



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomona aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

Luisa Fernanda Mercado-Tobio¹, Orfa Contreras-Martínez² M.Sc,
Alberto Angulo-Ortiz² M.Sc.

1. Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias Básicas.
Laboratorio de Productos Naturales. Car. 6a N° 76 – 103,
Montería, Córdoba, Colombia.

Resumen

El aumento desproporcionado de la resistencia bacteriana a múltiples fármacos se ha convertido en un problema de salud pública, producto del uso indiscriminado de estos medicamentos para contrarrestar diferentes patologías. *Pseudomona aeruginosa* es un patógeno oportunista involucrado en infecciones intrahospitalarias graves, gracias a la expresión de numerosos mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos, principalmente por la capacidad de formar biopelículas; esto le permite adherirse de forma estable a superficies bióticas (tejido vivo) o inertes y le otorga la habilidad para ser altamente resistente a diversos antibióticos, dificultando considerablemente su tratamiento y control. **Objetivo.** Evaluar la actividad antibiopelícula de los extractos de semilla en benzina de petróleo, carpelo en etanol y semilla en etanol de la especie *Trichilia hirta* frente aislados clínicos de *P. aeruginosa* en Montería-Córdoba. **Materiales y métodos.** Implementando los métodos de difusión en agar, microdilución y la prueba de inhibición en la formación de la biopelícula, se evaluó la actividad antibacteriana y antibiopelícula del material vegetal en estudio frente a 8 aislados clínicos y la cepa ATCC 27852 de *P. aeruginosa*. **Resultados.** El extracto de carpelo en etanol presentó actividad antibacteriana frente a las cepas evaluadas. Por otra parte, el extracto de semilla en benzina de petróleo fue más eficaz al momento de inhibir la formación de biopelícula. **Conclusión.** *T. hirta* posee metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y antibiopelícula.

Palabras claves: *Pseudomona aeruginosa*, actividad antibacteriana, actividad antibiopelícula, extractos vegetales, resistencia bacteriana.

Abstract

The disproportionate increase in bacterial resistance to multiple drugs has become a public health problem, as a result of the indiscriminate use of these drugs to counteract different pathologies. *Pseudomona aeruginosa* is an opportunistic pathogen involved in serious intrahospital infections, thanks to the expression of numerous intrinsic and acquired resistance mechanisms, mainly due to the ability to form biofilms; This allows it to adhere stably to biotic (living tissue) or inert surfaces and gives it the ability to be highly resistant to various antibiotics, making their treatment and control considerably difficult. **Objective.** Evaluate the antibiofilm activity of the seed extracts in petroleum benzene, carpel in ethanol and seed in ethanol of the *Trichilia hirta* species against *P. aeruginosa* clinical isolates in Montería-Córdoba. **Materials and methods.** Implementing the methods of agar diffusion, microdilution and the inhibition test in the formation of the biofilm, the antibacterial and antibiofilm activity of the plant material under study was evaluated against 8 clinical isolates and the strain ATCC 27852 of *P. aeruginosa*. **Results.** The carpel extract in ethanol showed antibacterial activity against the evaluated strains. On the other hand, the petroleum benzene seed extract was more effective at inhibiting biofilm formation. **Conclusion.** *T. hirta* has secondary metabolites with antibacterial and antibiofilm activity.

Keywords: *Pseudomona aeruginosa*, antibacterial activity, antibiofilm activity, plant extracts, bacterial resistance.

Introducción

A escala mundial, es alarmante el incremento de cepas bacterianas multirresistentes en centros hospitalarios, debido a los múltiples mecanismos de resistencia que expresan para defenderse de los antibacterianos; destacándose la formación de biopelículas como mecanismo preponderante en el proceso infeccioso [1,2]. Las biopelículas son reguladas por el Quorum Sensing, sistema de

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomona aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

señalizaciones químicas mediado por autoinductores, que les permite a los microorganismos patógenos comunicarse entre sí, interactuar como comunidad compleja y coordinar la expresión de genes y fenotipos, los cuales les proporciona resistencia y adaptabilidad a cualquier ambiente; además de ser el actor responsable de la maduración de películas y la expresión y secreción de factores de virulencia en las bacterias patógenas [1,2].

Las biopelículas bacterianas generan un gran impacto en el campo de la salud, atribuido a su alta incidencia en las infecciones hospitalarias. Éstas, son hábiles para formarse en cualquier tipo de superficies, entre ellas: implantes artificiales o dispositivos médicos, principalmente en dispositivos de asistencia ventricular, catéteres, válvulas cardíacas, mecánicas y marcapasos, prótesis articulares e implantes mamaros, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, entre otros [3,4]. Además, los microorganismos en biopelículas que influyen directamente en las infecciones intrahospitalarias son mucho más resistentes al tratamiento antibacteriano, agravando la salud del hospedero y volviendo ineficiente su sistema inmune para defenderse [5].

Pseudomona aeruginosa es uno de los principales patógenos oportunistas de gran relevancia clínica, formador de biopelículas por excelencia. Pertenece al grupo de patógenos llamado "ESCAPE" donde además se integran, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii* y las Enterobacterias; denominados de tal forma, por la capacidad de "escapar" de tratamientos antibacterianos, gracias a la multiresistencia que presentan frente a ellos [6]. *Pseudomona aeruginosa* se caracteriza por presentar mecanismos de resistencia intrínsecos: producción de β -lactamasas, modificación o disminución de porinas, plásmidos que codifican genes de resistencia, bombas de expulsión y baja permeabilidad de membrana; mecanismos de resistencia adquiridos por mutaciones y transferencia horizontal genética; factores de virulencia: pili tipo IV, flagelo, etc. Y factores de patogenicidad asociados a la formación de la biopelícula [7,8,9]. Por todo lo anterior, se le atribuye ser naturalmente resistente a la mayoría de las penicilinas, aminoglucósidos, quinolonas y β -lactámicos [7].

