



“ACTIVIDAD DEL RESIDUO  
BUTANOLICO Y LA FRACCIÓN  
BUTANOLICA DE LAS VAINAS DE  
*Caesalpinia spinosa* “TARA” SOBRE  
BIOPELÍCULAS DE *Staphylococcus aureus*  
EN SOPORTES DE ACERO  
INOXIDABLE.”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

BRYAN ANDRÉ CANAL NÚÑEZ

LIMA-PERÚ

2024



**ASESORA:**

Msc. Dora Maurtua Torres

**JURADO DE TESIS**

**MG. LEON FAUSTINO VILLEGAS VILCHEZ**

**PRESIDENTE**

**DRA. MONICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO**

**VOCAL**

**DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA**

**SECRETARIA**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, por su amor  
incondicional, apoyo constante y  
sacrificios que hicieron posible este logro.  
A mi familia y amigos, por su comprensión  
y aliento a lo largo de este camino.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a mi asesora Msc. Dora Maurtua por su invaluable orientación y apoyo durante todo el proceso de realización de esta tesis. Su dedicación, paciencia y sabiduría fueron fundamentales para el éxito de este trabajo.

Al Círculo de Investigación "Nuevas Tecnologías para Suministros de Fármacos a Base de Productos Naturales Peruanos para el Control de la Salud Bucal". por su orientación experta y por facilitar el acceso a recursos y conocimientos especializados que han enriquecido este estudio.

Expreso mi más sincera gratitud a la Dra. Haydee Montoya, cuya valiosa guía, paciencia y conocimientos fueron fundamentales en cada etapa de este proyecto. Su dedicación y apoyo constante me motivaron a alcanzar este importante objetivo académico.

Agradezco especialmente a Caroline Granados por su apoyo incondicional, comprensión y ánimo constante, que fueron esenciales para superar los desafíos y alcanzar este logro.

**FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

Ciencia activa

Financiado por otro proyecto- SIDISI 100416

# EFICACIA DEL EXTRACTO ETANOLICO Y LA FRACCIÓN BUTANOLICA DE *Caesalpinia spinosa* "TARA" SOBRE BIOPELÍCULAS DE *Staphylococcus aureus* EN SOPORTES DE ACERO INOXIDABLE

## INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[repositorio.upch.edu.pe](http://repositorio.upch.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

2

Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia

Trabajo del estudiante

1%

3

[www.scielo.org.pe](http://www.scielo.org.pe)

Fuente de Internet

1%

4

[hdl.handle.net](http://hdl.handle.net)

Fuente de Internet

1%

5

[cybertesis.unmsm.edu.pe](http://cybertesis.unmsm.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

6

[noesis.uis.edu.co](http://noesis.uis.edu.co)

Fuente de Internet

<1%

7

[eprints.uanl.mx](http://eprints.uanl.mx)

Fuente de Internet

<1%

Submitted to Universidad de Cartagena

## INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN .....	0
2. ANTECEDENTES .....	4
3. MARCO TEORICO .....	10
3.1 Descripción botánica .....	10
3.2 Extracción de metabolitos en plantas .....	12
3.3. Extracto etanólico .....	14
3.4. Residuo butanolico .....	14
3.5. Fracción butanolica .....	15
3.6 Acetonitrilo .....	16
3.7 Compuestos fenólicos .....	17
3.8 Taninos .....	17
3.9 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
3.10 Biopelícula estafilocócica .....	20
3.10.1 Fase de adherencia .....	21
3.10.2 Multiplicación .....	22
3.10.3 Éxodo .....	23
3.10.4 Maduración .....	23
3.10.5 Dispersión .....	24
3.11 Acero inoxidable .....	25
3.12 Fundamento de los métodos de caracterización .....	26
3.12.1 Extracción líquido-líquido .....	26
3.12.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) .....	27
3.12.3 Colorante Rojo de Congo .....	28
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	29
5. JUSTIFICACIÓN .....	31
6. HIPÓTESIS .....	34

6.2 Hipótesis alternativa .....	34
7. OBJETIVOS .....	35
7.1 Objetivo general: .....	35
7.2 Objetivos específicos:.....	35
8. VARIABLES DE ESTUDIO .....	36
9. MATERIALES Y METODOLOGIA.....	37
9.1 Diseño experimental.....	37
9.2 Definición de la muestra.....	37
9.3 Tamaño de la muestra.....	37
9.4 Lugar de Ejecución.....	39
9.5 Extracto vegetal .....	39
9.5.1 Partición líquido-líquido del extracto etanólico o extracto bruto orgánico	40
9.5.2 Fraccionamiento de los residuos .....	41
9.5.3 Análisis de los extractos residuales empleando la técnica analítica de cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS)	42
9.6 Cepa bacteriana .....	43
9.7 Capacidad de formación de biopelículas .....	44
9.8 Establecer la dosis mínima de los extractos residuales .....	44
9.9 Capacidad de adhesión a superficies de acero.....	46
9.10 Desarrollo de biopelículas de <i>S.aureus</i> en soportes de acero inoxidable .....	47
9.10.1 Desarrollo de biopelículas sobre discos de acero inoxidable .....	47
9.11 Evaluación de la eficacia de la fracción butanólica y el residuo butanólico contra matrices de biopelículas de <i>S. aureus</i> en acero inoxidable. ....	49
9.12 Consideraciones éticas .....	50
9.13. Análisis estadísticos .....	51
10. RESULTADOS.....	52
11. DISCUSIÓN .....	67
12. CONCLUSIONES .....	72
13. RECOMENDACIONES .....	74
14. LIMITACIONES .....	75
15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de variable.....	36
Tabla 2. Compuestos detectados en el RBUOH del EBO de tara.....	53
Tabla 3. Compuestos detectados en la fracción 50ACN del RBUOH del EBO de la tara .....	54
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para la reducción de células de la biopelícula del EBO y FBEBO, cepa, periodo de incubación (días). .....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía general de los fenilpropanoides en las plantas. Adaptado de Filippis 2015). .....	19
Figura 2. Etapas del desarrollo de biopelículas (Moormeier et al 2017) .....	25
Figura 3: a) Cepa criopersevada de <i>S. aureus</i> MRSA 43300. b) Stick de <i>S aureus</i> ATCC 25923 .....	43
Figura 4. Disposición del extracto bruto y la fracción residual en los pocillos de ELISA al establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	45
Figura 5. Capacidad de adherencia en discos de acero inoxidable. A) discos inoculados con la cepa de <i>S aureus</i> 25923. B) Discos inoculados con <i>S. aureus</i> MRSA 43300..	47
Figura 6. Formación de biopelículas de <i>S. aureus</i> sobre discos de acero inoxidable .	48
Figura 7.- Cromatograma de iones totales del extracto bruto orgánico de tara con las moléculas identificadas en el extracto.....	
Figura 8. Cromatograma de iones totales del residuo butanólico del extracto bruto orgánico de tara con las moléculas detectadas en el RBUOH del EBO de Tara .....	
Figura 9. Resultado del método de.....	56
Figura 10. Resultado positivo para <i>S aureus</i> cepa MRSA 43300.....	56
Figura 11. Concentración mínima inhibitoria (CIM). A. <i>S. aureus</i> MRSA 43300. B <i>S.aureus</i> ATCC 25923.....	
Figura 12. Adherencia de las cepas de <i>S aureus</i> sobre discos de acero inoxidable despues de 72 horas de incubación.....	52
Figura 13. Media de las células adheridas a superficies de acero entre dos cepas de <i>S. aureus</i> . .....	58
Figura 14. Comparación de medias del número de células eliminadas al emplear EBO y FBEBO en 2 cepas de <i>S. aureus</i> .....	59
Figura 15. Desarrollo de la biopelícula Estafilococica en un disco de acero inoxidable a 37 °C después de 3, 6, 9 y 12 días de incubación. ....	60
Figura 16. Reducción de células de la biopelícula (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de dos cepas de <i>S. Aureus</i> despues de 3, 6, 9 y 12 dias de incubación en superficies de acero inoxidable. ....	62

## RESUMEN

La formación de biopelículas estafilocócicas es uno de los principales factores de riesgo que afectan a la salud principalmente en ambientes nosocomiales y en la industria de los alimentos. *Caesalpinia spinosa* es una especie natural de América del Sur de la cual se han reportado la presencia de polifenoles principalmente en sus vainas. En el Perú se ha estudiado principalmente la actividad antibacteriana al emplear los extractos etanólico y metanólico de *C.spinosa* frente a diferentes patógenos sin embargo existen investigaciones aunque escasas sobre la actividad antibiopelícula de esta especie frente a *Staphylococcus aureus* y otros patógenos de importancia clínica. Por lo tanto, el principal objetivo del siguiente trabajo fue evaluar el efecto antibiopelícula del residuo butanólico y la fracción butanólica al enfrentarlas frente a cepas estándares de *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* Meticilina Resistente ATCC 43300 en discos de acero inoxidable. Se trabajó con 30 discos impregnados con cada una de las cepas y por cada tiempo evaluado (3,6,9 y 12 días). La caracterización fenotípica en agar rojo de Congo se evidenció por el crecimiento de colonias negras, asimismo la capacidad de adherencia mostró que la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 mostró un alto conteo de colonias ( $7.72 \text{ UFC/cm}^2$ ). La concentración mínima inhibitoria fue 50 mg/ml al emplear residuo butanólico y la fracción butanólica. La actividad antibiopelícula más significativa ( $p < 0.5$ ) se demostró al utilizar el residuo butanólico frente a ambas cepas con  $1.60 \pm 0.15 \text{ log UFC/cm}^2$  y  $2.26 \pm 0.10 \text{ log CFU/cm}^2$  respectivamente. Se concluye entonces que el residuo butanólico fue más efectivo en contraste con la fracción butanólica en función a su capacidad antibiopelícula.

**PALABRAS CLAVE:** *Staphylococcus aureus*, Biopelícula, antibiopelícula, fracción butanólica, residuo butanólico.

## ABSTRACT

The formation of staphylococcal biofilms is one of the main risk factors affecting health, particularly in nosocomial environments and the food industry. *Caesalpinia spinosa* is a natural species from South America in which polyphenols, primarily found in its pods, have been reported. In Peru, the antibacterial activity of ethanolic and methanolic extracts of *C. spinosa* has been mainly studied against various pathogens; however, there is limited research on the anti-biofilm activity of this species against *Staphylococcus aureus* and other clinically important pathogens. Therefore, the main objective of the following study was to evaluate the anti-biofilm effect of butanol residue and its butanol fraction by testing them against standard strains of *S. aureus* ATCC 25923 and Methicillin-Resistant *S. aureus* ATCC 43300 on stainless steel disks. We worked with 30 disks impregnated with each strain and for each evaluated time (3, 6, 9, and 12 days). Phenotypic characterization on Congo red agar showed the growth of black colonies. Additionally, the adherence capacity showed that the *S. aureus* ATCC 25923 strain had a high colony count (7.72 CFU/cm<sup>2</sup>). The minimum inhibitory concentration was 50 mg/ml when using both butanol residue and its butanol fraction. The most significant anti-biofilm activity ( $p < 0.05$ ) was demonstrated by the butanol residue against both strains with  $1.60 \pm 0.10$  log CFU/cm<sup>2</sup> and  $2.26 \pm 0.15$  log CFU/cm<sup>2</sup>, respectively. It is concluded that the butanol residue was more effective compared to the butanol fraction in terms of its anti-biofilm capacity.

**KEYWORDS:** *Staphylococcus aureus*, Biofilm, anti-biofilm, butanol fraction, butanol residue.



## 1. INTRODUCCIÓN

Se estima que más del 60 % de las infecciones son causadas por la formación y desarrollo de biopelículas según los institutos nacionales de la salud (INH) convirtiéndose en la principal problemática en ambientes intrahospitalarios y en la industria de alimentos debido que en condiciones adecuadas logra desarrollar grandes comunidades de microorganismos sobre diferentes dispositivos médicos, mesas, pisos e instrumentos los cuales pueden afectar drásticamente la salud de los pacientes, personal sanitario o de los trabajadores involucrados. El desarrollo de biopelículas bacterianas representa una merma importante en el desarrollo de las actividades e involucra un minucioso sistema de desinfección el cual no siempre es eficiente, además de ser tóxico debido a que se emplean una amplia gama de agentes desinfectantes de naturaleza ácida o alcalina (Brooks & Flint,2008).

Las biopelículas están formadas por grupos de bacterias sobre una matriz de exopolisacáridos, los cuales forman ecosistemas microbianos complejos con capacidad de desarrollarse sobre superficies bióticas o abióticas siendo la adhesión el primer paso, la cual depende de las propiedades fisicoquímicas entre la célula y la superficie de contacto, sustentada por las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y moléculas de la superficie de las bacterias como autolisinas o ácidos teicoicos presentes en estafilococos. Las células que forman parte de las biopelículas poseen ventajas sobre las células platónicas de la misma especie es decir que pueden adquirir nuevas características genéticas debido a su proximidad con otras células. Asimismo, se ha

descrito que los EPS tiene como función proteger a las células de esta comunidad contra la desecación, proporcionar estabilidad y controlar la penetración de agentes biocidas y compuestos desinfectantes en estas matrices celulares (Donlan, 2002).

Las estrategias más empleadas en el control y la eliminación de biopelículas contemplan métodos físicos, químicos y biológicos. La combinación de cobre Cu(II)/peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y Cu(II)/ peroximonosulfato (PMS) ha mostrado una alta eficiencia en la inactivación de biopelículas Otro método descrito consiste en modificar las superficies de acero inoxidable mediante fijación de diferentes iones metálicos, evita la adhesión de bacterias o afecta la viabilidad de la superficie al interactuar con las células bacterianas. Sin embargo, estas alternativas pueden generar efectos adversos como intoxicaciones por aspiración o contacto directo con la piel y el daño al medio ambiente. Por otro lado, el uso de compuestos bioactivos derivados del metabolismo secundario principalmente por hongos, bacterias y plantas por lo tanto son considerados una alternativa sustentable y segura dado que tienen la capacidad de prevenir o inhibir el crecimiento patógeno (Rautray *et al* 2010; Lee *et al* 2020).

Se ha descrito que los materiales de acero inoxidable son resistentes al calor y la corrosión debido a que están compuestos por aleaciones a base de hierro, pudiéndose mejorar estas características al aumentar los niveles de cromo y níquel respectivamente. La capacidad de adhesión y adaptación de bacterias aeróbicas y anaerobias sobre superficies de acero inoxidable se sustenta en su capacidad de interacción con este tipo de sustratos de forma simbiótica o aislada como consecuencia

de la producción de metabolitos los cuales contribuyen a la alteración de estas superficies favoreciendo la corrosión. (Dula, *et al* 2021; Decléty 2003)

Las plantas son organismos que producen diversos compuestos naturales y entre ellos están los que se derivan del metabolismo secundario, cuya función principal está asociada con la supervivencia y de la cual se han identificado diversas propiedades como antibacterianos, herbicidas e insecticidas, por ello se mantiene un conservado interés en desarrollar nuevos compuestos derivados de plantas que sean efectivo contra estos tapices microbianos. El Perú cuenta con una gran diversidad de flora de importancia comercial con diferentes propiedades que son empleadas en la industria farmacéutica y alimentos, *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze es una especie representativa localmente conocida como “tara” perteneciente a la familia Fabaceae. Es una leguminosa de tamaño arbóreo distribuida por toda la costa, con potencial valor económico principalmente por los diferentes principios activos atribuidos a sus partes áreas (semillas, vainas y tallo) las cuales son empleadas en gran medida por la industria farmacéutica y en el tratamiento de diferentes enfermedades emergentes. (Martel *et al* 2014, Avilés, 2018).

Se han realizado con énfasis principalmente estudios orientados a la actividad antibacteriana de los diferentes componentes de la tara sobre diferentes bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, bacterias orales entre otras (Nan *et al* 2015; Millones 2021), sin embargo los estudios enfocados en la eliminación de biopelículas formadas por *S.aureus* sobre un tipo de soporte son

limitadas, por lo que el siguiente trabajo busca evaluar la actividad de residuo butanólico y la fracción butanólica de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (*tara*) sobre biopelículas elaboradas por *Staphylococcus aureus* en un soporte que es de acero inoxidable.

## 2. ANTECEDENTES

Las biopelículas bacterianas son intrínsecamente influenciadas por las características y condiciones sobre el entorno en el cual se desarrollan y proliferan. En los ecosistemas naturales y artificiales su desarrollo se ve influenciado por la temperatura, nivel de oxígeno, pH, tipo de superficie y disponibilidad de nutrientes. Se ha encontrado un efecto sinérgico entre la temperatura y el tipo de superficie que interviene en el desarrollo de las biopelículas en *S. aureus* descubriéndose que el desarrollo sobre poliéster tuvo un mejor desarrollo a 37 °C que 25 °C, sin embargo, este patrón cambió cuando desarrollo sobre acero inoxidable siendo más eficiente una temperatura ajustada a 25 °C, las temperaturas en el rango de 7 y 28°C no muestra un patrón definido durante la formación de biopelícula. Esta discrepancia puede reflejar la diferencia en las condiciones experimentales o el efecto sinérgico de otros factores presentes en su entorno como la disponibilidad de nutrientes y la superficie de contacto que promueve la formación de biopelículas (Rumbaugh, & Ahmad 2014; Abdalan *et al* 2014; Pagedar *et al.* 2010; Vazquez-Sanchez *et al.* 2013).

Las superficies lisas usadas en las industrias de procesamiento de alimentos, clínicas y hospitales son acero inoxidable debido a su fácil limpieza y su resistencia a los agentes químicos empleados durante los procedimientos de desinfección, sin embargo estudios empleando microscopía de barrido han revelado que estas superficies son susceptibles a ser invadidas por bacterias debido a que los residuos orgánicos quedan adheridos sobre grietas o rayones ocasionado por la continua fricción mecánica. En la formación de biopelículas está condicionada por la naturaleza de los sustratos, la carga

de la superficie celular, presencia de flagelos y la fase de crecimiento bacteriano en contraste la maduración es influenciada por las condiciones ambientales, la especie/cepa bacteriana, la heterogeneidad fisiológica dentro de la biopelícula y la comunicación celular denominada quórum sensing (QS) , además el QS se ha descrito como un sistema de comunicación que emplean la mayoría de bacterias al ser sometidas a condiciones ambientales lo que desencadena en la producción de un péptido autoinductor (API). En *S. aureus* este sistema provoca cambios en la formación de biopelículas. En diferentes poblaciones celulares dentro de la biopelícula muestran un patrón expresión génica distinto ocasionadas por condiciones fisicoquímicas, como el oxígeno, la disponibilidad de sustratos, el pH y la densidad celular. (Di ciccio et al 2015; Parastan, R *et al* 2020).

Para combatir el desarrollo y la proliferación de biopelículas sobre superficies de acero inoxidable se ha establecido diferentes metodologías. Se propuso emplear acero inoxidable 304SS y 304SS con cojinetes de cobre (304CuSS) el cual presento una efectividad antibacteriana del 99.9% en contraste con 304SS asimismo se demostró que las superficies 304 CuSS tuvieron una fuerte inhibición sobre el crecimiento y la adherencia de las biopelículas después de 7 días de tratamiento. Otra alternativa es el uso de diferentes extractos vegetales los cuales presentan propiedades. Los extractos de propilenglicol de salvia y romero en tres diferentes concentraciones (0.01 %, 0.05 % y 0.1 %) los cuales tuvieron un efecto significativo sobre la formación de biopelículas en *Staphylococcus aureus* al aumentar la concentración de cada extracto empleado obteniendo un 94 % de efectividad al utilizar extracto de romero al 0.1%.

