* comúnmente coloniza la superficie epitelial (etapa 1) y causa infecciones superficiales (etapa 2),

pero en condiciones cuando se ve comprometido el anfitrión, el hongo establece infecciones profundas (etapa 3) para penetrar aún más en el tejido epitelial. Ocasionalmente, la infección por *C. albicans* se disemina (etapa 4), lo que permiten al hongo colonizar e infectar otros tejidos del huésped y puede ser fatal (Gow, Veerdonk, Brown, & Netea, 2011). Este proceso infeccioso implica numerosos factores de virulencia incluyendo adhesinas, la producción de enzimas hidrolíticas (proteínas secretoras de aspartil (SAP), fosfolipasas, y lipasas), formación de hifas, y el cambio fenotípico. SAP2 (y posiblemente otras proteínas SAP) es conocido por degradar muchas proteínas humanas, incluyendo mucina, proteínas de matriz extracelular, numerosas moléculas del sistema inmune, proteínas de las células endoteliales, y factores de coagulación (Mayer *et al.*, 2013; Naglik, Challacombe, & Hube, 2003).

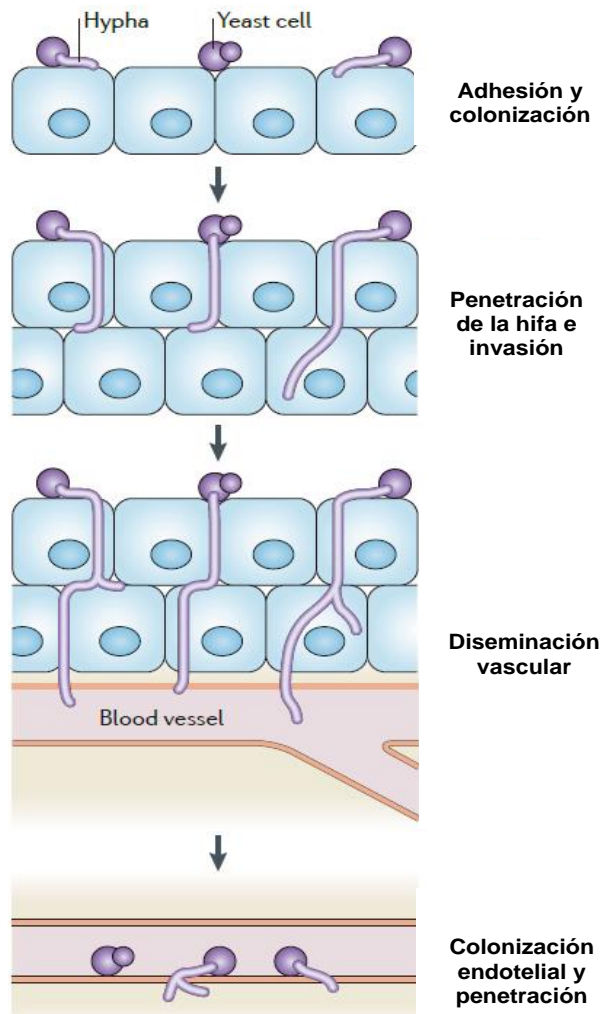


Figura 2. Ciclo infeccioso de *Candida albicans*. 1) Las levaduras de *C. albicans* forman hifas que entran en contacto con el epitelio y se adhieren fuertemente a las células huésped. Esta etapa esta mediada por una serie de adhesinas, incluyendo miembros de la familia Als y Hwp1. 2) Esto es seguido por la invasión epitelial inicial a través de dos de las vías: (i) por hongos impulsado por la penetración activa y (ii) la endocitosis inducida mediada anfitrión. 3) Alargamiento y ramificación de las hifas resultando en una extensa invasión interepitelial. Sorprendentemente, esta invasión en sí no causa daños en el epitelio. 4) La secreción simultánea de la toxina peptídica de hongos, Candidalisina, lisa los epitelios huésped y causa la destrucción del tejido (Gow *et al.*, 2011; Wilson, Naglik, & Hube, 2016).

Candida albicans es una levadura comensal, presente en las mucosas de los de seres humanos (Shankar *et al.*, 2015) y los animales de sangre caliente, siendo habitualmente aislada de la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y urogenital, y su conversión en agente patógeno depende principalmente de la alteración del

equilibrio entre la microbiota y el sistema inmunitario del hospedador. Es considerada por ello un patógeno oportunista (Aguilera, 2010; Shankar *et al.*, 2015).

Este hongo dimórfico ocasiona en el 80% de los casos, candidiasis vulvovaginal (CVV), esta infección ataca a cerca de tres cuartas partes de las mujeres fértiles durante su vida, y aproximadamente la mitad de estas mujeres desarrolla un nuevo episodio de micosis. Aunque los factores de riesgo en su mayoría no son identificables, etiologías conocidas de CVV recurrente incluyen resistencia intrínseca de *Candida* al tratamiento con azoles, uso de anticonceptivos, la inmunosupresión, la actividad sexual, y la hiperglucemia (Bullarbo *et al.*, 2017; Lopez-Ávila *et al.*, 2016). Presenta como parte de los síntomas: flujo, prurito, eritema, etc. Los síntomas típicos de la CVV consisten en prurito vulvar acompañado de secreción vaginal amarillenta y/o blanquecina, sin embargo, la secreción puede variar entre acuosa y densa, de manera homogénea. Puede haber dolor vaginal, dispareunia, ardor vulvar e irritación (Bullarbo *et al.*, 2017).

Otros padecimientos que puede ocasionar *C. albicans* son:

- **Candidiasis o moniliasis:** Infección superficial que aparece principalmente en individuos con defensas bajas, afectando a la piel, las mucosas y a las uñas. Los síntomas son leves como: enrojecimiento, picazón y malestar. En personas con cáncer, trasplantados o con SIDA la infección puede hacerse sistémica, y puede llegar a ser mortal (Tanaka, 2012).

- **Efectos alérgicos:** *C. albicans* rara vez ocasiona estos efectos y suelen observarse en pacientes con colonización o infección cutáneo-mucosa (Tanaka, 2012).
- **Efectos en la maternidad:** Candidiasis cutánea congénita (CCC) es una infección intrauterina congénita muy poco frecuente. Se adquiere por vía ascendente desde el tracto genital de la madre y se manifiesta de forma sistémica o cutánea en los seis primeros días de vida (Tanaka, 2012).

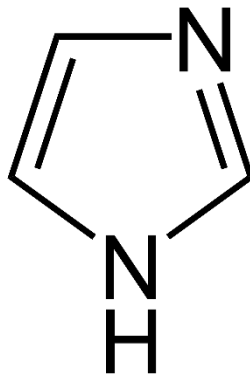


Figura 3. Estructura química de un imidazol.

La forma de tratamiento para *C. albicans* más usada consiste en una inducción intensa con antifúngicos (imidazoles, Figura 3), tales como butoconazol, clotrimazol, miconazol, terconazol, tioconazol, ketoconazol, fluconazol o itraconazol; seguido de un período prolongado de terapia de mantenimiento (Matheson & Mazza, 2017). Los imidazoles actúan en un componente importante de la membrana del hongo, el ergosterol, el cual es un lípido de la familia de los esteroides que actúa dándole fluidez, simetría e integridad; además de contribuir en funciones propias de muchas enzimas como la quitinsintetasa, que es importante para el crecimiento y división de

la propia célula. Los derivados imidazólicos inhiben las enzimas oxidativas asociadas al lanosterol-1,4- α -desmetilasa, bloqueando la conversión de lanosterol en ergosterol, lo que produce una alteración en la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas. Por otro lado, promueven la acumulación de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de los organelos intracelulares del hongo (Lopez-Ávila *et al.*, 2016).

2.4. Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son uno de los mayores problemas de salud pública que actualmente existen (OMS, 2017a). Debido a que los riesgos a la salud humana transmitidos por los alimentos pueden deberse a causas de orden biológico, químico o físico, los riesgos por peligros microbiológicos constituyen problema más grave e inminente (López-Hernández *et al.*, 2014). Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer (OMS, 2017a).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha reportado que las ETA afectan cada año alrededor de 600 millones de personas en el mundo, de las cuales 420 000 mueren, siendo el grupo de edad más afectado los menores de 5 años, con 125 000 muertes al año. Por otro lado, se ha establecido que las infecciones diarreicas son las más comúnmente asociadas al consumo de alimentos

contaminados, enfermando cada año aproximadamente a 550 millones de personas y de las cuales 230 000 mueren (OMS, 2017a, 2017b).

Las principales bacterias que han ocasionado ETA son: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria* y *Vibrio cholerae*. Estos microorganismos bacterianos han sido principalmente tratados con el empleo de antimicrobianos, como los antibióticos, sin embargo, su utilización excesiva o errónea en la medicina veterinaria y humana se ha vinculado a la aparición y propagación de bacterias resistentes, que hacen que los tratamientos de enfermedades infecciosas en los animales y en el hombre dejen de ser eficaces. Las bacterias resistentes se introducen en la cadena alimentaria a través de los animales (por ejemplo, las salmonellas a través del pollo). La resistencia a los antimicrobianos es una de las principales amenazas a las que se enfrenta la medicina moderna (OMS, 2017a).

2.4.1. *Salmonella* Typhimurium

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es una bacteria Gram-negativa y anaerobia facultativa, en forma de bastón (bacilo), perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 4) (Cohen, Mechanda, & Lin, 1996; Diamond *et al.*, 2017), es no esporulada, móvil por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*); es capaz de fermentar la glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. typhi*), también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcita. Por otro lado, son oxidasa negativo,

catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativo y producen SH₂ (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008). A pesar de su tamaño reducido (0.5 µm x 2 µm aproximadamente), se adapta fácilmente y logran colonizar diferentes ambientes; no obstante, son las temperaturas cercanas a 37°C las que más le favorecen (Perdomo Flórez, Ortiz Rivera, Nuñez rosero, & Castro Betancourth, 2010).

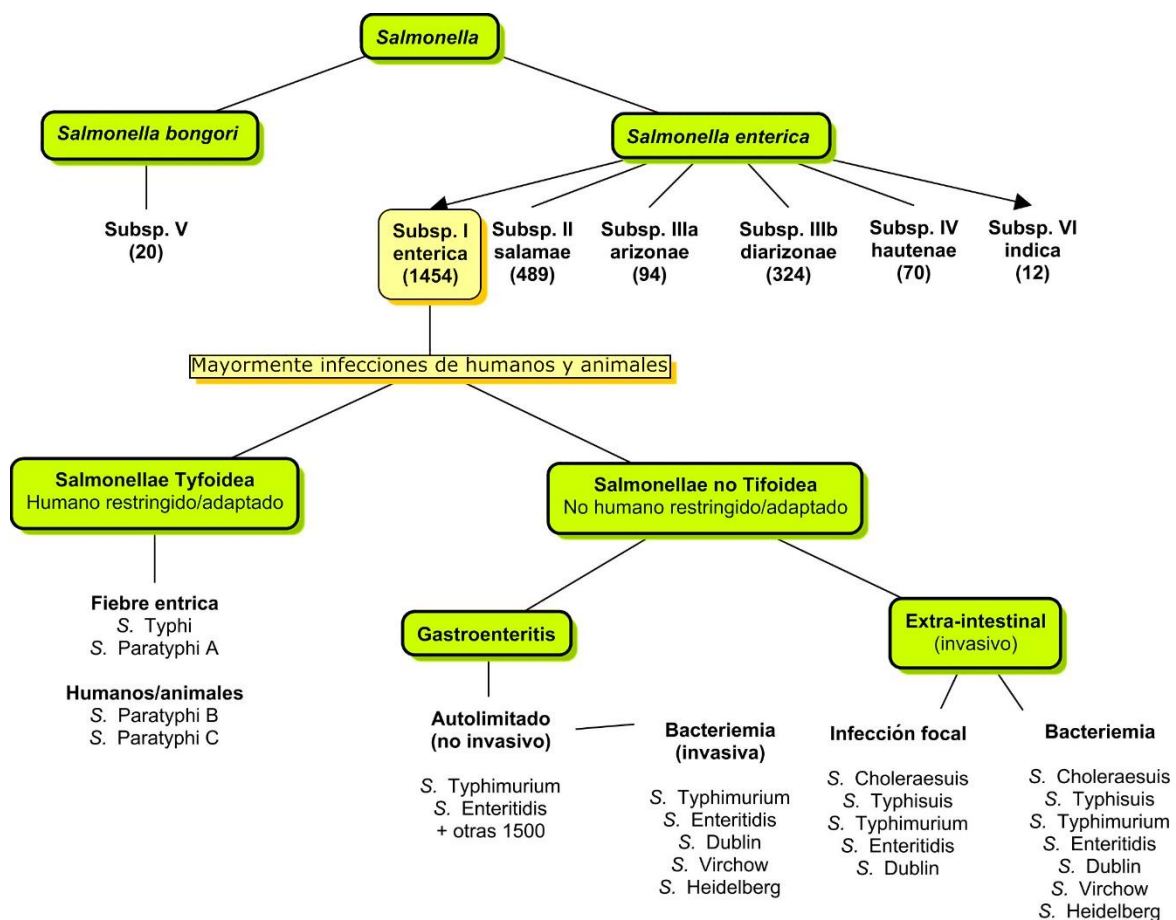


Figura 4. Diagrama representando la taxonomía del género *Salmonella* (Langridge, Wain, & Nair, 2013).

S. Typhimurium es transmitida por los alimentos y el agua, causando millones de casos de gastroenteritis, fiebre y septicemia al año, particularmente en bebés y

jóvenes (Diamond *et al.*, 2017). De acuerdo con la OMS, cada año enferman 550 millones de personas, de las cuales 220 millones son niños menores de 5 años. *Salmonella* es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial (OMS, 2017b).

La salmonelosis, que generalmente se caracteriza por la aparición brusca de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces, vómitos, es una enfermedad provocada por *Salmonella*. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre 6 y 72 horas (generalmente 12 a 36 horas) después de la ingesta de *Salmonella*, y la enfermedad dura entre 2 y 7 días (OMS, 2017a, 2017b). En la mayoría de los casos, los síntomas de salmonelosis son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico. Sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños pequeños y en ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida (OMS, 2017b).

Los alimentos asociados con los brotes de salmonelosis son, por ejemplo, los huevos, la carne de ave y otros productos de origen animal (OMS, 2017a). La ingesta de alimentos contaminados con *Salmonella* afecta las células del epitelio intestinal, lo que produce su destrucción, con consecuencias evidentes desde el periodo de incubación, el cual dura de 8 h a 72 h; durante este periodo el paciente usualmente padece diarrea y dolor abdominal, el cual, en ocasiones, es acompañado de fiebre (Perdomo Flórez *et al.*, 2010). La muerte por este microorganismo cada vez es más frecuente, debido a la creciente resistencia a los

antibióticos. Sin embargo, la infección a menudo se puede evitar atendiendo la higiene y el saneamiento de los alimentos (Diamond *et al.*, 2017).

En los casos graves el tratamiento consiste en la reposición de los electrolitos perdidos a raíz de los vómitos y la diarrea (suministro de electrolitos como iones de sodio, potasio y cloruro) y la rehidratación. La terapia antimicrobiana sistemática no está recomendada para casos leves o moderados en personas sanas. Esto se debe a que los antimicrobianos podrían no eliminar completamente la bacteria y seleccionar cepas resistentes, con lo cual el fármaco se volvería ineficaz. Sin embargo, los grupos de riesgo, como los lactantes, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos, podrían necesitar tratamiento antimicrobiano (OMS, 2017b).

2.4.1.1. Infección por *Salmonella* Tiphymurium

Salmonella posee estrategias extremadamente versátiles para infectar diferentes células huésped. Curiosamente, prefiere proliferar en un entorno no permisivo de las células inmunes como los macrófagos en lugar de las células epiteliales, que son muy permisivas (Garai, Gnanadhas, & Chakravorty, 2012).

Salmonella, antes de invadir la célula, debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o pili, cuatro de los cuales están definidos genéticamente como: fimbria tipo 1 (fim), fimbria codificada por plásmidos (pef), fimbria polar larga

(Ipf) y fimbria agregativa delgada (Curli) (agf/csg) (Sánchez Jiménez & Cardona Castro, 2003).

Después de que *Salmonella* se adhirió a la célula huésped utiliza un Sistema de Secreción de Proteínas Tipo III (T3SS), que está codificado sobre las islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2 respectivamente para cada isla) las cuales participan en el transporte de proteínas efectoras al citoplasma de la célula huésped, y cuyo objetivo es promover la invasión y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium*. Después del contacto con las células huésped, SPI-1 transporta proteínas efectoras que permiten la invasión bacteriana a través de la membrana plasmática, lo que resulta en la inducción de respuestas inflamatorias intestinales. Por el contrario, el SPI-2 transporta proteínas importantes para la supervivencia intracelular y movimiento vacuolar a través de la membrana de la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV). Las proteínas efectoras que se depositan dentro de la célula huésped por los dos T3SSs promueven la entrada, la supervivencia y la reproducción de las bacterias dentro de los tejidos del huésped (Figura 5) (Larock, Chaudhary, & Miller, 2015).

Salmonella induce la ondulación del citoesqueleto con ayuda de la proteína actina y macropinocitosis, para promover la absorción bacteriana en las células no fagocíticas, y los efectores de SPI-1 revierten estos cambios después de la entrada. La fagocitosis por los macrófagos también implica macropinocitosis, que se produce a través de cualesquiera mecanismos SPI-1-dependiente o SPI-1-independientes. La captación macropinocítica de *Salmonella* se produce rápidamente, y las

bacterias inicialmente residen en un espacio fagosomal compartido, que se somete a un proceso de maduración para formar un compartimento único que se conoce como SCV. *Salmonella* modifica el contenido de lípidos y proteínas de la SCV e induce cambios morfológicos, incluyendo polimerización de las asociaciones de actina de la membrana citoplasmática y tabulación endosomal de la membrana vacuolar, utilizando los efectores de la SPI-2 (Figura 6) (Larock *et al.*, 2015).

Salmonella manipula la membrana del huésped para dirigir el SCV hacia el núcleo y luego promover el movimiento del SCV hacia la periferia de la célula, donde presumiblemente se liberan bacterias en las células intestinales para infectar las células vecinas (Haraga, Ohlson, & Miller, 2008).

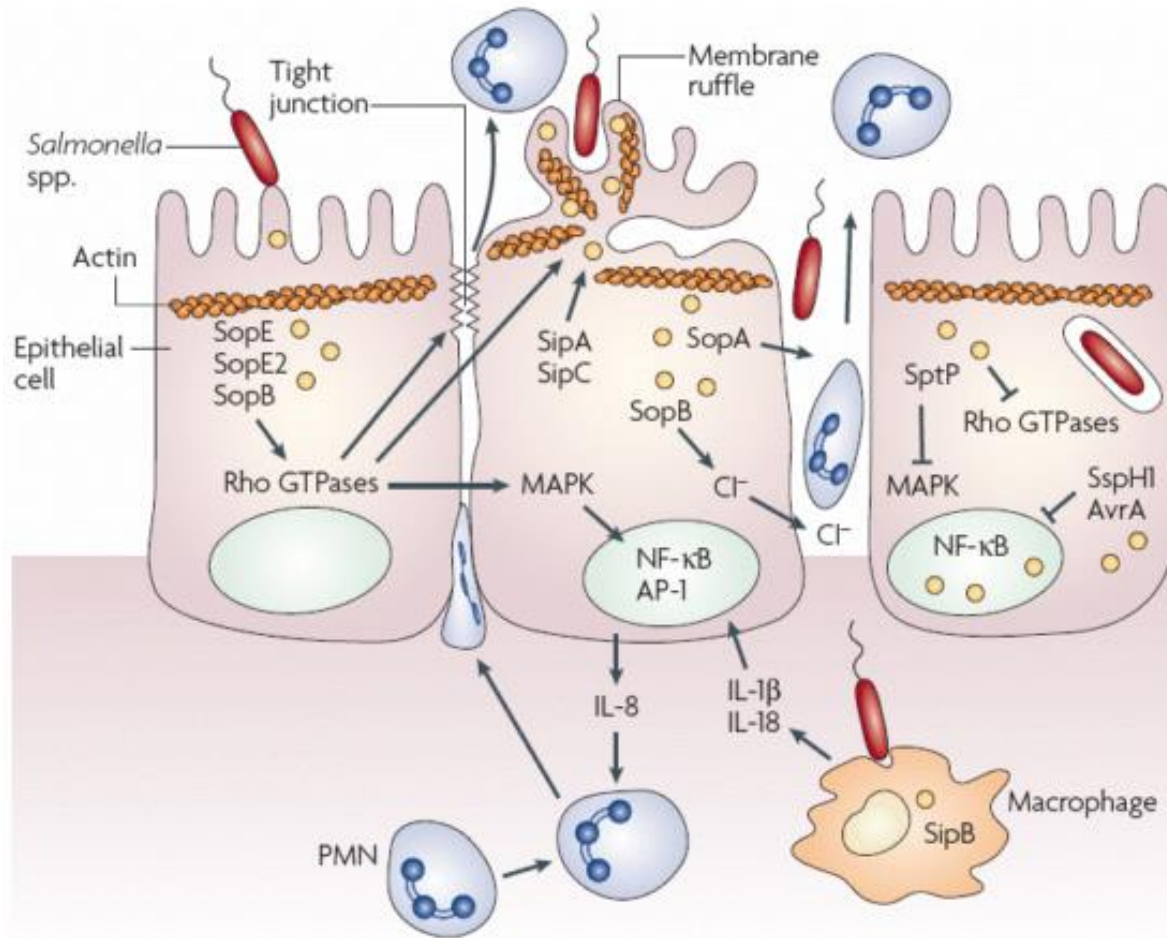


Figura 5. Cambios inducidos en la célula hospedadora para la internalización de *S. Typhimurium*. Cuando entra en contacto con la célula epitelial, *Salmonella* ensambla su sistema de secreción tipo 3 (SST3) codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) e inyecta efectores (esferas amarillas) en el interior del citoplasma eucariota. Los efectores SopE, SopE2 y SopB activan las GTPasas de tipo Rho, resultando en el reordenamiento del citoesqueleto por la actina en forma de pliegues de membrana, la inducción de la vía de la MAP quinasa (MAPK) y la desestabilización de las uniones estrechas entre los enterocitos. Cambios en el citoesqueleto por la actina debidos a la acción de los efectores SipA y SipC, llevan a la internalización de las bacterias. La señalización por la MAPK activa los factores de transcripción AP-1 y NF-κβ, los cuales a su vez inducen la expresión de la quemoquina Interleuquina-8 (IL-8), potente quimioatrayente de leucocitos polimorfonucleares (PMN). SipB induce la activación de la Caspasa-1 en macrófagos, con la consecuente liberación de IL-1β e IL-18, aumentando así la respuesta inflamatoria. La desestabilización de las uniones estrechas permite la transmigración de PMNs desde la región basolateral del epitelio a la apical, la pérdida de líquido de las células y el acceso de las bacterias a la lámina propia. Posteriormente, el citoesqueleto de actina se recompone y la señalización por la MAPK se apaga gracias a la acción enzimática de SptP. Esto resulta también en el silenciamiento de la respuesta inflamatoria, al cual también contribuyen SspH1 y AvrA mediante la inhibición de la activación de NF-κβ (Betancor & Yim, 2012; Haraga et al., 2008; Larock et al., 2015).