Pseudomona aeruginosa logra adaptarse a las condiciones medioambientales propias del entorno clínico, por lo que está involucrada directamente en las infecciones intrahospitalarias graves

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomona aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

o infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), afectando principalmente a pacientes inmunosuprimidos (diagnosticados con fibrosis quística, unidad de quemados, y sujetos a ventilación mecánica) especialmente a aquellos cuya instancia hospitalaria se da en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y en la unidad de críticos oncohematológicos [9,10]. Estas infecciones, aumentan los índices de morbimortalidad en pacientes hospitalizados, generando un grave problema de salud pública a nivel mundial. Asimismo, es responsable por causar sepsis, neumonía nosocomial, infecciones urinarias y de sitio quirúrgico, etc. [9, 11].

En Colombia, *P. aeruginosa* destaca por ubicarse en los primeros lugares de patógenos aislados con frecuencia en centros médicos, involucrada en diversas infecciones asociadas a la atención en salud. Un reporte epidemiológico realizado entre el 2018 y 2019, expuso a *P. aeruginosa* como uno de los patógenos con mayor frecuencia de aislamiento en pacientes hospitalizados, ubicándolo en cuarto lugar con un porcentaje de incidencia del 12.7% [32]. Asimismo, entre los años 2015 y 2017, este microorganismo presentó una frecuencia de aislamiento del 11.1% en pacientes que previamente tuvieron una intervención médica [33].

Por consiguiente, la comunidad científica ha enfocado su interés por encontrar sustancias bioactivas con potencial terapéutico, obtenidas a partir de plantas, algas e invertebrados marinos, debido a los efectos colaterales e incluso irreversibles, por someter a pacientes a tratamientos sintéticos. No obstante, hoy por hoy estas investigaciones van direccionadas mayormente a la búsqueda de moléculas capaces de inhibir la relación biopelícula-virulencia en patógenos oportunistas, considerando la agudeza de estas moléculas de configurar la expresión de genes bacterianos, mediante la inducción de metabolitos secundarios que puedan mimetizar las moléculas de señalización bacterianas [2,12].

Desde la antigüedad, las plantas han sido utilizadas en la etnobotánica, incluso en la actualidad, son aprovechadas sus propiedades curativas y terapéuticas por las comunidades étnicas y campesinas con escaso o nulo acceso a medicamentos; siendo una fuente valiosa, frente a un sinnúmero de afecciones que perjudican al ser humano [2,13]. Esta cualidad es atribuida por la presencia de metabolitos secundarios, con importante actividad biológica, dentro de las cuales se destaca, antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria,

antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, entre otras [14, 15, 16].

Trichilia hirta, perteneciente a la familia Meliaceae, es una planta utilizada en la medicina tradicional, para el tratamiento de afecciones respiratorias como asma bronquial, úlceras en la piel, neoplasias localizadas en el pulmón, próstata y otros tejidos. En países del Caribe se implementa como recurso antitumoral por pacientes con cáncer bajo tratamiento oncológico [17, 18]. Por otra parte, diferentes investigaciones han reportado actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antiparasitaria, citotóxica, actividad anti Quorum Sensing y antibiopelículas [14,15,16].

Esta investigación evaluó la actividad antibiopelícula de los extractos de semilla en benzina de petróleo, carpelo en etanol y semilla en etanol de la especie *T. hirta* frente aislados clínicos de *P. aeruginosa* en Montería-Córdoba, con el propósito de contribuir en la búsqueda de compuestos y moléculas de origen natural que puedan contribuir al control de este tipo de patógenos.

Materiales y métodos

Área de estudio

Esta investigación de tipo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de Productos Naturales (PRONAT), del programa de Química de la Universidad de Córdoba, en el área de bioensayos, bajo condiciones asépticas y estandarizadas que permitieran la reproducibilidad de este estudio.

Material vegetal

Se emplearon semillas y carpelos de la especie *T. hirta*, los cuales fueron colectados en la Universidad de Córdoba de la ciudad de Montería-Córdoba. Una muestra botánica fue identificada por miembros del Herbario de la Universidad de Córdoba (HUC), donde reposa con el número de colección HUC-6895.

Obtención de extractos vegetales

500 gramos de material seco y molido, fueron sometidos a extracción exhaustiva por el método de soxhlet con benzina de petróleo y concentrado a presión reducida en un Rotavapor Heidolph® G3 para eliminar el solvente de extracción. Posteriormente, el material

desengrasado por el método de soxhlet fue sometido a extracción exhaustiva por el método de maceración en frío con etanol (EtOH) al 96% durante 5 días; transcurrido este tiempo, la mezcla obtenida fue filtrada y concentrada. Una vez obtenidos los extractos secos, se realizaron diluciones empleando disolventes como tween 80 al 5% y dimetilsulfóxido al 10%, obteniendo las diferentes concentraciones para evaluar la actividad antibiopelícula (50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 y 5000ppm) [19].

Análisis fitoquímico preliminar

El análisis fitoquímico preliminar se realizó utilizando la metodología descrita por Pereira y colaboradores. Se realizó una detección preliminar de los siguientes metabolitos: alcaloides, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides y compuestos fenólicos [18].