Otra vía propuesta es empleando el residuo orgánico de conchas de abanico al enfrentarla sobre biopelículas de tres patógenos reconocidos por su incidencia en plantas de producción de carne y lácteos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli O157:H7* las cuales se desarrollaron sobre placas de acero inoxidable que al ser tratadas con esta sustancia a concentraciones del 0,25% como el 0,50% con tiempo de exposición de 1 minuto lograron reducir en 4 log UFC / cm<sup>2</sup>, 5 log UFC / cm<sup>2</sup>, 6 log UFC / cm<sup>2</sup> (Bodur *et al* 2012; Nan *et al* 2015; Piegerová *et al* 2019).

Las plantas a diferentes condiciones de estrés desarrollan nuevas moléculas a través de rutas alternas, estas moléculas conocidas como metabolitos secundarios son empleadas principalmente en el tratamiento de enfermedades y se presentan como una nueva alternativa en el control y la proliferación de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*. Se han reportado diferentes trabajos sobre este patógeno al ser enfrentado a diferentes principios activos, extraídos diferentes especies vegetales respondiendo de manera idónea al tratamiento *in vitro* frente al desarrollo de biopelículas. Los aceites esenciales presentes en *Cymbopogon nardus*, como el geraniol, tenían la capacidad de reducir la biomasa del tapiz bacteriano de *S aureus* hasta en un 100 % en concentración de 0.5 y 4 mg/mL. También se ha demostrado que el carvacrol, un aceite esencial presente en *Origanum vulgare L* en concentraciones de 10 µL / mL y 5 µL/mL permite reducir biopelículas maduras y jóvenes formadas en superficies de acero inoxidable después de un periodo de exposición de 10 y 15 minutos logrando reducir  $\geq 2$  log

UFC/cm<sup>2</sup> con un tiempo de exposición de 10 minutos para ambas concentraciones empleadas (Piegerová *et al* 2019; Pontes, E *et al* 2018; Rodrigues, J *et al* 2018).

El análisis fitoquímico de los extractos empleando diferentes solventes como etanol, metanol y una mezcla hidroalcohólica de hojas de *Caesalpinia spinosa* ha reportado en mayor cantidad de taninos en comparación de flavonoides y saponinas, mostrando actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Análisis histoquímicos en tara demostró la presencia de taninos distribuidos en el tejido parenquimatoso distribuido en los foliolos, raquis y peciolo, tracomas glándulas presentes en el raquis y peciolo contienen compuestos fenólicos, la presencia de mono terpenos asociados a las partes aéreas como las hojas están asociados a su actividad antibacteriana y antioxidante.

Los compuestos activos obtenidos del extracto crudo y de las fracciones difieren en relación a la polaridad de solvente empleado durante el proceso de extracción lo cual hace posible que metabolitos secundarios específicos puedan ser separados, por lo tanto. Se demostró que al emplear la combinación de solventes hexano: éter de petróleo empleados en la extracción liquido-liquido aumento el rendimiento en la obtención del contenido total de terpenos de *Severinia buxifolia* en la fracción en comparación con los extractos crudos, asimismo se encontró el gran potencial antioxidante de las fracciones metanolica y butanolica obtenidos de los extractos en hojas de *Psidium guajava*. Se ha reportado la actividad antibacteriana de la fracción butanolica acuosa frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25923) y

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) obtenidas de los extractos de los rizomas de *Solidago chilensis* Meyen. Algunas especies vegetales como *Achatina fulica* y *Terminalia fagifolia* mostraron actividad antibiopelícula en sus extractos y fracciones logrando inhibir el 80 % de la biopelícula (Suárez *et al* 2021; De Araujo *et al* 2015; Truong *et al* 2021; Tachakittirungrod *et al* 2007; Tania *et al* 2009).

Dentro de la familia fabácea existen algunas especies que muestran actividad Antiestafilococida se ha reportado que al emplear el extracto etanólico y sus fracciones de *Acacia polyacantha* presentaron un efecto antibacteriano frente a 14 cepas de *Staphylococcus aureus* metilo-resistentes obteniendo que los extractos de hojas, raíces y corteza inhibieron 92,85 % (13/14), 92,85 % (13/14) y 71,43 % (10/14) de las cepas bacterianas ensayadas respectivamente con una concentración mínima inhibitoria (CMI) variando entre 16 y 1024 µg/mL. Las fracciones exhibieron mejores resultados en comparación con las de sus extractos crudos, ya que sus CMI oscilaron entre 16 y 512 µg/mL, siendo las fracciones de hojas más activas que las obtenidas de cortezas (Ashu *et al* 2020).

Márquez *et al* 2007 demostraron que el número de células adheridas en superficie de vidrio ( $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup>) fue estadísticamente diferente ( $P \leq 0,05$ ) en superficies de acero inoxidable ( $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup>) siendo la temperatura importante durante esta etapa la cual fue de 37 °C. Este patrón se ha confirmado por Moreno *et al* 2020 al establecer diferencias entre *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* donde se

demostró que *S aureus* prefiere adherirse a superficie de acero que a superficies de naturaleza polimérica la cual fue significativa desde el punto de vista estadístico  $P < 0,0001$ . Por otro lado, Unlu *et al* 2018 ha demostrado el efecto antibiopelícula de diferentes fitoquímicos donde se eliminó significativamente ( $P < 0,05$ ) entre 50–78 % mediante el tratamiento con 2mg/mL de cinamaldehído asimismo 2 mg/mL de farnesol y terpinen-4-ol fueron al menos 50 % más efectivos ( $P < 0.05$ ) en la eliminación de biopelículas de 3 cepas diferentes de *S aureus*, sin embargo, bajo las mismas concentraciones de Citral, limoneno y eugenol mostraron las actividades antibiopelícula más bajas inferiores al 50 % ( $P < 0,05$ ).

### 3. MARCO TEORICO

En el Perú los registros botánicos describen 10 especies de *C. spinosa* y solo 3 se han identificado como endémicas, geográficamente esta especie se distribuye por la costa occidental de Sudamérica, desde el norte de Chile hasta Ecuador, Venezuela, Colombia y Bolivia, desde los 800 hasta los 3000 msnm. En nuestro país está distribuida en los departamentos alto andinos (Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Ancash, Apurímac) o escenarios con clima húmedo, seco y calurosos como las lomas. Se ha descrito hace más de 3000 años las culturas pre-incas aprovechaban las vainas y junto con metales como el hierro las empleaban como colorante para el teñido de prendas esto debido al hecho la presencia de taninos. En la actualidad presentan un valor económico sustentable debido a diferentes propiedades medicinales como su capacidad antimicrobiana y antioxidante principalmente de sus vainas y hojas (Larrera 2011; Cordero 2015).

#### 3.1 Descripción botánica

*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” o taya se describe como una especie de porte arbóreo o arbustivo, pertenece a la familia Fabaceae pudiendo alcanzar hasta 10 metros de alto. Presenta un fuste único con diámetro promedio en su adultez de 6 m generalmente de un color grisáceo con la presencia de espina de forma triangular de un grosor mediano al alcanzar la madurez, presentan ramas ascendentes la cual forman

una copa umbelífera y poco compacta. Presentan hojas estructuradas de forma bipinnada las cuales tiene una disposición en espiral y generalmente están agrupadas en pares de 6-8 foliolos. De inflorescencia racimosa terminales de una longitud de 15-20 cm de longitud, de flores amarillas o amarillas rojizas (corola), hermafroditas, zigomorfas, con un cáliz irregular. Los frutos son de tipo vaina con tonalidades variables durante su maduración desde amarillo, rojizo o acentuarse a un color naranja las cuales pueden contener entre 4 a 7 semillas redondeada de un diámetro variable (0.6-0.7cm) con apariencia parduzca en su madurez (Mostacero *et al* 2011; Martel *et al* 2014).

### 3.2 Principios activos

Las plantas tienen una capacidad dual de producir metabolitos primarios y secundarios con diversas propiedades biológicas. Los metabolitos primarios son compuestos esenciales para el metabolismo celular de las plantas, estos incluyen aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos en contraste los metabolitos secundarios son compuestos producidos en respuesta factores como el estrés y condiciones ambientales. la formación de estos principios activos comienza por la vía del ácido shikimico, la cual es compartida por bacterias, hongos, algas, parásitos y plantas, para la producción de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y vía también metabolitos del indol. La fenilalanina y la tirosina son precursores de la vía fenilpropanoide, y la primera enzima involucrada es la fenilalanina amonio liasa (PAL). La formación de 4-Coumaryl CoA y malonil CoA deriva en la formación de la mayoría de otros metabolitos secundarios importantes de fenilpropenos y poliaminas,

produciendo eventualmente flavonoides, flavonas, antocianinas, cumarinas, taninos, ligninas y estilbenos en las plantas que involucran ácido shikímico y se biosintetizan directamente a través del piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (de Filippis. 2015; Voght, 2010). La biosíntesis vía metabolitos se describe en la figura 1.

Los metabolitos secundarios reportados en *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze se encuentran principalmente en sus partes aéreas como hojas, vaina y semillas. La vaina de esta especie contiene taninos hidrolizables entre 40 % y 60% dependiendo de las condiciones ambientales en la cual se produce una reacción hidrolisis en la cual los taninos ocasionan la separación de ácido gálico. El contenido de taninos presentes en las hojas es referenciado en 12.7 %, así también se ha determinado la presencia de glicósidos, gomas, mucílagos y antraquinonas. Las semillas están compuestas principalmente por monosacáridos de naturaleza orgánica como la galactosa y manosa y en conjunto forman un hidrocoloide galactomanánico (Pareja-Vásquez *et al* 2020; Siccha *et al* 1994).

### 3.3 Extracción de metabolitos en plantas

La extracción es un proceso el cual se realiza para obtener los compuestos bioactivos de las plantas de diferente composición química tales como glucósidos (glucósidos cardíacos, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, saponinas y glucósidos de antraquinona), compuestos fenólicos (ácidos fenólico e hidroxicinámico, estilbenos, flavonoides y antocianinas), taninos ( taninos condensados y taninos hidrolizables),

mono-di- y sequi-terpenoides, fenilpropanoides , lignanos, resinas, alcaloides, furocumarinas, naftodiantronas, proteínas y péptidos empleando solventes de diferente polaridad y características químicas específicas. Por lo cual conlleva emplear una serie de etapas y consideraciones los cuales se describen a continuación:

La obtención y elección de material vegetal está sujeta a la observación primaria acorde a la especie de interés por lo cual se recolectan aquellas libres de plagas o de la senescencia. Para un mayor grado de reconocimiento los ejemplares son depositados en un herbario para su correcta identificación complementando con fuentes de biodiversidad y el conocimiento etnobotánico. El material vegetal es secado a una temperatura menor a 30 °C y no expuesta a la luz solar evitando su degradación química dado que pueden descomponer algunos compuestos termolábiles. La biomasa obtenida se expondrá a diferentes solventes acorde con el componente que se quiera purificar, asimismo al elegir un solvente o un sistema combinado de estos es necesario tener en cuenta grado de solubilidad -polaridad del objetivo, la pureza, la seguridad y facilidad de trabajar con el solvente (punto de ebullición).

Se han descrito diferentes técnicas en la obtención de los compuestos activos en las plantas estas varían acorde al nivel de costo y complejidad del método empleado y generalmente se emplean las más sencillas, eficaces y económicas como la percolación y maceración. La maceración se describe como un método sencillo pero eficaz donde la biomasa se expone a un solvente de elección por un determinado tiempo y condiciones ambientales acorde a la metodología de extracción cuya principal finalidad es romper es ablandar y romper los tejidos de la planta para obtener todos los

compuestos fitoquímicos solubles que luego serán separados empleando técnicas complementarias (Cvjetko *et al* 2018; Jones & Kinghorn 2012)

#### 3.4. Extracto etanólico

Se obtiene a través de la maceración de materias vegetales utilizando etanol como disolvente, aprovechando sus propiedades polares para extraer compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos (González *et al.*, 2019). Este método de extracción es eficaz y seguro, permitiendo la obtención de una variedad de metabolitos secundarios, incluidos flavonoides y alcaloides, que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Los extractos etanólicos son utilizados en múltiples aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética, gracias a su capacidad para preservar los compuestos bioactivos (Pérez *et al.*, 2015).

#### 3.5. Residuo butanólico

El residuo butanólico es un extracto obtenido a partir del fraccionamiento del extracto bruto metanólico mediante la utilización de butanol como solvente. Este proceso implica la extracción de compuestos solubles en butanol, lo que permite la concentración de metabolitos de interés que pueden poseer propiedades bioactivas significativas. El uso de butanol es relevante debido a su capacidad para disolver una amplia gama de compuestos orgánicos, incluyendo flavonoides, saponinas y compuestos fenólicos (Pérez *et al.*, 2015). La obtención de este residuo se realiza tras la extracción inicial con solventes más polares, lo que garantiza una separación más efectiva de los metabolitos.

### 3.6. Fracción butanólica

La fracción butanólica es un extracto obtenido a partir de la separación de compuestos bioactivos de la materia vegetal mediante la extracción con butanol. Este solvente, de naturaleza intermedia, permite disolver una variedad de compuestos orgánicos, como fenoles, flavonoides y otros metabolitos secundarios, que son difíciles de extraer con solventes más polares o apolares (Pérez et al., 2015). La obtención de la fracción butanólica generalmente sigue un proceso en dos etapas: primero, se realiza una extracción con un solvente polar (como agua o etanol), seguido de un fraccionamiento con butanol para concentrar los compuestos de interés (Santos et al., 2017). En algunos casos, se utiliza una mezcla de 50% de acetonitrilo como parte del proceso de extracción, lo que mejora la solubilidad de ciertos compuestos y optimiza la recuperación de metabolitos (Martínez et al., 2018).

### 3.7 Butanol

n-butanol se describe químicamente y estructuralmente como un alcohol de cadena linear corta conformada por redes de grupos hidroxilos donde 5 o más moléculas pueden interactuar entre sí y poseen la capacidad de formar 2 fases a temperatura ambiente. Asimismo, el grupo hidroxilo de este solvente funciona como aceptor y donador de enlaces de hidrogeno y su corta cadena alifática puede crear un ambiente hidrofóbico lo cual hace posible que moléculas de diferente tamaño y polaridad puedan interactuar con la fase de butanol (Reetz *et al* 2021).

### 3.8 Acetonitrilo

El acetonitrilo, un solvente con una masa molecular de 41.05 g/mol y un punto de ebullición de 81.6°C, juega un papel fundamental en la extracción y fraccionamiento de metabolitos secundarios gracias a sus características físicas únicas. Este solvente se destaca por su alta polaridad y habilidad para formar enlaces de hidrógeno, lo que le permite disolver una amplia variedad de compuestos como alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas y ácido di-O-galoilquínico, un metabolito fenólico con propiedades antioxidantes (S. A. Varga, 2021). En técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la extracción líquida-líquida (LLL), el acetonitrilo se combina frecuentemente con otros solventes, como agua o metanol, para ajustar la polaridad de la mezcla, lo que facilita la extracción de compuestos con distintas propiedades químicas (J. M. Cox, 2019). La capacidad del acetonitrilo para formar enlaces de hidrógeno y su baja viscosidad permiten una disolución y separación efectiva de los metabolitos. En métodos como la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y la extracción en fase sólida (SPE), este solvente mejora la recuperación de metabolitos interactuando con las superficies de adsorción y penetrando eficazmente en las muestras, lo que reduce las pérdidas y mejora la pureza de las fracciones obtenidas (S. D. Patel et al., 2020). En particular, para la extracción de ácido di-O-galoilquínico, el acetonitrilo facilita la liberación y cuantificación del ácido al interactuar con sus grupos funcionales durante el análisis (A. K. Smith et al., 2022). Por tanto, el acetonitrilo es un solvente crucial en la extracción y análisis de metabolitos secundarios debido a su capacidad para ajustar la polaridad de las mezclas de solventes, formar enlaces de hidrógeno y separar eficazmente los compuestos.

### **3.9 Compuestos fenólicos**

Son una clase de compuestos orgánicos presente en todas las plantas como metabolitos secundarios. En diferentes concentraciones su estructura se define como un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo, dada esta característica tienden a ser solubles en agua ya que se presentan con mayor frecuencia combinadas con el azúcar como glucósidos y suelen estar localizadas en la vacuola. Entre los compuestos fenólicos naturales, se conocen más de mil estructuras, los flavonoides forman el grupo más grande, sin embargo, se han detectado en menor cantidad fenoles monocíclicos simples, los fenilpropanoides y las quinonas fenólicas. El aislamiento de fenoles vegetales a veces son obstáculo debido que su capacidad de formar complejos con proteínas mediante enlaces de hidrógeno y también son muy susceptibles a la oxidación debido a la acción de enzimas 'fenolasas' específicas presentes en todas las plantas. Además, los fenoles pueden formar complejos con las proteínas y, como resultado se presenta una inhibición de la actividad enzimática en los extractos de plantas crudos. Para contrarrestar estos efectos en el aislamiento de estos compuestos se recomienda realizar estos procedimientos en alcohol en ebullición para evitar que se produzca la oxidación enzimática (Harborne, 1973)

### **3.10 Taninos**

Son metabolitos secundarios más abundantes producido por las plantas cuya producción oscila entre 5% y al 10% del peso seco de las hojas, se definen

químicamente como compuestos polifenólicos de alto peso molecular que van desde 500 Da (daltons) hasta 3000 Da, capaces de formar complejos insolubles o solubles de tanino-proteína por lo tanto se consideran que son solubles en agua y se encuentran principalmente en hojas, flores, frutos y raíces de las plantas, los cuales se encuentran en las vacuolas y su rol está asociado a la defensa contra animales herbívoros estudios *in vitro* ha demostrado propiedades antihelmínticas, antiparasitarias y antibacterianas. Según su estructura química y propiedades estas biomoléculas polifenolicas se clasifican en 2 grupos, aquellos formados por polimerización conocidos como taninos condensados (TC) y los taninos hidrolizables que provienen de la esterificación de los compuestos polifenolicos. Ambos grupos se diferencian por su peso molecular, estructura y su efecto al ser ingerido por rumiantes principalmente. Las estructuras químicas de los TH están conformadas por un carbohidrato, generalmente D-glucosa, como núcleo central y generalmente se encuentran en concentraciones bajas en plantas en contraste a los TC. Por el contrario, los taninos condensados se encuentran principalmente en leguminosas forrajeras, árboles y tallos, su estructura se describe en unidades de flavonoides (flavan-3-ol) unidas por enlaces carbono-carbono y su complejidad depende de las unidades flavonoides que varían entre los constituyentes (Barbehen & Peter 2011; Eshratkhah *et al* 2015).