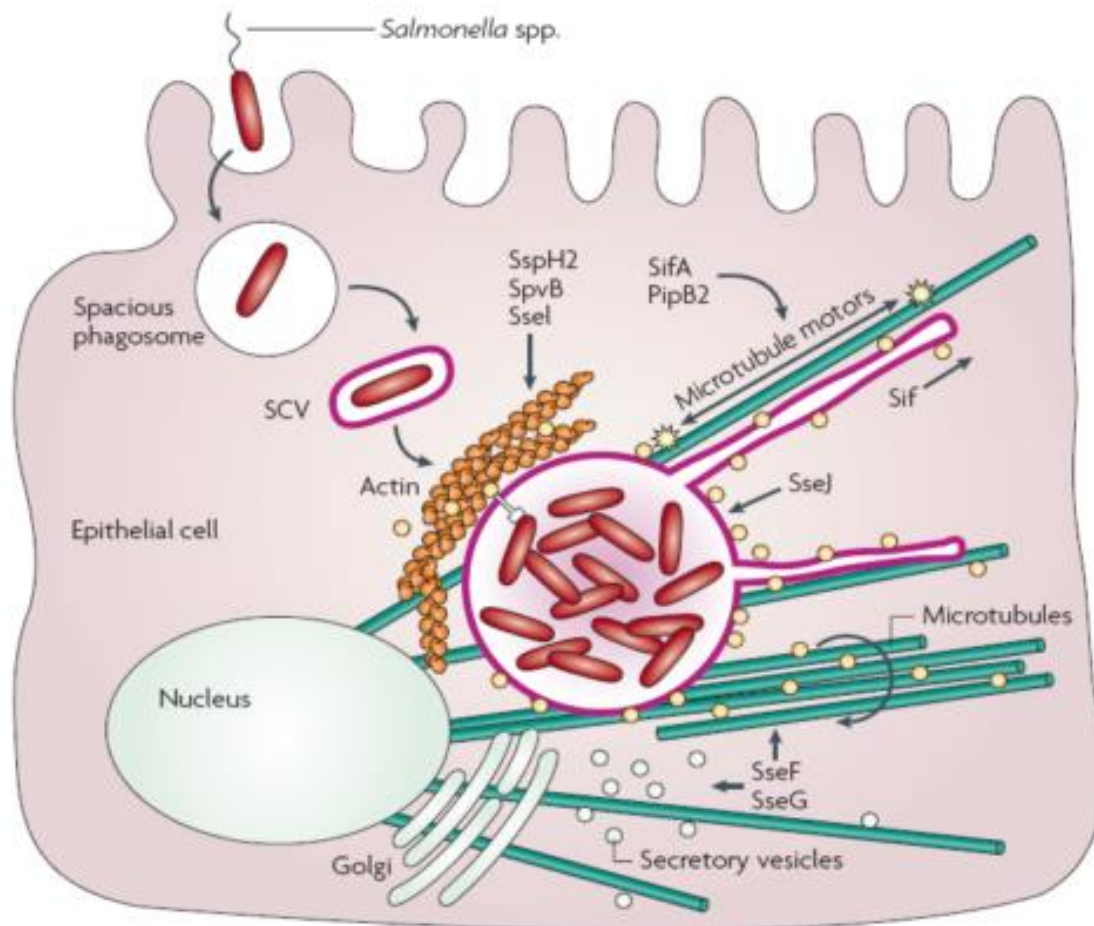


Figura 6. Formación de la SCV e inducción del SST3 codificado en SPI-2 en el interior celular.

Una vez que *Salmonella* es internalizada en la célula hospedadora, queda incluida en una vacuola formada por los pliegues de membrana implicados en la internalización. Posteriormente, ocurre fusión de los lisosomas, acidificando el contenido vacuolar, y asociación de marcadores endocíticos lisosomales como la proteína LAMP-1, localizada en la membrana vacuolar (de color púrpura). A esta vacuola se la conoce como SCV (del inglés, "Salmonella containing vacuole"). Dentro de la SCV se induce la expresión y ensamblaje del sistema de secreción tipo 3 (SST3) de SPI-2, mediante el cual se translocan variados efectores bacterianos (esferas amarillas) a través de la membrana vacuolar. Los efectores del SST3 de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) SifA y PipB2 contribuyen a la formación de unos filamentos conocidos como Sifs (del inglés "Salmonella induced filaments"), los cuales se disponen a lo largo de los microtúbulos (en verde) y regulan la acumulación de proteínas motoras (estrellas amarillas) sobre los Sifs y la SCV. El significado biológico de los Sifs se desconoce, aunque su formación se asocia con la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir y replicarse intracelularmente. SseJ es una deacilasa que es activa en la membrana de la vacuola. SseF y SseG causan acumulación de microtúbulos adyacentes a la SCV y dirigen el tráfico de vesículas derivadas del Golgi hacia la SCV. La actina se acumula alrededor de la SCV y esto es dependiente del SST3 de SPI-2. SspH2, SpvB y SseI se piensa juegan un rol en esta acumulación de actina. *Salmonella* manipula las membranas del huésped para dirigir la SCV hacia el núcleo y luego promover el movimiento del SCV hacia la periferia de la célula, donde presumiblemente se liberan bacterias a las células intestinales para infectar las células vecinas. (Betancor & Yim, 2012; Haraga *et al.*, 2008; Larock *et al.*, 2015).

2.4.1.2. Resistencia a fármacos

Salmonella Typhimurium ha sido tratada con el uso de diversos antibióticos entre ellos ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina, hacia los cuales ha mostrado cierta inmunidad o resistencia (de Toro *et al.*, 2014).

Los betalactámicos (ampicilina, amoxicilina, oxacilina, metilcilina, entre otros) son antibióticos de actividad bactericida lenta, producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana (inhibición del peptidoglicano) e inducción de la autólisis bacteriana afectando la integridad de la pared celular. La generación de resistencia por *Salmonella* hacia estos fármacos, la realiza mediante la producción de enzimas betalactamasas, las cuales son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).

Los aminoglucósidos poseen una potente acción bactericida, reconociendo a la inhibición de la síntesis proteica como el mecanismo de acción tradicional de estos compuestos y también producen una lectura errónea de la información del ARN mensajero, determinando la incorporación de algunos aminoácidos incorrectos en la cadena peptídica. Los principales mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos son: a) Alteración del sitio blanco, por mutación de los genes de proteínas ribosomales o del ARN 16S; b) Reducida acumulación intracelular del compuesto, atribuida a la impermeabilidad de la membrana externa, causada por varios factores, como son cambios en las proteínas de membrana externa; c)

Alteración del acoplamiento de la síntesis de ATP con el transporte de electrones, produciéndose una disminución de la entrada del antimicrobiano a la bacteria por fallas en la generación de una fuerza protón motriz; d) Resistencia mediada por eflujo; e) Inactivación de los compuestos por enzimas modificantes de aminoglucósidos, estas enzimas catalizan la modificación covalente de grupos aminos e hidroxilos de la molécula, generando modificaciones químicas que llevan al aminoglucósido a unirse débilmente a los ribosomas bacterianos y, por lo tanto, también afectando el ingreso del antibacteriano en la fase 2 dependiente de energía (Mella M. *et al.*, 2004).

2.4.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram-positiva, intracelular, anaerobia facultativa en forma de bastón (bacilo), no formadora de esporas y móvil (Ferreira, Wiedmann, Teixeira, & Stasiewicz, 2014; Tessema, Møretrø, Kohler, Axelsson, & Naterstad, 2009).

L. monocytogenes es una de las causas más importantes de enfermedades transmitidas por alimentos, siendo la listeriosis su padecimiento más severo. Esta ETA afecta principalmente a mujeres embarazadas, lactantes, ancianos y personas inmunocomprometidas, y puede ser causada por la ingesta de alimentos de origen animal, ya sea en carnes, embutidos y/o lácteos, contaminados con *L. monocytogenes*; también a esta bacteria la podemos encontrar ampliamente distribuida en el medio ambiente (Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson, & Whiting,

2017; Lepe *et al.*, 2014; Tessema *et al.*, 2009). La listeriosis puede presentarse como septicemia, meningitis u otras infecciones del sistema nervioso central y durante el embarazo puede ocasionar abortos espontáneos o muerte fetal.

Este patógeno transmitido por alimentos causa aproximadamente 1460 hospitalizaciones cada año en los Estados Unidos, de las cuales 260 terminan en muerte. En los países desarrollados del mundo se presentan de 0.36 a 5 casos de listeriosis por cada millón de personas al año (Ferreira *et al.*, 2014).

2.4.2.1. Infección por *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes puede internalizarse tanto en las células fagocíticas como no fagocíticas. La entrada a las células fagocíticas está mediado por el fagocito, mientras que la entrada a las células no fagocíticas está iniciada por la bacteria, que opta por el receptor celular mediado por la maquinaria de endocitosis (Radoshevich & Cossart, 2017; Tessema *et al.*, 2009).

La internalización o entrada de *L. monocytogenes* es la etapa característica de infección de este microorganismo, en ella intervienen la internalina A (InIA) e InIB, las cuales son dos miembros de la familia de 25 proteínas llamadas internalinas. Estas proteínas se unen a la membrana celular de las eucariotas mediante sus receptores, E-cadherina y Met, respectivamente, induciendo así la absorción bacteriana a través de endocitosis mediada por receptores. Las internalinas pueden anclarse a la pared celular, asociarse con la pared celular o ser secretadas y

mediadas por una variedad de diferentes funciones virulentas. Por ejemplo, la adición de InIC afecta la rigidez del citoesqueleto y la señalización inmune innata, InIP es mediadora de la invasión a la placenta e InIJ es expresada solamente *in vivo*. Una vez que la bacteria se internaliza dentro de la vacuola, utiliza listeriolisina O (LLO) y dos fosfolipasas, fosfolipasa A (PlcA; también conocido como 1-fosfatidilinositol fosfodiesterasa) y PlcB, para la ruptura vacuolar y escape *L. monocytogenes*, las cuales son etapas cruciales para su patogenicidad. En células no fagocíticas, una lipoproteína PrfA dependiente llamada péptido feromona codifica la lipoproteína A (PpIA), y tras la secreción de la lipoproteína de la bacteria, el péptido N-terminal pPpIA se libera y promueve el escape vacuolar. El péptido pPpIA no afecta la eficiencia de la perforación de la vacuola, pero en cambio conduce a la señalización y secreción alteradas de una subunidad de translocasa SecA2 sustrato dependiente, que probablemente contribuyen al escape vacuolar en un mecanismo aún desconocido. Además, se ha revelado que, en los fagocitos profesionales, la escisión del fago del genoma bacteriano restaura la actividad de un gen de competencia, llamado comK, y sorprendentemente favorece el escape vacuolar en macrófagos. La proteína ComG de secreción tipo II, y ComEC, un canal de membrana, mostraron ser necesarios para el escape fagosomal bacteriano, lo que lleva a la hipótesis que sus estructuras contribuyen a la interrupción física del fagosoma (Figura 7) (Radoshevich & Cossart, 2017).

Posteriormente, *L. monocytogenes* puede sobrevivir y dividirse en el citosol de la célula huésped e inducir cambios en la morfología de los orgánulos de la célula huésped, alterando de ese modo su función para propagar la infección. Aunque, la

primera función reportada de LLO era la formación de poros que conducían a la ruptura fagosomal, varios estudios recientes han puesto de manifiesto las funciones adicionales de LLO en la membrana plasmática antes del ingreso y dentro de la célula. Tras la infección bacteriana, LLO causa una alteración en la morfología mitocondrial y una función que beneficia al patógeno por un mecanismo aún desconocido. De esta manera la mitocondria se vuelve pequeña y redonda, y si este proceso se suprime de manera experimental, la bacteria no puede dividirse eficientemente. Además, LLO induce una fisión mitocondrial no canónica proceso que es independiente de la proteína relacionada con dinamin-1 (DRP1). Las mitocondrias se contraen tras el contacto con el retículo endoplásmico (RE) en los puntos de fisión, y se requiere la polimerización de actina para potenciar la generación de la fuerza necesaria para la fisión en ausencia de Drp1. Las mitocondrias no son los únicos organelos afectados por esta toxina, estudios han mostrado que la LLO también afecta al RE y los lisosomas (Figura 7) (Radoshevich & Cossart, 2017).

L. monocytogenes posee la capacidad de polimerizar la actina y propagarse célula a célula. Esta bacteria expresa un factor de virulencia anclado llamado proteína de ensamble a actina (ActA), la cual se induce en el citoplasma del huésped e interacciona con el complejo ARP2/3 para mediar la polimerización de actina y generar suficiente fuerza para propagarse de una célula a otra y con ayuda de la formación de colas similares a las de un cometa (Figura 7) (Radoshevich & Cossart, 2017).

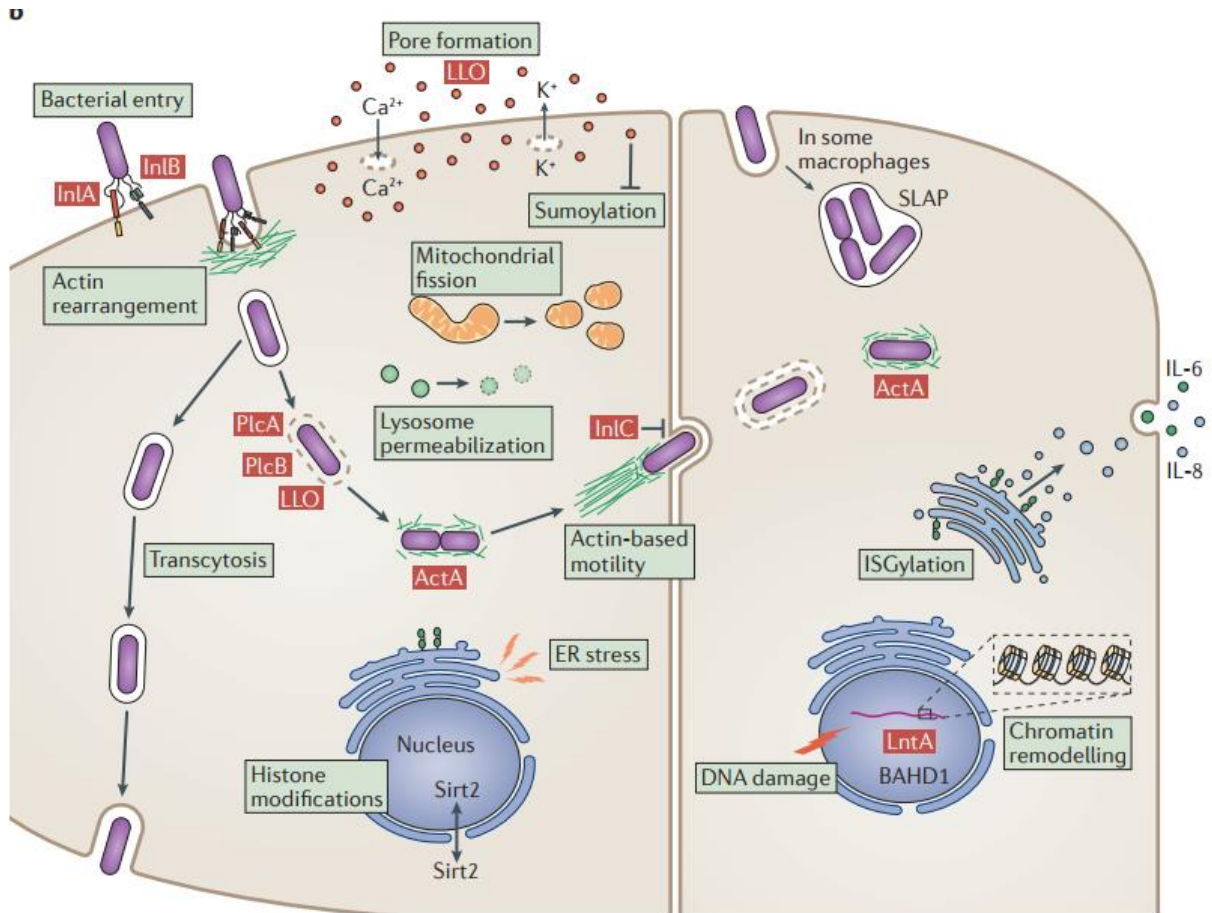


Figura 7. Ciclo infeccioso de *Listeria monocytogenes*: *L. monocytogenes* entra en las células no fagocíticas, como las células epiteliales, a través de endocitosis mediada por receptor, y en la mayoría de los casos, se escapa de la vacuola. En células caliciformes, puede transmitirse a través de la célula dentro de una vacuola, y en algunos macrófagos, puede replicarse en espaciosos fagosomas que contienen *Listeria* (SLAP). Sobre el escape vacuolar, *L. monocytogenes* la infección tiene una plétora de efectos sobre la célula a través de la actividad de potentes factores de virulencia. Listeriolisina O (LLO), la fosfolipasa A (PlcA) y PlcB median el escape vacuolar. LLO también conduce a cambios en la modificación de histonas, desumoiación, fisión mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico (RE) y permeabilización lisosomal, todo lo cual puede ocurrir a partir de la actividad de formación de poros de LLO extracelular. La proteína A dirigida a *Listeria* nuclear (LntA) interactúa con el bromo adyacente complejo de proteína que contiene el dominio de homología 1 (BAHD1) para la expresión de genes estimulados por el interferón (ISG), y la proteína deacetilasa sirtuina 2 dependiente de NAD (SIRT2) se dirige hacia el núcleo para desacetilar la histona 3at lisina 18, llevando a los cambios en el empaque de cromatina que alteran la expresión génica aguas abajo. La infección también conduce a daño en el ADN, y el huésped las células combaten la infección regulando positivamente varios efectores antibacterianos, por ejemplo, ISG15 y el proceso de modificación por ISG15 llamada ISGilación, que modula la secreción de citocinas por modificación covalente de ER y Golgi proteínas. ActA, proteína que induce el ensamblaje de actina; IL, interleucina; Inl, internalina (Radoshevich & Cossart, 2017).

2.4.2.2. Resistencia a fármacos

L. monocytogenes, es susceptible a una variedad de antibióticos que actúan bacterias Gram-positivas, entre ellos se encuentran la penicilina, ampicilina, amoxicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina, cotrimoxazol, vancomicina e imipenem. Médicos típicamente usan amino-penicilinas (por ejemplo, ampicilina o amoxicilina) en combinación con un aminoglucósido, como gentamicina, para tratamiento de infecciones invasivas. En casos donde la sensibilidad es reducida o se encuentra resistencia a betalactámicos, una cantidad de agentes activo contra bacterias Gram-positivas se puede utilizar, aunque cotrimoxazol generalmente se considera como la segunda opción terapéutica (Gómez *et al.*, 2014).

El principal mecanismo usado por esta bacteria en la generación de resistencia es el de bombas de expulsión (Komora, Bruschi, Magalhães, Ferreira, & Teixeira, 2017), así como la transferencia horizontal de información genética. La resistencia de *Listeria* a los agentes antimicrobianos debida al material genético se ocasiona dado que, la información genética que participa durante la adaptación a corto plazo puede ser transmitida a *Listeria*. Además, este patógeno posee heterogeneidad genética, con lo que se indica que la transferencia horizontal de genes es común en esta bacteria. Por otro lado, la conjugación de plásmidos, transposones y genes que por conjugación pueden ser transmitidos a *Listeria* han provocado las resistencias hacia algunos fármacos (Ruiz-Bolivar, Poutou-Piñales, & Carrascal-Camacho, 2008).