Cepas bacterianas

Se emplearon 8 aislados clínicos de *P. aeruginosa* y la cepa de referencia ATCC 27852, como se observa en la tabla 1, donadas por el Laboratorio Clínico y de Patología Bernardo Espinosa, con previo consentimiento informado por el comité de ética de la institución. Las cepas bacterianas fueron crio-conservadas en caldo BHI que contenían 30% (v/v) de glicerol a -70°C de temperatura; y repicadas en subcultivos periódicos preservados a temperatura ambiente en caldo BHI y agar Cetrimide [21].

Microorganismo	Fuente de aislamiento
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Aspirado traqueal (69854)
	Aspirado traqueal (70034)
	Aspirado traqueal (94103)
	Aspirado traqueal (68920)
	Urocultivo (66354)
	Urocultivo (75783)
	Urocultivo (68803)
	Urocultivo
ATCC	27852

Tabla 1. Fuente de aislamiento cepas de *P. aeruginosa*.

Evaluación biológica de los extractos frente a las cepas bacterianas.

Mediante el método de difusión en agar, el método de microdilución y la prueba de inhibición de la formación de la biopelícula, se evaluó el efecto antibiopelícula de los extractos de *T. hirta* frente a los aislados

clínicos de *P. aeruginosa*. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado [20,21].

Preparación y estandarización del inóculo

A partir de un cultivo puro, se tomaron de dos a tres colonias bacterianas, se inocularon en 15 ml de caldo BHI y se incubaron durante 18 a 24 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del inóculo, midiendo la densidad óptica de cada dilución a 630nm en un espectrofotómetro GENESYS™, hasta alcanzar la concentración del inóculo deseado, que corresponde a valores de absorbancia entre 0.08 y 0.13 equivalente a una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml [20,22].

Método de difusión en agar empleando discos

Se utilizó la metodología propuesta por Kirby-Bauer en 1959. En cajas de Petri previamente esterilizadas, se realizó una siembra masiva y a profundidad de 1000µl del inóculo previamente estandarizado ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) por cada 25ml de agar cetrimide; una vez solidificado se dispusieron equidistantemente discos de papel filtro de 6mm de diámetro, previamente impregnados de extracto durante 18-24 horas a las concentraciones anteriormente descritas. De igual forma, se empleó ciprofloxacina como control positivo, y tween 80 al 5% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% como control negativo. Finalmente, las cajas fueron selladas e incubadas a 37°C durante 24 horas. La actividad antibiopelícula se evidenció por la ausencia de coloración verde en el agar (pigmento expresado por *P. aeruginosa* al formar biopelícula), midiendo los halos formados alrededor de los discos [20,22].

Método de microdilución

Se utilizaron microplacas de ELISA de 96 pozos, en las cuales se adicionaron 50µl de los extractos a las diferentes concentraciones anteriormente descritas y 50µl del inóculo bacteriano previamente estandarizado. A su vez, se sembraron el control positivo (ciprofloxacina) y el control negativo (tween 80 al 5% y dimetilsulfóxido al 10%) con el inóculo bacteriano, respectivamente. Posteriormente, se realizó una lectura previa en el lector de ELISA (ChroMate®4300) a 650nm y las microplacas fueron selladas e incubadas a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, se efectuó una segunda lectura, midiendo los valores de absorbancia y

realizando una diferencia con los valores anteriormente medidos [20,22].

Prueba de inhibición en la formación de la biopelícula

Se empleó la metodología utilizada por O´toole y Kolter en 1998 con modificaciones; esta técnica también es conocida como ensayo de cristal violeta. Inicialmente, se estandarizó el inóculo bacteriano tal y como se describió anteriormente, luego en microplacas de ELISA de 96 pozos se adicionaron 50µl de los extractos a las diferentes concentraciones anteriormente descritas y 50µl del inóculo bacteriano, a su vez, ciprofloxacina como control positivo, y tween 80 al 5% y dimetilsulfoxido al 10% como controles negativos; las microplacas fueron selladas e incubadas a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, se realizó una lectura en el lector de ELISA (ChroMate®4300) midiendo los valores de absorbancia a 630nm.

Seguido al paso anterior, se invirtió la microplaca de ELISA sobre papel absorbente y se lavó 3 veces con buffer fosfato salino (BPS-pH7.4), con el fin de eliminar las bacterias en estado plantónico que no formaban parte de la biopelícula.

Seguidamente, se adicionaron 100µl de metanol (CH₃OH) absoluto durante 15 minutos para fijar las biopelículas adherentes y luego se descartó dejando secar las microplacas a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 100µl de cristal violeta al 1% en cada uno de los pozos durante 15 minutos. El exceso de tinte se eliminó enjuagando las microplacas tres veces con BFS. Se adicionó 100 µl de DMSO puro durante 30 minutos, con la intención de solubilizar el exceso de cristal violeta adherido a las paredes de los pozos. Finalmente se realizó una lectura en el lector de ELISA midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 630nm (ChroMate®4300) [21].

Para calcular el porcentaje de formación de biopelícula, se implementó la siguiente fórmula matemática:

$$PF = \frac{BFC \times 100\%}{C}$$

$$PI = 100\% - PF$$

Dónde:

- C= Biopelícula formada por la cepa pura sin la adición de extractos.
- BFC= Resultado de la biopelícula formada en presencia del extracto.
- PF= Porcentaje de formación.
- PI= Porcentaje de inhibición.

Teniendo en cuenta que el control de crecimiento (microorganismo sin sustancia) fue el punto de referencia, se estableció que los porcentajes obtenidos mayores al control, correspondieron a la formación de biopelícula, mientras que, los porcentajes obtenidos menores al control se establecieron como inhibición de la formación de la biopelícula. Los resultados se reportaron en términos de porcentaje de inhibición, puesto que el objetivo del proyecto fue evaluar la capacidad de los extractos de *T. hirta* en inhibir las biopelículas formadas por las cepas de *P. aeruginosa* [23].