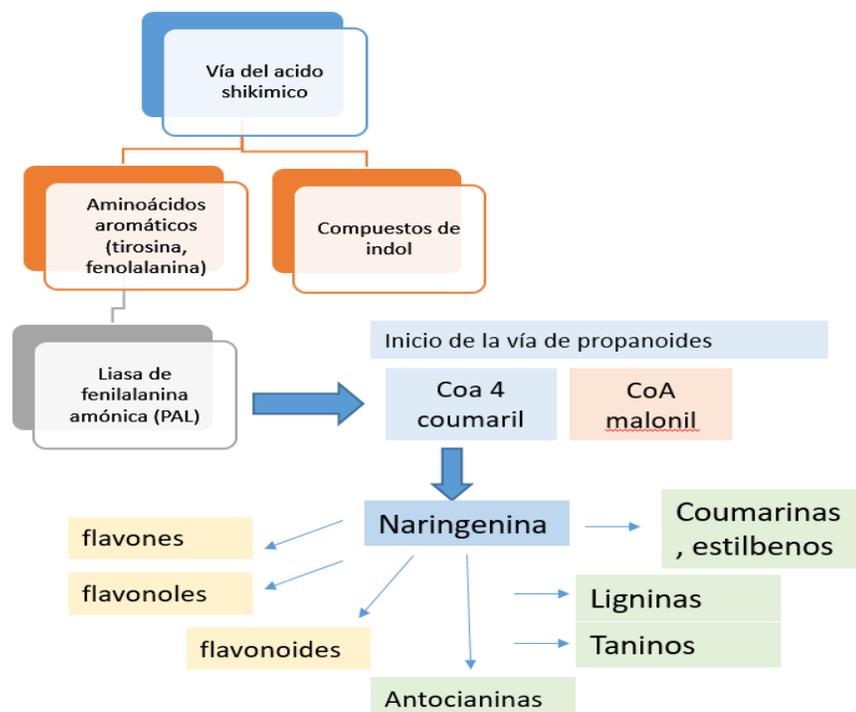


Figura 1. Vía general de los fenilpropanoides en las plantas. Adaptado de *Filippis* (2015).

### 3.11 *Staphylococcus aureus*

Actualmente el género *Staphylococcus* está conformado por más de 50 especies que se han descrito como cocos que están agrupados como células únicas, en pares o dispuestas en racimos de uvas y al emplear la técnica de tinción clásicas son clasificados como Gram positivos, además son no móviles, no esporulados ni forman capsula y pueden vivir en presencia o ausencia de oxígeno. Sus características metabólicas y bioquímicas las describen como productores de catalasa, capaces de fermentar glucosa pueden desarrollarse en medios con cloruro de sodio al 10% (halófito) y la temperatura de crecimiento óptimo oscila entre 20 y 45 °C. En cultivo

la descripción fenotípica de sus colonias las describe como lisas con una tonalidad crema, redondeadas y convexas mientras que los análisis en base a su material genético han demostrado que la cantidad de guanina citocina (G+C) va de 30 a 39 %. Este microorganismo es parte natural del microbiota de la piel y mucosas en los humanos así también están distribuidos por todo ambiente, sin embargo, principalmente *Staphylococcus aureus* se identificado como patógeno en animales y el hombre (Grace, D.& Fetsch, A. 2018; Bierowiec, K *et al* 2016).

### **3.12 Biopelícula estafilocócica**

La formación de biopelículas estafilocócicas sigue un patrón sistematizado lo que permite su predicción y se establece por la unión de bacterias plantónicas a una determinada superficie donde intervienen las fuerzas de Van der Waals, interacciones electroestáticas, interacciones estéricas e interacciones hidrofóbica- hidrofílica entre las bacterias y las superficies. La asociación bacteriana conduce a la formación de microcolonias capaces de producir sustancias poliméricas finalmente la maduración de estas microcolonias depende de la formación de canales que permitan el transporte hacia el interior de la biopelícula. Además, la adhesión microbiana es dependiente de la relación hidrófoba-hidrofílica de la superficie que interactúan y un aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana favorece la adhesión celular tanto en la superficie de soporte hidrófila como en la hidrófoba (Liu *et al.*,2004; Parastran *et al* 2020).

Asimismo, la capacidad que determina la unión a cualquier tipo de soporte como plásticos, cristales y metales, está condicionada por proteínas específicas la pared bacteriana y de apéndices motrices. Generalmente comprende un proceso dividido en 5 etapas: adherencia, multiplicación, éxodo, maduración y dispersión (Otto M, 2018; Moormeier, D. E., & Bayles, K. W 2017).

### **3.12.1 Fase de adherencia**

El estafilococo puede fijarse a un determinado sustrato por dos vías, una activa que es mediada por flagelos, pili, adhesinas, capsula y la carga de superficial bacteriana o la vía pasiva que involucra factores físicos relacionado con el carácter hidrofóbico que mantiene entre la superficie y las bacterias. Asimismo, durante el proceso de formación de la biopelícula se da una unión reversible la cual depende de la carga eléctrica bacteriana (electroestático o hidrofóbico) y las fuerzas de Van der Waals. Un grupo de proteínas de unión específicas interviene en la interacción con células humanas, la familia más importante de estas proteínas de unión son MSCRAMM (componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de la matriz adhesiva) que están conformadas desde el extremo N al C de un péptido señal, un dominio de unión al ligando con secuencias repetidas, una región de anclaje a la pared celular y una región que atraviesa la membrana además existe un grupo de proteínas unidas a la superficie no covalentemente llamadas colectivamente SERAM (moléculas adhesivas de repertorio expandido secretables), que se unen a la superficie mediante mecanismos aún no identificados y generalmente muestran una amplia especificidad en la unión a

proteínas de las células eucariotas. Se identificó que *S. epidermidis* las moléculas de unión específicas como la autolisina *AtlE* y para la especie *S. aureus* está asociada a *Atl* y el ácido teicoico.

### **3.12.2 Multiplicación**

Al adherirse a una superficie determinada y con una fuente necesaria de nutrientes, las células se comienzan a dividirse y acumularse, sin embargo, previo a la producción de la matriz extracelular, las células hijas son vulnerables al desprendimiento asociado a fuerzas de flujo de los fluidos. Para mantener la estabilidad de la biopelícula inmadura las células de *S. aureus* producen diferentes factores que estabilizan las interacciones de célula a célula. Los estafilococos producen proteínas extracelulares que podrían facilitar la acumulación de biopelículas al promover la unión intercelular poco después de la unión inicial. Este evento de división y acumulación celular se denomina etapa de multiplicación. El estafilococo puede fabricar varias proteínas extracelulares que facilitan la acumulación de biopelícula al inducir la unión intercelular poco después de la unión. Algunas de estas proteínas categorizadas como MSCRAMM, algunas de ellas descritas *FnBP*, *ClfB* y *SdrC*, las cuales cumplen la función en la unión como en la acumulación. En el caso de *S. aureus* la proteína *SasG* esta cumple funciones de acumulación y fijación temprana.

### **3.12.3 Éxodo**

Se describe como una etapa de dispersión temprana la cual coincide con la formación de microcolonias dando como resultado la reestructuración de la biopelícula. Asimismo, esta reestructuración es mediada por la degradación del ADN extracelular (eDNA) dependiente de nucleasas y es independiente del mecanismo de dispersión de Agrd que ocurre después del desarrollo de la microcolonia. En *S. aureus* se ha demostrado que la degradación del eDNA dentro de la matriz está asociado a la producción y secreción de una nucleasa ocasiona la reducción de la biomasa.

### **3.12.4 Maduración**

Se inicia con la formación de microcolonias encargadas de producir una matriz de naturaleza polimérica. Los polímeros de esta matriz que conforman la biopelícula tienen una composición variable que incluye polisacáridos, proteínas y ácido teicoico. Estudios empleando microscopia de fluorescencia demostraron dos tipos de microcolonias las cuales se desarrollan en diferentes intervalos y difieren la expresión génica. La primera fue una microcolonia de rápido crecimiento que exhibía expresión constitutiva de *lrgAB* en respuesta a condiciones de hipoxia mientras que el segundo tipo parecía tener un ritmo más lento y expresaba *cidABC*. El desarrollo de este conglomerado bacteriano es influenciado por las condiciones ambientales que pueden favorecer el crecimiento y la división celular desencadenando la producción de polímeros polianiónicos pudiéndose ser excretados al exterior cuya función principal es de servir como pegamento entre las bacterias y la superficie. Este exopolímero

secretado por la microcolonias de la biopelícula está compuesto principalmente por azúcares y polisacáridos, los grupos funcionales de los polisacáridos portadores de carga o neutros son capaces de intercambiar iones y concentrar iones en la superficie en la cual se adhirieron.

### **3.12.5 Dispersión**

En esta última fase la dispersión de la biopelícula en *S. aureus* está bajo el control de la detección de *quórum sensing* Agr y este sistema depende de la densidad celular y la acumulación de moléculas de señal llamadas autoinductores. Esta bacteria además produce una feromona llamada octapéptida o péptido autoinductor (AIP) la cual se acumula en el medio de cultivo y que al alcanzar una concentración umbral se une y activa la histidina quinasa AgrC. Activado AgrC fosforila el regulador de respuesta, AgrA, que luego inicia la transcripción del promotor P3 del operón agr, produciendo una molécula de ARN reguladora (RNA III) encargado de establecer control en la activación de los factores de virulencia y genes asociados a la biopelícula. También se ha reportado que este sistema de detección Agr está implicado en el desarrollo de las biopelículas mediante la expresión del promotor P3 en las micro colonias.

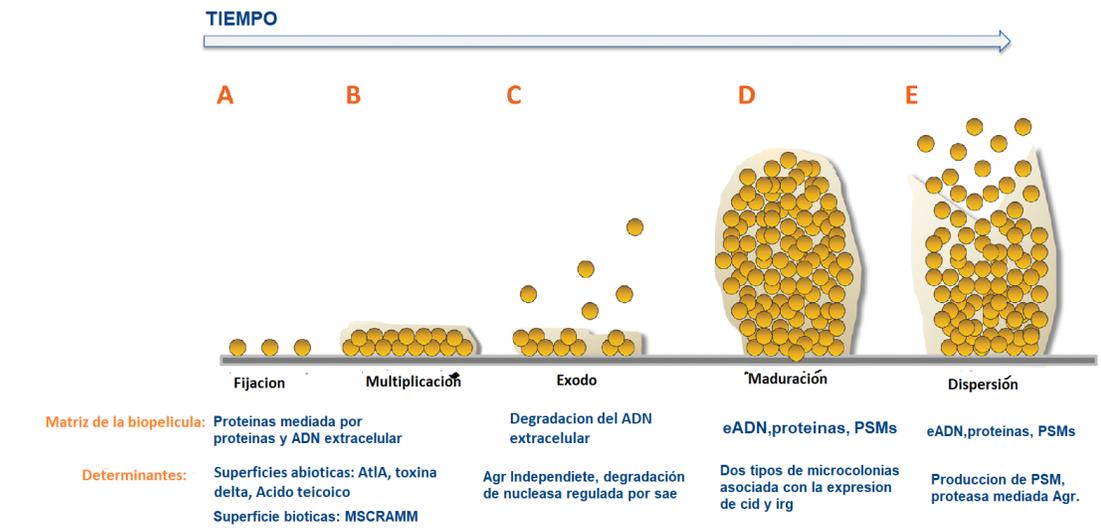


Figura 2. Etapas del desarrollo de biopelículas (Moormeier *et al* 2017)

### 3.13 Acero inoxidable

El acero inoxidable, pertenece a la familia de aleaciones a base de hierro con concentraciones significativas de aleación con níquel, manganeso, silicio y titanio entre otros metales. Por tanto, los materiales con esta composición presentan una resistencia a la corrosión y al calor atribuida a un porcentaje determinado del metal asociado el cual produce diferentes variaciones en las características de los diversos tipos. Un componente añadido a los materiales de acero inoxidable es el óxido de cromo el cual le da capacidad de resistir al proceso de oxidación. Por otro lado, la calidad del acero inoxidable es definido por la cantidad de cromo añadido, el cual debe superar el 10% y en combinación con el níquel permitirá determinar la naturaleza y la característica

que definirán el tipo de acero inoxidable. Asimismo, los aceros se pueden clasificar en 3 grupos de acuerdo a su composición y características metalúrgicas. El grupo de aceros inoxidables austénicos contienen cromo y níquel, los ferríticos presentan cromo como elemento principal de aleación y los martensíticos son aleaciones de cromo-hierro con un nivel significativo de carbono. Generalmente son empleados para fabricación de equipos y utensilios biomédicos y en la industria de alimentos (Leal 2011; Declety 2003).

### **3.14 Fundamento de los métodos de caracterización**

#### **3.14.1 Extracción líquido-líquido**

Consistió en separar diferentes componentes de una mezcla la cual se fundamenta en la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer de dos diferentes solventes. La primera solución se llama alimentadora y se pone en contacto con la fase del disolvente en una matriz mezcladora-decantadora, generalmente es un material de vidrio conocida como pera decantación, después de la extracción y separación en fases, la fase que queda empobrecida se convierte en el refinado y la fase solvente enriquecida se convierte en el extracto o solvente cargado. El refinado pasará por una etapa de recuperación de disolvente para eliminar cualquier disolvente arrastrado antes comenzar el proceso, asimismo algunos solutos pueden estar unidos con el componente de interés, estas impurezas pueden eliminarse mediante lavados, el producto será un

extracto lavado y un refinado, este extracto se pondrá en contacto con una segunda solución acuosa para extraer el componente deseado (Mohdaly & Smetanska, 2011).

### **3.14.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas**

#### **(LC/MS)**

Es una técnica donde se produce la separación física de los compuestos blanco o analitos seguida de su detección en base a su masa molecular además de ser altamente sensible, selectiva y precisa para detectar cantidades minúsculas desde microorganismos o incluso nanogramos de diferentes analitos por ejemplo metabolitos de fármacos, pesticidas y sustancias adulterantes en alimentos incluso extractos de productos naturales. Dentro de las ventajas más resaltantes aplicadas destacan:

- Proporciona información robusta altamente selectiva y sensible para detectar moléculas de un peso molecular exacto de una amplia gama de muestras.
- Tiene la capacidad de discriminar diferentes solutos en bajas concentraciones (incluso aquellas que están expresadas en parte por millón ppm) en una mezcla.
- Asimismo, el LC-MS ofrece un alta selectividad, masa específica y especificidad en comparación con otras técnicas de cromatografía (Büyükköroğlu *et al* 2018).

### **3.14.3 Colorante Rojo de Congo**

El rojo de Congo es un colorante textil que es empleado para identificar la producción de fibras amiloides. Y eventualmente su uso trascendió en el desarrollo de aplicaciones microbiológicas y con notoriedad en la identificación de cepas que producen apéndices amiloides llamados curli y que sobre expresan polisacáridos en la matriz de la biopelícula. El segundo mensajero diguanilato cíclico (c-di-GMP) regula la producción de polisacáridos de matriz de biopelícula, por lo tanto, la tinción de muestras con rojo Congo se puede utilizar como un intermediario de la producción elevada de c-di-GMP en bacterias. Este colorante natural permite la identificación de cepas que producen un alto c-di-GMP de una manera económica, cuantitativa y de alto rendimiento. La aplicación directa de este colorante es como complemento del agar generando el agar rojo de congo. Esta prueba es referida como una detección previa de cepas con capacidad de formar biopelículas (Jones & Wozniak 2017).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las comunidades microbianas adheridas a una superficie se pueden encontrar en ambientes hospitalarios, industriales y naturales convirtiéndose en un problema crítico en sector salud, debido a que se pueden desarrollar en dispositivos médicos aumentando el grado de infecciones en los pacientes y resistencia a los antibióticos. Asimismo, las superficies en las plantas de procesamiento de alimentos se convierten en un ambiente ideal para el desarrollo de biopelículas bacterianas debido a una vasta cantidad de nutrientes convirtiéndose en fuente de contaminación cruzada durante el procesamiento convirtiéndose en un factor crítico que desnuda la calidad y seguridad alimentaria afectando la salud de los consumidores y operarios.

*Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos más frecuentes que puede crecer y proliferar en estos ambientes y principalmente en superficies de acero inoxidable presentes en instalaciones de procesamiento de alimentos y atención médica, asimismo es responsable de la persistencia de enfermedades que pueden llegar a ser crónicas como consecuencia de su rápida adaptabilidad y fácil reproducibilidad en distintos dispositivos médicos (válvulas cardíacas, catéteres, prótesis , etc.) afectando la duración de hospitalización o aumentando el riesgo quirúrgico y como resultado de la prevalencia de estas y otras enfermedades estafilocócicas han llevado a un significativo aumento en los gastos relacionados con infecciones causadas por *S. aureus* durante la última década con costos anuales estimados a los 450 millones de dólares (Moormeier, D. E., & Bayles, K. W 2017).

Asimismo, el continuo desarrollo de metodologías que involucran la obtención de nuevos compuestos con actividad principalmente antimicrobiana no contempla en su totalidad la diversidad botánica especialmente en países con una gran diversidad botánica como el Perú además los estudios realizados se centran principalmente en obtención de estos compuestos en base a extractos brutos empleando diferentes solventes los cuales no reflejan todo el potencial terapéutico que se podría obtener de ellas. Por lo que es necesario trabajar con el residuo y fracciones a partir de estos extractos (Abebe, 2020). Es así que el presente estudio pretende desarrollar una biopelícula de *S. aureus* sobre una superficie de acero inoxidable y demostrar que el residuo butanólico y la fracción butanólica de *C. spinosa* tienen efecto inhibitorio.

## JUSTIFICACIÓN

La elección de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus metilina* resistente (MRSA) ATCC 43300 en este estudio se fundamenta en su relevancia clínica y en su capacidad para formar biopelículas, un fenómeno crítico en infecciones nosocomiales. *S. aureus* es un patógeno comúnmente implicado en diversas infecciones, y la cepa MRSA representa un desafío significativo debido a su resistencia a múltiples antibióticos (Klevens *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2020). La inclusión de ambas cepas permite evaluar la eficacia de los extractos de *Caesalpinia spinosa* en contextos de infecciones tanto comunes como complicadas por resistencia. Además, las cepas *S. aureus* ATCC son reconocidas como controles estándar en investigaciones microbiológicas, garantizando la reproducibilidad de los resultados y facilitando la comparación con estudios previos (Lorian, 2005; Duran *et al.*, 2017). Tanto *S. aureus* ATCC 25923 como *S. aureus* MRSA ATCC 43300 son conocidos por su capacidad para formar biopelículas en superficies inertes, como el acero inoxidable, lo que contribuye a su persistencia en entornos hospitalarios y alimentarios (O'Toole *et al.*, 2000; Costerton *et al.*, 1999). Asimismo, la elección de una cepa sensible y una resistente permite investigar el potencial de los extractos para inhibir la formación de biopelículas en cepas con diferentes perfiles de resistencia, proporcionando así una evaluación más completa de su eficacia antimicrobiana (Jett *et al.*, 1994; Parvez *et al.*, 2019). Estudios han demostrado que estos patógenos pueden permanecer viables en superficies de acero inoxidable, incluso en condiciones secas, y que el uso continuo de sanitizantes puede provocar ralladuras en dichos materiales, aumentando su

susceptibilidad a la colonización (Vlková *et al.*, 2008; Dutra *et al.*, 2018). En la industria láctea, las biopelículas de *S. aureus* pueden formarse en diversas superficies, incluyendo mesas de trabajo y equipos, afectando negativamente la calidad microbiológica del producto final. Además, dispositivos médicos como prótesis articulares y catéteres, que suelen estar fabricados de acero inoxidable, son propensos a ser colonizados por *S. aureus* bajo condiciones favorables (Pietrocola *et al.*, 2022). Las biopelículas confieren una protección significativa a las células bacterianas, lo que disminuye la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013), generando así la necesidad de desarrollar nuevas estrategias y agentes anti-biopelículas que minimicen el riesgo de contaminación en los alimentos (Ait Ouali *et al.*, 2014; Meesilp y Mesil, 2018). Por ello, es esencial realizar investigaciones adicionales que evalúen la formación de biopelículas en materiales comúnmente utilizados en la industria láctea, como el acero inoxidable, y el comportamiento de estos microorganismos frente a extractos de plantas como *Caesalpinia spinosa* (tara).