2.4.3. Mecanismos de resistencia por las bacterias

Son cuatro los mecanismos que pueden efectuar las bacterias para generar resistencia:

- a) **Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que se pierda la funcionalidad de este. La bacteria es capaz de sintetizar β -lactamasas, las cuales son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia (ampicilina). También produce, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos, como la estreptomicina, provocando en ellos reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación (Komora *et al.*, 2017; López Cuevas, León Félix, Jiménez Edeza, & Chaidez Quiroz, 2009; Tafur, Torres, & Villegas, 2008).
- b) **Bombas de expulsión:** las bacterias toman el antibiótico del espacio periplásmico y lo expulsa al exterior, con lo cual evitan su llegada al sitio de acción. Este mecanismo es más frecuentemente usado por bacterias Gram-negativas (Tafur *et al.*, 2008).
- c) **Cambios en la permeabilidad de la membrana:** las bacterias generan un cambio en su bicapa lipídica, alterando con ello la permeabilidad de la membrana. Esta permeabilidad también la ocasiona con cambios en las porinas, las cuales son proteínas que forman canales llenos de agua depositados en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos antibióticos (Blair *et al.*, 2015; Tafur *et al.*, 2008).

d) Alteración del sitio de acción: Las bacterias alteran el sitio en el que el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir alguna de sus funciones vitales. Este mecanismo es principalmente usado por bacterias Gram-positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas (Blair *et al.*, 2015; Komora *et al.*, 2017; Tafur *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha demostrado que las bacterias también pueden adquirir resistencia a los antimicrobianos a través de transferencia vertical u horizontal de información genética (López Cuevas *et al.*, 2009).

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto proteico obtenido del fruto de *Bromelia karatas* contra *Candida albicans* ATCC 10231, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

1.2. Objetivos específicos

- Establecer el perfil electroforético de los extractos proteicos soluble del fruto de *Bromelia karatas*.
- Evaluar la actividad proteolítica de cada una de las fracciones obtenidas en la separación.
- Evaluar la actividad antifúngica del extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas* sobre *Candida albicans* ATCC 10231.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas* sobre *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra microorganismos patógenos.
- Caracterizar los componentes proteicos presentes en el ES del fruto de *B. karatas*.

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

Los frutos de *Bromelia karatas* fueron comprados en el mercado Lucas de Galvéz, recolectados por el comerciante en Tizimín, Yucatán, y almacenados a -80°C.

Las cepas empleadas fueron *Candida albicans* ATCC 10231, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, activadas en agar LB y reactivadas para sus pruebas en agar Sabouraud conservada, agar Müller Hinton y agar Infusión Cerebro Corazón respectivamente para cada microorganismo.

2.2. Extracción proteica

Los frutos de piñuela almacenados a -80°C se pelaron y separaron sus semillas, posteriormente se molieron en un extractor para la obtención de una pulpa homogénea, con ayuda del buffer de extracción Tris-HCl pH 7.5; después la pulpa molida fue filtrada a través de tela pellón para separar los sólidos; seguidamente, este jugo, se sometió a dos centrifugaciones (5000 rpm) de 30 min, el sobrenadante fue recuperado y fue sometido a centrifugación (5000 rpm por 25 min) en columnas Amicon® de 3 kDa de 15 mL, y recuperado para su posterior concentración en columnas Amicon® de 3 kDa de 500µL (10 000 rpm por 10 min), obteniéndose el extracto proteico soluble (ES).

2.3. Determinación de la concentración proteica

El contenido de proteína en el extracto proteico soluble (ES) se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), se usó albumina sérica de bovino (ASB) (Sigma-Aldrich) como estándar. La curva patrón se realizó evaluando concentraciones de 1, 3, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Para los ensayos se usaron tubos Eppendorf con un volumen de 5 μL , consistiendo en 1, 3, 5, 10, 15 y 20 μL de muestra, 99, 97, 95, 90, 85 y 80 μL de agua destilada respectivamente para cada concentración y 900 μL del reactivo de Bradford; el blanco se realizó sin la adición de la muestra a evaluar (100 μL de agua destilada y 900 μL del reactivo de Bradford). Posteriormente los tubos se incubaron por 10 min en oscuridad y se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro. El ensayo fue evaluado por triplicado.

2.4. Determinación del perfil electroforético

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970). El ensayo se llevó a cabo en un gel constituido por dos fases: un gel concentrado y un gel separador. El primero se preparó al 4 % de acrilamida en amortiguador Tris-HCl 1.0 M a pH 6.8, y el segundo al 12% de acrilamida en amortiguador Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8.

La muestra fue preparada con 10 $\mu\text{g/mL}$ de concentración proteica? final de ES, 3 μL de buffer de carga 5X y agua destilada hasta obtener un volumen final de 15 μL ,

y posteriormente se sometió a desnaturalización térmica (95°C por 10 min). La electroforesis se llevó a cabo a 80V durante 2 h y 30 min, con el uso de un buffer de corrida (Tris-Glicina y 0.1% SDS, pH 8.3). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de un rango de 10-250 kDa.

Después el gel obtenido fue incubado 2 h en agitación y en solución fijadora, para su posterior tinción con azul de Coomassie, para la cual, primeramente el gel se incubó en una solución de teñido (0.1% de azul de Coomassie R-250, 10% ácido acético, 45% metanol) durante 2 h, posteriormente se colocó en una solución de desteñido (10% metanol y 10% ácido acético), hasta eliminar el exceso de azul de Coomassie (Bollag *et al.*, 1996), y por último se sometió a varios lavados con agua destilada.

El gel en condiciones no reductoras se realizó de la misma manera, con las siguientes excepciones: el buffer de carga añadido a la muestra (ES) no contenía β -mercaptoetanol y la muestra no se sometió a desnaturalización térmica.

2.5. Semi-purificación del extracto proteico soluble del fruto de *Bromelia karatas* por cromatografía de intercambio iónico

Se realizó mediante el uso de la columna HiTrap® SP HP y HiTrap® Q HP (intercambiador catiónico y aniónico respectivamente). Se utilizó un gradiente de 0.1M - 1M de NaCl para eluir el extracto soluble (ES) en diferentes fracciones; posteriormente las fracciones fueron lavadas con buffer de extracción para eliminar

el exceso de NaCl; y por último cada una de las fracciones fue ultrafiltrada y almacenada a 4°C.

2.6. Determinación de la actividad proteolítica sobre el gel

Se realizó una electroforesis en condiciones nativas. El ensayo se llevó a cabo en un gel constituido por dos fases: un gel concentrado y un gel separador. El primero se preparó al 4 % de acrilamida en amortiguador Tris-HCl 1.0 M a pH 6.8, y el segundo al 12% de acrilamida en amortiguador Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8.

La muestra fue preparada con 10 µg/mL de muestra, 3 µL de buffer de carga nativo y agua destilada hasta obtener un volumen final de 15 µL. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 2 h, con el uso de un buffer de corrida (Tris-Glicina). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de un rango de 10-250 kDa.

Después el gel obtenido fue lavado con Tritón al 0.1% e incubado a 37°C; toda la noche, en agitación y en buffer de incubación (Tris.HCl 50 mM, ZnCl₂ 1 mM y CaCl₂ 10 mM), para su posterior tinción con negro amido, para la cual, primeramente el gel se sumergió en una solución de teñido (0.1% de negro amido y 7% ácido acético) durante 2 h, posteriormente se elimina el exceso de negro amido mediante 2 a 3 lavados con ácido acético al 7%.

2.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana

2.7.1. Evaluación de la actividad antifúngica mediante el método de difusión en disco

Para la determinación de la actividad antifúngica se usó a *Candida albicans* ATCC 10231, la cual se creció previamente en agar Sabouraud, a partir de la cual se ajustó un inóculo a una concentración de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC/mL), y posteriormente se llevó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Después el inóculo fue plaqueado en agar Sabouraud, en seguida se colocarán discos de papel filtro en los cuales se aplicaron 100, 200, 400 y 600 $\mu\text{g/mL}$ del extracto soluble. Se utilizó amortiguador de extracción como control negativo. Posteriormente las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 h. La actividad antimicrobiana se manifiesta con la formación de halos transparentes alrededor de los discos, que indicaron la inhibición del crecimiento microbiano (Schwalbe, Steele-Moore, & Goodwin, 2007). Los ensayos se evaluaron por triplicado.

2.7.2. Evaluación de la actividad antifúngica mediante el método de difusión en disco en presencia de EDTA

Para la determinación de la actividad antifúngica en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se usó a *Candida albicans* ATCC 10231, la cual se creció previamente en agar Sabouraud, a partir de la cual se ajustó un inóculo a una concentración de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC/mL), y posteriormente se llevó a

una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Después el inóculo fue plaqueado en agar Sabouraud, en seguida se colocaron discos de papel filtro en los cuales se aplicaron 100, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los extractos obtenidos a partir de un buffer de extracción que contenía EDTA a una concentración de 2 mM. Se utilizó el amortiguador de extracción con y sin EDTA como control negativo. Posteriormente las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 h. La actividad antimicrobiana se determinó con la formación de halos transparentes alrededor de los discos, que indicaron la inhibición del crecimiento microbiano (Schwalbe et al., 2007). Los ensayos se evaluaron por triplicado, y se analizaron por ANOVA/Tukey con un nivel de significancia α de 0.05 mediante el programa Statgraphics Centurion 16.103 ®.

2.7.3. Evaluación de la actividad antifúngica mediante el método de microdiluciones

El microorganismo a evaluar fue *Candida albicans* ATCC 10231, para el cual se preparó un inóculo de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC/mL), y posteriormente se llevó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Se emplearon tubos Eppendorf de 1.5 mL con un volumen total utilizado por tubo de 500 μL , por lo que, para la preparación de la muestra se empleó 250 μL de medio Sabouraud 2X, 5 μL de inóculo, diferentes concentraciones de extracto proteico soluble (100, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$) y el resto de agua destilada estéril. El control negativo fue preparado de la misma manera sin la adición del extracto proteico soluble, y como control positivo se usó el buffer de extracción. El ensayo se realizó por triplicado.

Después los tubos se incubaron a 37°C en agitación constante durante 24 h, y se tomaron lecturas en un espectrofotómetro a las 12 y 24 h de incubación y a una longitud de onda de 600 nm; se tomó muestra en los mismos períodos de tiempo para su plaqueo en agar Sabouraud y se realizó el conteo de colonias (Schwalbe *et al.*, 2007). Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA/Tukey con un nivel de significancia α de 0.05 mediante el programa Statgraphics Centurion 16.103®.

2.7.4. Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de microdiluciones

Los microorganismos a evaluar fueron *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, para las cuales se preparó un inóculo de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC/mL), y posteriormente se llevó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Se emplearon tubos Eppendorf de 1.5 mL, con un volumen total utilizado por tubo de 500 μ L, por lo que, para la preparación de la muestra se empleó 250 μ L de medio Müller Hinton 2X, para *S. Typhimurium* y medio Infusión Cerebro Corazón 2X para *L. monocytogenes*, 5 μ L de inóculo, diferentes concentraciones de extracto proteico soluble (100, 200 y 250 μ g/mL) y el resto de agua destilada estéril. El control negativo fue preparado de la misma manera sin la adición del extracto proteico soluble, y como control positivo se usó ampicilina (40 μ g/mL para *S. Typhimurium* y 20 μ g/mL para *L. monocytogenes*). El ensayo se realizó por triplicado.

Después los tubos se incubaron a 37°C en agitación constante durante 12 h, y se tomaron lecturas en un espectrofotómetro a las 0, 5, 8, 10, y 12 h de incubación y a una longitud de onda de 600 nm; se tomó muestra en los mismos periodos de tiempo para su plaqueo en agar Müller Hinton y agar Infusión Cerebro Corazón para *Salmonella* y *Listeria* respectivamente, y finalmente se realizó el conteo de colonias (Schwalbe *et al.*, 2007). Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA/Tukey con un nivel de significancia α de 0.05 mediante el programa Statgraphics Centurion 16.103 ®.

2.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de microdiluciones

Para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la muestra proteica contra *Candida albicans* ATCC 10231, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, se desarrolló de acuerdo con el método de microdiluciones anteriormente mencionado para cada microorganismo patógeno. Todas las concentraciones a evaluar se realizaron por triplicado (Schwalbe *et al.*, 2007).

2.9. Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de microdiluciones en presencia del inhibidor E-64

Los microorganismos a evaluar fueron *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, para las cuales se preparó un inóculo de 0.5

McFarland (1×10^8 UFC/mL), y posteriormente se llevó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Se emplearon tubos Eppendorf de 1.5 mL, el volumen total empleado por tubo fue 500 μ L, por lo que, para la preparación de la muestra se empleó 250 μ L de medio Müller Hinton 2X, para *S. Typhimurium* y medio Infusión Cerebro Corazón 2X para *L. monocytogenes*, 5 μ L de inóculo, 5 μ g/mL de extracto proteico soluble, diferentes concentraciones de inhibidor E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 μ M) y el resto de agua destilada estéril. El control negativo fue preparado de la misma manera sin la adición del ES y sin inhibidor E-64, y como control positivo se empleó la bacteria en presencia del ES (5 μ g/mL). El ensayo se realizó por triplicado.

Después los tubos se incubaron a 37°C en agitación constante durante 12 h, y se tomaron lecturas en un espectrofotómetro a las 0, 5, 8, 10, y 12 h de incubación y a una longitud de onda de 600 nm; se tomó muestra en los mismos periodos de tiempo para su plaqueo en agar Müller Hinton y agar Infusión Cerebro Corazón para *Salmonella* y *Listeria* respectivamente, y finalmente se realizó el conteo de colonias (Schwalbe *et al.*, 2007). Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA/Tukey con un nivel de significancia α de 0.05 mediante el programa Statgraphics Centurion 16.103 ®.

2.10. Caracterización del extracto proteico soluble del fruto de *Bromelia karatas*

El ensayo se llevó a cabo en un nano Acquity nanoflow, sistema de cromatografía de líquidos (UPLC) (Waters, Milford, MA, EE.UU.), acoplado a un espectrometro de

masas con trampa de iones lineal LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), equipado con una fuente de iones nano electrospray.

Para la digestión en gel de las bandas de proteínas, el protocolo de Shevchenko, 1996, 2006, se modificó ligeramente, tal como describe López-Castillo *et al.*, después del SDS-PAGE, las bandas con mejor separación obtenidas por cromatografía de intercambio iónico fueron cortadas del gel con un tamaño aproximado de 1 mm de ancho y picados en cubos. Los cubos se transfirieron a viales y se lavaron con una solución 1:1 (v/v) de bicarbonato de amonio 125 mM y acetonitrilo (ACN) hasta decoloración completa. Los pasos de reducción y alquilación se realizaron por incubación con ditioneitol (DTT) 10 mM y ácido indol-3-acético (IAA) 55 mM. Las piezas de gel se enjuagaron con acetonitrilo (ACN), luego las piezas de gel encogidas se secaron en una centrifuga de vacío. Para la digestión de proteínas, las piezas secas de gel se rehidrataron en una solución 50 mM de bicarbonato de amonio que contiene 10 ng/L de tripsina (PROMEGA, Madison, WI, EE. UU.) y se incubaron durante la noche a 37°C. Después de la digestión triptica, los péptidos se pudieron extraer agitando por 15 minutos con una solución 1:2 (v/v) de 5% de ácido fórmico / ACN a 37°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se secó en una centrifuga de vacío, antes del análisis de LC-MS / MS, los péptidos se disolvieron en 20 µL de ácido fórmico al 0.1% (v/v) (López-Castillo *et al.*, 2015).

CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de la concentración proteica

La Tabla 4 muestra la concentración y la cantidad proteína soluble presente en el extracto proteico soluble (ES) obtenido del fruto de *B. karatas*, para el cual se obtuvo una concentración de 0.8934 mg/mL y un rendimiento de 1.7868 mg de proteína/100 g de piñuela. Meza Espinoza *et al.*, en el 2017, obtuvo una concentración de 0.46 mg/mL y 8.79 mg/g de rendimiento para el fruto de *B. karatas*, en un buffer de fosfato y cisteína, el valor de la concentración proteica obtenida por Meza Espinoza fue inferior a la obtenida en este estudio para los frutos de esta misma *Bromeliaceae*, pero su rendimiento fue mayor al obtenido en este trabajo. La alta concentración y bajo rendimiento de proteínas por parte del ES del fruto de *B. karatas*, comparado con el mostrado por Meza Espinoza y colaboradores en *B. karatas*, puede deberse a que la concentración proteica varia de una especie de *Bromeliaceae* a otra o incluso a las diferencias en el método de extracción empleado y a las condiciones medioambientales en las que se encuentren.

5.2. Perfil electroforético del extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas*

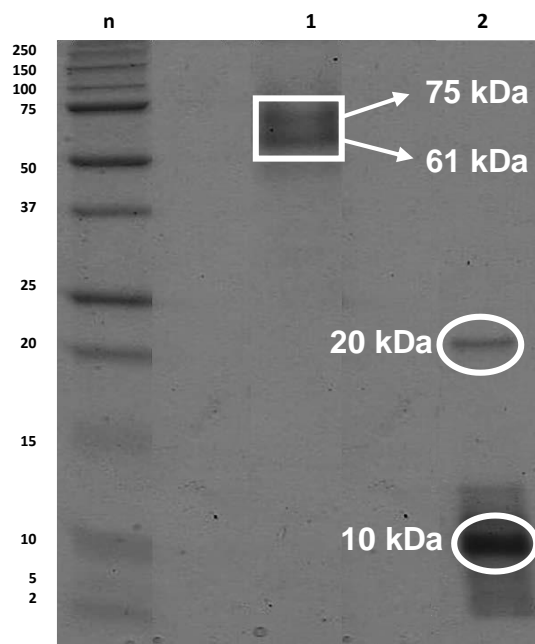


Figura 8. Perfil electroforético: n: Marcador de peso molecular (2- 250 kDa), Carril 1: Extracto proteico soluble (ES) no desnaturalizado y Carril 2: ES desnaturalizado.

La Figura 8 muestra el perfil proteico para ES del fruto de *B. karatas* en condiciones no reductoras y reductoras, en el ES no desnaturalizado se observan dos bandas con un tamaño de 75 y 61 kDa aproximadamente, mientras que en condiciones desnaturalizantes se aprecian dos bandas de menor tamaño, una de las cuales se encuentra alrededor de los 10 kDa y otra entre los 20 – 22 kDa. Montes en 1990, estableció la presencia predominante de una sulfidril proteasa en el fruto de *B. karatas*, llamada karatasina, para la cual obtuvo un peso molecular de 24.858 kDa (en el jugo crudo de *B. karatas*), pero que después de someterla a un proceso de purificación (haciéndola pasar por membranas de diferentes poros) obtuvo dos bandas una de 12 a 13 kDa y otra de 20 kDa (condiciones reductoras), por lo que, debido a que las bandas obtenidas en el presente ensayo en condiciones

reductoras coinciden con las mostradas por Montes, se puede sugerir que el perfil electroforético reportado en este trabajo presenta las subunidades peptídicas que conforman a la karatasina, subunidades que anteriormente fueron obtenidas por Montes, *et al.* 1990. Además, García Magaña *et al.*, en el 2018, realizaron una caracterización parcial de las proteasas presentes en *B. karatas* obteniendo también un perfil que presentaba bandas de 10 a 20 kDa, como las mostradas en la Figura 8. Por lo que se ha asociado la presencia de cistein proteasas en la familia *Bromeliaceae* en un rango de peso molecular de entre 21 – 31 kDa (Meza-Espinoza *et al.*, 2017). Además, Meza Espinoza obtuvo dos bandas en condiciones no reductoras para su extracto proteico de *B. karatas*, que estaban entre los 66.2 – 97 kDa, las cuales concuerdan con las obtenidas en este trabajo en las mismas condiciones (75 kDa).

5.3. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra *Candida albicans* ATCC 10231

Para evaluar la actividad antimicrobiana del ES contra *Candida albicans* ATCC 10231, se emplearon diferentes concentraciones proteicas, y se utilizó el método de difusión en disco. En la Figura 9 se muestra la exposición de *C. albicans* a cuatro concentraciones proteicas de ES distintas (100, 200, 400 y 600 µg/mL), observándose que el ES obtenido del fruto de *B. karatas*, no posee una actividad inhibitoria contra este microorganismo patógeno. En el 2002 Camacho Hernández *et al.* evaluaron diferentes cepas fúngicas, obtenidas de la Facultad de Medicina de la UNAM, con un extracto metanólico del fruto de *Bromelia pinguin*, entre las que se

encontraban *Candida albicans*. Tal como sucedió con el ES del fruto *B. karatas*, el extracto metanólico del fruto de *B. pinguin* no mostró efecto contra *Candida* spp., sin embargo, Camacho Hernández y colaboradores observaron actividad antifúngica significativa contra las demás especies fúngicas que evaluaron: *Trichophyton* spp. y *Paecilomyces variotii* ATCC 22319, pero dicha actividad no se comparaba con la presentada por el antibiótico control (Nistatina), la cual era mayor. También, Jafari *et al.*, en el 2010, aplicó a *C. albicans* tratamientos de extractos etanólicos del fruto, hojas y tallo de *Ananas comosus*. *A. comosus* a diferencia de *B. pinguin* y *B. karatas*, sí logró inhibir al microorganismo fúngico, presentando la mayor inhibición con 75.5 mm en el extracto etanólico obtenido del fruto.

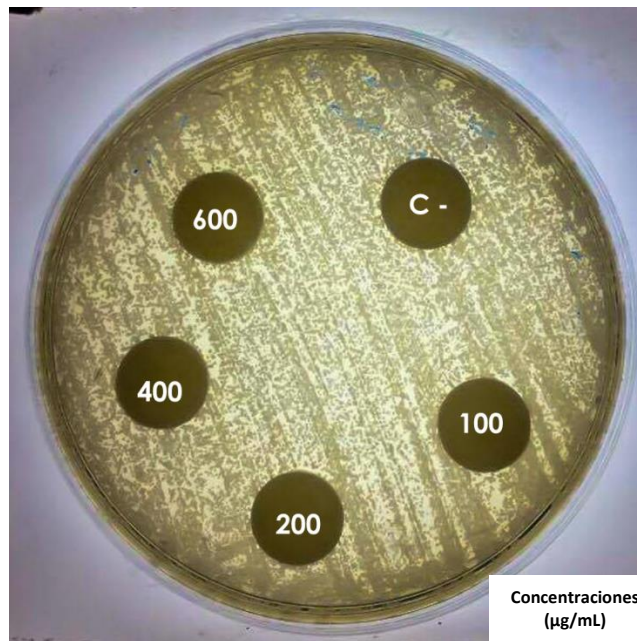


Figura 9. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra *Candida albicans* ATCC 10231, empleando diversas concentraciones (100, 200, 400 y 600 µg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas*.