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de la actividad biológica de los extractos frente a las cepas bacterianas, se estableció un diseño en bloques completo al azar con estructura factorial, donde la variable dependiente fue la absorbancia y los factores fueron extracto y concentración. Inicialmente, se evaluó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilks; luego, se aplicó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre las medianas de los datos y, por último, se aplicó una prueba de comparación de Tukey para determinar cuál de los extractos tuvo mayor significancia frente a las cepas bacterianas. Todo lo anterior, se realizó en el programa Infostat Ver. 20201. Asimismo, se realizaron tablas y gráficos en el programa Microsoft Excel 2019.

Todas las pruebas aplicadas se evaluaron con un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0,05$).

Resultados

El análisis fitoquímico realizado a cada uno de los extractos, arrojó la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: esteroides o triterpenoides, fenoles, flavonoides, taninos y saponinas, y alcaloides como se observa en la tabla 2.

Extracto	Esteroides o Triterpenoides	Fenoles	Flavonoides	Alcaloides
Carpelo en etanol	++	+++	++	+
Semilla en benzina de petróleo	+++	-	-	-
Semilla en etanol	+++	-	-	-

Tabla 2. Análisis fitoquímico de los extractos: semilla en benzina de petróleo mediante el método de soxhlet, semilla en etanol y carpelo en etanol. (-) Ausencia, (+) Presencia, (++) Presencia moderada, (+++) Presencia abundante.

Al llevar a cabo la metodología de difusión en agar, no se observó formación de halos de inhibición en el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa* al exponerse a cada uno de los extractos a las diferentes concentraciones. No obstante, para el caso del control positivo: ciprofloxacina a 5000ppm, se percibió halos de inhibición en promedio de 30 ± 5 mm. Los disolventes tween 80 y DMSO usados para los extractos, no arrojaron resultados, confirmando la inocuidad de estos.

Los resultados obtenidos por el método de microdilución muestran una disminución en el crecimiento bacteriano a medida que aumentan las concentraciones, exceptuando el extracto de semilla en etanol, donde, no se evidenció reducción en el crecimiento de los microorganismos. El extracto de semilla en benzina de petróleo únicamente mostró mayor actividad frente a la cepa *P. aeruginosa* 94103 a una concentración de 5000ppm, mientras que, en el resto de las cepas evaluadas, el extracto no tuvo ningún efecto en ninguna de las concentraciones.

En cuanto al extracto de carpelo en etanol, para la cepa *P. aeruginosa* urocultivo, se evidenció un mayor efecto inhibitorio a la concentración de 3500ppm; para el caso de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27852, esta presentó mayor sensibilidad a la concentración de 5000ppm; asimismo fue el caso para las cepas *P. aeruginosa* 66354 y *P.*

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

aeruginosa 68920. La cepa *P. aeruginosa* 68803 tuvo mayor efecto inhibitorio a la concentración de 3000ppm, la cepa *P. aeruginosa* 75783, mostró mayor reducción en su crecimiento frente a la concentración de 4000ppm, y para las cepas *P. aeruginosa* 69854 y *P. aeruginosa* 70034 ambas presentaron mayor inhibición en su crecimiento frente a la concentración de 2000ppm, como se observa en la tabla 3.

Cepa	Extracto	Concentración	Control de crecimiento	Crecimiento neto	Control positivo
Uro	CEtOH	3500ppm	0,630	0,350	0,369
27852	CEtOH	5000ppm	0,799	0,371	0,298
66354	CEtOH	5000ppm	1,330	0,375	0,316
68803	CEtOH	3000ppm	1,290	0,360	0,174
68920	CEtOH	5000ppm	1,120	0,198	0,226
69854	CEtOH	2000ppm	0,725	0,238	0,212
70034	CEtOH	2000ppm	0,823	0,455	0,224
75783	CEtOH	4000ppm	1,264	0,763	0,274
94103	SBP	5000ppm	1,326	0,662	0,161

Tabla 3. Ensayos de microdilución después de 24 horas de incubación. Control de Crecimiento (Microorganismo sin sustancia antibacteriana); Crecimiento neto (Microorganismo con extractos a evaluar); Uro (Urocultivo); CEtOH (extracto carpelo en etanol); SBP (extracto de semilla en benzina de petróleo).

Los resultados del método de microdilución se resumen en el anexo 1.

En la actividad antibiopelícula se observó que, a bajas concentraciones de los extractos, disminuyó la formación de biopelícula en las cepas bacterianas, a excepción del extracto de semilla en etanol que no presentó actividad. Por otra parte, en las concentraciones más altas se presentó un aumento en la producción de biopelícula en comparación con el control. Estos resultados muestran un comportamiento contrario a los obtenidos en los ensayos de microdilución. El extracto de carpelo en etanol únicamente mostró actividad inhibitoria en los microorganismos *P. aeruginosa* 66354 a 50ppm y *P. aeruginosa* 75783 a 1000ppm, arrojando un porcentaje de inhibición de 63% y 61% respectivamente.

El extracto de semilla en benzina de petróleo inhibió mayormente la formación de biopelícula; esto se evidenció en los aislados clínicos *P. aeruginosa* 69854 y *P. aeruginosa* 68920 a 50ppm, mostrando un porcentaje de inhibición de 31% y 90% respectivamente. Asimismo, para la cepa ATCC 27852 a 100ppm el porcentaje de inhibición fue de 69%. El aislado *P. aeruginosa* urocultivo a la concentración de

500ppm arrojó un porcentaje de inhibición de 91% y para la cepa *P. aeruginosa* 68803 a 1000ppm el porcentaje de inhibición fue de 72%.