*Caesalpinia spinosa* es una especie de gran valor en el Perú, tanto por su producción como por su uso medicinal tradicional en el tratamiento de diversas afecciones. Entre 2008 y 2018, se exportaron 219,062 toneladas de tara, lo que representó un ingreso significativo al mercado (MINAGRI, 2019). Esta planta contiene compuestos bioactivos como taninos y aceites esenciales, que han mostrado actividad antibacteriana y antioxidante contra patógenos relevantes como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y otros, conocidos por su capacidad formadora de biopelículas y su importancia nosocomial (Castro *et al.*, 2016;

Pareja *et al.*, 2020; Millones, 2019; König *et al.*, 2018). La extracción de metabolitos secundarios de esta especie no solo incrementa la producción, sino que también reduce costos durante el proceso de purificación, debido a la cantidad de biomasa obtenida. Además, estos compuestos presentan propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas y en la eliminación de biopelículas. Por lo tanto, la elección del solvente adecuado es crucial; el butanol y el etanol se proponen como catalizadores efectivos. El butanol, al ser menos soluble en agua, facilita la obtención de productos en menos pasos, mientras que el etanol, siendo más polar, permite una mayor retención de compuestos activos y es económicamente viable (König *et al.*, 2018).

Así, con base en los resultados previos sobre la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios extraídos de *C. spinosa*, se propone el uso de estos compuestos bioactivos para la eliminación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* desarrolladas en soportes de acero inoxidable, contribuyendo a una mejor comprensión y control de este fenómeno en la industria alimentaria y médica.

## 4. HIPÓTESIS

### **6.1 Hipótesis Nula**

El residuo butanólico y la fracción butanólica de *Caesalpinia spinosa* no tienen un efecto significativo en la reducción de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* en acero inoxidable.

### **6.2 Hipótesis alternativa**

El residuo butanólico y la fracción butanólica de *Caesalpinia spinosa* tienen un efecto significativo en la reducción de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* en acero inoxidable

## 5. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general:

- Evaluar la actividad del residuo butanólico y la fracción butanólica obtenidas de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre biopelículas de *Staphylococcus aureus* en acero inoxidable tipo 304.

### 7.2 Objetivos específicos:

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la fracción butanólica y el residuo butanólico frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) ATCC 43300.
- Comparar la adhesión de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) ATCC 43300 en discos de acero inoxidable tipo 304 mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (CFU).
- Comparar la eficacia del residuo butanólico y la fracción butanólica en la reducción de biopelículas de *Staphylococcus aureus* en discos de acero inoxidable a diferentes intervalos de tiempo, como 3, 6, 9 y 12 días.
- Determinar los metabolitos secundarios obtenidos mediante cromatografía líquida acoplada a masas.

## 6. VARIABLES DE ESTUDIO

Tabla 1. Descripción de variable

<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>	<b>Tipo De variable</b>	<b>Escala</b>	<b>Valor</b>
<b>Extracto experimental</b>	Compuestos activos aislados con actividad antibiopelícula	Cualitativo/ Independiente	Nominal	Extracto etanólico y la fracción butanólica de <i>Caelsapinia spinosa</i> ( ug/ml)
<b>Microorganismo</b>	Bacteria de la cual se evaluará el efecto antibiopelícula	Cualitativo/ Independiente	Nominal	<i>Staphylococcus. aureus</i> ATCC 25923 <i>Staphylococcus. aureus</i> MRSA 43300
<b>Periodo de desarrollo de biopelícula</b>	crecimiento de la biopelícula sobre discos de acero	Cuantitativo /independiente	De razón	3d,6d,9d,12d
<b>Efecto antibiopelícula</b>	Capacidad de una sustancia de eliminar la biopelícula de un soporte de acero inoxidable	Cuantitativo/ Dependiente	De razón	<i>UFC/ml</i>

## MATERIALES Y METODOLOGIA

### 9.1 Diseño experimental

- El presente trabajo es definido de tipo Experimental secuencial, *in vitro*, analítico y comparativo.

### 9.2 Definición de la muestra

Son 240 discos de acero tipo 304 impregnados con *S. aureus* ATCC25923 y 240 discos con *S. aureus* Meticilina Resistente ATCC 43300.

### 9.3 Tamaño de la muestra

Para establecer un tamaño poblacional adecuado se empleó la siguiente fórmula para datos continuos.

$$n = \frac{(Z \cdot \sigma)^2}{E^2}$$

Donde:

Z = valor crítico para el nivel de confianza (1.96 para 95%).

$\sigma$  = desviación estándar estimada (para datos continuos).

E = margen de error

$$n = \frac{1.96x2^2}{0.05^2}$$

$$n = 61.47$$

Por lo tanto, se necesita aproximadamente 62 muestras por grupo evaluado. Por lo tanto, se considerarán 60 discos de acero inoxidable tipo 304

- = Nivel de Confianza (Z): Grado de certeza que deseas tener de que tu muestra representa a la población. Un nivel de confianza del 95% corresponde a un valor crítico z de aproximadamente 1.96.
- = Margen de Error (Precisión): Cantidad de error aceptable en los resultados. Se tomo un margen de error de  $\pm 0.05$  ya que es bastante amplio y asegura que el tamaño de muestra calculado será suficiente incluso si la variabilidad real es alta
- = La desviación estándar ( $\sigma$ ): Se define como una medida de la variabilidad o dispersión de los datos en torno a la media. Se tomará una desviación estándar de 2 debido a que se considera conservadora y esta estimación conservadora ayuda a evitar calcular un tamaño pequeño de la población, asegurando que el tamaño de muestra sea adecuado incluso si la variabilidad real en los datos es más alta.

#### **9.4 Lugar de Ejecución**

Se desarrolló en el Laboratorio de Bacteriología que es parte de los laboratorios de Investigación y desarrollo “Abraham Vaisberg Wolach” (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía e ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

#### **9.5 Extracto vegetal**

La Fracción 50% acetonitrilo del residuo butanolico y el residuo butanolico fueron proporcionados por el proyecto de investigación financiado por FONDECYT “Nuevas tecnologías para suministros de fármacos a base de productos naturales peruanos para el control de la salud bucal” del concurso ciencia activa 2016-163. Financiado por Fondecyt – Lima -Perú. Anexo 16

La especie vegetal de *C. spinosa* proviene del departamento de Ayacucho la cual fue recepcionada y trabajada en el “Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos” de la Universidad Nacional de Ingeniería” (LIBIPMET) donde se realizó el proceso de extracción y obtención de los extractos residuales.

Se trabajó a partir de vainas secas de *Caesalpinia spinosa*, por su alto contenido en taninos, previamente se separarán las semillas de la vaina. Para obtener el peso real de vaina se obtendrá mediante sustracción entre el peso total de la vaina y la semilla.

Luego las vainas se secaron en una estufa a 40 °C durante 48 horas, después de este intervalo la muestra se pulverizo en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. A esta muestra pulverizada se le agrego 100 mL de etanol de 96°

depositándose en un frasco ámbar dejando reposar durante 1 semana (el procedimiento se repetirá 4 veces), después del tiempo de maceración se filtró y se concentró en una campana de extracción. Con este procedimiento se obtuvo el extracto etanólico o denominado también extracto bruto orgánico (EBO).

### **9.5.1 Partición líquido-líquido del extracto etanólico o extracto bruto orgánico**

En el proceso realizado con el extracto bruto orgánico (EBO) o extracto etanólico de la tara, este se disolvió en una mezcla de metanol (MeOH) y agua en proporción 4:1 (v/v), utilizando aproximadamente 40 mL de esta mezcla para conseguir una completa solubilización. Para la partición líquido-líquido, se utilizó una columna de vidrio con llave de teflón, de 3.5 cm de diámetro interno y 100 cm de largo, que fue montada en un soporte universal. Tras armar la columna, se añadieron 40 mL de agua ultrapura, seguido del extracto disuelto, y posteriormente se incorporaron lentamente alrededor de 250 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), observándose la formación de dos fases: la fase superior acuosa y la fase inferior orgánica. Se dejó reposar durante 3 horas hasta que ambas fases se tornaran translúcidas, momento en el que se abrió la llave de la columna para recolectar la fase orgánica en un vaso de 500 mL, mientras que la fase acuosa permaneció en la columna. A continuación, se añadió nuevamente 200 mL de  $\text{CHCl}_3$  y se repitió el procedimiento anterior, juntando las fases clorofórmicas en el mismo recipiente. La fase acuosa se recuperó en un vaso de 100 mL y ambas fases fueron llevadas a la campana de extracción para evaporar el cloroformo. En la misma columna, se añadieron 200 mL de n-butanol (BuOH) y se vertió lentamente la fase acuosa

previamente obtenida, observando nuevamente la formación de dos fases: la fase acuosa inferior y la fase butanólica superior. Se dejó reposar durante 3 horas hasta que ambas fases quedaron completamente translúcidas, y luego se separaron y recolectaron en vasos de 500 mL para la fase butanólica y de 100 mL para la fase acuosa. La fase butanólica fue llevada de inmediato a la campana de extracción para evaporar el BuOH, repitiéndose el procedimiento una vez más. Finalmente, la fase acuosa, tras evaporar las trazas de BuOH, fue congelada a -70 °C durante 24 horas en una ultracongeladora y luego liofilizada en un liofilizador LABCONCO 2.5L a una presión de 0.018 mbar y -54 °C. Este proceso resultó en la obtención de tres residuos: el residuo clorofórmico (RCHCl<sub>3</sub>), el residuo butanólico (RBUT) y el residuo acuoso (RH<sub>2</sub>O).

### **9.5.2 Fraccionamiento de los residuos**

El RBUT fue sometido a fraccionamiento, por cromatografía en columna flash, donde fue utilizado como fase estacionaria sílica gel fase reversa C-18 y como fase móvil la mezcla de acetonitrilo (ACN) y agua (al 0,1% TFA) al 10%, ACN: H<sub>2</sub>O 50% y MeOH 100%. Los solventes orgánicos fueron evaporados en una campana de extracción y la parte acuosa fue congelado a -70 °C por 24 horas (en ultracongeladora) y sometido a liofilización, obteniéndose así la: fracción 50% acetonitrilo del residuo butanólico (F50%ACN R<sub>BuOH</sub>).

### **9.5.3 Análisis de los extractos residuales empleando la técnica analítica de cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS)**

En un vial limpio y seco se pesó 1 mg de la muestra. A cada una de ellas se adicionó 2 mL de la solución de extracción y las mezclas fueron sometidas a agitación en equipo de ultrasonido (150W, 0.7 A) durante 20 minutos; las muestras fueron extraídas con una mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1). Las soluciones resultantes fueron filtradas hacia viales de HPLC utilizando un filtro de PVDF (0,45 µm de diámetro de poro). Las soluciones fueron guardadas a -20 °C hasta su análisis mediante LC-MS.

El Residuo butanólico, Fracción (10% de Acetonitrilo del residuo butanólico) y Fracción butanólica (50% de Acetonitrilo del residuo butanólico) de la Tara con la intención de identificar los componentes que están presentes en cada una de las muestras, estas fueron analizadas por un sistema UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Alemania), equipado con un detector de matriz de fotodiodos (PDA), un horno de columna y un muestreador automático Luna® Omega C 18 (150 x 2,1 mm, 1,6 µm) (Phenomenex, EE.UU.) que fue mantenida a 40°C. El volumen de inyección fue de 4 µL y el caudal fue de 0,25 ml/min-1. La mezcla de compuestos se separó usando un gradiente de elución compuesta por: ácido fórmico al 0,1% (A) y acetonitrilo al 1% de ácido fórmico (B) como fase móvil a un caudal constante (0,25 ml min<sup>-1</sup>) de acuerdo con el siguiente programa de elución: 5% B (0,0 - 5,0 min); 5 – 100 % B (5,0 – 35 min) y 100 – 5 % B (35 – 40 min).

Los datos espectrométricos se registraron en un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific, Alemania) equipado con una sonda de electropulverización

(HESI). El instrumento se operó en modo positivo y negativo usando los siguientes parámetros: los caudales de gas envolvente y gas auxiliar fueron 48 y 2 unidades, respectivamente; el voltaje de pulverización fue de  $\pm 2,4$  kV; la temperatura capilar fue de  $260^{\circ}\text{C}$  y el nivel de RF de la lente S fue de 100. Se adquirieron espectros de masas de barrido completo en el rango de 120-1500 m/z con una resolución de 35000 (FWHM a 400 m/z). La disociación inducida por colisión (HCD) de alta energía se fijó en 30 y 35 e (Spínola *et al*, 2014).

## 9.6 Cepa bacteriana

Se empleó las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 Meticilina resistente (MRSA) las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología de los laboratorios de investigación y desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

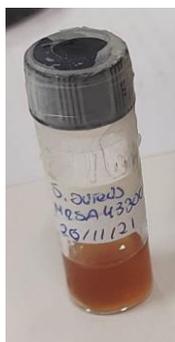


Figura 3: a) Cepa criopersevada de *S. aureus* MRSA ATCC 43300. b) Stick de *S. aureus* ATCC 25923

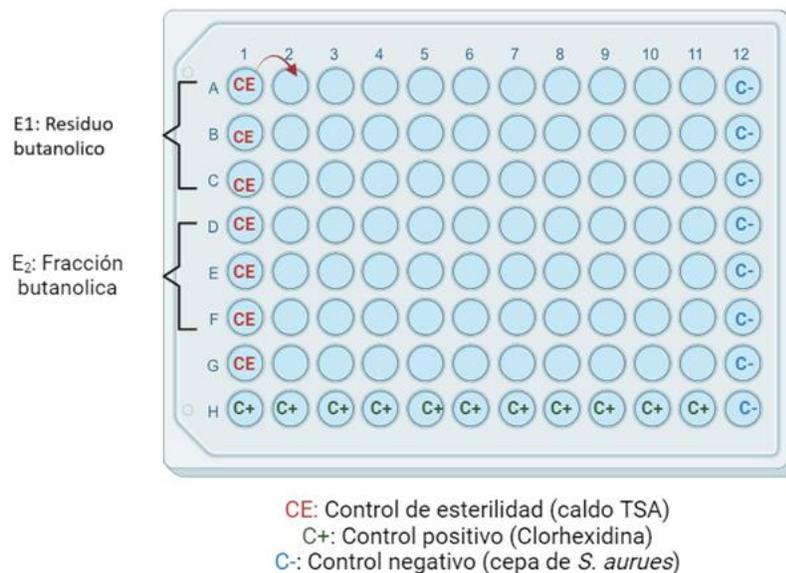
### **9.7 Capacidad de formación de biopelículas**

En este ensayo se determinó la capacidad de formar biopelículas mediante el colorante anicónico rojo de Congo. El medio rojo de Congo (ARG) está compuesto por 36 g / L de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI), 5 g/L de sacarosa, 15 g/L de agar y 0,8 g/L de rojo Congo. El colorante rojo Congo se preparó como solución acuosa y se esterilizó en la autoclave a 121°C durante 15 minutos. Las placas con ARG se incubaron aeróbicamente durante 24 horas a 37°C para obtener colonias bacterianas individuales. La lectura de los resultados se interpretó como positiva el crecimiento de colonias negras y negativa aquellas con una tonalidad roja-rosada (Hou, W *et al* 2012).

### **9.8 Establecimiento de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Se disolvieron 2 gramos de muestras liofilizadas de residuo butanólico y fracción butanólica de vainas de tara en 40 mL de DMSO, alcanzando una concentración final de 50 mg/mL, elegida para optimizar la solubilidad y estabilidad de los compuestos bioactivos presentes. Las soluciones se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar una completa disolución. La dosis mínima capaz de inhibir el crecimiento bacteriano se determinó mediante microdilución en caldo en placas de 96 pozos. Cada placa recibió 140 µL de medio de cultivo tripticasa de soja (TSB), que contenía cepas bacterianas calibradas a una densidad óptica (DO) de 0.01 a 520 nm, equivalente a 0.5 en la escala de McFarland. En las tres primeras filas, se añadieron 140 µL de los extractos evaluados, realizando diluciones seriadas hasta el pozo 11A.

Luego, se incorporaron 20  $\mu$ L del cultivo bacteriano en cada pozo. Se usó clorhexidina al 0.12% como control positivo y el medio TSB como control negativo. Las placas se envolvieron en Parafilm y se colocaron en una cámara húmeda para evitar la deshidratación, incubándose durante 24 horas a 37 °C bajo condiciones aeróbicas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la menor concentración de los extractos de *Caesalpinia spinosa* que suprimió el crecimiento microbiano, con ensayos realizados por triplicado y resultados expresados como valores medios  $\pm$  desviación estándar (Frassinetti *et al.*, 2020; Calla-Poma *et al.*, 2020).



**Figura 4.** Disposición del residuo butanolico y la fracción butanolica en los pocillos de ELISA al establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI)

### **9.9 Capacidad de adhesión a superficies de acero**

En placas de poliestireno de 24 pozos (Merk) se colocaron los discos de acero inoxidable N.º 304 de dimensiones 10 mm x3 mm de espesor, los cuáles fueron tratados con agua destilada y alcohol 70%, luego fueron remojados en acetona durante 10 minutos para eliminar la grasa, posteriormente se lavaron con agua destilada, alcohol al 70% y se enjuagaron con agua desionizada finalmente fueron autoclavados durante 15 minutos a 121°C. Se evaluó la adhesión según lo descrito por Mahyudin *et al* 2018, con modificaciones. Se preparó una alícuota de 50 µl de los inóculos bacterianos con 100 µl de caldo tripticasa soya (TSB; Merck, Darmstadt, Alemania) suplementado con 1% de glucosa para obtener una concentración final  $10^5$  UFC/ml en la escala Mc Farland. Luego con ayuda de una micropipeta se tomó 20 µl de la mezcla y se colocó en el centro del disco de acero inoxidable y se incubó a 37°C durante 72 h. Al completar el proceso de incubación, los discos se enjuagaron en una solución tampón de PBS (pH 7,4) durante 15 segundos con la finalidad que los discos estuvieran libres de células no adheridas. Posteriormente las células adheridas fueron colectadas mediante un hisopo estéril, luego estos se sumergieron en agua peptonada estéril (APS) y sometidos a agitación en un vortex (Eurotech, 2800 rpm) durante 30 segundos. Las células en solución fueron sometidas a diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) empleando APS. Finalmente, de cada dilución se transfirió 100 µl en placas con agar Baird Parker y se diseminó por toda la placa empleando un asa de Drigalski y se incubó a 36°C durante 24 h, por lo tanto, el número de células se expresaron como log UFC/cm<sup>2</sup>. Para evaluar la adhesión de las células en los discos de acero, se seleccionarán aquellas que

presenten un conteo entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, ya que este rango indica la formación de biopelículas. Un recuento bacteriano por debajo de este rango sugiere únicamente el proceso de adhesión. (Wirtanen, Ahola y Mattila-Sandholm, 1995; Zotolla y Sasahara, 1994, Mahyudin *et al* 2018).