5.4. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco (EDTA) contra *Candida albicans* ATCC 10231

Debido a los resultados negativos obtenidos al evaluar la interacción de ES sobre *C. albicans*, se agregó EDTA al buffer de extracción proteica, con el fin de inhibir a aquellas proteasas que podrían estar degradando otras moléculas de naturaleza proteica con posible actividad, presentes en el extracto proteico. En la Figura 10 se muestra el ensayo realizado en el que se evaluó la actividad antimicrobiana del ES del fruto de *B. karatas* contra esta levadura, observándose que la actividad inhibitoria, mostrada como halos sin crecimiento, no es debida al ES sino a la presencia del EDTA, el cual se ha definido como un potente antifúngico por Hachem, *et al.* en el 2006; Raad *et al.*, en el 2008, y en la patente numero US 6,509,319 B1, del 2000, dado a que el EDTA captura los iones de calcio en el medio, evitando la unión de *C. albicans* a las proteínas, reduciendo así el crecimiento de *C. albicans* al eliminar el calcio de las paredes celulares y causar el colapso de la pared celular, y al inhibir la reacción enzimática (Casalinuovo, Sorge, Bonelli, & Di Francesco, 2017).

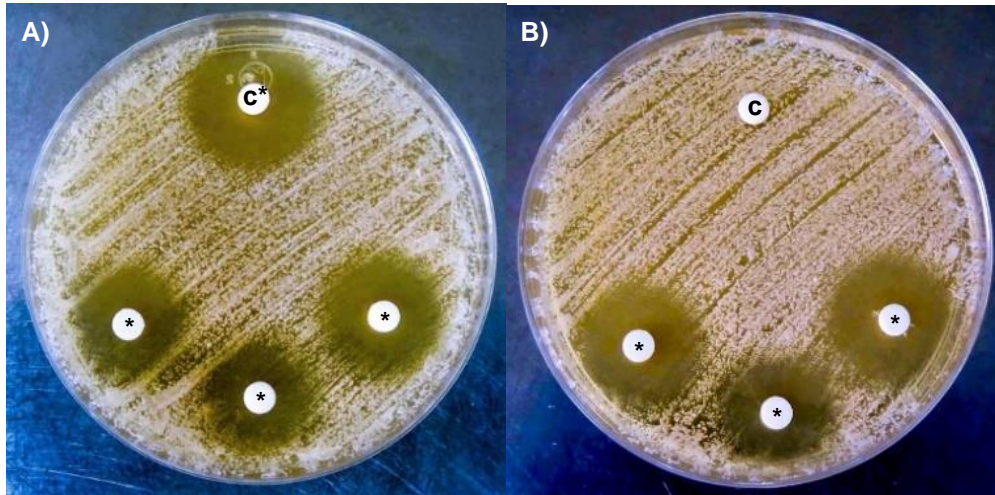


Figura 10. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra *Candida albicans* ATCC 10231: A) En presencia de buffer Tris-HCl con EDTA 2 mM (c*) y extracto proteico soluble con EDTA 2 mM (*) y B) En presencia de buffer Tris-HCl (c) y extracto proteico soluble con EDTA (*).

La Figura 11 representa la magnitud de los halos de inhibición obtenidos por cada uno de los tres extractos proteicos del fruto de *B. karatas* contra *C. albicans*, observándose que el mayor halo de inhibición se presenta en el disco que contenía el buffer de extracción con EDTA, con una magnitud de 2.263 cm, pero esta magnitud no posee una diferencia estadísticamente significativa con los demás halos presentados en los diferentes extractos. Confirmándose con esto que el EDTA, tal como lo reportan los autores anteriormente mencionados, es el responsable de la actividad antifúngica contra *C. albicans*, ocasionada por la desestabilización de la pared celular de este microorganismo.

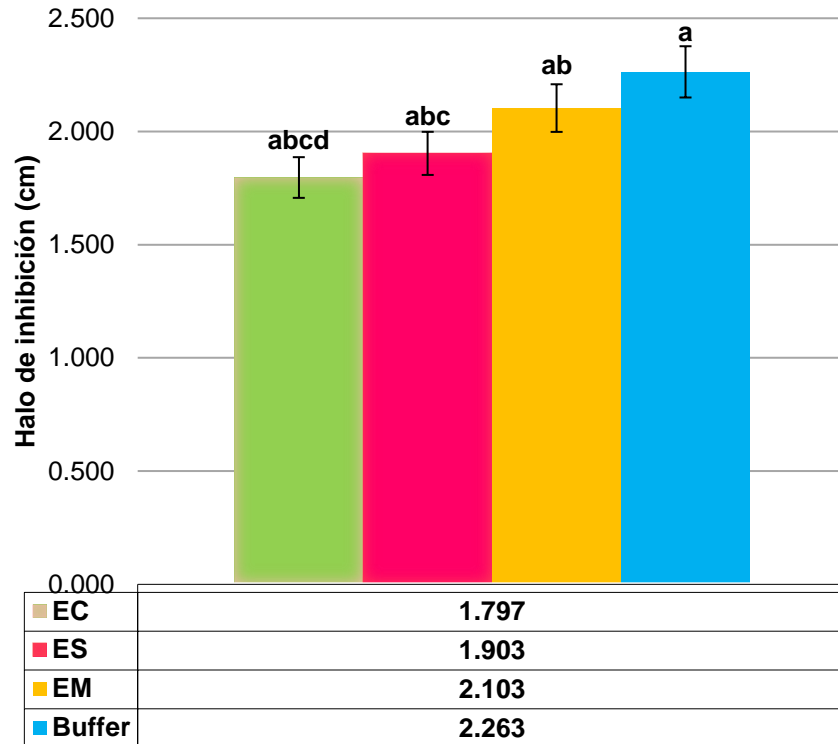


Figura 11. Radio de los halos de inhibición para los diferentes extractos obtenidos del fruto de *B. karatas* y el buffer de extracción con EDTA. EC: Extracto crudo; ES: Extracto soluble; EM: extracto membranal. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103[®].

5.5. Actividad antimicrobiana por el método de microdiluciones contra *Candida albicans* ATCC 10231

Debido a la baja absorción del ES en los discos de papel filtro, se sugirió que la ausencia de inhibición del ES sobre *C. albicans* podría deberse a que el extracto no se difundía correctamente en los discos de papel filtro, por lo que, para descartar esta posibilidad, se planteó realizar la actividad antifúngica mediante el método de microdiluciones. En este ensayo se evaluaron tres concentraciones proteicas ante las cuales *C. albicans* no se mostró susceptible y entre las que no se observa una diferencia significativa (Figura 12), este efecto se observa también en la Figura 13,

en la cual se observa que los sucesivos incrementos en la concentración proteica del ES estimulan el crecimiento de *C. albicans*. Determinándose de esta manera que, el ES del fruto de *B. karatas* no posee actividad fungistática ni fungicida contra este microorganismo patógeno, y concuerda con lo reportado por Camacho Hernández *et al.* en el 2002 (mencionado anteriormente), en el caso del fruto de *B. pinguin*.

La ausencia de actividad del ES contra *C. albicans* ATCC 10231, se sugiere que es debida a tres diferentes factores: 1) Los componentes presentes en el extracto no poseen la capacidad de inhibir la síntesis del ergosterol, el cual es el principal componente de la membrana de los hongos; 2) *Candida* es capaz de producir proteasas, las cuales pueden estar inhibiendo a las moléculas proteicas, con posible actividad, del ES y 3) *Candida* puede que utilice el ES como sustrato para su crecimiento.

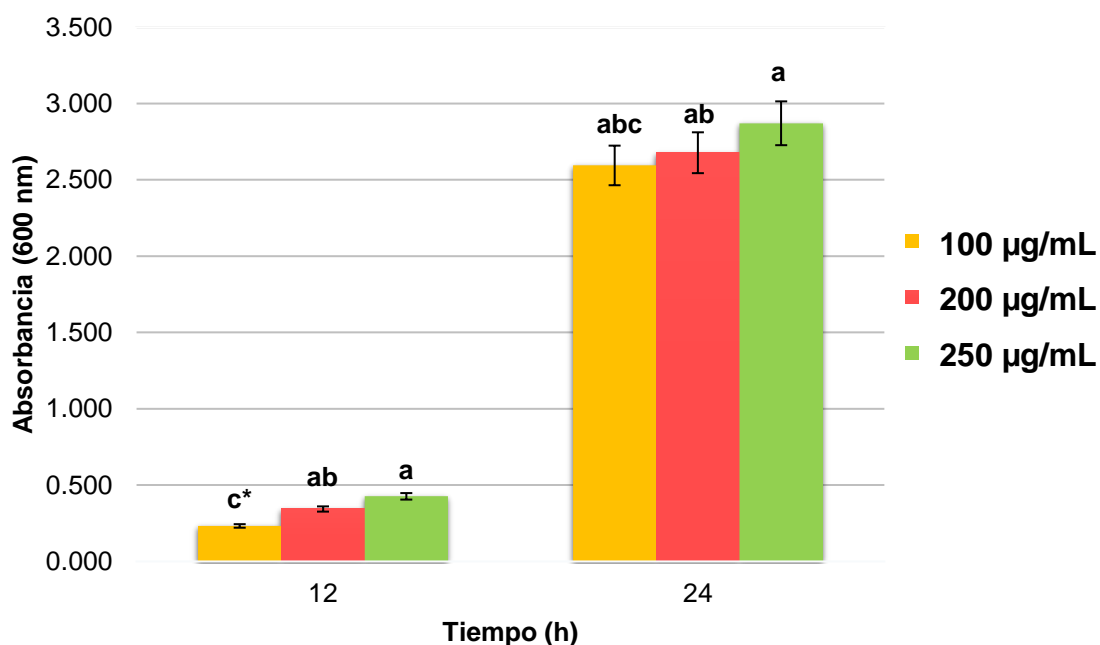


Figura 12. Efecto de tres concentraciones (100, 200 y 250 µg/mL) de extracto proteico soluble contra *Candida albicans* ATCC 10231. * indica una diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103 ®.

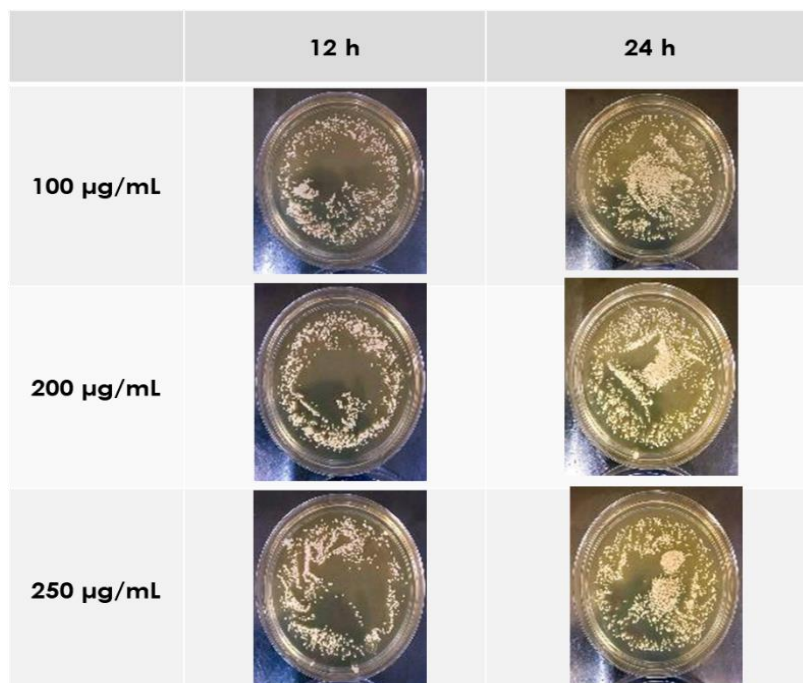


Figura 13. Efecto de tres concentraciones (100, 200 y 250 µg/mL) de extracto proteico soluble contra *Candida albicans* ATCC 10231.

5.6. Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*

La curva de crecimiento es necesaria para efectuar los experimentos correspondientes a la actividad antibacteriana de las cepas con las que se trabajan, ya que es necesario utilizar inóculos con células que se encuentren en la fase exponencial (Ramírez, *et al.* 2009).

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo por triplicado con un control positivo y un control negativo de ampicilina. La Figura 14 muestra la curva de crecimiento para

Salmonella Typhimurium ATCC 13311 y la Figura 15 presenta la curva de crecimiento para *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

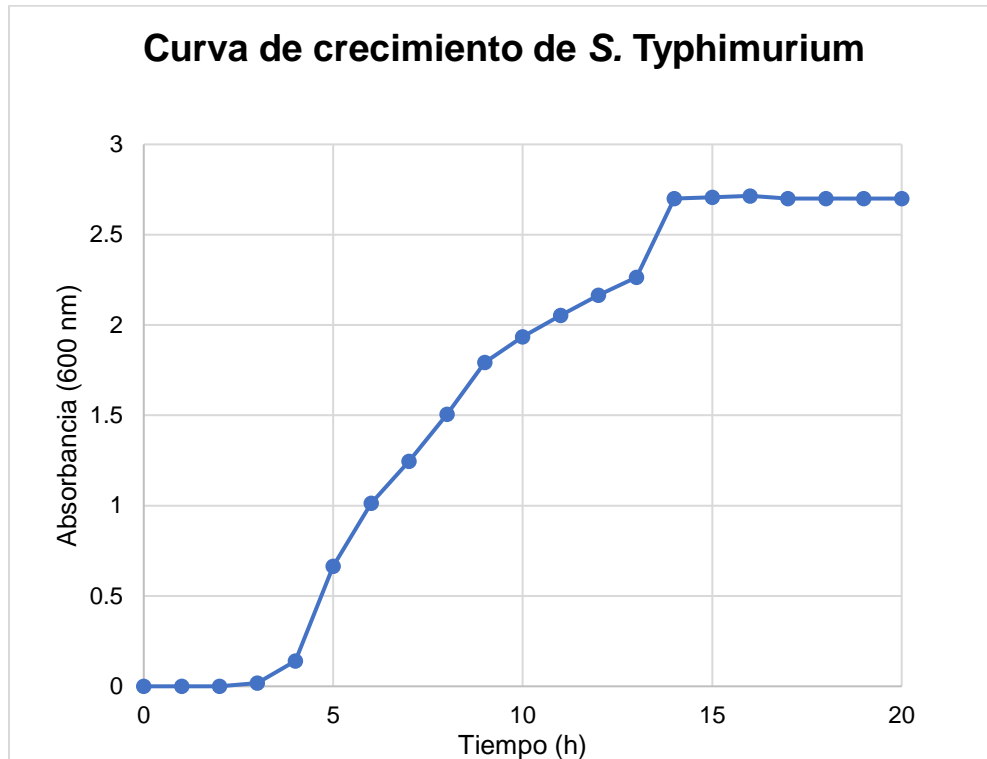


Figura 14. Curva de crecimiento de *S. Typhimurium* ATCC13311.

es decir, existen más células vivas que muertas y están en condiciones para seguir replicándose.

5.7. Actividad antimicrobiana y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), por el método de microdiluciones sobre *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311

La Figura 16 muestra el efecto inhibitorio del ES del fruto de *B. karatas* contra *S. Typhimurium*, observándose una disminución de la absorbancia de este microorganismo bacteriano directamente proporcional a la concentración proteica de extracto empleada. En la Figura 16, se observa que a partir de la hora 5 de incubación, el ES a una concentración de 3 mg/mL no muestra una diferencia estadísticamente significativa con el control positivo (ampicilina a una concentración de 40 µg/mL). También se presenta la concentración mínima de extracto para la cual la absorbancia es igual a 0 (MIC), para su obtención se evaluaron diversas concentraciones de ES, hasta llegar al valor de 3 mg/mL equivalente a su MIC (se evaluó desde la concentración de 350 µg/mL de ES).

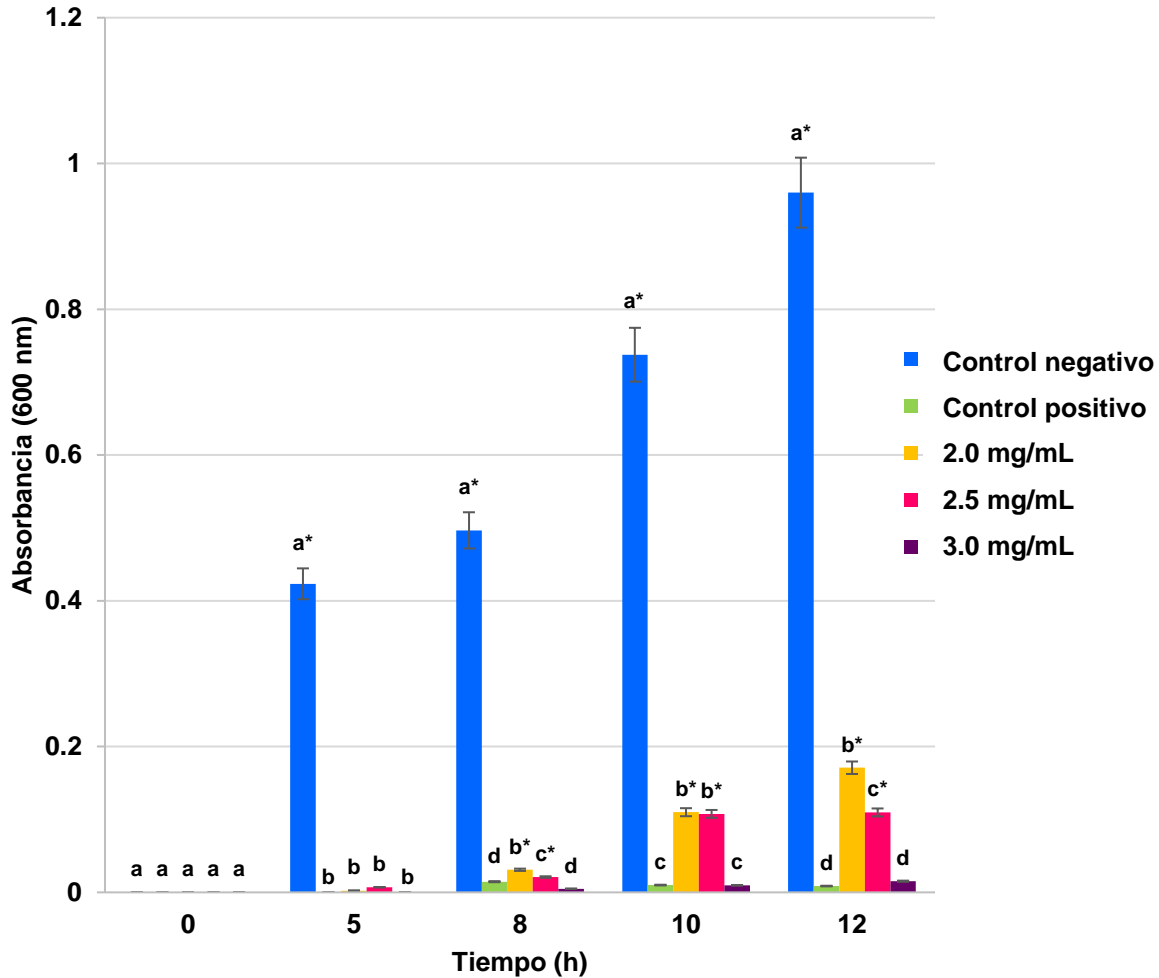


Figura 16. Efecto de tres concentraciones (2.0, 2.5 y 3.0 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas* contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 y determinación de MIC (3.0 mg/mL). Control negativo: *S. Typhimurium* sin ES; Control positivo: Ampicilina (40 µg/mL). * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103 ®.

Para conocer si el efecto del ES contra este patógeno bacteriano es bactericida o bacteriostática, se plaqueó el inóculo en presencia y ausencia de ES a diferentes tiempos de incubación y a una concentración proteica equivalente a su MIC (3.0 mg/mL), observándose que a partir de las 5 h de incubación de *Salmonella* en presencia de ES, es inhibido en un 100%, pero al llegar a las 12 h de incubación este muestra un crecimiento menor al obtenido en su respectivo control, en el cual no se muestra una diferencia estadísticamente significativa, pero de acuerdo con lo

establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) el ES si presenta una inhibición parcial (95.94% de inhibición, Figura 17) de *Salmonella*; por lo que, existe un efecto bacteriostático del ES contra este microorganismo bacteriano. Este efecto se puede observar con claridad en la Figura 18.