En cuanto a las cepas *P. aeruginosa* 70034 y *P. aeruginosa* 94103 no se evidenció inhibición en la formación de biopelícula por parte de los extractos. Todo lo anterior se observa en la tabla 4.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN			
Cepa	Extracto	Concentración	Porcentaje
Uro	SBP	500	91%
27852	SBP	100	69%
66354	CEtOH	50	63%
68803	SBP	1000	72%
68920	SBP	50	90%
69854	SBP	50	31%
70034	-	-	-
75783	CEtOH	1000	61%
94103	-	-	-

Tabla 4. Mayores porcentajes de inhibición en la formación de biopelícula.

Los resultados de la actividad antibiopelícula se resume en el anexo 2 y 3.

El análisis estadístico arrojó que los datos obtenidos en el método de microdilución y la prueba de inhibición en la formación de la biopelícula, no tuvieron una distribución normal, evidenciándose en los resultados obtenidos en el test de Shapiro-Wilks, por lo tanto, se realizó un análisis con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en la cual los factores y la interacción entre estos presentaron ser significantes con $\alpha=0,05$ como se muestra en la tabla 5 y 6, indicando que los extractos evaluados afectan la absorbancia para las diferentes cepas bacterianas. Las tablas 3 y 4 muestran las combinaciones más significantes con un $\alpha=0,05$ según el test de Tukey para el ensayo de microdilución y la prueba de inhibición en la formación de la biopelícula, respectivamente.

Cepas	P-valor	Cepas	P-valor
Uro	<0,0001	Uro	<0,0001
27852	<0,0001	27852	<0,0001
66354	0,0214	66354	<0,0001
68803	<0,0001	68803	<0,0001
68920	<0,0001	68920	<0,0001
69854	<0,0001	69854	<0,0001
70034	<0,0001	70034	<0,0001
75783	<0,0001	75783	<0,0001
94103	<0,0001	94103	<0,0001

Tabla 5: P valor para las pruebas de Shapiro-Wilks (izquierda) y Kruskal-Wallis (derecha) de los datos obtenidos en la actividad antibacteriana por el método de microdilución.

Cepas	P-valor	Cepas	P-valor
Uro	<0,0001	Uro	<0,0001
27852	<0,0001	27852	<0,0001
66354	<0,0001	66354	<0,0001
68803	<0,0001	68803	<0,0001
68920	<0,0001	68920	<0,0001
69854	<0,0001	69854	<0,0001
70034	<0,0001	70034	<0,0001
75783	<0,0001	75783	<0,0001
94103	<0,0001	94103	<0,0001

Tabla 6: P valor para las pruebas de Shapiro-Wilks (izquierda) y Kruskal-Wallis (derecha) de los datos obtenidos en la actividad antibiopelícula.

Discusión

La familia Meliaceae ha sido objeto de estudio en los últimos años, debido a sus diversas propiedades terapéuticas y medicinales atribuidas a la variedad de metabolitos secundarios que presenta, destacándose: flavonoides, alcaloides, lignanos, quinonas, taninos, cumarinas, terpenoides, saponinas, entre otros; a los cuales se les otorga actividad antimicrobiana, antibiopelícula, control en la producción del Quorum Sensing e inhibición en la producción de capsulas bacterianas y toxinas [12,24].

Trichilia hirta es fuente de alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides, fenoles y taninos, entre otros; resaltando que, estos fitoquímicos son procedentes de las diferentes estructuras que conforman a la planta (raíz, tallo, hoja, corteza, flor, fruto, semilla, etc.) [24,25]. Cabe resaltar, el interés de realizar un análisis fitoquímico preliminar a las diferentes estructuras vegetales usadas en la investigación, donde se logró evidenciar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios, como se observa en la tabla 2, tal como lo realizó Pereira *et al.* en el 2009 [18], quienes realizaron

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomona aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

un tamizaje fitoquímico a los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de *T. hirta* e igualmente Hernández *et al.* en el 2010 [26], donde realizaron un estudio de la estabilidad físico-química e identificación fitoquímica de extractos etanólicos de *T. hirta* (Meliaceae).

En esta investigación el extracto de carpelo en etanol resalta por la variedad de metabolitos secundarios que presenta e igualmente los extractos de semilla en benzina de petróleo y el extracto de semilla en etanol, con presencia abundante de esteroides y triterpenoides. Teniendo en cuenta los métodos empleados para la obtención de los extractos (soxhlet y maceración en frío), éstos permiten que los extractos resultantes conserven sus propiedades fitoquímicas intactas, para ser aprovechados en la investigación [27].

En cuanto a los resultados obtenidos en el método de difusión en agar empleando discos, es importante mencionar la viabilidad y reproducibilidad de este tipo de ensayos; por lo tanto, se recomienda al evaluar cualitativamente el efecto de sustancias bioactivas frente a microorganismos de interés clínico [28]. Sin embargo, teniendo en cuenta que no se observaron halos de inhibición por efecto de los extractos, estos resultados se toman en consideración dado que, dependen directamente de la elección de las metodologías más adecuadas teniendo en cuenta la naturaleza de los extractos; puesto que, para los extractos no polares (sustancias lipídicas), en este caso el extracto de semilla en benzina de petróleo, sus constituyentes puede que no se difundan correctamente en el agar, por lo que se recomienda aplicar técnicas de microdilución [20].