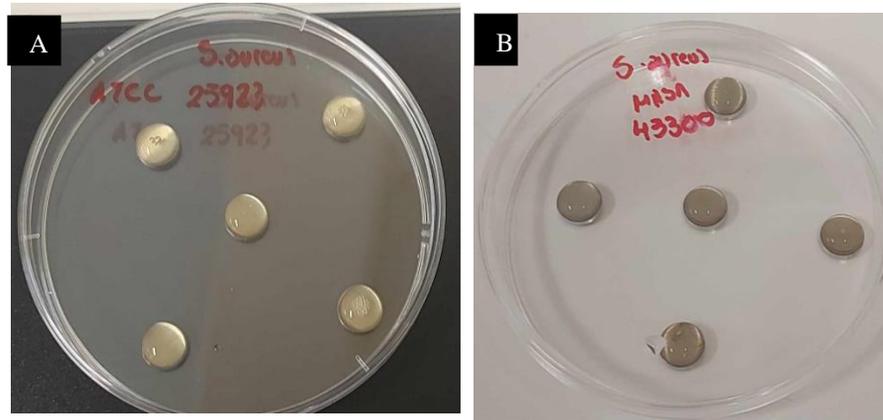


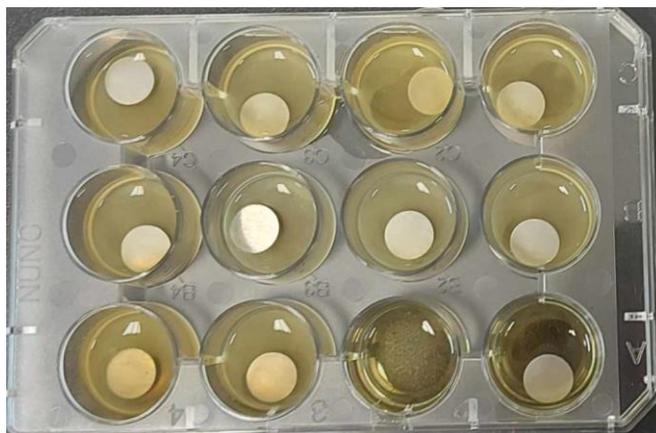
Figura 5. Capacidad de adherencia en discos de acero inoxidable. A) discos inoculados con la cepa de *S. aureus* 25923. B) Discos inoculados con *S. aureus* MRSA 43300

## 9.10 Desarrollo de biopelículas de *S. aureus* en soportes de acero inoxidable

### 9.10.1 Desarrollo de biopelículas sobre discos de acero inoxidable

Sé preparo una suspensión bacteriana de cada una de las cepas de *S. aureus* en dos tubos conteniendo 10 mL de caldo tripticasa soya (TSB), la cual se obtuvo al inocular 2 colonias de un cultivo previo en agar tripticasa soya TSA, esta suspensión se incubo a 37 °C durante 24 horas. Después de ese período, se midió la densidad óptica (DO) igual a 0.01 mediante un espectrofotómetro a 520 nm en caldo tripticasa de soja (TSB),

siendo equivalente a  $10^6$  UFC. Los discos de acero inoxidable fueron sumergidos en placas estériles de 12 pocillos que contenían 1 ml de caldo TSB suplementado con 1 % de glucosa y con 1ml de suspensión de células de *S. aureus* (aproximadamente  $10^6$  log UFC / ml). Las placas de 12 pocillos se sellaron con parafilm y luego se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 días, 6 días, 9 días y 12 días respectivamente. Las biopelículas formadas se retiraron de los discos de acero inoxidable, que habían estado incubándose en placas de 12 pozos. Al finalizar el periodo de incubación, se lavaron dos veces con solución salina estéril para eliminar las células no adheridas. Durante el proceso, el medio de cultivo fue renovado cada 24 horas. (Moreno *et al* 2020).



**Figura 6.** Formación de biopelículas de *S. aureus* sobre discos de acero inoxidable

### **9.11 Evaluación de la eficacia de la fracción butanólica y el residuo butanólico contra matrices de biopelículas de *S. aureus* en acero inoxidable.**

Cada disco de acero inoxidable en el que se desarrolló biopelículas fue transferido a tubos falcon de 10 mL los cuales fueron colocados en un vortex a 2800 rpm para eliminar las células no adheridas, luego cada disco fue colocado en una placa petri y en la cual se agregó 1ml del residuo butanólico y la fracción butanólica y se mantuvieron en reposo durante 60 minutos. Después del periodo de exposición los discos se lavaron dos veces con agua peptonada bufferada (APB) luego las piezas de acero inoxidable fueron transferidas a tubos estériles que contenían perlas de vidrio de dimensiones (1,00 mm - 1,05 mm), para lograr el desprendimiento total de las células se empleó un vortex en intervalos de 30 segundos por muestra. Luego de la exposición los discos se sumergieron en tubos que contenían 2ml PBS y se tomó 1ml y se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  y enseguida se dispuso 1ml de cada tubo en agar plate count (PC), se incubaron a 37°C por 24 horas y luego se realizó el conteo de colonias que fueron desprendidas de los discos por agitación constante la cual se expresó como UFC/disco, el medio de cultivo TSB se utilizó como control. Según la metodología de Burget *et al* 2013 se seleccionó aquella dilución donde se desarrolle un rango entre 30-300 colonias, luego se calculó la media de la dilución seleccionada y se transformaron a unidades de logaritmo empleando la siguiente ecuación (Rodriguez *et al* 2018; Burget *et al* 2013).

$$\text{Reduccion logaritmica} = \text{Log}[N_0] - \text{Log} [N]$$

Donde:

$N_0$ : es el conteo de UFC/disco, previo al tratamiento (control).

$N$ : es el conteo de UFC/disco, después del tratamiento con las fracciones

### 9.12 Consideraciones éticas

La ejecución de la presente investigación se reportó como un estudio *in vitro* empleando cepas patrón ATCC de *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection) como formadoras de biopelículas y al ser enfrentadas al residuo butanólico y la fracción butanólica de las vainas de *Caesalpinia spinosa*. Este proyecto obtuvo la aprobación del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de inscripción 208886, Constancia N° CAR-DUARI-O-109-24)

### **9.13. Análisis estadísticos**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar de los datos obtenidos en cada ensayo. Se realizó un análisis estadístico para determinar las diferencias ( $p \leq 0.05$ ) mediante ANOVA de medias repetidas de 3 vías para determinar si había diferencias significativas entre la cepa, los extractos residuales y el periodo de desarrollo de la biopelícula, seguido de la prueba de Tukey. Para este análisis, se utilizó el software informático Stata 17.

## 7. RESULTADOS

En el residuo butanólico (RBUT) del extracto etanólico de *Caeselpina spinosa* se identificaron 19 compuestos, dentro de los cuales el ácido di-O-galoilquínico, dos isómeros del ácido tri-O-galoilquínico, también fueron identificados el ácido galoilquínico, el etil éster del ácido galoilquínico, el ácido Tetra-O-galoilquínico, el etil éster del ácido di-O-galoilquínico, el etil éster del ácido Tri-O-galoilquínico, el etil éster del ácido Tetra-O-galloylquinico, ácido elágico y ácido quínico.

En la fracción obtenido con 50% de acetonitrilo del residuo butanólico del extracto etanólico (50% ACN del RBUT del EtOH) fueron identificados 10 compuestos, de los cuales 2 son isómeros del ácido Tetra-O-galoilquínico, 2 isómeros del ácido Tri-O-galoilquínico etil éster y dos isómeros del etil éster del ácido Tetra-O-galloylquinico, también fueron identificados el isómero del ácido tri-O-galoilquínico, isómero del ácido Tetra-O-galoilquínico, Isómero del etil éster del ácido di-O-galoilquínico, Isómero del ácido Tetra-O-galoilquínico, Isómero del etil éster del ácido Tri-O-galoil-(digaloil)-quínico y el ácido quínico.

**Tabla 2.** Compuestos detectados del residuo butanólico

<b>Tr (min)</b>	<b>[M-H]</b>	<b>Nombre</b>	<b>Referencia Bibliográfica</b>
<b>2.27</b>	343.0672	Ácido galoilquínico	Clifford <i>et al</i> 2007
	495.0784	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>et al</i> 2006
<b>2.46</b>	495.0782	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>et al</i> 2006
<b>3.08</b>	495.0783	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>et al</i> 2006
<b>3.24</b>	495.0784	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>et al</i> 2006
<b>3.44</b>	495.0785	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>Et al</i> 2006
<b>3.93</b>	495.0785	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>et al</i> 2006
<b>4.81</b>	495.0784	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>et al</i> 2006
<b>5.22</b>	495.0783	Isómero del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>et al</i> 2006
<b>6.76</b>	371.0984	Etil éster del ácido galoilquínico	Sandoval 2016
<b>8.42</b>	647.0894	Isómero del ácido tri- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>Et al</i> 2006
<b>10.62</b>	647.0891	Isómero del ácido tri- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo <i>Et al</i> 2006
<b>11.86</b>	799.1003	Ácido Tetra- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
<b>12.45</b>	523.1090	Etil éster del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
<b>14.02</b>	675.1202	Etil éster del ácido Tri- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
<b>15.03</b>	827.1312	Etil éster del ácido Tetra- <i>O</i> -galloylquínico	Sandoval 2016
<b>18.89</b>	300.9988	Ácido elágico	Chernetsova <i>et al</i> 2012

**Tabla 3.** Compuestos detectados en la fracción 50%ACN del RBUT del EtOH de tara

<b>Tr (min)</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	<b>Nombre</b>	<b>Referencia Bibliográfica</b>
9.30	647.0898	Isómero del ácido tri- <i>O</i> -galoilquínico	Kondo Et al 2006
11.24	799.1002	Isómero del ácido Tetra- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
12.46	523.1094	Isómero del etil éster del ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
	799.1001	Isómero del ácido Tetra- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
13.86	675.1204	Isómero del etil éster del ácido Tri- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
14.01	675.1202	Isómero del etil éster del ácido Tri- <i>O</i> -galoilquínico	Sandoval 2016
14.86	827.1315	Isómero del etil éster del ácido Tetra- <i>O</i> -galloylquínico	Sandoval 2016
15.18	827.1312	Isómero del etil éster del ácido Tetra- <i>O</i> -galloylquínico	Sandoval 2016
15.66	979.1426	Isómero del etil éster del ácido Tri- <i>O</i> -galoil-(digaloil)-quínico	Sandoval 2016
22.71	191.1071	Ácido quínico	

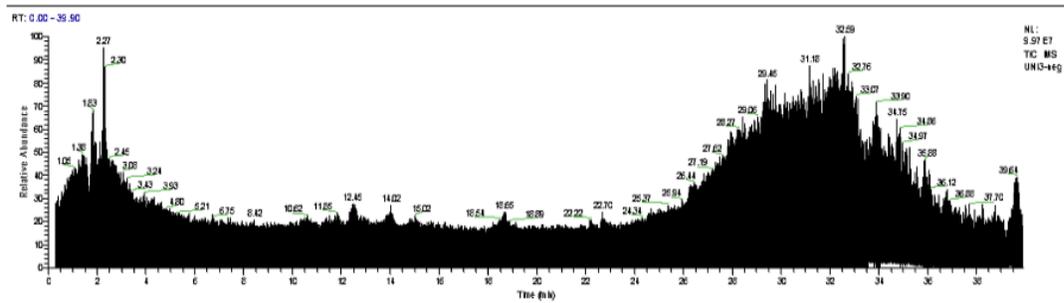


Figura 7.- Cromatogramas en el modo negativo del Residuo butanólico (RBUT)

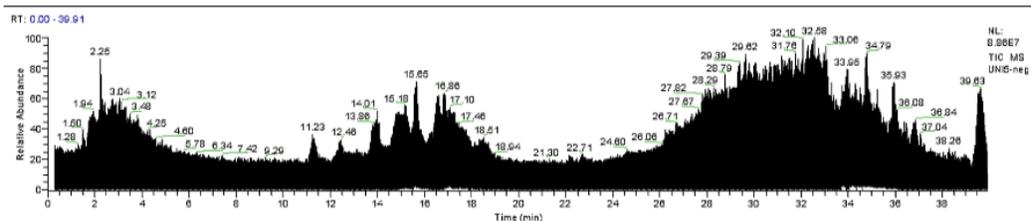
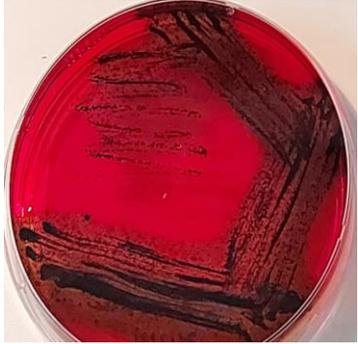


Figura 8. Cromatogramas en el modo negativo de la fracción obtenida con 50% de acetonitrilo del residuo butanólico del extracto etanólico (50% ACN del RBUT del EtOH) de la tara

La capacidad de formación de biopelículas en las cepas evaluadas de *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* Meticilina Resistente ATCC 43300 se evidenció por el crecimiento y desarrollo de colonias de color negro por el estudio cualitativo con la coloración rojo de Congo (Figura 9,10).

	
<p>Figura 9. Coloración negra de las colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en medio rojo de congo</p>	<p>Figura 10. Coloración negra de las colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> Metilicina Resistente ATCC 43300 en medio rojo de congo</p>

La concentración mínima inhibitoria (CIM) para el residuo butanólico y la fracción butanólica por el método de microdilución enfrentada a las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA ATCC 43300 fue determinada en 50 mg/ml.

La capacidad de adherencia de las cepas de *S. aureus* en los discos de acero inoxidable fue mayor a  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> después de un periodo de 72 horas de incubación. Donde la cepa *S. aureus* ATCC 25923 mostro significativamente una mayor adherencia de  $7.72 \pm 0.06$  en contraste con la cepa clínica que solo mostro solo  $7.44 \pm 0.16$  expresada en UFC/cm<sup>2</sup> (Figura 11).

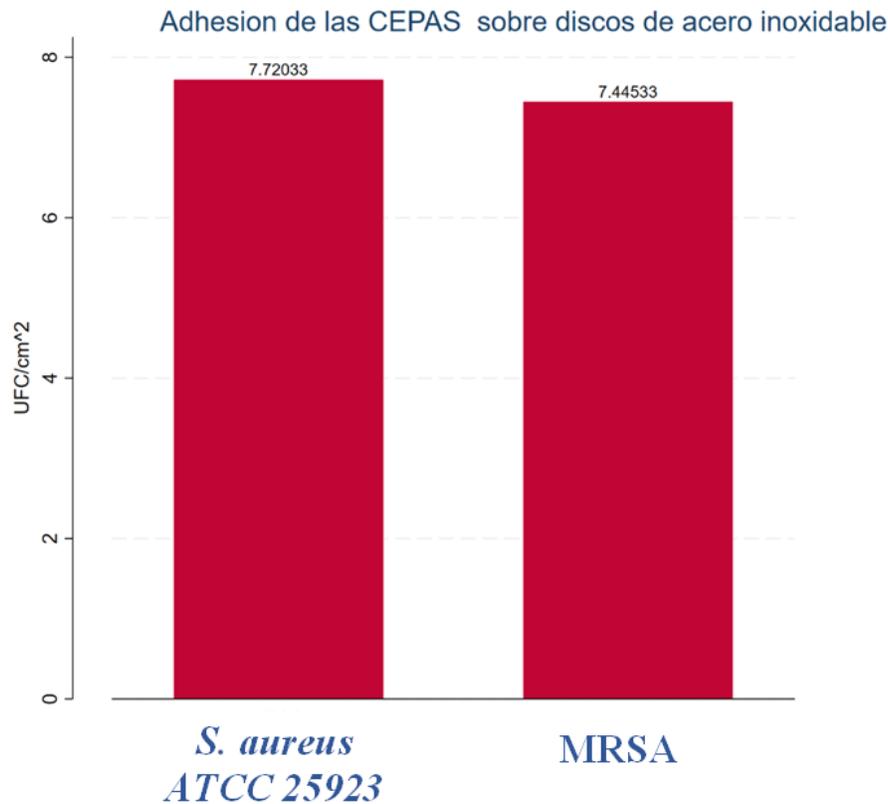


Figura 11. Adherencia de las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA ATCC 43300 sobre discos de acero inoxidable después de 72 horas de incubación.

La distribución de los datos presenta una asimetría negativa en ambos grupos evaluados, en donde la mayor concentración se evidencia por encima de la media asimismo se confirmó que la mayor adhesión se observó en el grupo *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 12).

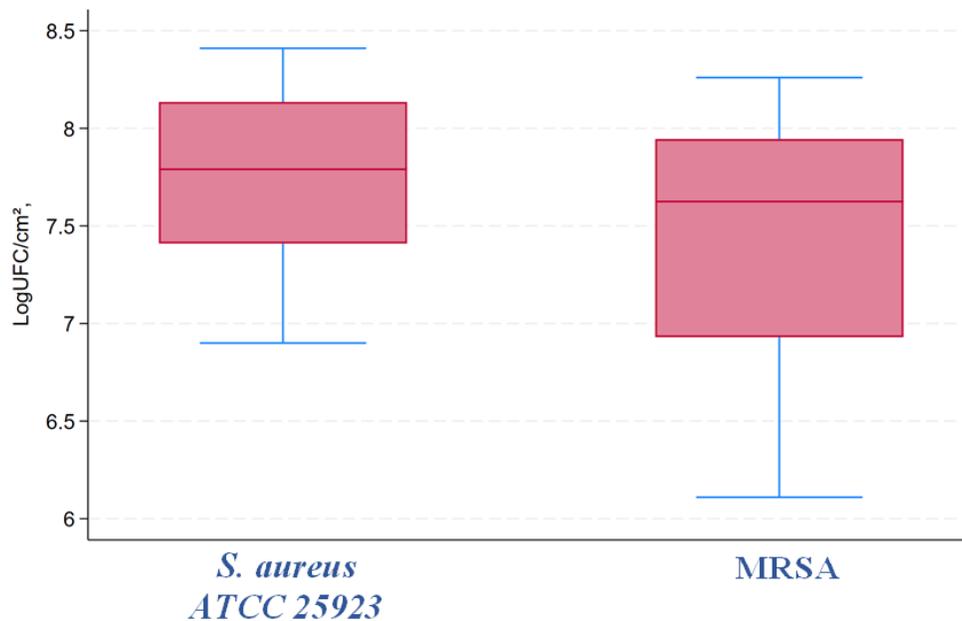


Figura 12. Media de las células adheridas a superficies de acero entre dos cepas de *S. aureus* *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA ATCC 43300

La distribución de los datos varía entre los grupos de cepas en relación al tratamiento empleado, por lo tanto, se describe que en el grupo ATCC los datos presentan una o mayor dispersión y concentración de datos derivando en una asimetría negativa, sin embargo, los datos distribuidos en el grupo MRSA presenta una asimetría positiva al ser tratados con el FBUT y una simetría al ser tratados con el RBUT. Asimismo, solo el grupo *S. aureus* ATCC 25923 que fue tratado con el RBUT mostro valores atípicos o outliers (Figura 13).