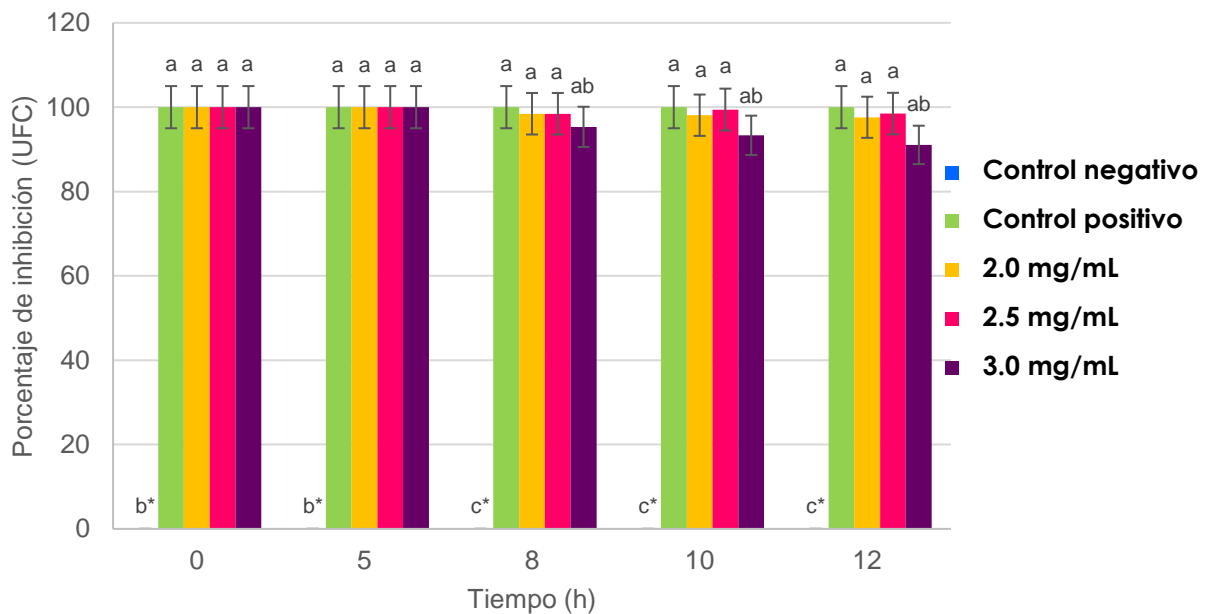


Figura 17. Porcentaje de inhibición de tres concentraciones (2.0, 2.5 y 3.0 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas* contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 y determinación de MIC (3.0 mg/mL). Control negativo: *S. Typhimurium* sin ES; Control positivo: Ampicilina (40 µg/mL). ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103[®].

El efecto bacteriostático de este microorganismo puede ser debido a que el ES no es capaz de actuar de una manera similar a los antibióticos (explicados en la sección 1.5.2.1) que atacan a este microorganismo o incluso a que *Salmonella* es capaz de producir cambios en su membrana externa impidiendo la entrada o mecanismos de modificación de los componentes proteicos del ES, además de que puede producir enzimas que podrían degradar algún compuesto activo del ES.

En el 2016 Nag, *et al.*, elaboraron un extracto metanólico del fruto de *Ananas comosus*, el cual fue aplicado a seis diferentes bacterias entre las que se encontraba *Salmonella Typhi*, ante la cual presentó 0% de inhibición y no lograron determinar su MIC, pero si presentó una inhibición significativa contra *Escherichia coli*, otra bacteria gram negativa, con un MIC de 792 $\mu\text{g/mL}$ y un 100% de inhibición. Por lo que, comparando con el ES del fruto de *B. karatas* aplicado a un serotipo distinto de *Salmonella* (*S. Typhimurium*), se logró una inhibición mayor a la de *A. comosus* pero menor a la de *E. coli* (98.5%) a una MIC mayor (3.0 mg/mL), esto puede deberse a que entre *Bromeliaceae* los compuestos bioactivos pueden variar de una especie a otra, además de que estos compuestos pueden actuar de diferente manera y no únicamente sobre la pared celular, por ello *A. comosus* pudiera presentar una actividad antimicrobiana contrastante en bacterias gram negativas.

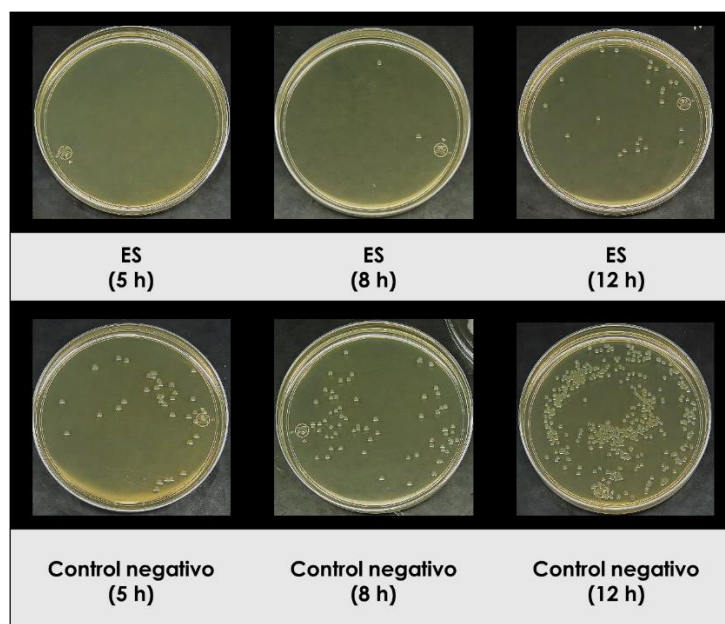


Figura 18. Efecto del extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas*, a una concentración de 3000 $\mu\text{g/mL}$, contra *S. Typhimurium* ATCC 13311. ES: Extracto soluble; Control negativo: *S. Typhimurium* sin ES.

5.8. Actividad antimicrobiana y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), por el método de microdiluciones sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

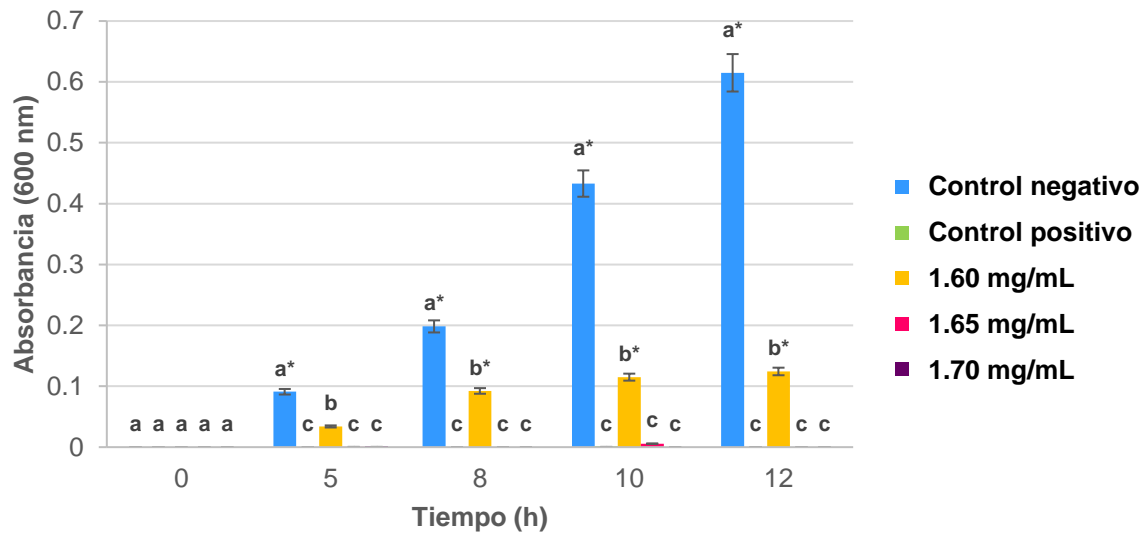


Figura 19. Efecto de tres concentraciones (1.6, 1.65 y 1.7 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas* contra *L. monocytogenes* ATCC 15313. Control negativo: *L. monocytogenes* sin ES; Control positivo: Ampicilina (20 µg/mL). ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103®.

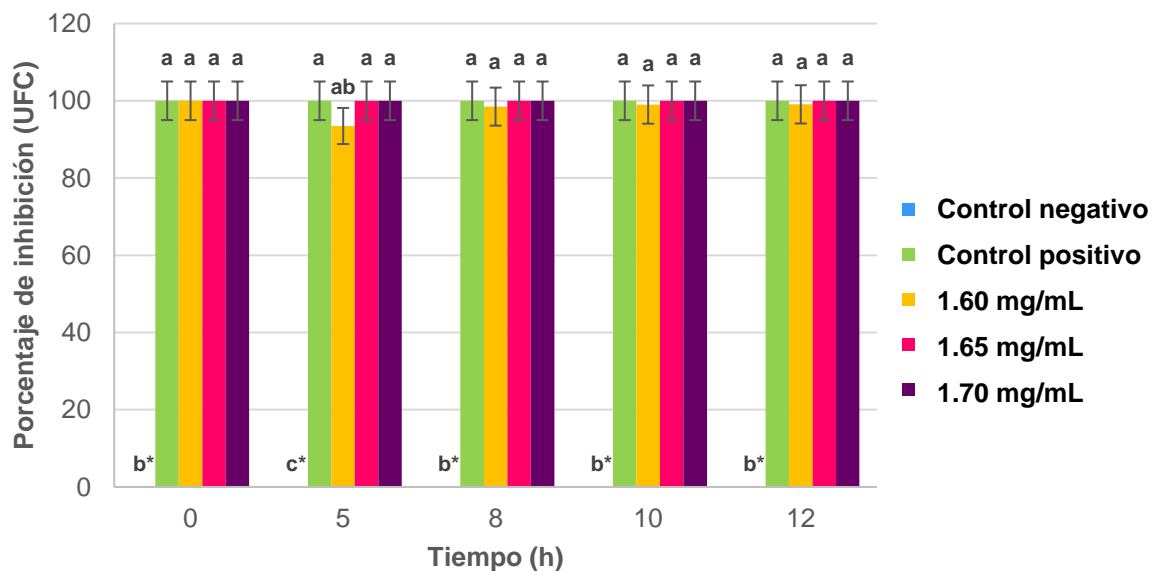


Figura 20. Porcentaje de inhibición de tres concentraciones (1.6, 1.65 y 1.7 mg/mL) de extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas* contra *L. monocytogenes* ATCC 15313. Control negativo: *L. monocytogenes* sin ES; Control positivo: Ampicilina (20 µg/mL). * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103 ®.

La Figura 19 muestra el efecto inhibitorio del ES del fruto de *B. karatas* contra *L. monocytogenes*, observándose una disminución de la absorbancia de este patógeno directamente proporcional a la concentración proteica de extracto empleada; a partir de la concentración de 1.65 mg/mL existe una diferencia estadísticamente significativa con el control negativo y la concentración de 1.6 mg/mL. También se presenta la concentración mínima de extracto para la cual la absorbancia es igual a 0 (MIC), para su obtención se evaluaron diversas concentraciones de ES, hasta llegar al valor de 1.65 mg/mL equivalente a su MIC (se evaluó desde la concentración de 700 µg/mL de ES)

Para conocer si el efecto del ES contra este microorganismo bacteriano es bactericida o bacteriostática, se sembró el inóculo incubado en presencia del ES a diferentes tiempos de incubación y a una concentración proteica de 1.65 mg/mL en medio infusión cerebro corazón. De igual modo se inóculo un tratamiento control que consistió en 20 µg/mL de ampicilina. Como resultado se observó que no hubo crecimiento de células viables a partir de las 5 h de incubación del microorganismo bacteriano en presencia de ES, por lo que presenta una inhibición del crecimiento del 100% a partir de las 5 h de incubación (Figura 20). Por lo tanto, el ES posee un efecto bactericida contra *L. monocytogenes*, de acuerdo a lo establecido por la CLSI, este efecto se puede observar en la Figura 21.

Pío-León *et al.*, en el 2009 elaboraron cuatro diferentes extractos obtenidos del fruto de *B. pinguin* y evaluaron la actividad de estos contra diferentes bacterias entre las que estaban las gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus*, obteniendo un MIC que va de 8 – 16 mg/mL para estas bacterias. El MIC obtenido para la gram positiva, *L. monocytogenes*, con el ES del fruto de *B. karatas* es de 5 – 10 veces menor que el obtenido por Pío-León con el extracto de *B. pinguin*, y esta diferencia entre bromelias se sugiere que se debe al tipo de compuestos activos que contienen, así como a los mecanismos de defensa que posee cada gram positiva tratada.

Se sugiere, que el efecto bactericida del ES del fruto de *B. karatas* contra *L. monocytogenes*, puede ser debido a que el ES es capaz de ocasionar modificaciones en la membrana de *Listeria*, así como de actuar de una manera similar a la ampicilina.

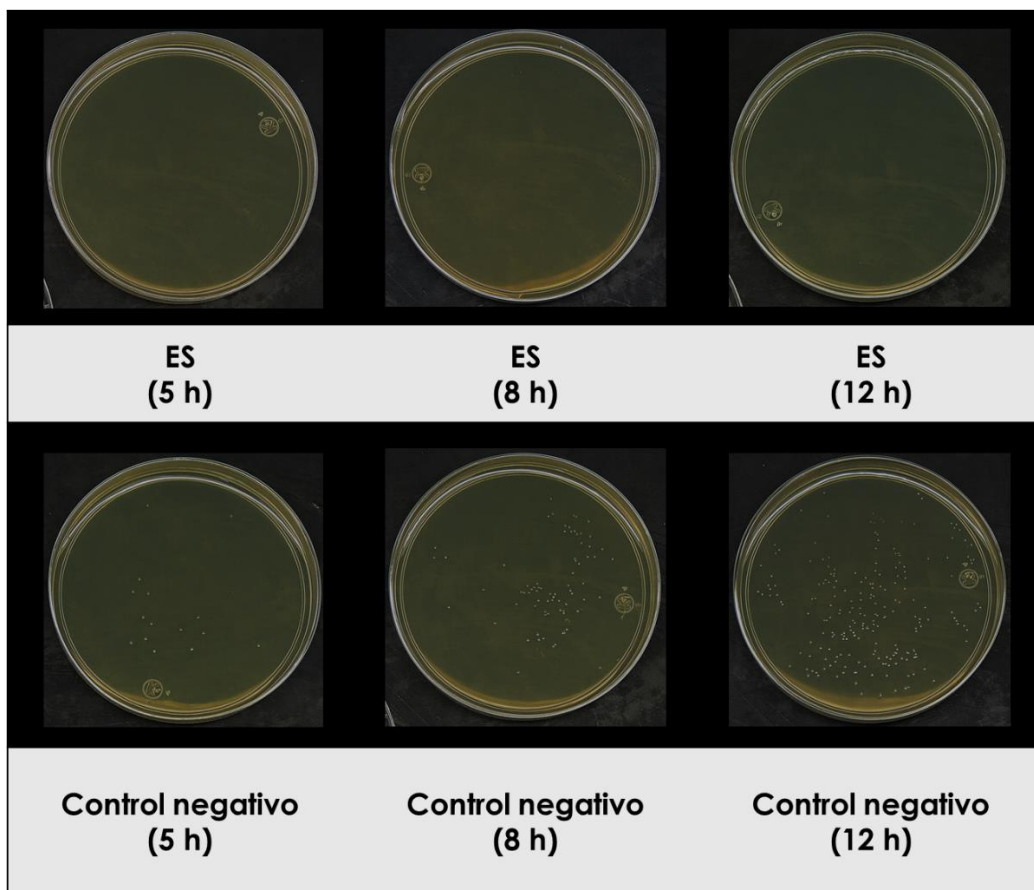


Figura 21. Determinación del efecto del extracto proteico soluble del fruto *B. karatas*, a una concentración de 1.65 mg/mL, contra *L. monocytogenes* ATCC 15313. ES: Extracto soluble; Control negativo: *L. monocytogenes* sin ES.

5.9. Actividad antimicrobiana en presencia del inhibidor E-64 por el método de microdiluciones sobre *Salmonella* Tiphymurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

La familia *Bromelaceae* es rica en cistein proteasas (sección 2.2.1), debido a ello se empleó un inhibidor específico de estas peptidasas (E-64 (trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane)), para establecer si los efectos antimicrobianos anteriormente mencionados eran debidos a la presencia de este tipo de enzimas.

5.9.1. Actividad antimicrobiana en presencia del inhibidor E-64, por el método de microdiluciones sobre *Salmonella* Tiphymurium ATCC 13311

En la Figura 22, se muestra la actividad antimicrobiana del ES (MIC = 3.0 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 μ M) sobre *S. Tiphymurium*, observándose un aumento de la absorbancia directamente proporcional a la concentración de E-64 empleada. Existe una diferencia estadísticamente significativa de la absorbancia en el tratamiento con 2.5 μ M de E-64, con respecto a las demás concentraciones de E-64 evaluadas y el control negativo. Para establecer si este aumento de la absorbancia era debido a la presencia de células viables, el inóculo de cada uno de los tratamientos con E-64 y sus controles fueron plaqueados a los diferentes tiempos de incubación, observándose un aumento de colonias en el tratamiento con E-64 a 2.5 μ M (Figura 23), por lo que el porcentaje de inhibición del ES contra *S. Tiphymurium* se redujo a 87.6% (Figura 24). Por lo tanto, se puede sugerir que la actividad contra este microorganismo bacteriano es debida a la presencia de cistein proteasas, dado que, en otros estudios se ha logrado inhibir a estas enzimas, tal es el caso del trabajo realizado por Pérez *et al.*, en el 2010, quien logró inhibir el 40% de la penduliflorian I, la cual es una cistein proteasa caracterizada de la *Bromeliaceae Hohenbergia penduliflor*.

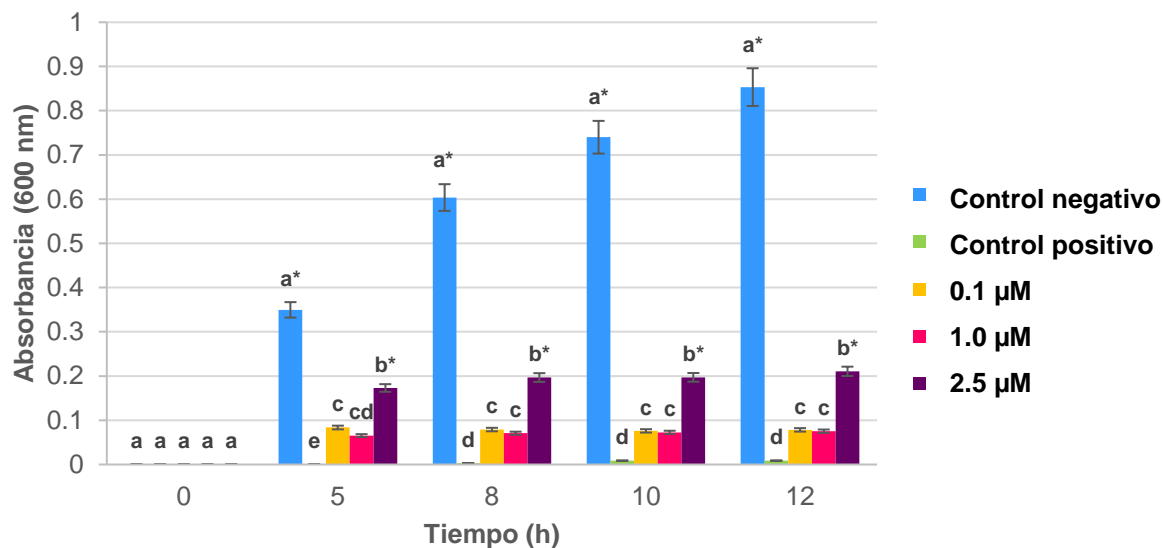


Figura 22. Actividad antimicrobiana del ES (MIC = 3.0 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) sobre *S. Tiphymurium* ATCC 13311. Control negativo: *S. Tiphymurium* sin ES y sin E-64; Control positivo: *S. Tiphymurium* + ES. * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103®.

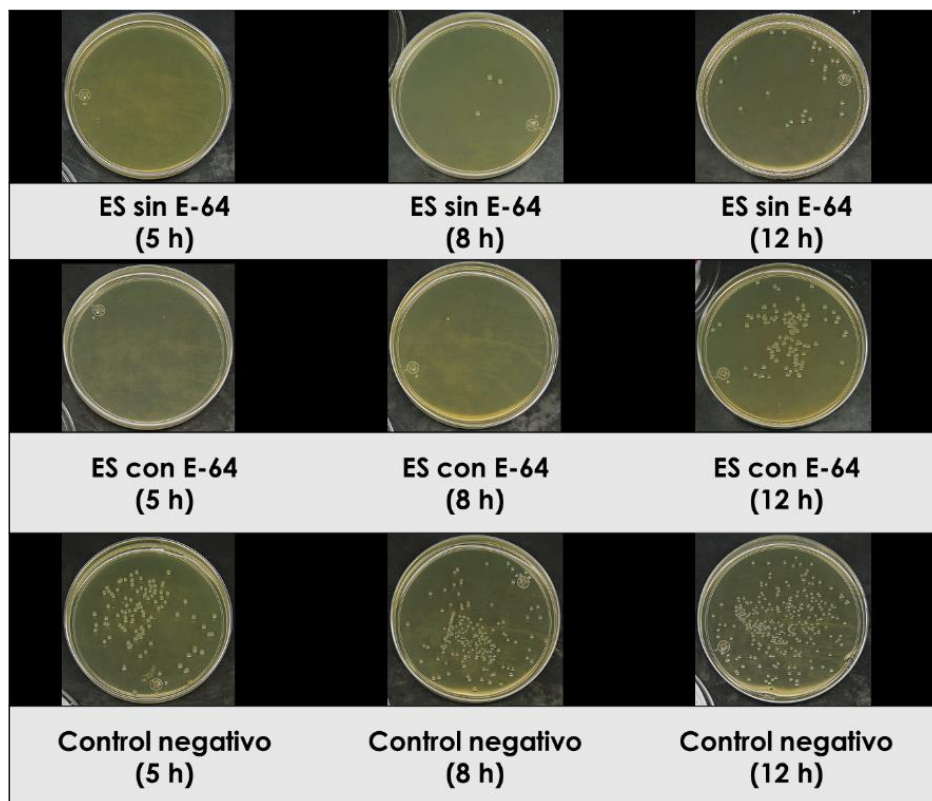


Figura 23. Determinación del efecto del extracto proteico soluble del fruto *B. karatas*, a una concentración de 3.0 mg/mL, contra *S. Tiphymurium* ATCC 13311, en presencia de inhibidor E-64 2.5 µM. ES: Extracto soluble; Control negativo: *S. Tiphymurium* sin ES y sin E-64.