Asimismo, para los extractos de semilla y carpelo en etanol, el papel filtro Whatman empleado para los sensidiscos está compuesto de celulosa, y a su vez, las moléculas de glucosa que hacen parte de su estructura química, presentan grupos hidroxilos libres haciendo que la superficie del disco sea hidrófila; por tanto, los extractos etanólicos al ser de naturaleza polar, algunos de sus compuestos son de origen catiónico, trayendo consigo que estas moléculas se retengan y se adhieran a la superficie del disco, dificultando su adecuada difusión en el agar [20,22,28].

Por otra parte, la correcta difusión de los compuestos depende directamente de otros factores a tomar en consideración tales como: el número, tamaño y la forma de las partículas. Las moléculas se difunden más rápido a un gradiente de concentración más alto, las

partículas pequeñas se difunden mucho más rápido que las partículas grandes y a medida que aumenta el radio de las moléculas, se espera que la difusión disminuya proporcionalmente, debido al aumento de las interacciones soluto-disolvente [22].

En la actualidad, son escasas las publicaciones donde evalúen el potencial antimicrobiano y antibiopelícula de extractos obtenidos a partir de la especie *T. hirta*, por tanto, en esta investigación se tomaron en cuenta estudios realizados con especies vegetales pertenecientes a la familia Meliaceae.

El extracto de carpelo en etanol y el extracto de semilla en benzina de petróleo manifestaron actividad antimicrobiana frente a las cepas bacterianas ensayadas en el método de microdilución, siendo más eficaz en la actividad el extracto etanólico; estos resultados se soportan con los reportados por Mathews 2007 [27], quien evalúa la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de hoja y corteza de la especie *Cedrela odorata*, destacándose la actividad de los extractos metanólicos y etanólicos de corteza frente a las cepas de *P. aeruginosa*. Gómez 2014 [13], también evaluó la actividad antibacteriana de microorganismos gram positivos y gram negativos frente a los extractos metanólicos, hexánicos y acetato de etilo de hojas, corteza y flores de *C. odorata*, encontrándose que los extractos metanólicos de hojas y acetato de etilo de flores resultaron ser los más efectivos, puesto que, inhibieron a cinco de las seis bacterias ensayadas, entre ellas *P. aeruginosa*.

Asimismo, se complementan con los resultados obtenidos por Reyes y Fernández 2013 [29], donde publican la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Azadirachta indica* frente a microorganismos gram positivos, gram negativos y cepas fúngicas; obteniendo que, el extracto es de alta efectividad frente a *P. aeruginosa* y el resto de las especies microbianas evaluadas. Igualmente, Mickymaray 2019 [12], reportó la actividad antibacteriana de extractos etanólicos, metanólicos, acuosos y diclorometano de las especies *Walsura robusta*, *Swietenia mahagoni*, *Azadirachta indica*, *Ekebergia capensi*, *Trichilia emetica*, *Melia azedarach*, frente a microorganismos gram positivos, gram negativos y fúngicos, resaltando su actividad por la presencia de bioactivos tales como: flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, terpenoides, taninos y saponinas, entre otros; siendo efectivos contra *P. aeruginosa* validando los resultados obtenidos en la investigación.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

El extracto de carpelo en etanol y el extracto de semilla en benzina de petróleo mostraron actividad antibiopelícula frente a la mayoría de las cepas bacterianas ensayadas empleando la técnica de cristal violeta; tal como lo reportaron Anh Ta *et al.* en el 2014 [16], quienes ensayaron extractos etanólicos de corteza, madera, hojas y flores de 30 especies de la familia Meliaceae (incluida *T. hirta*), evaluando su actividad anti Quorum Sensing y antibiopelícula frente a cepas de *Chromobacterium violaceum* y *P. aeruginosa*; reportando que estas presentan actividad antibiopelícula, resaltando a las especies *Carapa guianensis*, *Chukrasia tabularis*, *Swietenia mahogani* y *Trichilia martiana* las cuales tuvieron mayor eficacia en la inhibición de la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*. Igualmente, Jahan *et al.* en el 2018 [30], evaluaron los extractos metanólicos y acetato de etilo de hojas, flores, corteza, tallo, semilla, fruto y raíz de 4 especies de plantas, entre ellas *Azadirachta indica* frente a cepas de *P. aeruginosa*, donde reportaron que *A. indica* tiene fuerte actividad biológica, debido a que los extractos de esta destacaron como agentes antibiopelícula.

Según Anh Ta en el 2015 [31], los extractos de plantas suelen contener de varios cientos a más de mil compuestos diferentes. Es posible que los compuestos con modos de acción opuestos estén presentes en el mismo extracto y que los compuestos activos no estén presentes en concentraciones lo suficientemente altas como para provocar una respuesta lícita. El escenario opuesto también es posible cuando los diferentes compuestos actúan en sinergia para amplificar la actividad observada.

Conclusiones

La especie *T. hirta* es una fuente promisoría de metabolitos secundarios como triterpenoides y fenoles con importante actividad frente a *P. aeruginosa*, por lo que es fundamental continuar su estudio en la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana y antibiopelícula.

Se ratifica mayor sensibilidad al método de microdilución en comparación con el método de difusión en agar empleando discos, al realizar ensayos de actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a cepas de *P. aeruginosa*.

La técnica de cristal violeta es un método eficaz para la evaluación de la actividad antibiopelícula de extractos vegetales frente a cepas de *P. aeruginosa*, dada la efectividad del extracto de semilla en benzina de petróleo y carpelo en etanol frente a la mayoría de cepas evaluadas.