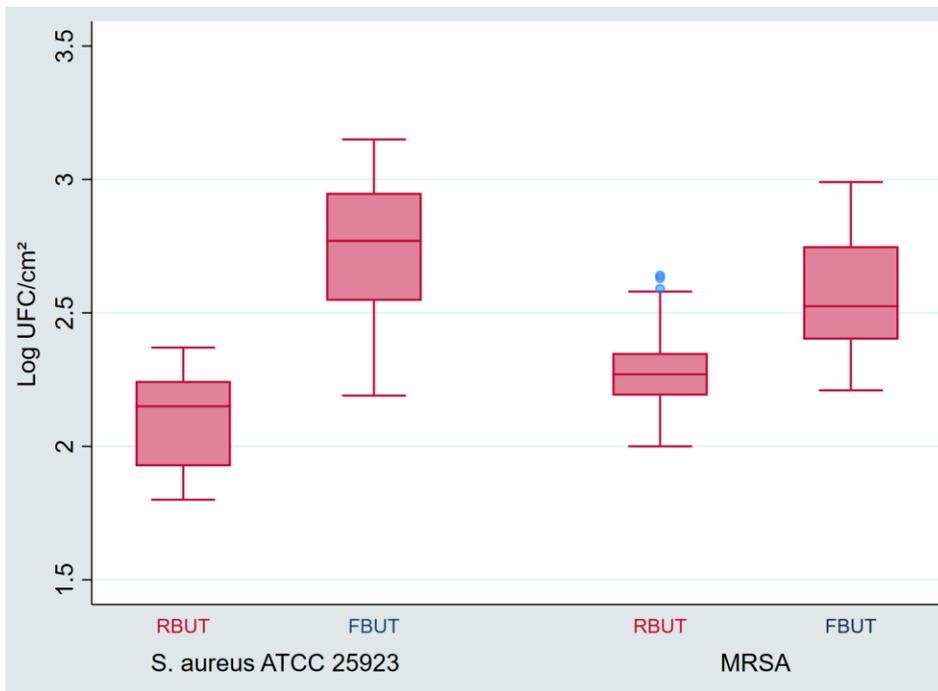


Figura 13. Comparación de medias del número de células eliminadas al emplear RBUR y FBUR en 2 cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *MRSA* ATCC 43300

El análisis de la adhesión de las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *MRSA* ATCC 43300 a diferentes intervalos de tiempo indica que, al tercer día, la cepa *S. aureus* ATCC 25923 exhibe una adhesión media de  $7.72 \pm 0.06$  UFC/cm<sup>2</sup>, significativamente más alta en comparación con *MRSA*, que tiene una adhesión de  $7.47 \pm 0.09$  UFC/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ). A 6 días, la adhesión media de *S. aureus* ATCC 25923 es  $7.89 \pm 0.08$  UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que *MRSA* muestra  $7.79 \pm 0.07$  UFC/cm<sup>2</sup>, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Al día 9, la cepa *S. aureus* ATCC 25923 alcanza una adhesión media de  $8.34 \pm 0.04$  UFC/cm<sup>2</sup>, considerablemente mayor que la de *MRSA*, que es  $8.15 \pm 0.05$  UFC/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ). Finalmente, a 12 días, la adhesión

media de *S. aureus* ATCC 25923 es  $6.98 \pm 0.08$  UFC/cm<sup>2</sup>, significativamente superior a la de MRSA, que es  $6.26 \pm 0.08$  UFC/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ). Estos resultados demuestran que la cepa *S. aureus* ATCC 25923 tiene una adhesión consistentemente más alta en comparación con MRSA en los primeros y últimos períodos de observación, mientras que MRSA presenta una adhesión mayor a 9 días, aunque esta diferencia no resulta ser estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) (Figura 14).

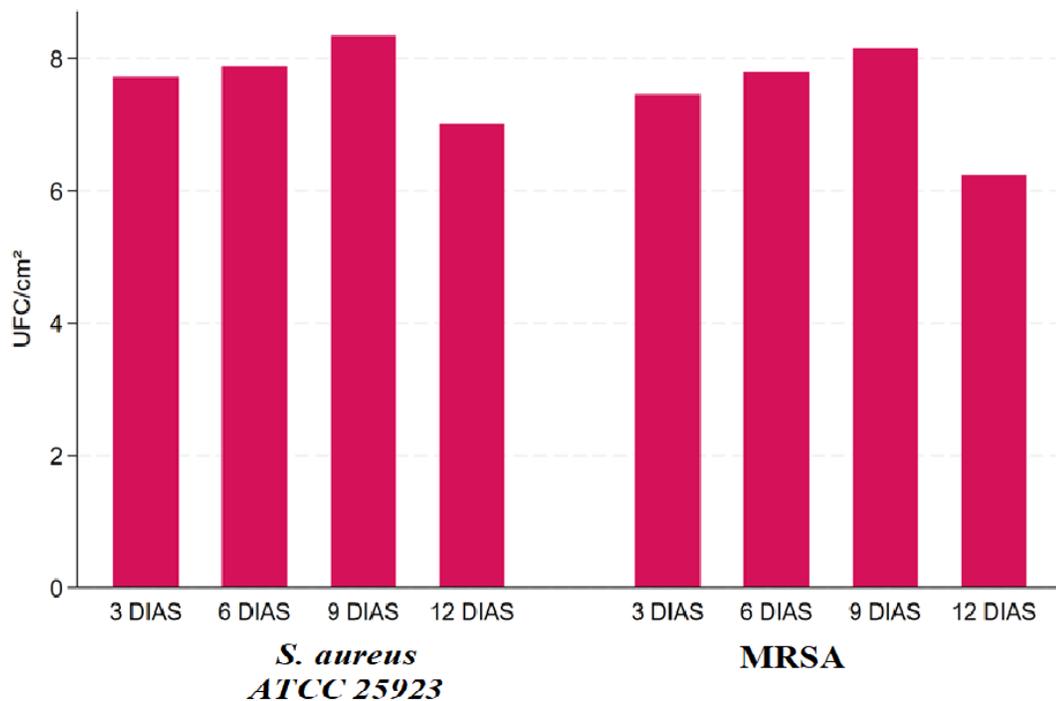


Figura 14. Desarrollo de la biopelícula de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA ATCC 43300 en un disco de acero inoxidable a 37 °C después de 3, 6, 9 y 12 días de incubación.

El Residuo butanólico (RBUT) mostró una mayor eficacia en la reducción de la biopelícula en comparación con la fracción butanólica (FBUT) para ambas cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA ATCC 43300 a lo largo de los períodos de incubación evaluados. Para la cepa *S. aureus* ATCC 25923, a los 3 días el RBUT redujo la biopelícula de *S. aureus* a  $2.08 \pm 0.10$  log UFC/cm<sup>2</sup>, significativamente menor que FBUT, que tuvo  $2.36 \pm 0.09$  log UFC/cm<sup>2</sup>. A los 6 días, RBUT mostró una reducción de  $1.83 \pm 0.14$  log UFC/cm<sup>2</sup>, frente a  $2.28 \pm 0.11$  log UFC/cm<sup>2</sup> para FBUT ( $p < 0.05$ ). A los 9 días, RBUT alcanzó  $1.60 \pm 0.15$  log UFC/cm<sup>2</sup>, en comparación con  $2.18 \pm 0.10$  log UFC/cm<sup>2</sup> para FBUT ( $p < 0.05$ ). Finalmente, a los 12 días, RBUT presentó una reducción de  $1.56 \pm 0.15$  log UFC/cm<sup>2</sup>, FBUT mostró  $2.14 \pm 0.10$  log UFC/cm<sup>2</sup>.

Para la cepa *S. aureus* MRSA ATCC 43300 a los 3 días, RBUT mostró una reducción de  $2.18 \pm 0.11$  log UFC/cm<sup>2</sup> (significativamente menor que la fracción FBUT, que tuvo una reducción de  $2.45 \pm 0.09$  log UFC/cm<sup>2</sup>, con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). A los 6 días, la diferencia entre los dos tratamientos se mantuvo significativa, con RBUT reduciendo la biopelícula a  $1.91 \pm 0.15$  log UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que FBUT mostró  $2.34 \pm 0.12$  log UFC/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ). A los 9 días, RBUT continuó siendo más efectivo con una reducción de  $1.68 \pm 0.13$  log UFC/cm<sup>2</sup>, comparado con  $2.28 \pm 0.10$  log UFC/cm<sup>2</sup> para FBUT ( $p < 0.05$ ). Finalmente, a los 12 días, RBUT presenta una reducción de  $1.55 \pm 0.14$  log UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que FBUT tuvo  $2.26 \pm 0.10$  log UFC/cm<sup>2</sup> con diferencias significativas en todos los casos ( $p < 0.05$ ) (figura 15).

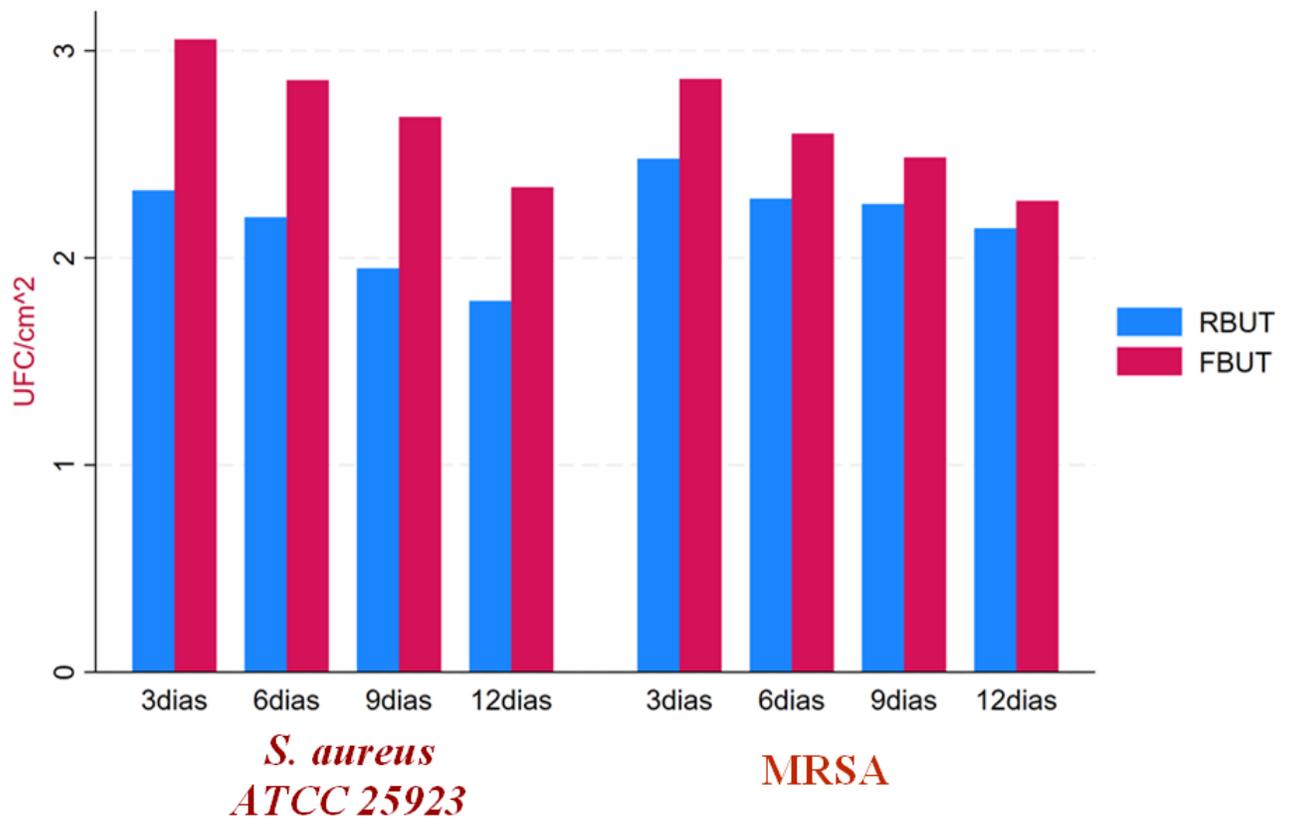


Figura 15.\_ Reducción de células de la biopelícula (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de dos cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA ATCC 43300 después de 3, 6, 9 y 12 días de incubación en superficies de acero inoxidable.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para la reducción de células de la biopelícula del RBUT y FBUT, cepa, periodo de incubación (días).

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob>F
Model	51.657118	15	3.4438078	1017.87	0.0000
DROGA	26.068041	1	26.068041	7704.77	0.0000
CEPA	.07008334	1	.07008334	20.71	0.0000
DROGA#CEPA	4.8884036	1	4.8884036	1444.84	0.0000
TIEMPO	18.900382	3	6.3001274	1862.09	0.0000
DROGA#TIEMPO	.73774427	3	.24591476	72.68	0.0000
CEPA#TIEMPO	.86192203	3	.28730734	84.92	0.0000
DROGA#CEPA#TIEMPO	.13054163	3	.04351388	12.86	0.0000
Residual	1.5698801	464	.00338336		
Total	53.226998	479	.11112108		

Los datos obtenidos por anova describen que en el siguiente modelo que el valor F es muy elevado (1017.87) y el p-valor es 0.0000, lo que sugiere que el modelo en su totalidad es sumamente significativo. Esto nos indica que al menos una de las variables independientes tiene un impacto notable en la disminución de la biopelícula.

Asimismo, la variable DROGA muestra un efecto altamente significativo ( $F = 7704.77$ ,  $p < 0.0001$ ), indicando una diferencia importante en la reducción de la biopelícula entre las distintas drogas empleadas. De manera similar, la variable CEPA presenta un efecto significativo ( $F = 20.71$ ,  $p < 0.0001$ ), sugiriendo diferencias notables en la reducción de la biopelícula entre las cepas de *S. aureus* analizadas. Además, el TIEMPO de incubación también tiene un efecto altamente significativo ( $F = 1862.09$ ,  $p < 0.0001$ ),

lo que demuestra que la reducción de la biopelícula varía significativamente a lo largo del tiempo (tabla 4).

La interacción entre la variable DROGA y la variable CEPA resulta significativa ( $F = 1444.84$ ,  $p < 0.0001$ ), lo que implica que la eficacia de la droga en la reducción de la biopelícula depende de la cepa específica de *S. aureus*. De manera similar, la interacción entre DROGA y TIEMPO es significativa ( $F = 72.68$ ,  $p < 0.0001$ ), sugiriendo que el efecto de la droga en la reducción de la biopelícula cambia con el tiempo de incubación. También, la interacción entre CEPA y TIEMPO muestra significancia ( $F = 84.92$ ,  $p < 0.0001$ ), indicando que el impacto de la cepa en la reducción de la biopelícula varía con el transcurso del tiempo. Además, la interacción triple entre DROGA, CEPA y TIEMPO es significativa ( $F = 12.86$ ,  $p < 0.0001$ ), revelando que la combinación de estos tres factores influye notablemente en la reducción de la biopelícula, y que estos factores no actúan de manera independiente (tabla 4).

**La tabla 5** muestra los resultados del test de Tukey. Al comparar las distintas combinaciones de tratamiento y tiempo, se observan resultados notables que destacan la eficacia del tratamiento de la fracción butanólica (FBUT) y el residuo butanólico (RBUT) en ambas cepas de *S. aureus* ATCC 25923 Y MRSA 43300 en todos los puntos de tiempo evaluados (3, 6, 9 y 12 días). Por ejemplo, el tratamiento (ATCC 25923#RBUT#6días) presenta una reducción de -0.1296 en comparación con (ATCC 25923#RBUT#3días), mientras que la reducción se incrementa a -0.3763 entre (ATCC 25923#RBUT#9días) y (ATCC 25923#RBUT#3días), alcanzando -0.5340 en (ATCC

25923#RBUT#12días). En contraste, el tratamiento con la FBUT muestra un aumento significativo en la reducción del crecimiento bacteriano, siendo (ATCC 25923#FBUT#3días) superior con un incremento de 0.7293 respecto a (ATCC 25923#RBUT#3días), y un aumento de 0.5320 a los 6 días. Sin embargo, la efectividad del tratamiento con la FBUT parece estabilizarse, ya que (ATCC 25923#FBUT#12días) presenta solo un incremento mínimo de 0.0153. En la cepa MRSA 43300, los resultados también son reveladores: (MRSA 43300#FBUT#3días) muestra un aumento de 0.5383 frente a (ATCC 25923#RBUT#3días), aunque en (MRSA 43300#FBUT#12días) la reducción es apenas de -0.0503 en comparación con el control. Al comparar tratamientos entre diferentes tiempos, se observa que (ATCC 25923#RBUT#9días) y (ATCC 25923#RBUT#6días) muestran una reducción de -0.2467, mientras que (ATCC 25923#FBUT#3días) frente a (ATCC 25923#RBUT#6días) evidencia un notable aumento de 0.8590. Estos hallazgos subrayan una tendencia de aumento en la efectividad del tratamiento FBUT con el aumento del tiempo de exposición, mientras que RBUT muestra efectos acumulativos positivos en algunos casos. En conjunto, estos resultados destacan la importancia del tratamiento con la FBUT como una opción preferente para el manejo del desarrollo de biopelículas causadas por ambas cepas, sugiriendo su superioridad en eficacia y efectividad en el control del crecimiento bacteriano. Estos hallazgos subrayan la importancia del tratamiento con la FBUT como opción preferente para ambas cepas.

Tabla 5. Evaluación de Comparaciones de Medias por Tukey

CONTRASTE	Reducción	Std. Err.	[95% Conf. Interval]
(ATCC 25923#RBUT#6dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	-0.1296665	0.0150186	[-0.1814071, -0.077926]
(ATCC 25923#RBUT#9dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	-0.3763333	0.0150186	[-0.4280738, -0.3245927]
(ATCC 25923#RBUT#12dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	-0.5339999	0.0150186	[-0.5857405, -0.4822594]
(ATCC 25923#FBUT#3dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.7293334	0.0150186	[0.6775928, 0.7810739]
(ATCC 25923#FBUT#6dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.5320001	0.0150186	[0.4802595, 0.5837406]
(ATCC 25923#FBUT#9dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.3550001	0.0150186	[0.3032595, 0.4067406]
(ATCC 25923#FBUT#12dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.0153334	0.0150186	[-0.0364071, 0.067074]
(MRSA 43300#RBUT#3dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.1530001	0.0150186	[0.1012595, 0.2047406]
(MRSA 43300#RBUT#6dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	-0.04	0.0150186	[-0.0917405, 0.0117406]
(MRSA 43300#RBUT#9dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	-0.0659999	0.0150186	[-0.1177405, -0.0142594]
(MRSA 43300#RBUT#12dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	-0.1829999	0.0150186	[-0.2347404, -0.1312594]
(MRSA 43300#FBUT#3dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.5383334	0.0150186	[0.4865928, 0.5900739]
(MRSA 43300#FBUT#6dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.2740001	0.0150186	[0.2222595, 0.3257406]
(MRSA 43300#FBUT#9dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	0.1590001	0.0150186	[0.1072595, 0.2107406]
(MRSA 43300#FBUT#12dias) vs (ATCC 25923#RBUT#3dias)	-0.0503333	0.0150186	[-0.1020738, 0.0014073]
(ATCC 25923#RBUT#9dias) vs (ATCC 25923#RBUT#6dias)	-0.2466667	0.0150186	[-0.2984073, -0.1949262]
(ATCC 25923#RBUT#12dias) vs (ATCC 25923#RBUT#6dias)	-0.4043334	0.0150186	[-0.4560739, -0.3525929]
(ATCC 25923#FBUT#3dias) vs (ATCC 25923#RBUT#6dias)	0.8589999	0.0150186	[0.8072594, 0.9107405]
(ATCC 25923#FBUT#6dias) vs (ATCC 25923#RBUT#6dias)	0.6616666	0.0150186	[0.6099261, 0.7134072]
(ATCC 25923#FBUT#9dias) vs (ATCC 25923#RBUT#6dias)	0.4846666	0.0150186	[0.4329261, 0.5364072]

## 11. DISCUSIÓN

La actividad antibacteriana ha sido precursora para entender el comportamiento y el mecanismo de acción de manera individual de las células bacteriana frente a biomoléculas obtenidas de diferentes organismos principalmente plantas, lo cual lo convierte en una alternativa integral principalmente en ambientes hospitalarios y las industrias de alimentos. Sin embargo, los estudios respecto a la actividad antibiopelícula son limitados y en menor medida enfocados al efecto de *C.spinosa* , se sabe que más del 98 % de las bacterias sobre la tierra se encuentran formando interconexiones conocidas como biopelículas las cuales se desarrollan favorecidas por las condiciones de su entorno y la capacidad de estas para poder colonizar diversos sustratos bióticos o abióticos. Por lo tanto, en este trabajo resalta la importancia del efecto antibiopelícula de la tara frente a dos diferentes de cepas de *S. aureus* las cuales se tomaron como patrones puesto que tuvieron la capacidad de formar biopelículas sobre discos de acero inoxidable.