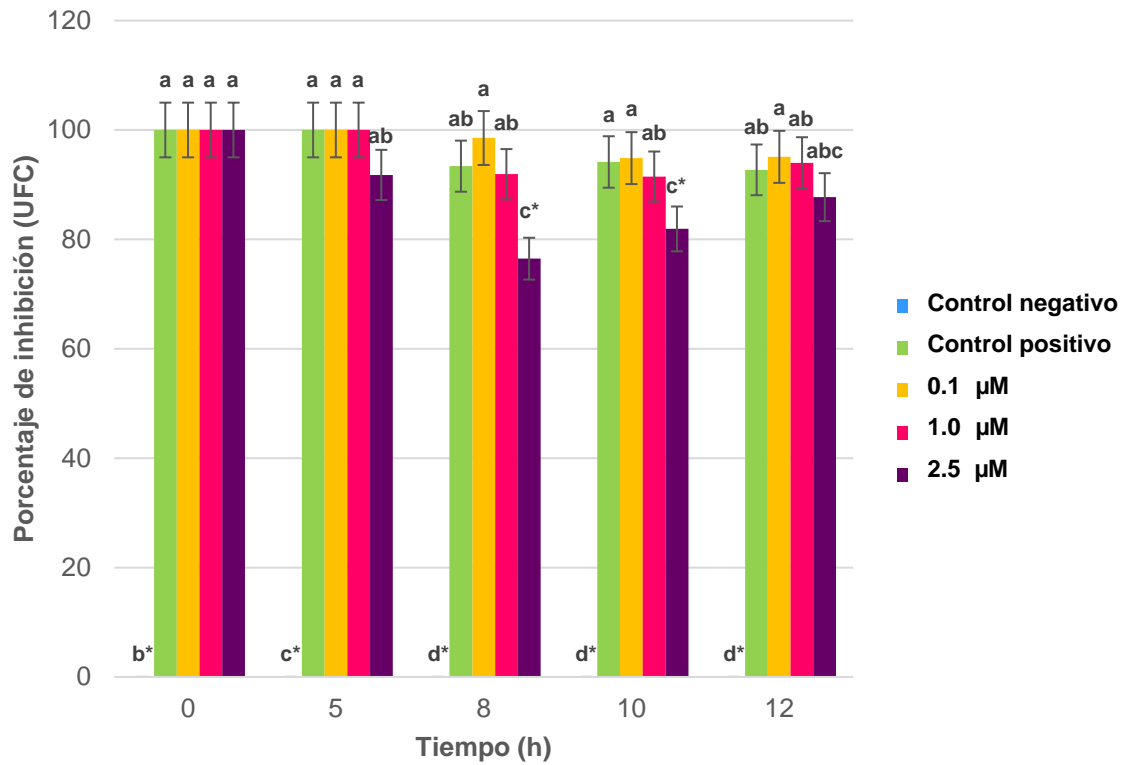


Figura 24. Porcentaje de inhibición del ES (MIC = 3.0 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 μM) contra S. Typhimurium ATCC 13311. Control negativo: S. Typhimurium sin ES y sin E-64; Control positivo: S. Typhimurium + ES. * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103®.

5.9.2. Actividad antimicrobiana en presencia del inhibidor E-64, por el método de microdiluciones sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

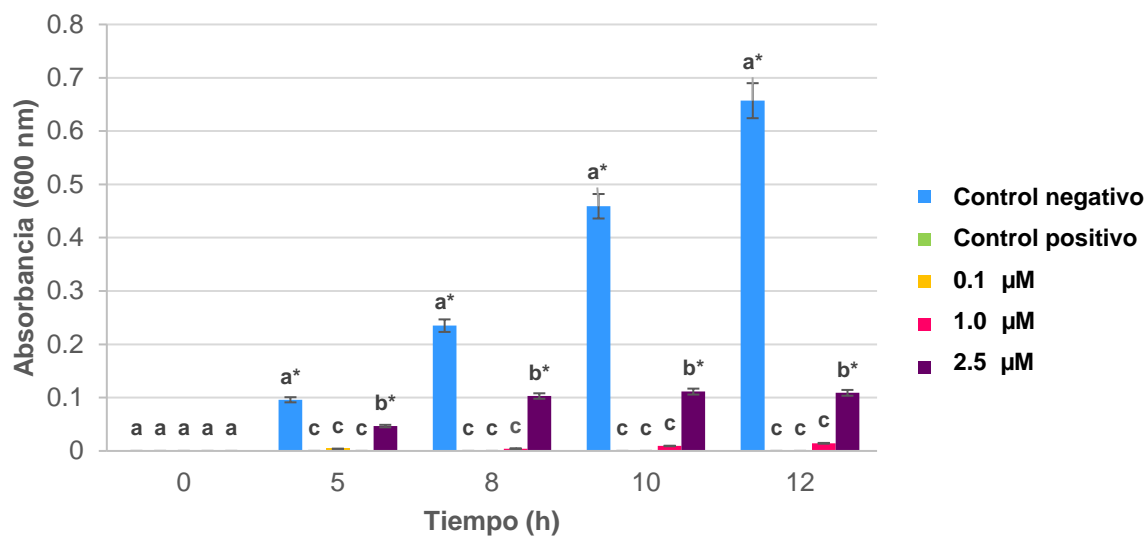


Figura 25. Actividad antimicrobiana del ES (MIC = 1.65 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Control negativo: *L. monocytogenes* sin ES y sin E-64; Control positivo: *L. monocytogenes* + ES. * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103®.

En la Figura 25, se muestra la actividad antimicrobiana del ES (MIC = 1.65 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) sobre *L. monocytogenes*, observándose un aumento de la absorbancia directamente proporcional a la concentración de E-64 empleada. La absorbancia dada por la concentración de 2.5 µM de E-64, muestra una diferencia estadísticamente significativa tanto con los controles empleados, como con las demás concentraciones de inhibidor.

Para establecer si el aumento de la absorbancia era debido a la presencia de células viables, el inóculo de cada uno de los tratamientos con E-64 y sus controles fueron

plaqueados a los diferentes tiempos de incubación, observándose un aumento de colonias en el tratamiento con E-64 a 2.5 μ M (Figura 26), por lo que el porcentaje de inhibición del ES contra *L. monocytogenes* se redujo a 94.3% (Figura 27). El ES con E-64 a 2.5 μ M no posee una diferencia estadísticamente significativa con las demás concentraciones del inhibidor evaluadas, ni con el control positivo, a partir de la hora 8 de incubación. Por lo tanto, se puede sugerir que la inhibición del crecimiento de este microorganismo bacteriano es debida a la presencia de cistein proteasas presentes en el ES de *B. karatas*,

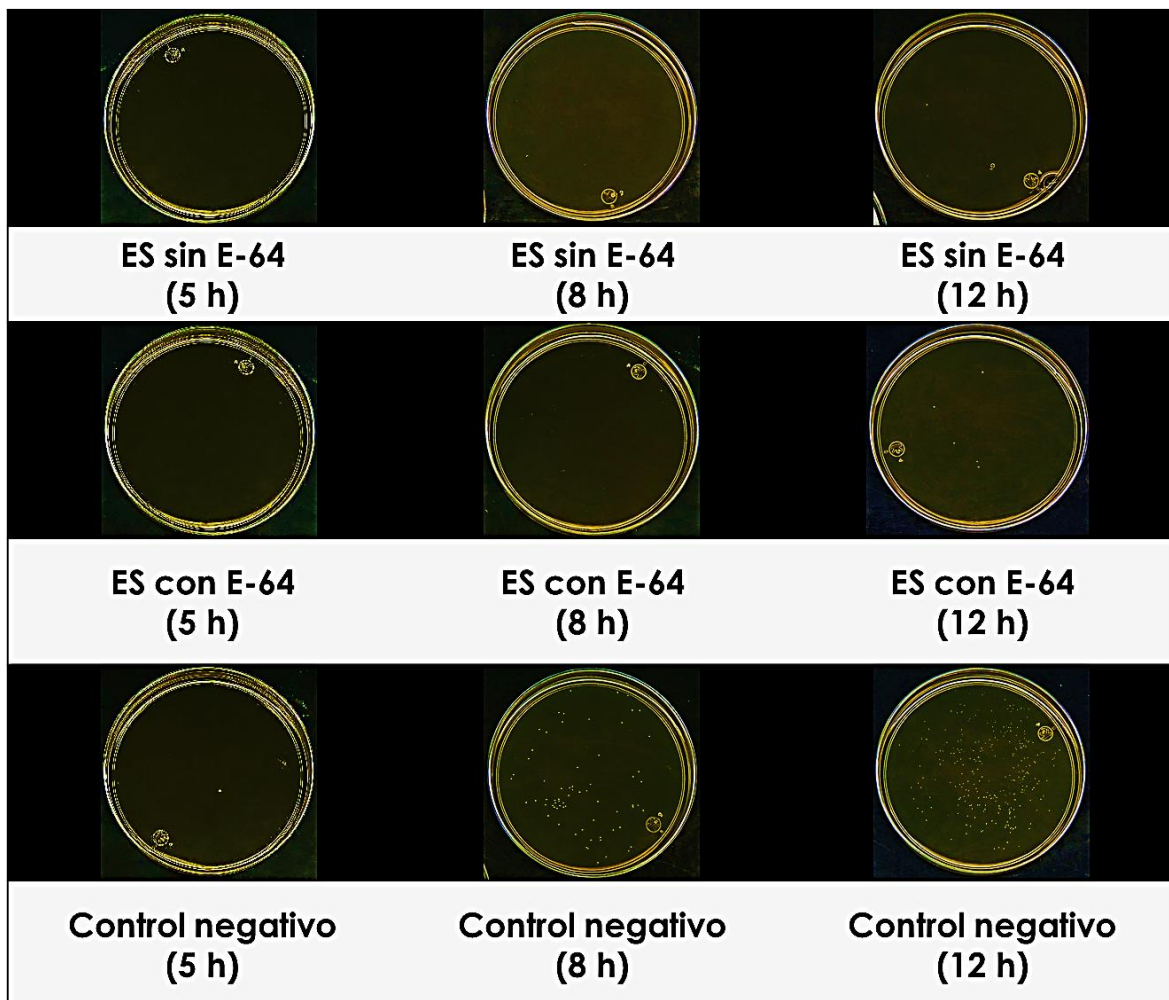


Figura 26. Determinación del efecto del extracto proteico soluble del fruto *B. karatas*, a una concentración de 1.65 mg/mL, contra *L. monocytogenes* ATCC 15313, en presencia de inhibidor E-64 2.5 µM. ES: Extracto soluble; Control negativo: *L. monocytogenes* sin ES y sin E-64.

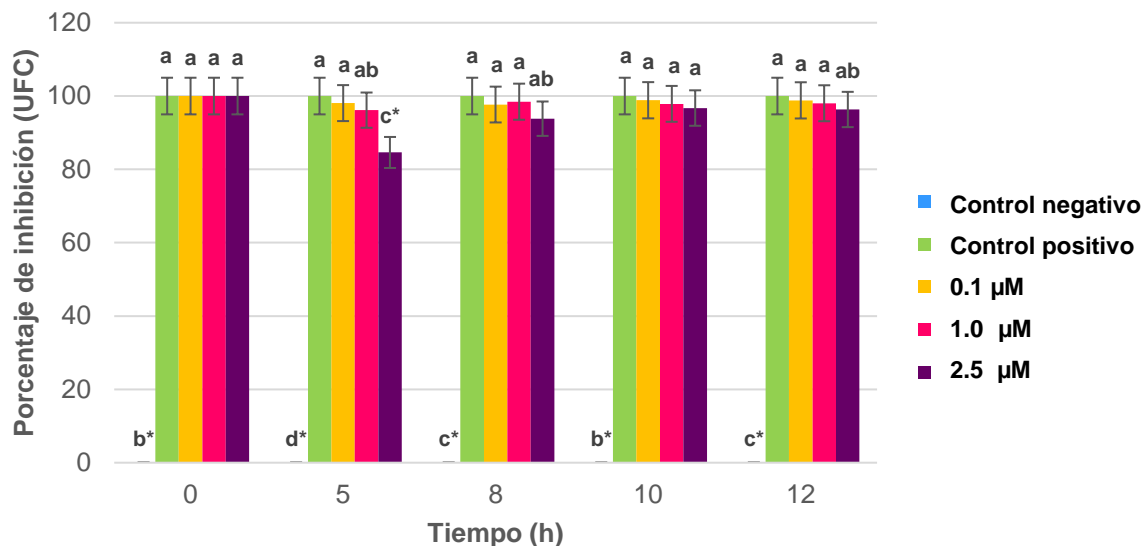


Figura 27. Porcentaje de inhibición del ES (MIC = 1.65 mg/mL) en presencia de tres concentraciones de E-64 (0.1, 1.0 y 2.5 µM) contra *L. monocytogenes* ATCC 15313. Control negativo: *L. monocytogenes* sin ES y sin E-64; Control positivo: *L. monocytogenes* con ES. * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103®.

Pardo *et al.*, en el 2000 y Vallés *et al.*, en el 2007, sometieron a extractos de *Bromelia balansae* y *Bromelia antiacantha* respectivamente, a la presencia del inhibidor de E-64 y mostraron que la actividad de las enzimas presentes en estas bromelias se inhibía completamente, demostrándose la presencia de cistein proteasas en estas plantas.

5.10. Separación de proteínas por cromatografía de intercambio iónico

5.10.1. Intercambiador catiónico (SP)

Se logró la separación de las proteínas presentes en el ES obtenido del fruto de *B. karatas*, mediante el empleo de una columna HiTrap SP FF y un gradiente escalonado de NaCl que va de 0.1 a 1.0 M. En la Figura 28 se muestra el gel de poliacrilamida en el cual se corrieron cada una de las fracciones obtenidas para el

ES no desnaturalizado y desnaturalizado, observándose la mejor separación en las fracciones 1 y 2, las cuales muestran el mismo perfil, con dos bandas de aproximadamente 61 y 75 kDa (no reductor) y 10 y 20 kDa (desnaturalizado).

Por lo que, concuerda con lo reportado por Montes *et al.*, en 1990, quienes establecieron la presencia de subunidades, de la cistein proteasa karatasina, de aproximadamente 10 a 20 kDa en el fruto de *B. karatas*. También posee similitud con lo establecido por Meza Espinoza en el 2017, el cual reporto la presencia de la karatasina en condiciones no reductoras a 75 kDa, en el mismo fruto.

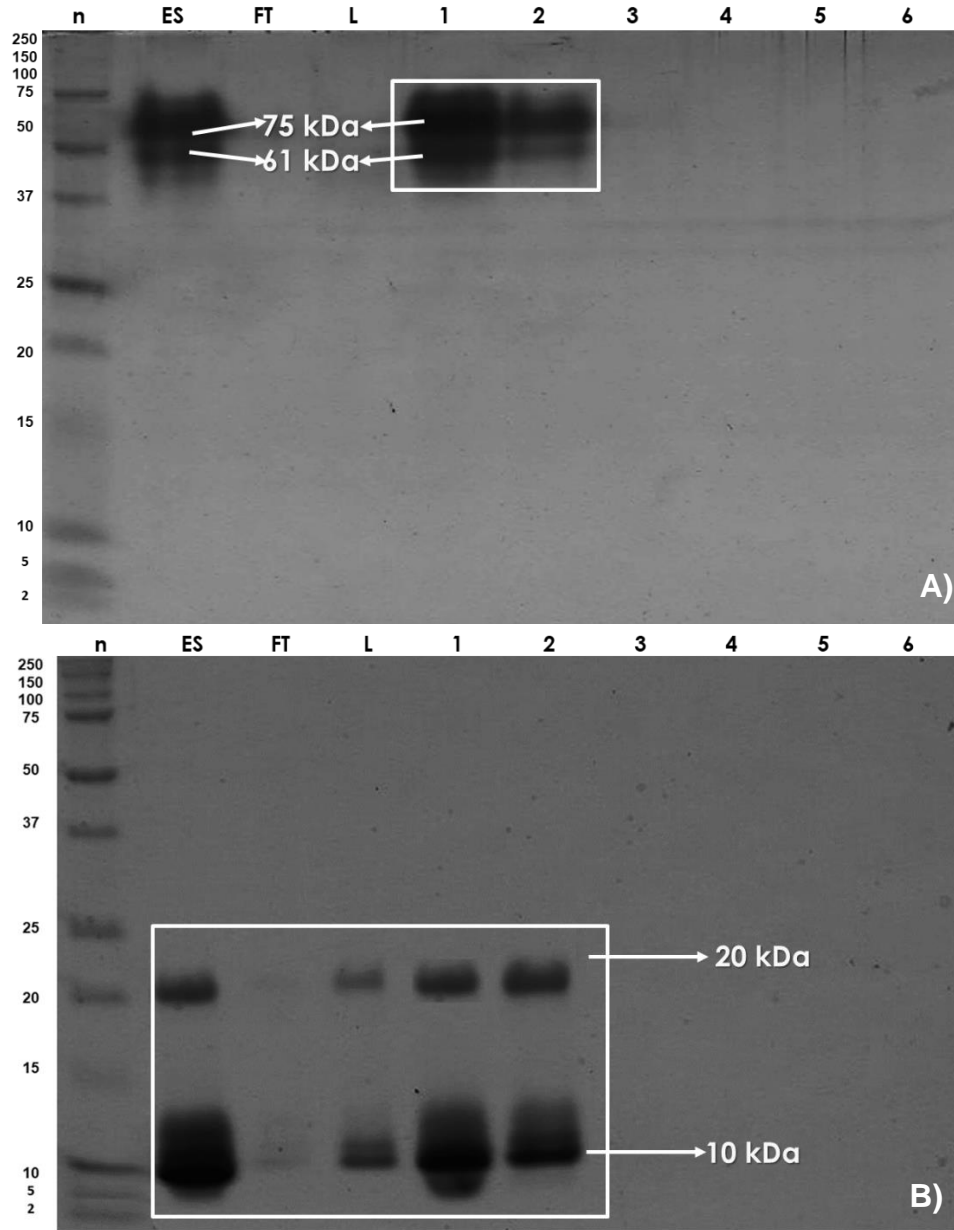


Figura 28. Separación de proteínas cargadas positivamente presentes en el extracto proteico soluble del fruto de *B. karatas*. A) Condiciones no reductoras; B) Condiciones reductoras. n. Marcador de peso molecular; ES. Extracto soluble; L. Lavado de columna Q; FT. Flowthrough de Q; 1. Fracción 1 (0.1 M NaCl); 2. Fracción 2 (0.2 M NaCl); 3. Fracción 3 (0.3 M NaCl); 4. Fracción 4 (0.4 M NaCl); 5. Fracción 5 (0.5 M NaCl); 6. Fracción 6 (1.0 M NaCl). Se cargó 10 µg/mL en cada pozo.

5.11. Determinación de la actividad proteolítica sobre el gel

Se evaluaron las actividades proteolíticas de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico. En la Figura 29 se muestran la actividad de cada una de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio catiónico, se observa una actividad en la fracción 1 y 2, eluidas con 0.1 y 0.2 M de NaCl respectivamente, y esta actividad se encuentran a un tamaño de 75 kDa aproximadamente.

Al igual que en trabajo de Meza Espinoza, en el 2017, la actividad de proteasa del extracto del fruto de *B. karatas* obtenido en este trabajo, después de la semipurificación por cromatografía de intercambio iónico, conservó su actividad proteolítica en condiciones no reductoras.