Recomendaciones

Separar, identificar y elucidar las moléculas presentes en cada uno de los extractos estudiados donde se encontró actividad antibacteriana y antibiopelícula y realizar estudios de actividad biológica por separado, para determinar el compuesto responsable.

Realizar ensayos de viabilidad celular para establecer la inocuidad de los extractos vegetales frente a las células humanas.

Realizar estudios de actividad antioxidante, antitumoral, antiparasitaria, insecticida, citotóxica utilizando la especie *T. hirta* con el propósito de evaluar su posible potencial biológico.

Agradecimientos

A la Universidad de Córdoba quien me brindó mi formación profesional, al Laboratorio Clínico y de Patología Bernardo Espinosa por la donación de los aislados clínicos y la Cepa ATCC respectivamente. Al semillero de investigación MICROBIOL y al grupo de investigación Química de los Productos Naturales (PRONAT).

Referencias bibliográficas

1. Ćirić A, Petrović J, Glamočlija J, Smiljković M, Nikolić M, Stojković D, Soković M. Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends. *South African Journal of Botany*. 2018; 120:65-80.
2. Brango J, Castellanos L, Arévalo C. Búsqueda de Compuestos Inhibidores de Quorum Sensing (IQS) a Partir de Extractos de Origen Natural. Primera Fase. [tesis de maestría]. Bogotá (CO): Universidad Nacional de Colombia, Bogotá; 2011.
3. Soo Joo-H, Otto M. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.* 2012;19(12):1503-1513.
4. Baldión M, Huertas M, Yepes A. Biopelículas bacterianas de tubo-oro-traqueal y su sensibilidad antimicrobiana en dos UCIS

- en Bogotá, Colombia. Bogotá (CO): Universidad del Rosario, Bogotá; 2020.
5. Alam K, Al Farraj D, Mah-e-Fatima S, Arfat M, Soliman M, Alkufeidy R, Mustafa A, Bhasme P, Alshammari M, Alkubaisi N, Mehmood A, Alam T. Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Infection and Public Health*. 2020; <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.007>.
 6. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*. 2019; 44:26-47.
 7. Pang Z, Raudonis R, Glick B, Lin T, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019; 37(1): 177-192.
 8. Azam M, Khan A. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. 2018; 24(1): 350-359.
 9. Paz V, Mangwani S, Martínez A, Álvarez D, Solano S, Vásquez R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chilena Infectol*. 2019; 36(2): 180-189.
 10. Inadina R. Factores asociados a la resistencia antibiótica por *Pseudomonas aeruginosa* extremadamente resistente, en pacientes adultos del hospital alta complejidad Virgen de la Puerta, 2017-2019. [tesis de pregrado]. Trujillo (Perú): Universidad Privada Antenor Orrego, Perú; 2020.
 11. Brindhadevi K, Lewis F, Mylonakis E, Shanmugam S, Nath T, Pugazhendhi A. Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry* 96. 2020; 49–57.
 12. Mickymary S. Efficacy and Mechanism of Traditional Medicinal Plants and Bioactive Compounds against Clinically Important Pathogens. *Antibiotics*. 2019; 8:257.
 13. Gómez C. Actividad biológica de *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) e identificación de sus metabolitos secundarios. [tesis de pregrado]. Chiapas (MEX): Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México; 2014.
 14. Hernández E, Mora N, Morris H, Delgado L, Martínez C. Actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia*

- hirta* sobre células tumorales humanas. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2013; 32(1):93-101.
15. Hernández E, Batista A, Portuondo D, Tamayo V, Mora N, Morris H, Martínez H. Immunorestorative in immunosuppressed Balb/c mice and cytotoxic activity of water extract from *Trichilia hirta* root. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2010; 9(6):457-464.
 16. Anh C, Freundorfer M, Mah T, Otálora M, García M, Sánchez P, Poveda L, Maschek A, Baker B, Adonizio A, Downum K, Durst T, Arnason J. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing and Biofilm Formation by Extracts of Neotropical Rainforest Plants. Planta Med. 2014; 80:343–350.
 17. Hijuelo Y. Etnobotánica y medicina herbolaria. Batey: Revista Cubana de Antropología Sociocultural. 2013; 3(3): 84-89.
 18. Pereira S, Vega D, Almeida M, Morales C. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. Revista Química Viva. 2009; 8(3):192-199.
 19. Angulo A, Torres O, Santafe G, Contreras O. Búsqueda de sustancias químicas en la flora Cordobesa (Informe final de proyecto de investigación). Córdoba: Universidad de Córdoba (Colombia). 2011.
 20. Ramirez L, Marin D. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica año XV 2009; 42: 263-268.
 21. O´Toole G, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology. 1998; 28(3):449–461.
 22. Valgas C, Machado S, Smânia E, Smânia A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology. 2007; 38:369-380.
 23. Martínez Y, Arévalo C. "Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad antifouling de compuestos de origen natural." [tesis de maestría]. Bogotá (CO): Universidad Nacional de Colombia, Bogotá; 2010.