Se ha definido que el tipo de superficie afecta el desarrollo y la proliferación de la biopelícula estafilococia, diversas investigaciones convergen que el segundo material más propenso e idóneo para su desarrollo de biopelículas son materiales o superficies de acero inoxidable (Abdallah, M *et al* 2014; Moreno *et al* 2020) en nuestro estudio se reporta que la adhesión a los discos de acero inoxidable en promedio fue de 7.7 UFC/cm<sup>2</sup> y 7.4 UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente lo cual referencia a los estudios anteriores. Asimismo, Unlu *et al* 2018 consolida que *S. aureus* posee la capacidad de adherirse con facilidad sobre superficies hidrofílicas como el vidrio y el acero inoxidable sobre

aquellas hidrofóbicas como materiales de poliestireno y polipropileno. Otro estudio, Liu et al 2015, sostiene que la adición de un suplemento de glucosa al medio incrementa la hidrofobicidad por lo tanto influye en la respuesta química de la superficie celular y su comportamiento sobre la superficie. El tiempo de maduración en la biopelícula estafilocócica se ha demostrado que suele ocurrir al tercer día aproximadamente y suele desarrollarse según disponibilidad de nutrientes, competencia entre bacterias y los cambios en el entorno.

La elección de la fracción (50% de acetonitrilo del residuo butanólico) y el residuo butanólico en esta investigación se basó en los resultados iniciales proporcionados por el Circulo de investigación UPCH (Fiorella Acuña, comunicación personal, 2022), que demostraron su efectividad significativa contra cepas de *Staphylococcus aureus*, incluyendo la cepa resistente como MRSA. Estas fracciones fueron seleccionadas por su capacidad para extraer una amplia variedad de compuestos bioactivos, aumentando así la probabilidad de identificar sustancias con actividad antimicrobiana. Además, se sabe que el residuo butanólico es eficaz en la captura de metabolitos con propiedades biológicas, lo que sugiere que puede contener componentes que actúan de manera sinérgica para inhibir el crecimiento bacteriano.

El tipo de sistema de extracción y los solventes afectan la cantidad y tipo de biomolécula disponible por lo tanto se ha demostrado que los extractos obtenidos al emplear como solventes polares el sistema etanol/agua en la extracción de las vainas de *C.spinosa* comprobaron la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (Skowrya S, 2014) por lo tanto el perfil fitoquímico cambia al emplear otro tipo de

solventes como lo reportado por Clifford et al 2007, mediante cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS) empleando taninos de tara comercial en el cual se encontró principalmente ácido galoilquinico como principal constituyente antes que ácido tánico, asimismo la metanolisis de este compuesto produjo isomerías convirtiéndose en galato de metilo trigalato de metilo lo que condujo a la obtención de productos basados en el núcleo de ácido 1,3,4,5-tetragaloilquinico y tres basados en el núcleo de ácido 3,4,5-trigaloilquinico. En el presente trabajo se reporta 29 isomerías, 19 obtenido del residuo butanolico y diez compuestos isomericos para la fracción butanolica, lo cual nos indica la generación de nuevos isómeros derivados de ácido galoilquinico.

La presencia de ciertos isómeros en el residuo y la fracción indica que estos compuestos no solo son abundantes, sino que también podrían actuar de manera sinérgica. La redundancia en la presencia de isómeros puede ofrecer una ventaja adaptativa, permitiendo que los extractos mantengan una actividad biológica robusta incluso si un isómero específico resulta menos efectivo bajo ciertas condiciones (Clifford *et al.*, 2007). Esto es especialmente relevante en el contexto de la actividad antibiopelícula, donde diferentes isómeros pueden tener diversos mecanismos de acción que se complementan entre sí, aumentando así la eficacia del extracto en su conjunto. Adicionalmente, la coexistencia de isómeros podría influir en la modulación de la respuesta antibiopelícula, ya que la variabilidad estructural puede afectar la interacción de estos compuestos con las células bacterianas y la matriz extracelular de la biopelícula. Por ejemplo, ciertos isómeros pueden ser más efectivos en la inhibición de

la síntesis de exopolisacáridos, mientras que otros pueden desestabilizar las biopelículas existentes al alterar las interacciones intercelulares (Fong & Yildiz, 2015).

La identificación de menos compuestos en la fracción butanólica en comparación con el residuo butanólico puede tener varias implicaciones. Primero, esto podría sugerir que la fracción contiene compuestos más específicos o potentes que, a pesar de estar en menor cantidad, podrían tener una mayor eficacia en su actividad antibiopelícula. Este fenómeno ha sido observado en otros estudios, donde la reducción en la diversidad de compuestos a menudo se asocia con un aumento en la potencia biológica de los mismos (López *et al.*, 2015). Por otro lado, una menor cantidad de compuestos identificados también puede indicar un proceso de extracción más selectivo, donde se priorizan ciertos compuestos con mayor actividad biológica. Además, la menor diversidad de compuestos en la fracción butanólica puede facilitar la identificación de los mecanismos de acción específicos. La investigación sugiere que la actividad antibiopelícula podría ser más fácilmente atribuida a compuestos individuales en una matriz menos compleja, lo que permite estudios más dirigidos sobre sus efectos y mecanismos (Pérez *et al.*, 2017). Esto se alinea con la tendencia en la investigación de fármacos naturales, donde una formulación más concentrada de activos puede conducir a resultados más predecibles y efectivos.

La actividad antibiopelícula de los compuestos presentes en la fracción butanólica y el residuo butanólico (RBUT) del extracto bruto orgánico de tara (*Caesalpinia spinosa*) se manifiesta a través de su capacidad para interferir con la formación y estabilidad de la biopelícula en *Staphylococcus aureus*. Estos compuestos fenólicos, como los

isómeros del ácido tri-O-galoilquínico y el ácido elágico, ácido quinico pueden alterar la expresión de genes clave como *icaA* y *icaD*, que son esenciales para la síntesis de poliglucosamina, un componente fundamental de la matriz extracelular de la biopelícula, lo que resulta en una disminución de la cohesión y la integridad de la biopelícula (Cerca et al., 2006). Además, su efecto sobre el sistema de regulación de quorum sensing, particularmente en el gen *agr*, modula la producción de factores de virulencia, inhibiendo la formación de la biopelícula mediante la reducción de la expresión de genes relacionados con la adhesión y la producción de la matriz (McDowell *et al.*, 2001).

Asimismo, se ha reportado que la actividad antibiopelícula del ácido galoilquínico se puede atribuir a varios mecanismos de acción. En primer lugar, se ha evidenciado que este ácido interfiere con la adhesión bacteriana, un paso crítico en la formación de biopelículas. Al reducir la capacidad de las bacterias para adherirse a superficies, el ácido galoilquínico limita el establecimiento inicial de la biopelícula (Clifford et al., 2007). Además, estudios han mostrado que este compuesto puede afectar la producción de exopolisacáridos, componentes clave de la matriz extracelular de la biopelícula. Al alterar la síntesis de estos polisacáridos, el ácido galoilquínico disminuye la cohesión de la biopelícula y facilita su erradicación (Kondo *et al.*, 2006). Por otro lado, el ácido quinico, detectado en la fracción butanólica, ha mostrado propiedades antibacterianas y puede afectar la adhesión bacteriana, un paso crucial en la formación de la biopelícula. Esta interferencia podría resultar en una disminución de la cohesión de la biopelícula, facilitando su erradicación.

## 12. CONCLUSIONES

1. Se determinó que la fracción butanólica de *Caesalpinia spinosa* exhibe actividad antibiopelícula significativamente mayor en comparación con el residuo butanólico contra las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* *Meticilina* resistente (MRSA) ATCC 43300, sustentada por la prueba estadística de ANOVA de 3 vías que resolvió que las variables CEPA, TIEMPO y DROGA, así como sus interacciones, tienen un efecto significativo sobre la reducción del parámetro analizado ( $p < 0.0001$ ).
2. La determinación de una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 50 mg/ml para las cepas *S. aureus* MRSA y ATCC 25923, utilizando el residuo y la fracción butanólica, resalta la actividad antimicrobiana significativa de estos compuestos. Este resultado sugiere que los compuestos presentes en ambas fracciones son eficaces para inhibir el crecimiento bacteriano.
3. La cepa *S. aureus* MRSA presenta una mayor capacidad de adhesión y formación de biopelículas en comparación con la cepa *S. aureus* ATCC 25923. Esta diferencia subraya la mayor capacidad de MRSA para colonizar y persistir en superficies de acero inoxidable.

4. La fracción butanólica de *Caesalpinia spinosa* es consistentemente más eficaz que el residuo butanólico en la reducción de biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923 y MRSA ATCC 43300 en discos de acero inoxidable tipo 304, con diferencias significativas en todos los períodos de incubación ( $p < 0.05$ ). Asimismo, los resultados de la prueba Tukey muestran que fracción butanólica provoca una reducción significativamente mayor en la biopelícula de *S. aureus* en comparación con el residuo butanólico en todos los días de incubación evaluados.
  
5. Se identificaron un total de 19 compuestos en la fracción butanólica y 10 compuestos en el residuo butanólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa*.

### 13. RECOMENDACIONES

- Aunque la contribución respecto a la eficacia de los metabolitos secundarios identificados tuvo un efecto aceptable y prometedor en la eliminación de biopelículas de *S. aureus* es necesario repetir este ensayo con más fracciones derivadas del extracto bruto orgánico.
- Incluir en estudios futuros énfasis en el mecanismo de acción de estos metabolitos durante la inhibición de la biopelícula para tener una comprensión más precisa
- Extender el ensayo y verificar el efecto antibiopelícula sobre otras bacterias de origen nosocomial y presentes en la industria alimentaria.

## 14. . LIMITACIONES

- La actividad antibiopelícula se evaluó exclusivamente en discos de acero inoxidable, lo que limita la capacidad de extrapolar los resultados a otras superficies donde pueden formarse biopelículas, como plásticos o tejidos.
- El estudio se centró únicamente en la fracción butanólica y residuo butanólico, sin explorar un rango más amplio de concentraciones o extractos de *Caesalpinia spinosa*, lo que podría limitar la comprensión de su actividad antimicrobiana.
- La caracterización fenotípica realizada mediante agar rojo de Congo, aunque informativa, no abarca otros aspectos bioquímicos o genéticos que podrían influir en la formación y estabilidad de las biopelículas.
- La actividad antibiopelícula del residuo butanólico y la fracción butanólica de *Caesalpinia spinosa* fue evaluada en condiciones controladas de laboratorio, lo que puede no reflejar su eficacia en entornos más complejos y variables, como los presentes en infecciones nosocomiales o en la industria alimentaria.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ait Ouali, L., Moukhliiss, A., & El Ghalemi, A. (2014). New approaches for the control of biofilm formation: Antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/jam.12438>.
2. Ashu, F. A., Na-Iya, J., Wamba, B. E. N., Kamga, J., Nayim, P., Ngameni, B., Beng, V. P., Ngadjui, B. T., & Kuete, V. (2020). Antistaphylococcal Activity of Extracts, Fractions, and Compounds of *Acacia polyacantha* Wild (Fabaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1-10. Ö.
3. Aviles, R (2018). Estudio químico y biológico de extractos de la hoja de tara *Caesalpinia spinosa* (tesis de bachiller). Universidad Nacional Mayor de San Marcos
4. Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014a). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196(7), 453–472. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>.
5. Abebe, G. M. (2020). The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>.
6. Barbehenn, R. V., & Peter Constabel, C. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551–1565. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>
7. Bierowiec, K., Płoneczka-Janeczko, K., Rypuła, K. (2016). Is the colonisation of *Staphylococcus aureus* in pets associated with their close contact with owners? *PLoS One*. 11 (5), e0156052. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156052>.
8. Brooks, J., & Flint, S. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(12), 2163- 2176.
9. Bodur, T., & Cagri-Mehmetoglu, A. (2012). Removal of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on stainless steel using scallop shell powder. *Food Control*, 25(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.032>.
10. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids

Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256-265.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>.

11. Burguet N, Brito L y Cánovas I. Evaluation of the effectiveness of a disinfectant through the contact plate method. *Rev Cubana Farm.* 2013; 47(2): 185-192.
12. Calla-Poma, R. D., Requena-Mendizabal, M. F., Millones-Gómez, P. A., Maurtua-Torres, D., Bacilio-Amaranto, R., Valderrama-Negron, A. C., Calderon-Miranda, M. A., Calla-Poma, R. A., & Huauya\_Leuyacc, M. E. (2020). Antimicrobial Activity and Antiadherent Effect of Peruvian *Psidium guajava* (Guava) Leaves on a Cariogenic Biofilm Model. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 21(7), 733–740.  
<https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2893>
13. Castro, A. J., Ramos, N. J., Juárez, J. R., Ruíz, J. R., Choquesillo, F. F., Ponce, J. J., Santa María, O. H., Castillo, A. A., García, D. A., Escudero, J., Navarro, A. J., Huamán, S. A., Machaca, M. B., Gutiérrez, P. I., Ramirez, E. G., & Gonzales, S. (2017). COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL *DE Caesalpinia spinosa* “TARA”, EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE Y EFECTO ANTIBACTERIANO FRENTE A *Streptococcus mutans*. *Ciencia e Investigación*, 19(2), 89–94.  
<https://doi.org/10.15381/ci.v19i2.13636>.
14. Castro, J. R., Torres, L. F., & Millones, A. A. (2016). Antibacterial activity of *Caesalpinia spinosa* extracts against pathogenic bacteria. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2268-2273.  
<https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1130907>.
15. Cerca, N., et al. (2006). Involvement of the *ica* operon in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 40(4), 194-202.
16. Cordero Irene (2015). Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo, como referente para la restauración y conservación del bosque de nieblas de Atiquipa (Perú). [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio Institucional.
17. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
18. Clifford, M. N., Stoupi, S., & Kuhnert, N. (2007). Profiling and characterization by LC-MSN of the galloylquinic acids of green tea, tara

- tannin, and tannic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2797-2807. <https://doi.org/10.1021/jf063533l>.
19. Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 52-73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>.
  20. Cox, J. M. (2019). Solvent properties and applications in high-performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 11(15), 2237-2248.
  21. Chernetsova, E. S., et al. (2012). Antimicrobial activity of ellagic acid against biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Food*, 15(3), 283-288.
  22. De Araújo, A. R., Quelemes, P. V., Perfeito, M. L. G., De Lima, L. I., Sá, M. C., Nunes, P. A., Joanitti, G. A., Eaton, P., Soares, M. J. D. S., & Leite, J. R. S. A. (2015). Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0084-2>.
  23. de Filippis, L. F. (2015). Plant secondary metabolites. *Plant-Environment Interaction*, 263–299. <https://doi.org/10.1002/9781119081005.ch15>.
  24. Decléty, P. (2003). METALS USED IN THE FOOD INDUSTRY. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 3869–3876. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00772-0>.
  25. Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., & Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>.
  26. di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 50, 930–936. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>.
  27. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.

28. Dula, S., Ajayeoba, T. A., & Ijabadeniyi, O. A. (2021). Bacterial biofilm formation on stainless steel in the food processing environment and its health implications. *Folia Microbiologica*, 66(3), 293–302. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00864-2>.
29. Dutra, A. R., Silva, L. C., & Ferreira, F. C. (2018). Survival of *Staphylococcus aureus* on stainless steel surfaces after cleaning and disinfection. *Food Control*, 85, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.017>.
30. Eshratkhah, B. (2015, December 16). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *ACADEMIA*. [https://www.academia.edu/1791770/Plants\\_and\\_secondary\\_metabolites\\_Tannins\\_A\\_Review](https://www.academia.edu/1791770/Plants_and_secondary_metabolites_Tannins_A_Review)
31. Grace, D., & Fetsch, A. (2018). *Staphylococcus aureus* —A Foodborne Pathogen. *Staphylococcus Aureus*, 3–10. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809671-0.00001-2>.
32. Harborne, J. B. (1973). Phenolic Compounds. *Phytochemical Methods*, 33–88. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7_2).
33. Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2012). Biofilm-Forming Capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from Ocular Infections. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(9), 5624. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9114>
34. Frassinetti, S., Gabriele, M., Moccia, E., Longo, V., & di Gioia, D. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT*, 124, 109149. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109149>.
35. Fritz, S. A., & Jernigan, J. A. (2020). The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 34(2), 227-239. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.01.001>
36. Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
37. Fong, J. N., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm Matrix and the Evolution of the Biofilm Lifestyle. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 44-50.

38. Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of Plant Secondary Metabolites. *Methods in Molecular Biology*, 341–366. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13).
39. Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2017). Congo Red Stain Identifies Matrix Overproduction and Is an Indirect Measurement for c-di-GMP in Many Species of Bacteria. *C-Di-GMP Signaling*, 147–156. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_12).
40. Justino, C., Duarte, K., Freitas, A., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2014). Classical Methodologies for Preparation of Extracts and Fractions. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 35–57. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63359-0.00003-3>
41. Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>.
42. González, J. A., López, M. A., & Ruiz, E. (2019). Phytochemical analysis and biological activity of *Caesalpinia spinosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 13(5), 85-95.
43. Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., et al. (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*, 298(15), 1763-1771. <https://doi.org/10.1001/jama.298.15.1763>.
44. König, G., Reetz, M. T., & Thiel, W. (2018). 1-butanol as a solvent for efficient extraction of polar compounds from aqueous medium: Theoretical and practical aspects. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 122(27), 6975–6988. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b02877>.
45. Larrea M. 2011. La tara, guarango o taya (*Caesalpinia spinosa*) en la Región Andina: criterios ambientales para la sustentabilidad de su aprovechamiento y manejo en Bolivia, Ecuador y Perú. Quito, Perú: ECOBONA, Serie de Capacitación No. 5. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPER.
46. Liu, M., Wu, X., Li, J., Liu, L., Zhang, R., Shao, D., & Du, X. (2017). The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. *Food Control*, 73, 613-618. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.015>

47. Rautray, T. R., Narayanan, R., Kwon, T. Y., & Kim, K. H. (2010). Surface modification of titanium and titanium alloys by ion implantation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 93B(2), 581–591. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31596>.
48. Leal, S. (2011). Caracterización de aceros inoxidable y estudio de su resistencia mecánica y conformabilidad. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma De Nuevo León. San Nicolás de Los Garza, México).
49. Liu Y, Yang S, Xu H, Qin L , Tay J . The influence of cell and substratum surface on hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol*. 2004; 110: 251–256. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.02.012.
50. López, P., et al. (2015). The role of phytochemicals in the inhibition of bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6, 115.
51. Marqués, S. C., Rezende, J. D. G. O. S., De Freitas Alves, L. A., Silva, B. C., Alves, E., De Abreu, L. C., & Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 538-543. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822007000300029>.
52. Martel, C., Rojas, N., Marín, M., Avilés, R., Neira, E., & Santiago, J. (2014). *Caesalpinia spinosa* (Caesalpinaceae) leaves: anatomy, histochemistry, and secondary metabolites. *Brazilian Journal of Botany*, 37(2), 167–174. <https://doi.org/10.1007/s40415-014-00590>.
53. Martínez, J. A., López, M. A., & Torres, R. M. (2018). Techniques for the characterization of bioactive compounds. *Journal of Natural Products*, 81(2), 295-307.
54. McDowell, E. J., et al. (2001). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(2), 113-121.
55. Meesilp, S., & Mesil, S. (2018). Biofilm control strategies in food safety. *Food Microbiology*, 76, 163-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.005>.
56. Millones, P. (2021). Efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de *streptococcus gordonii* y *fusobacterium nucleatum* (tesis doctoral). Universidad Peruana Cayetano Heredia.
57. Mohdaly Adel & Smetanska Iryna 2011. Methods for the extraction of metabolites from plant tissues.