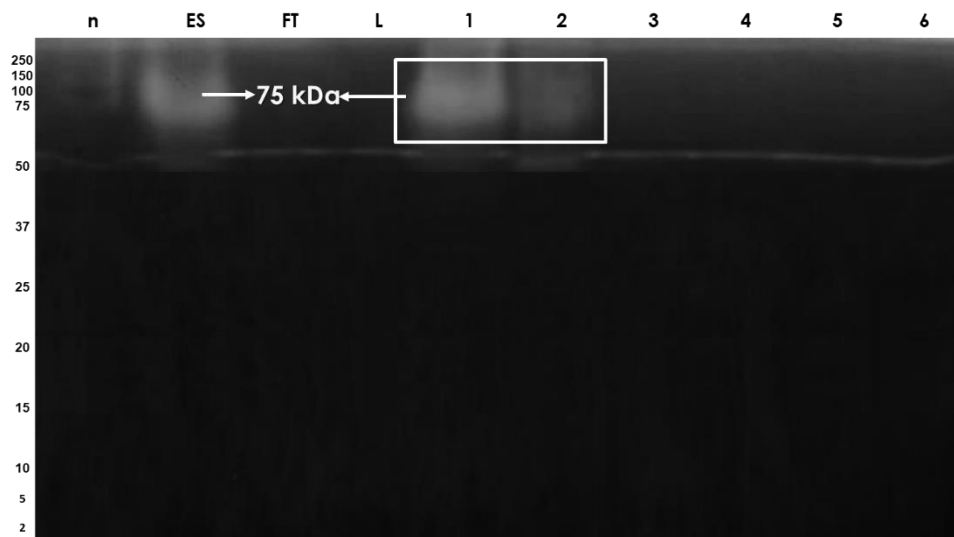
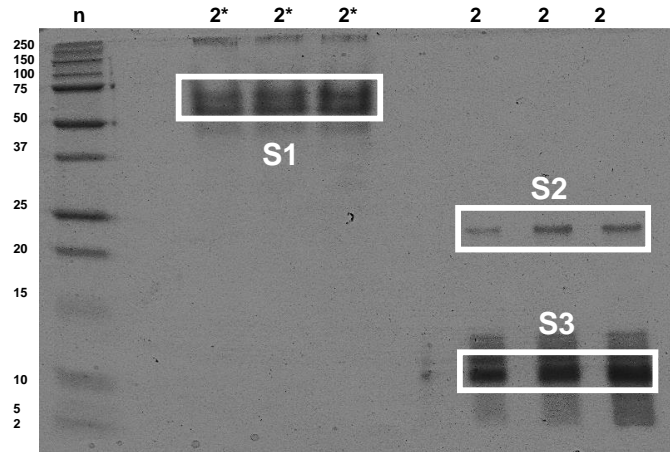


Figura 29. Zimograma de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio catiónico. n. Marcador de peso molecular; ES. Extracto soluble; L. Lavado de columna Q; FT. Flowthrough de Q; 1. Fracción 1 (0.1 M NaCl); 2. Fracción 2 (0.2 M NaCl); 3. Fracción 3 (0.3 M NaCl); 4. Fracción 4 (0.4 M NaCl); 5. Fracción 5 (0.5 M NaCl); 6. Fracción 6 (1.0 M NaCl). Se cargo 10 $\mu\text{g/mL}$ en cada pozo.

5.12. Identificación del ES del fruto de *B. karatas*.

Se logró la identificación de tres bandas de proteína presentes en la fracción 2 obtenida mediante cromatografía de intercambio catiónico. La Figura 30, muestra el gel de poliacrilamida (4 y 15% de bis-acrilamida), en el cual se cargó la fracción 2 obtenida por cromatografía de intercambio catiónico del ES en condiciones no reductoras, en la cual se obtuvieron 2 bandas de 61 y 75 kDa aproximadamente (S1), y en condiciones reductoras también se observan 2 bandas de aproximadamente 10 y 20 kDa (S2 y S3). Los resultados de la identificación de cada una de estas bandas dieron para una cistein proteasa abundante en la familia de la *Bromeliaceae*s, la bromelaína.

En 1995, Harrach *et al.*, caracterizaron parcialmente un extracto obtenido del tallo de *Ananas comosus* (piña), en el cual demostraron la presencia de la proteasa bromelaína, su SDS-PAGE en condiciones reductoras mostro cuatro bandas: 14, 17, 22 y 24 kDa, similares a las obtenidas en este trabajo.



Banda	Grupo de proteina	Enzima	Cobertura (%)	Péptidos con los que concuerda
S1	AGS78388.1	Bromelaina	35.5	1. HALTVLGYGDSSGK ** * *****k* 2. WAFSALATVEGLYK ***a* ****s ** 3. GGVFTGSCGTSLNH .***s*p***** 4. SWGSSWGEYGYLR ***a****r** * 5. SLDAANLSLYQPQPAMVSDGCDGGWVVK**y***** 6. DASGDATPANSMPNSPLASGDFQYYK*****h** 7. CLPGPSSAYLTGYK ...*n*** ***.
S2	AGS78388.1	Bromelaina	27	1. HALTVLGYGDSSGK ** * *****k* 2. NSWGSSWGEYGYLR ***a****r** * 3. AFSALATVEGLYK **a* ****s ** 4. GVGFTGSCGTSLNH ...*s*p***** 5. SLDASGDFQYYK * E*****h** 6. HNGGDCPGLPNVAYLTGYK*v**s** ***. 7. VPQSLDWR *** ***
S3	BAA21849.1	Bromelaina	33.1	1. SLNHALTVLGYGDSSGK ***** * ***** 2. NSWGSSWGEYGYLR *****g**v* 3. FSDLFPNPDPVPPGANYPYLYK

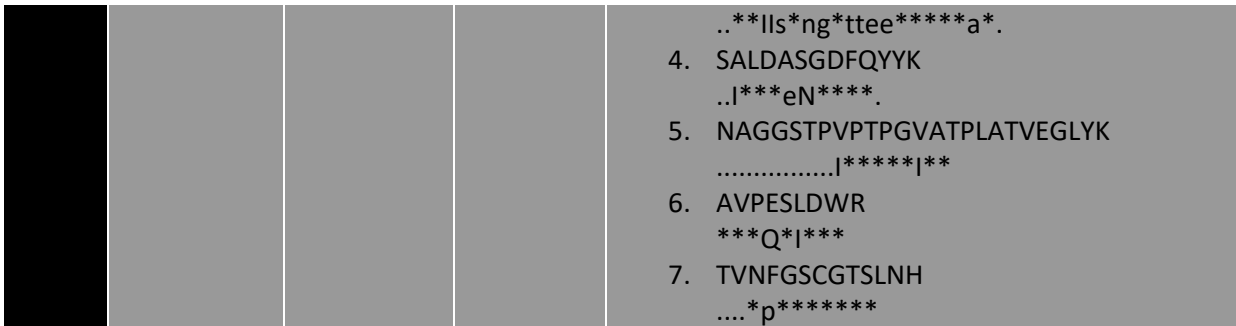


Figura 30. Identificación de los componentes del ES. n. Marcador de peso molecular; 2*. Fracción 2 (0.2 M NaCl) no reductora; 2. Fracción 2 (0.2 M NaCl) desnaturalizada. Se cargaron 10 µg/mL.

5.13. Actividad antimicrobiana de la fracción 2, obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra *Salmonella* Tiphymurium ATCC 13311

La Figura 31 muestra el efecto inhibitorio de la fracción 2 de la columna de intercambio catiónico (SP) a dos concentraciones (5 y 10 µg/mL) contra *S. Tiphymurium* ATCC 13311, y a diferentes tiempos de incubación, observándose una disminución de la absorbancia de este patógeno, estadísticamente significativa para todos los tratamientos a partir de la hora 10 de incubación.

Para establecer la existencia o inexistencia, de una disminución en el crecimiento de *S. Tiphymurium*, los inóculos en presencia del ES semipurificado en la fracción 2 de la columna de intercambio catiónico (SP) a 10 µg/mL, fueron incubados a los tiempos de 5, 8, 10 y 12 h, y plaqueados (Figura 32). Los resultados de este ensayo mostraron que existe una disminución de las células viables de este microorganismo bacteriano, en un rango de inhibición aproximado de 97% y 98% por parte del ES obtenido en la fracción 2 a una concentración de 5 y 10 µg/mL respectivamente (Figura 33); el porcentaje de inhibición dado por el extracto obtenido de la fracción 2 no muestra una diferencia estadísticamente significativa con el control positivo.

Por lo que el extracto separado en la fracción 2, posee una actividad antimicrobiana similar a la obtenida por el ES, con una concentración menor de proteína. Esto debido a que en el ES separado por cromatografía de intercambio catiónico solo se encuentran concentradas las proteínas cargadas positivamente, las cuales se pueden sugerir como cistein proteasas, dado a que como se indica en la sección 2.2.1 *B. karatas* es rica en este tipo de proteasas y además como se menciona en la sección 5.9.1 la actividad contra este microorganismo patógeno podría estar dada por la presencia de este tipo de proteasas positivas.

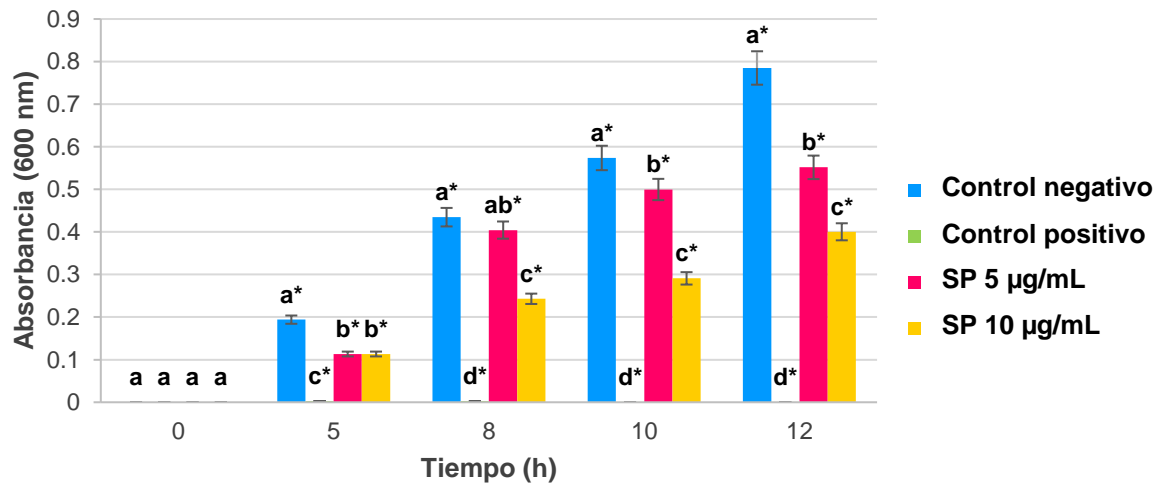


Figura 31. Actividad antimicrobiana de la fracción 2, obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra *S. Typhimurium* ATCC 13311. Control negativo: *S. Typhimurium* sin fracción 2; Control positivo: Ampicilina (40 µg/mL). * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103[®].

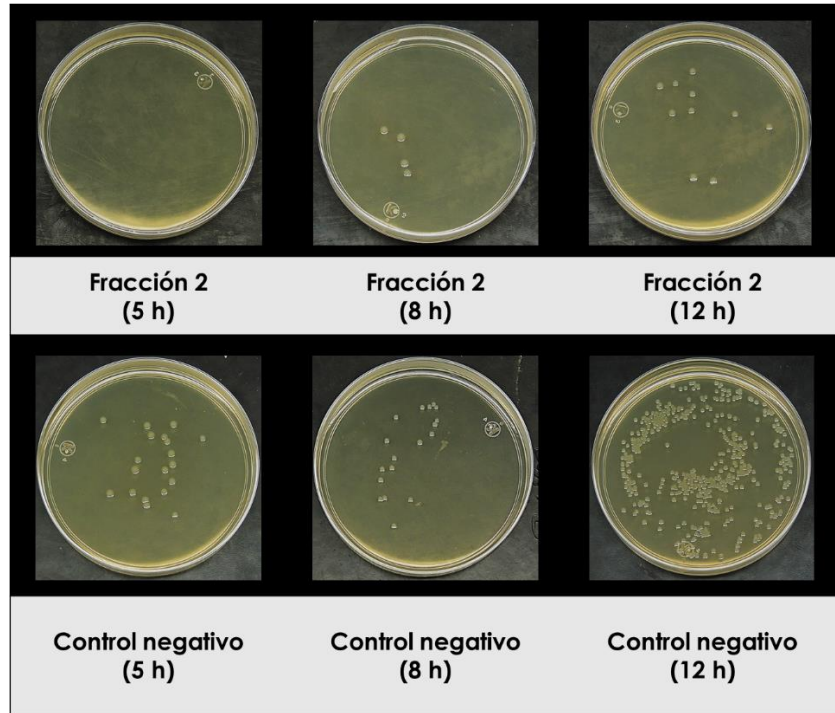


Figura 32. Inhibición de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 por el ES semi-purificado en la fracción 2 (10 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico. Control negativo: *S. Typhimurium* sin fracción 2.

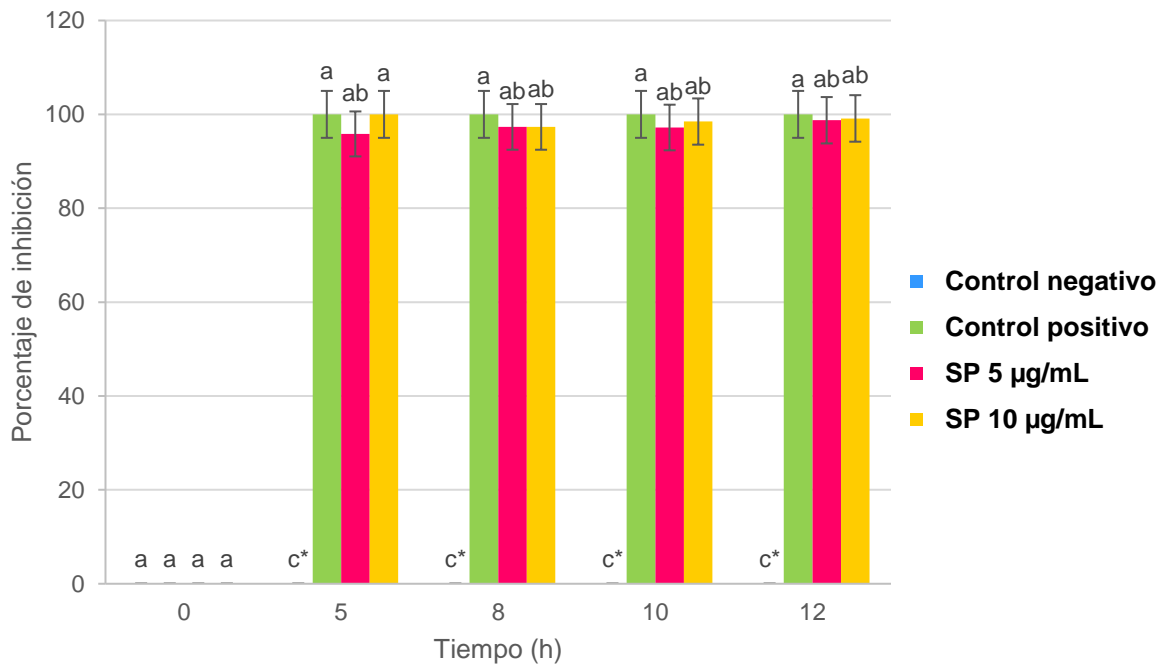


Figura 33. Porcentaje de inhibición de la fracción 2 (5 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico sobre *S. Tiphymurium* ATCC 13311. Control negativo: *S. Tiphymurium* sin fracción 2; Control positivo: Ampicilina (40 µg/mL). * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103®.

5.14. Actividad antimicrobiana de la fracción 2 obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

L. monocytogenes ATCC 15313, fue sometida a un tratamiento de 5 y 10 µg/mL de la fracción 2 de la columna de intercambio catiónico (SP), a diferentes tiempos de incubación. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 34, observándose una disminución de la absorbancia de este patógeno en presencia de la fracción 2, estadísticamente significativa con respecto a los dos controles usados.

L. monocytogenes, mostró una disminución de su crecimiento cuando fue tratada con el ES semipurificado obtenido en la fracción 2 de de la columna SP a una concentración de 10 µg/mL, efecto que se observa en el plaqueo mostrado en la Figura 35. Estos resultados mostraron que existe una disminución de las células viables de este microorganismo bacteriano, en un rango de inhibición aproximado del 65% y 80% respectivamente para cada una de las concentraciones usadas de de ES semi-purificado (5 y 10 µg/mL), estadísticamente significativo (Figura 36). Por lo que el ES del fruto de *B. karatas*, posee una actividad antimicrobiana aproximadamente 1.25 veces mayor a la obtenida por el ES obtenido en la fracción 2 con una concentración menor de proteína contra *L. monocytogenes*. Por lo que se sugiere que *L. monocytogenes*, requiere una concentración mayor de ES semi-purificado a la empleada en el presente ensayo, dado a que si presentó un aumento

del porcentaje de inhibición directamente proporcional a la concentración de ES semi-purificado en la fracción 2.

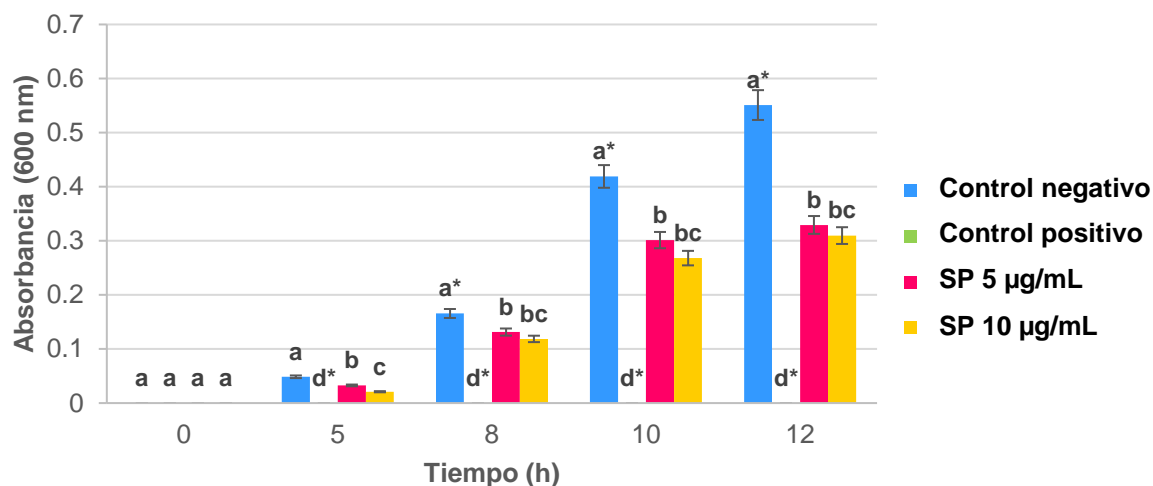


Figura 34. Actividad antimicrobiana de la fracción 2, obtenida por cromatografía de intercambio catiónico contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Control negativo: *L. monocytogenes* sin fracción 2; Control positivo: Ampicilina (20 µg/mL). * Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103[®].

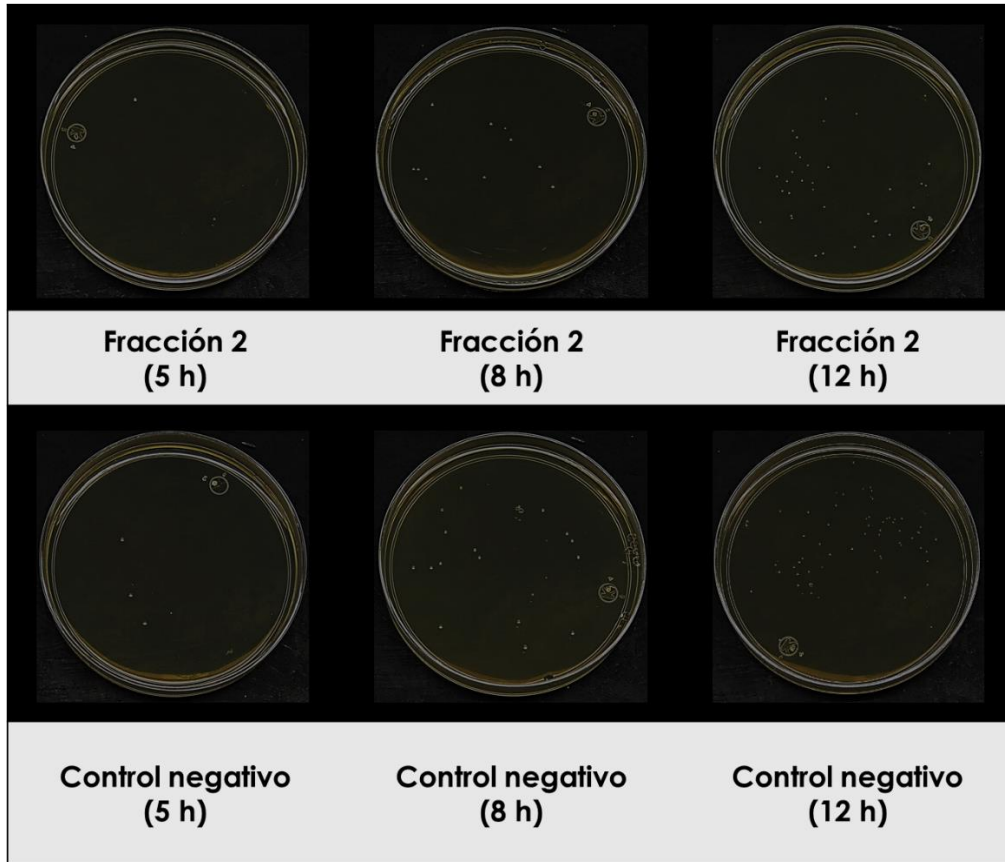


Figura 35. . Inhibición de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 por el ES semi-purificado en la fracción 2 (10 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico. Control negativo: *L. monocytogenes* sin fracción 2.

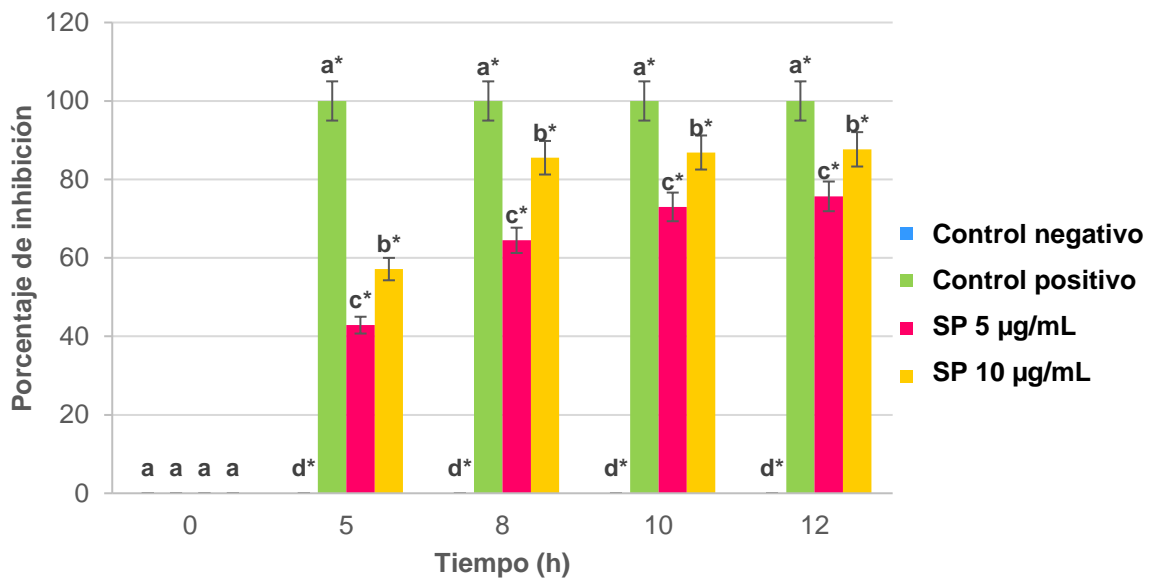


Figura 36. Porcentaje de inhibición de la fracción 2 (5 µg/mL) obtenida por cromatografía de intercambio catiónico sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Control negativo: *L. monocytogenes* sin fracción 2; Control positivo: Ampicilina (20 µg/mL). *Indica diferencia significativa. ANOVA/Tukey, $\alpha = 0.05$, Statgraphics Centurion 16.103[®].

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto proteico soluble (ES) del fruto de *Bromelia karatas*, el cual, al realizar el análisis electroforético muestra dos grupos de bandas predominantes, en condiciones no reductoras de 61 y 75 kDa, y en condiciones reductoras de 10 kDa y otra alrededor de los 20 kDa, aproximadamente, correspondientes a las reportadas para las cistein proteasas de bromelias.
- El ES del fruto de *B. karatas* no presenta actividad fungicida ni fungistática contra *Candida albicans* ATCC 10231.
- Existe una inhibición de crecimiento por parte del extracto proteico soluble del fruto de *Bromelia karatas* contra ambos microorganismos bacterianos (*L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*), la cual es directamente proporcional a la concentración proteica del extracto
- Se muestra una inhibición de las cepas bacterianas de 100% y 95.94% para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* respectivamente, causada por el ES del fruto de *B. karatas*. Estableciéndose por tanto, un efecto bactericida contra *L. monocytogenes* ATCC 15313 y *S. Typhimurium* ATCC 13311, sugiriéndose que este efecto es debido a la interacción de los componentes del ES con la pared celular y/o membrana del macroorganismo bacteriano.
- Mediante la cromatografía de intercambio catiónico el ES del fruto de *B. karatas* se logró semipurificar. La mejor separación se logró en las fracciones 2 y 3, con la aparición de dos bandas de aproximadamente 10 y 20 kDa, que

de acuerdo a los resultados de identificación corresponde a la proteasa bromelaína.

- El ES obtenido en la fracción 2 de la columna de intercambio catiónico, a una concentración de 5 µg/mL, muestra un porcentaje de inhibición de alrededor del 98% contra *S. Typhimurium* y 90% contra *L. monocytogenes*, por lo que puede sugerirse que la actividad presentada por el ES semipurificado en esta fracción, es debida a la presencia de cistein proteasas, las cuales se encuentran cargadas positivamente.
- La actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* está dada por la presencia de cisteín-proteasas como la bromelaína.

CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adolfsson, A., Hagander, A., Mahjoubipour, F., & Larsson, P.-G. (2017). How Vaginal Infections Impact Women's Everyday Life —Women's Lived Experiences of Bacterial Vaginosis and Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Advances in Sexual Medicine*, 7(1), 1–19.
<https://doi.org/10.4236/asm.2017.71001>
- Aguilera, L. L. (2010). *Estudio De PGA 26, Una Proteína Implicada En La Arquitectura De La Pared Celular De Candida Albicans*. Universidad de València.
- Andrade-Cetto, A., & Medina-Hernández, A. E. (2013). Hypoglycemic effect of Bromelia plumieri (E . Morren) L . B . Sm ., leaves in STZ-NA-induced diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology*, 4(April), 1–4.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00036>
- Bautista, C. T., Wurapa, E. K., Saterén, W. B., Morris, S. M., Hollingsworth, B. P., & Sanchez, J. L. (2017). Association of Bacterial Vaginosis With Chlamydia and Gonorrhea Among Women in the U.S. Army. *Am J Prev Med American Journal of Preventive Medicine*, 52(5), 632–639.
<https://doi.org/10.1016/j.amepre.2016.09.016>
- Belotto, E. M., Souza-Leal, T., Paraluppi, A. L., Furtado, A. L. F. F., Gaspi, F. O.

G., & Pedroso-de-Morares, C. (2014). Caracterização anatômica ,
histoquímica e de classes de metabólitos secundários de folhas de *Guzmania*
lingulata (L .) Mez . *Rev. Bras. Pl. Med.*, 16(1), 127–134.

Betancor, L., & Yim, L. (2012). *Salmonella y salmonelosis*. Montevideo, Uruguay.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V.
(2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews*
Microbiology, 13(December), 42–51. <https://doi.org/10.1039/c0cc05111j>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C.
(2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks,
virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75,
1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>

Bullarbo, M., Andersch, B., Samuelson, E., Lindgren, A., Kondori, N., & Baltzer, I.
M. (2017). Self diagnosis of vulvovaginal Candidiasis is Poor - A Comparison
of Diagnostic Methods Introducing β -Glucan as a Complement. *Bioenergetics*
Open Access, 6(1). <https://doi.org/10.4172/2161-038X.1000202>

- Caffer, M. I., Terragno, R., & Binsztein, N. (2008). *Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de Salmonella spp.* (Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán,” & Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur, Eds.). WHO Global Salm Surv. Retrieved from http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_salmonella_2008.pdf
- Camacho-Hernández, I. L., Chávez-Velázquez, J. A., Uribe-Beltrán, M. J., Ríos-Morgan, A., & Delgado-Vargas, F. (2002). Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*. *Fitoterapia*, 73(5), 411–413.
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00128-4](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00128-4)
- Casalinuovo, I. A., Sorge, R., Bonelli, G., & Di Francesco, P. (2017). Evaluation of the antifungal effect of EDTA, a metal chelator agent, on *Candida albicans* biofilm. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(6), 1413–1420. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28387883>
- Chen, Y., Fu, X., Mei, X., Zhou, Y., Du, B., Tu, Y., & Yang, Z. (2016). Characterization of functional proteases from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. *Journal of Functional Foods*, 25, 149–159.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.05.017>
- CICY. (2010). Flora: Península de Yucatán. Retrieved December 4, 2017, from http://www.cicy.mx/sitios/flora_digital/ficha_virtual.php?especie=174

Clinical and Laboratory Standards Institute. M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline (1999).

Cohen, H. J., Mechanda, S. M., & Lin, W. (1996). PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4303–4308. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168256&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Cruz Quintana, S., Díaz Sjostrom, P., Mazón Baldeón, G., Arias Socarrás, D., Calderón Paz, M., & Angélica, H. M. (2017). Genome of *Candida albicans* and drug resistance. *ResearchGate*.

Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T., & Yeo, P. F. (1985). *The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution, and Taxonomy*. Berlin, Heidelberg, New York and Tokyo: Springer-Verlag.

de Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., & Sáenz, Y. (2014). Antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella enterica* isolates. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 32(1), 4–10. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2013.03.006>

Diamond, C. E., Weng, K., Leong, K., Vacca, M., Rivers-Auty, J., Brough, D., &

Mortellaro, A. (2017). Salmonella typhimurium-induced IL-1 release from primary human monocytes requires NLRP3 and can occur in the absence of pyroptosis. *SCIENTIFIC REPORTS*, 7(6861), 1–9.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07081-3>

Errasti, M. E. (2013). *Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina*. Universidad Nacional de la Plata. Retrieved from

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/31727/Documento_completo_

_.Errasti.pdf?sequence=1

Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R., & Ramírez-Morillo, I. (2010). *Flora del bajo y de regiones adyacentes* (Vol. 25). México: Centro de Investigación Científica de Yucatan A. C.

FERREIRA, V., WIEDMANN, M., TEIXEIRA, P., & STASIEWICZ, M. J. (2014).

Listeria monocytogenes Persistence in Food-Associated Environments:

Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health.

Journal of Food Protection, 77(1), 150–170. [https://doi.org/10.4315/0362-](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150)

028X.JFP-13-150

Garai, P., Gnanadhas, D. P., & Chakravorty, D. (2012). Salmonella enterica

serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of

host-pathogen interactions. *Virulence*, 3(4), 377–388.

<https://doi.org/10.4161/viru.21087>

García-Magaña, M. de L., Gonzáles-Borrayo, J., Montalvo-González, E., Rudiño-Piñera, E., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Salazar-Leyva, J. A. (2018). Isoelectric focusing , effect of reducing agents and inhibitors : partial characterization of proteases extracted from Bromelia karatas. *Springer*.

<https://doi.org/10.1007/s13765-018-0380-6>

Givnish, T. J., Barfuss, M. H. J., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., ... Sytsma, K. J. (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98(5), 872–895.

<https://doi.org/10.3732/ajb.1000059>

Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J. J., Rota, C., Ariño, A., & Yangüela, J. (2014). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiology*, 42, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.017>

González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & Oliver-Salvador, M. del C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983–996.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>

- Gow, N. A. R., Veerdonk, F. L. Van De, Brown, A. J. P., & Netea, M. G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence : discriminating invasion from colonization. *Nature Publishing Group*, *10*(2), 112–122.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>
- Gupta, A., Shah, A., & Chaphalkar, S. (2016). Extraction of Proteases from Medicinal Plants and their Potential as AntiViral Targets. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, *6*(2). <https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000228>
- Hachem, R., Bahna, P., Hanna, H., Stephens, L. C., & Raad, I. (2006). EDTA as an Adjunct Antifungal Agent for Invasive Pulmonary Aspergillosis in a Rodent Model. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, *50*(5), 1823–1827. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1823-1827.2006>
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews. Microbiology*, *6*(january), 53–66.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Harrach, T., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Nuck, R., Grunow, D., & Maurer, H. R. (1995). Isolation and Partial Characterization of Basic Proteinases from Stem Bromelain. *Journal of Protein Chemistry*, *14*(1), 41–52.
- Jafari, Z., Soleymani, N., & Shojaee-Saedi, B. (2010). The antimicrobial activity of

the yeast *Candida albicans* alcoholic extract of the pineapple plant. *Journal of Biology*, 7(3).

Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., & Teixeira, P. (2017).

Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.013>

Laemmli, U. K. (1970): (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680–685.

<https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lagos, C. C. (2015). MEDICINAL PLANTS USED IN THE TREATMENT OF GYNECOLOGICAL DISEASES IN LETICIA AND PUERTO NARIÑO (AMAZONAS, COLOMBIA). *Etnobiología*, 13(1), 53–72. Retrieved from <http://asociacionetnobiologica.org.mx/revista/index.php/etno/article/view/145>

Langridge, G. C., Wain, J., & Nair, S. (2013). Invasive Salmonellosis in Humans.

EcoSalPlus, 1–14. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.6.2.2>

Larock, D. L., Chaudhary, A., & Miller, S. I. (2015). Salmonellae interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology*, 13(4), 191–205.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro3420>

Lepe, J. A., Torres, M. J., Smani, Y., Parra-millán, R., Pachón, J., Vazquez-barba, I., & Aznar, J. (2014). In vitro and intracellular activities of fosfomicin against clinical strains of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *43*(2), 135–139.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.018>

Lopez-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., & Zavala-Castro, J. E. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. *Biomédica*, *27*(490), 127–136.

López-Castillo, L. M., López-Arciniega, J. a. I., Guerrero-Rangel, A., Valdés-Rodríguez, S., Brieba, L. G., García-Lara, S., & Winkler, R. (2015). Identification of B6T173 (ZmPrx35) as the prevailing peroxidase in highly insect-resistant maize (*Zea mays*, p84C3) kernels by activity-directed purification. *Frontiers in Plant Science*, *6*(September), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00670>

López-Hernández, K. M., San, M., Pardío-Sedas, V. T., C, D., Williams, J. D. J., & C, D. (2014). Microbial risk assessment of *Vibrio* spp. in seafood products in México. *Revista de Salud Pública de México*, *56*(3), 295–301.

López Cuevas, O., León Félix, J., Jiménez Edeza, M., & Chaidez Quiroz, C. (2009). Detection and antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* in water and agricultural soil. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *32*(2), 119–126.

Retrieved from

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000200007

Luther, H. E. (2012). *An alphabetical list of Bromeliad binomials* (13th ed.).

Sarasota, Florida USA: Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad Society International.

Matheson, A., & Mazza, D. (2017). Recurrent vulvovaginal candidiasis: A review of guideline recommendations. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 57(2), 139–145. <https://doi.org/10.1111/ajo.12592>

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>

Mella M., S., Sepúlveda A., M., González R., G., Bello T., H., Domínguez Y., M., Zemelman Z., R., & Ramírez G., C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4), 330–338. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182004000400007>

Meza-Espinoza, L., Vivar-Vera, M. de los Á., García-Magaña, M. de L., Sáyago-Ayerdi, S. G., Chacón-López, A., Becerrea-Verdín, E. M., & Montalvo-González, E. (2017). Enzyme activity and partial characterization of proteases

obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Springer*. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0244-6>

Mondragón Chaparro, D. M., Ramírez Morillo, I. M., Flores Cruz, M., & García Franco, J. G. (2011). *La familia Bromeliaceae en México*. (L. Márquez Oríz, Ed.). Chapingo, Texcoco, Estado de México, México: SAGARPA, SNICS, SINAREFI y Universidad Autónoma Chapingo.

Monteiro, R. F., & Forzza, R. C. (2016). Typification of *Bromelia karatas*, the type of the genus *Bromelia* (Bromeliaceae). *TAXON*, 65(5), 1101–1106.

Montes, C., Amador, M., Cuevas, D., & Cordoba, F. (1990). Subunit structure of karatasin, the proteinase isolated from: *Bromelia plumieri* (karatas). *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 17–24.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10869883>

Montes R., C., Terán G., V. F., Zuñiga B., R. A., & Caldón, Y. E. (2014). MORPHOLOGICAL DESCRIPTION OF *Bromelia karatas*, A PROMISSING GENETICAL RESSOURCE FOR THE PATIA VALLEZ, CAUCA, COLOMBIA. *Bioteconología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 12(1), 62–70.
Retrieved from
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612014000100008&lang=pt

Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Coss-Navarrete, E. L., Bañuelos-Pérez, M. de J., Salazar-Leyva, J. A., Osuna-Ruiz, I., ... Mazorra-Manzano, M. Á. (2015). CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE Y CASEINOLÍTICA DE LAS PROTEASAS DEL FRUTO DE "AGUAMA" (*Bromelia pinguin* L.). *Biotecnia/Revista de Ciencias Biológicas Y de La Salud*, 19(2), 19–24.

Morillo Ramírez, I. (2006). Bromelias. In *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* (p. 183). Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatan A. C.

Moyano, D., Murillo, M., Murillo, E., Solanilla, W., Méndez, J., & Aristizabal, J. (2012). BROMATOLOGICAL AND PHYTOCHEMICAL PARAMETERS EVALUATION AND ANTIOXIDANT FUNCTIONALITY OF BROMELIA KARATAS (BROMELIACEAE) FRUITS. *Vitae*, 19(1), S439–S441. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914138>

Müller Esterl, W., & Brandt, U. (2008). *Bioquímica : fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Reverté.

Nag, M., Mukherjee, P. k, Biswas, R., Chanda, J., & Kar, A. (2016). Evaluation of Antimicrobial Potential of Some Indian Ayurvedic Medicinal Plants. *Pharmacogn J.* , 8(6), 525–533. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.6.3>

Nagao, K., & Udey, M. C. (2015). Mushrooming Insights into Skin Dendritic Cell Physiology. *Elsevier*, 42, 210–213. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/S1074761315000515/1-s2.0-S1074761315000515-main.pdf?_tid=05d6af34-39c8-11e7-87e1-00000aab0f6c&acdnat=1494891871_59d25cee298d939c8ae65f2b01c301b5

Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 400–428.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400>

Natalucci, C. L., Abreu Payrol, J., Bruno, M. A., Martin, M. I., Pardo, M. F., Pérez, A. T., ... Caffini, N. O. (2009). *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales. Capítulo 4. Fuentes naturales de fitoproteasas. Proteasas de Bromeliaceae.* (M. de la C. Hernández, Ed.) (Primera). Buenos Aires, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-CYTED.

Natalucci, C. L., Brullo, A., López, L. M. I., Hilal, R. M., & Caffini, N. O. (1996). Macrodontin , a new protease isolated from fruits of Pseudananas macrodontes (MORR) harms (Bromeliaceae). *Journal of Food Biochemistry*, 19, 443–454.

Nature. (2017). Proteases. Retrieved July 25, 2017, from https://www.nature.com/subjects/proteases?WT.ac=search_subjects_latestres

_proteases#research-and-reviews

OMS. (2017a). Inocuidad de los alimentos. Retrieved December 3, 2017, from

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

OMS. (2017b). Salmonella (no tifoidea). Retrieved from

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>

Parada, F., & Duque, C. (1998). Studies on the Aroma of Piñuela Fruit Pulp (

Bromelia plumieri): Free and Bound Volatile Composition and Characterization of Some Glucoconjugates as Aroma Precursors. *J. High Resol. Chromatogr.*, 21(10), 577–581.

Pardo, M. F., López, L. M. I., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., & Caffini, N.

O. (2000). Purification of Balansain I , an Endopeptidase from Unripe Fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3795–3800.

Perdomo Flórez, W., Ortiz Rivera, F., Nuñez rosero, Y. A., & Castro Betancourth,

D. (2010). Prevalence of salmonellosis on modernized poultry laying farms in the department of huila. *Revista Facultad de Salud*, 2(1), 77–84. Retrieved from <https://www.journalusco.edu.co/index.php/rfs/article/view/31/36>

Pérez, A., Carvajal, C., Trejo, S., Torres, M. J., Martin, M. I., Lorenzo, J. C., ...

Hernández, M. (2010). Penduliflorain I: A Cysteine Protease Isolated from *Hohenbergia penduliflora* (A.Rich.) Mez (Bromeliaceae). *The Protein Journal*, 29(4), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9243-7>

Pío-León, J. F., López-Angulo, G., Paredes-López, O., Uribe-Beltrán, M. de J., Díaz-Camacho, S. P., & Delgado-Vargas, F. (2009). Physicochemical, nutritional and antibacterial characteristics of the fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(3), 181–187. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0125-0>

Raad, I. I., Hachem, R. Y., Hanna, H. A., Fang, X., Jiang, Y., Dvorak, T., ... Kontoyiannis, D. (2008). Role of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in catheter lock solutions: EDTA enhances the antifungal activity of amphotericin B lipid complex against *Candida* embedded in biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 515–518. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S0924857908002963/1-s2.0-S0924857908002963-main.pdf?_tid=e8c2bb46-881b-49f4-8ad9-ebb6a05e6b38&acdnat=1535561750_87c5357f8466e70d58fbba6de05299e0

Raad, I., Sherertz, R., & Hachem, R. (2000). *US 6,509,319 B1*. Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/64/3a/53/6cbd801c231c22/US6509319.pdf>

Radoshevich, L., & Cossart, P. (2017). *Listeria monocytogenes*: towards a

complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>

Ramírez, A., Stella, L., & Marín Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263–268.

Ruiz-Bolivar, Z., Poutou-Piñales, R. A., & Carrascal-Camacho, A. K. (2008). Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. *Ciencias Biomédicas*, 6(10). Retrieved from http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA10_ARTREVIS4_LIS TE2.pdf

Sánchez Jiménez, M. M., & Cardona Castro, N. M. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio*, 7(1), 22–29. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Nora_Cardona-Castro/publication/259822841_Mecanismos_de_interaccion_de_Salmonella_c on_la_mucosa_intestinal/links/02e7e52e13566b3e8a000000/Mecanismos-de-interaccion-de-Salmonella-con-la-mucosa-intestinal.pdf

Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58(S2), 2–13. <https://doi.org/10.1111/myc.12330>

- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (2007). *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols* (CRC Press). Florida, EUA.
- Shankar, J., Solis, N. V, Mounaud, S., Szpakowski, S., Liu, H., Losada, L., ... Filler, S. G. (2015). Using Bayesian modelling to investigate factors governing antibiotic-induced *Candida albicans* colonization of the GI tract. *Scientific Reports*, 5, 8131. <https://doi.org/10.1038/srep08131>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella enterica* isolates. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(1), 217–226. Retrieved from http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf
- Tanaka, K. (2012). *Candida albicans*. *Instituto Nacional de Seguridad E Higiene En El Trabajo: DataBio*, 12(34), 2433–2442. <https://doi.org/10.1128/AAC.01366-12>
- Tessema, G. T., Møretrø, T., Kohler, A., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2009).

Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 6973–6980.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00608-09>

Vallés, D., Furtado, S., & Cantera, A. M. B. (2007). Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 409–413.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.011>

Wang, H., Huang, Z., Wu, Z., Qi, X., Lin, D., Hospital, J., ... Wang, H. (2017). An epidemiological study on vaginitis in 6,150 women of reproductive age in Shanghai Haixia. *New Microbiol*, 2(40).

Wilson, D., Naglik, J. R., & Hube, B. (2016). The Missing Link between *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis and Host Cell Damage. *PLoS Pathog*, 12(10), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005867>