<https://www.researchgate.net/publication/321686071> Methods for the extraction of metabolites from plant tissues.

58. Moreno, A., dos Santos, D. M., Lamartine De Moraes Melo Neto, C., Luiz De Melo Moreno, A., de Magalhães Bertoz, A. P., & Goiato, M. C. (2020a). In vitro evaluation of the effect of different disinfectants on the biofilm of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* formed on acrylic ocular prostheses. *PLOS ONE*, *15*(10), e0240116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240116>.
59. Mostacero, J; Castillo, F.; Mejía, F.R.; Gamarra, O.A.; Charcape, J.M.; Ramírez, R.A. 2011. Plantas Medicinales del Perú-Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Asamblea Nacional de Rectores-instituto de Estudios Universitarios “José Antonio Encinas”. ISBN: 978-612-4011-59-7. Trujillo, Perú. 909 p.
60. Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, *104*(3), 365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>.
61. MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego, Per.). 2019. ABC de la producción y comercio de tara en el Perú. Boletín - Perfil Técnico N° 1. Dirección General de Políticas Agrarias - Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria. Abril 2019.
62. Nan, L., Yang, K., & Ren, G. (2015). Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. *Materials Science and Engineering: C*, *51*, 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.012>.
63. Reetz, M. T., & König, G. (2021). *n*-Butanol: An Ecologically and Economically Viable Extraction Solvent for Isolating Polar Products from Aqueous Solutions. *European Journal of Organic Chemistry*, *2021*(46), 6224-6228. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202100829>.
64. Rodrigues, J. B. D. S., Souza, N. T. D., Scarano, J. O. A., Sousa, J. M. D., Lira, M. C., Figueiredo, R. C. B. Q. D., de Souza, E. L., & Magnani, M. (2018). Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. *LWT*, *93*, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.052>.
65. Rumbaugh, K. P., & Ahmad, I. (Eds.). (2014). *Antibiofilm Agents*. Springer Series on Biofilms. Published. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-53833-9>.

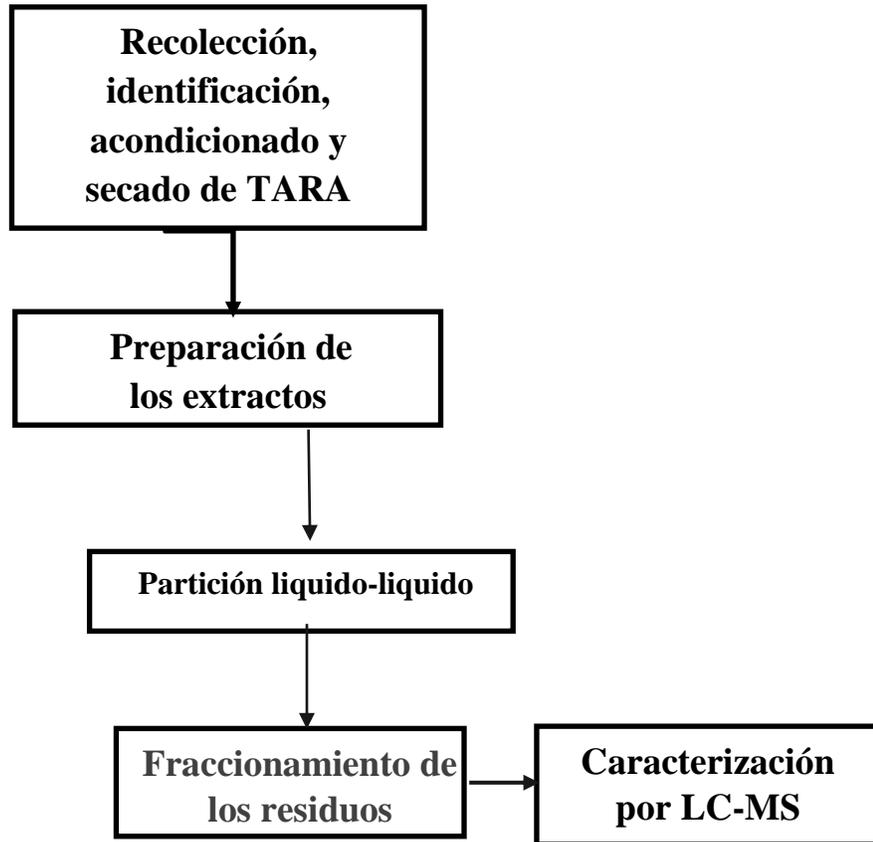
66. Santos, A. C., Oliveira, L. C., & Lima, M. F. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of plant extracts: A review. *Phytochemistry Reviews*, 16(3), 445-462.
67. Siccha A, Lock O, Molina M. Determinación Cuantitativa de Galactomananos en las Gomas de Tara, Charán y Uña de Gato, por Cromatografía de Gases. *Bol Soc Quim del Perú*. 1994; 39-43.
68. Smith, A. K., Liu, X., & Walker, H. (2022). The impact of solvent properties on analytical method performance. *Analytical Chemistry Reviews*, 97(6), 1123-1137.
69. Suárez, L., Pereira, A., Hidalgo, W., & Uribe, N. (2021). Antibacterial, Antibiofilm and Anti-Virulence Activity of Biactive Fractions from Mucus Secretion of Giant African Snail *Achatina fulica* against *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiotics*, 10(12), 1548. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121548>.
70. O'Toole, G. A., & Kolter, R. (2000). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens*: a role for the second messenger cyclic diguanylate. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5867-5872. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5867-5872.2000>.
71. Otto, M. (2018). Staphylococcal Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0023-2018>.
72. Pagedar A, Singh J, Batish VK (2010) Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. *J Basic Microbiol* 50:201000034. doi:10.1002/jobm.201000034.
73. Parastan, R., Kargar, M., Solhjoo, K., & Kafilzadeh, F. (2020). *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Reports*, 20, 100739. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100739>.
74. Pareja-Vásquez, M., Pardo-Aldave, K., Jurado-Teixeira, B., Guillen, A., Romero-Coasaca, A. C., & Meneses-Rivadeneira, L. (2020). Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” Fabaceae sobre bacterias de la biopelícula bucal. *Diagnóstico*, 59(1), 5–11. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v59i1.201>.

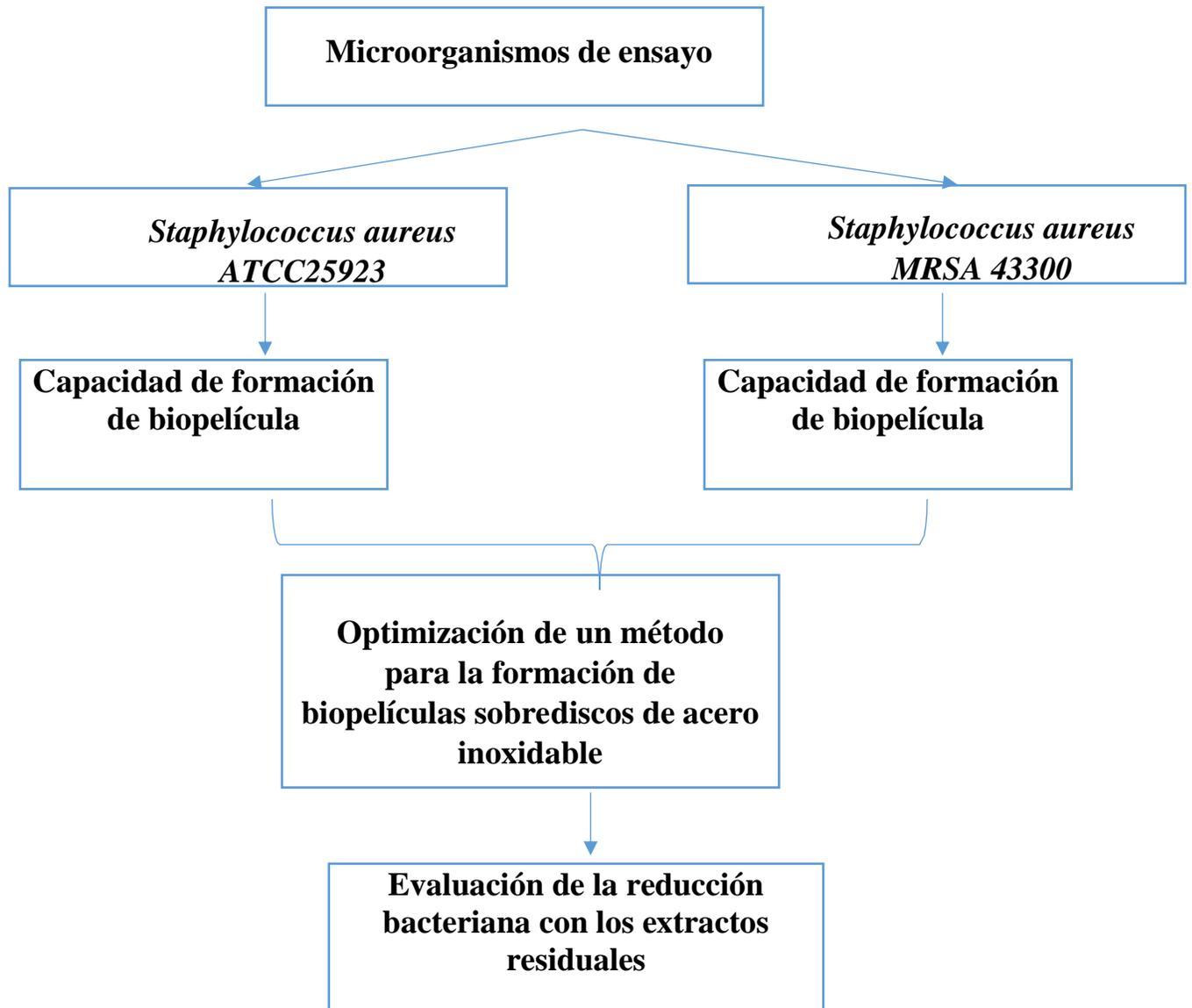
75. Patel, S. D., Singh, R., & Kumar, V. (2020). Role of acetonitrile in mass spectrometry and chromatographic techniques. *Journal of Chromatographic Science*, 58(8), 670-680.
76. Pérez, M. C., González, J. A., & Ruiz, E. (2015). Extraction and fractionation of natural products. *Natural Product Chemistry*, 20(3), 455-467.
77. Pérez, J., et al. (2017). Natural compounds as biofilm inhibitors: Insights and challenges. *Molecules*, 22(5), 924.
78. Piegerová, A., Koščová, J., Schusterová, P., Nemcová, R., & Kryvtsova, M. (2019). In Vitro Inhibition of Biofilm Formation by *Staphylococcus Aureus* Under the Action of Selected Plant Extracts. *Folia Veterinaria*, 63(1), 48–53. <https://doi.org/10.2478/fv-2019-0007>.
79. Pietrocola, G., Campoccia, D., Motta, C., Montanaro, L., Arciola, C. R., & Speziale, P. (2022). Colonization and Infection of Indwelling Medical Devices by *Staphylococcus aureus* with an Emphasis on Orthopedic Implants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5958. <https://doi.org/10.3390/ijms23115958>.
80. Pontes, E. K. U., Melo, H. M., Nogueira, J. W. A., Firmino, N. C. S., de Carvalho, M. G., Catunda Júnior, F. E. A., & Cavalcante, T. T. A. (2018). Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 633–639. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0502-2>.
81. Spínola, V., Llorent-Martínez, E.J., Gouveia, S. and Castilho, P.C. (2014). *Myrica faya*: A New Source of Antioxidant Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9722–9735.
82. Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103(2), 381-388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.034>.
83. Tania, S., Rafael, L., Teresinha, N., Moritz, J., Maria, I., & Eduardo, M. (2009). Evaluation of antimicrobial and antiplatelet aggregation effects of *Solidago chilensis* Meyen. *International Journal of Green Pharmacy*, 3(1), 35. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.49372>.
84. Truong, D., Ta, N. T. A., Pham, T. V., Huynh, T. D., Do, Q. T. G., Dinh, N. C. G., Dang, C. D., Nguyen, T. K. C., & Bui, A. V. (2021). Effects of

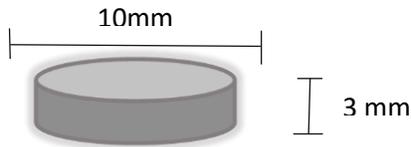
solvent—solvent fractionation on the total terpenoid content and in vitro anti-inflammatory activity of *Serevenia buxifolia* bark extract. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1720-1735. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2149>.

85. Unlu, A., Sar, T., Seker, G., Erman, A. G., Kalpar, E., & Yesilcimen Akbas, M. (2018). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains and their control by selected phytochemicals. *Journal of Medical Microbiology*, 67(9), 1210-1218. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000719>
86. Varga, S. A. (2021). Properties and uses of acetonitrile in analytical chemistry. *Journal of Analytical Chemistry*, 93(4), 456-465.
87. Vazquez-Sanchez D, Habimana O, Holck A (2013) Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. *Curr Microbiol* 66:110–121. doi:10.1007/s00284-012-0247-8.
88. Vlková, H., Sobotka, M., & Král, P. (2008). Survival of *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces and its relation to biofilm formation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.006>.
89. Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>.
90. Wirtanen, G., Ahola, W., & Mattila-Sandholm, T. (1995). Evaluation of cleaning procedures in elimination of biofilm from stainless steel surface in process equipment. *Food Bioproducts and Process*, 73, 9–16.
91. Zotolla, E. A., & Sasahara, K. C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, 23, 125–148.

15 ANEXOS







480  
DISCOS DE ACERO INOXIDABLE  
304

240 DISCOS DE A.I  
*S.aureus* ATCC 25923

240 DISCOS DE A.I  
*S.aureus* MRSA ATCC 43300

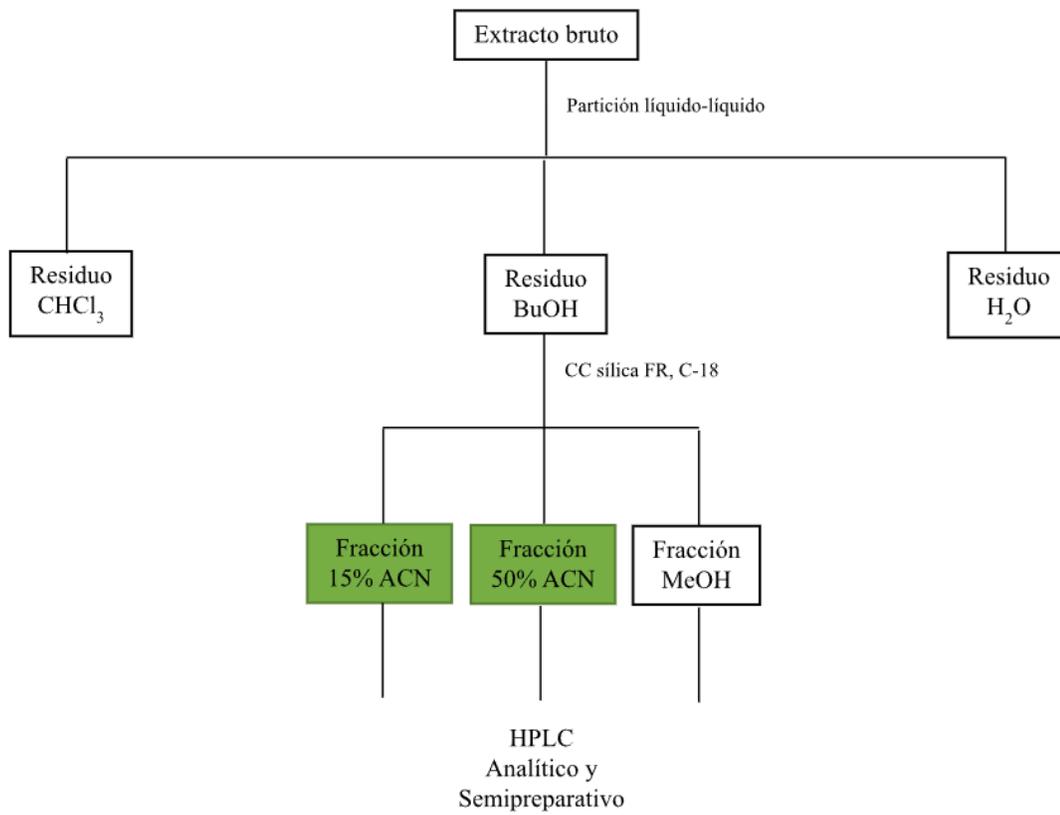
TIEMPO DE DESARROLLO DE LA  
BIOPELICULA

TIEMPO DE DESARROLLO DE LA  
BIOPELICULA

60 DISCOS

Fracción butanólico 50mg/ml  
Residuo butanólico 50mg/ml  
Medio TSB suplementado con glucosa  
1%+ disco A.I (control)

Fracción butanólico 50mg/ml  
Residuo butanólico 50mg/ml  
Medio TSB suplementado con glucosa  
1%+ disco de A.I (control)





# UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

## Facultad de Ciencias

---

Lima, 18 de setiembre de 2024

Dra. Dora Maurtua  
Universidad Peruana Cayetano Heredia  
Presente.-

Sea, la presente oportunidad para saludarla y comentarle que para el trabajo de tesis de su estudiante BRYAN ANDRÉ CANAL NÚÑEZ, fueron entregadas las siguientes muestras:

- 1 fracción 10% ACN RESIDUO BUTANOLICO DEL EBO DE TARA.
- 2 fracción 50% ACN DEL RESIDUO BUTANOLICO DEL EBL DE TARA
- 3 RESIDUO BUTANOLICO DE LA TARA.

Atentamente,

Dra. Ana Valderrama Negrón  
Jefa del Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos  
LIBIPMET

Nº	Extracto 0.25 mg/ml	RMN mg	LC-MS mg	AB g	Escherichia coli ATCC 25922	Staphylococcus aureus ATCC 25923	Bacillus subtilis ATCC 6633	Pseudomona aeruginosa ATCC 9036	Streptococcus mutans ATCC 25175
	<b>Manzanilla</b>								
1	RCHCl <sub>3</sub> (Residuo cloroformico)	82,5	7,2	20,035	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<b>Tara</b>								
2	10%ACN del RH <sub>2</sub> O (10% acetoniitrilo del residuo acuoso)	115,1	20,9	22,865	0.00	25.70	11.23	10.50	0.00
3	RBuOH (Residuo butanólico)	56,1	4,6	20,031	10.08	27.05	12.93	9.15	0.00
4	50% ACN del RBuOH (50% acetoniitrilo del residuo butanólico)	44,7	3,3	20,085	9.05	21.25	11.63	10.00	12.00
5	50%ACN del RH <sub>2</sub> O (50% acetoniitrilo del residuo acuoso)	63,7	5,2	15,097	7.80	23.40	11.60	13.25	0.00
6	10%ACN del RBuOH (10% acetoniitrilo del residuo butanólico)	95,3	5,6	20,064	7.70	20.80	12.03	12.25	0.00
7	RH <sub>2</sub> O (Residuo acuoso)	63,7	7,9	20,259	8.73	23.00	12.10	8.45	0.00
8	EBO (Extracto bruto orgánico)	80,4	9,1	20,077	8.65	27.15	11.65	10.80	10.60