24. Rojas J, Pérez A, Martínez J, Mieles J. Actividad antibacteriana de extracto de hojas de *Melia azedarach* L. Revista Colombiana de Biotecnología. 2012; 14(1):224-232.
25. Bouyahya A, Dakka N, Et-Touys A, Abrini J, Bakri Y. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2017; 10(8):729-743.
26. Hernández E, Aguilar B, Martín Y. Estudio de estabilidad físico-química e identificación fitoquímica de extractos etanólicos de *Trichilia hirta* (Meliaceae). Revista Cubana de Química. 2010; 22(1):22-26.
27. Mathews J. actividad bactericida y fungicida de extractos crudos de cuatro especies forestales. [Tesis de pregrado]. Tingo María (PERÚ): Universidad Nacional Agraria De La Selva, Perú; 2007.
28. Grant J, Jordan E, Bregu M, Mearns-Spragg A, Boyd K. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. Journal of Biotechnology 70. 1999; 27-32.
29. Reyes D, Fernández R. Efecto biocida *in vitro* del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus sp* y *Pseudomonas sp*. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2013; 17(3): 27-32.
30. Jahan M, Abuhena M, Kalam A, Minnatul M. *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of selected medicinal plants and spices extracts against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2018; 7(3): 2114-2121.
31. Anh Ta. Bacterial biofilm inhibition and antifungal activity of neotropical plants. [Tesis Post Doctoral]. Ottawa (CANADÁ): University of Ottawa, Canadá: 2015.
32. Pardo R. Caracterización epidemiológica de Infecciones asociadas a dispositivos en hospital del Caribe colombiano, 2018-2019.
33. Hernández O, Camacho O, González H, Bolívar S, Campo M, Zuluaga I. Impacto sobre la resistencia bacteriana de la revisión previa de la prescripción de antibióticos por el servicio farmacéutico en hospitales del Atlántico (Colombia). Salud Uninorte. 2020; 35(2).

Anexos

EXTRACTO DE SEMILLA EN ETANOL

CONCENTRACIÓN (PPM)

Cepas	Ctrol Crec.	Ctrol Positivo	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
Uro	0,946	0,231	0,419	0,387	0,696	0,786	0,830	0,894	0,900	0,915	0,923	0,981	1,007	0,895
27852	0,790	0,282	0,438	0,413	0,385	0,483	0,489	0,527	0,581	0,640	0,682	0,735	0,750	0,807
66354	1,348	0,274	0,631	0,645	0,640	0,689	0,680	0,706	0,738	0,751	0,842	0,857	0,856	0,776
68803	1,281	0,575	1,032	1,044	0,944	0,843	0,891	0,963	1,047	1,096	1,091	1,210	1,237	1,251
68920	1,174	0,219	0,290	0,253	0,311	0,335	0,409	0,495	0,583	0,642	0,612	0,748	0,747	0,768
69854	0,858	0,287	0,254	0,234	0,303	0,364	0,354	0,385	0,484	0,505	0,532	0,606	0,662	0,694
70034	1,030	0,222	0,384	0,434	0,538	0,537	0,646	0,610	0,651	0,703	0,772	0,744	0,796	0,802
75783	1,286	0,181	0,817	0,783	0,740	0,719	0,721	0,733	0,764	0,790	0,785	0,819	0,858	0,846
94103	1,285	0,423	0,699	0,735	0,786	0,899	0,938	1,023	0,990	1,021	1,007	0,994	1,048	0,971

EXTRACTO DE CARPELO EN ETANOL

CONCENTRACIÓN (PPM)

Cepas	Ctrol Crec.	Ctrol Positivo	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
Uro	0,630	0,369	0,471	0,494	0,449	0,496	0,512	0,450	0,470	0,427	0,350	0,368	0,372	0,395
27852	0,799	0,298	0,392	0,441	0,442	0,407	0,405	0,397	0,424	0,402	0,410	0,401	0,379	0,371
66354	1,330	0,316	0,768	0,766	0,706	0,682	0,712	0,641	0,524	0,494	0,382	0,469	0,401	0,375
68803	1,290	0,174	0,874	0,851	0,856	0,852	0,872	0,848	0,708	0,360	0,532	0,583	0,517	0,447
68920	1,120	0,226	0,369	0,330	0,275	0,357	0,289	0,306	0,301	0,234	0,205	0,227	0,210	0,198
69854	0,725	0,212	0,274	0,263	0,273	0,278	0,187	0,238	0,262	0,246	0,278	0,260	0,265	0,261
70034	0,823	0,224	0,406	0,382	0,400	0,408	0,443	0,391	0,456	0,451	0,464	0,448	0,454	0,455
75783	1,264	0,274	0,838	0,821	0,849	0,899	0,830	0,809	0,803	0,890	0,814	0,763	0,783	0,802
94103	1,249	0,255	0,721	0,738	0,694	0,786	0,703	0,721	0,735	0,716	0,690	0,708	0,778	0,735

EXTRACTO DE SEMILLA EN BENZINA DE PETRÓLEO

CONCENTRACIÓN (PPM)

Cepas	Ctrol Crec.	Ctrol Positivo	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
Uro	0,843	0,228	0,870	0,510	0,939	0,905	0,887	1,015	0,987	1,038	1,008	0,925	0,795	0,753
27852	0,919	0,205	1,321	1,381	1,347	1,391	1,312	1,284	1,228	1,182	1,131	1,162	1,259	1,180
66354	1,270	0,203	0,914	1,075	1,010	1,052	0,967	0,992	1,014	1,001	0,948	0,972	0,978	0,939
68803	1,331	0,210	0,708	0,846	0,838	0,937	0,914	1,170	1,014	0,958	1,009	1,020	0,908	0,919
68920	0,753	0,001	1,023	0,974	1,032	1,050	1,016	0,663	1,044	1,041	0,971	0,921	0,873	0,805
69854	0,914	0,231	1,260	1,302	1,132	1,261	1,283	1,217	1,213	1,143	1,075	1,054	1,037	1,039
70034	0,911	0,214	1,319	1,328	1,324	1,382	1,316	1,242	1,127	1,155	1,145	1,151	1,125	1,081
75783	1,266	0,172	1,225	1,079	1,136	1,093	1,148	1,134	0,930	0,934	0,996	0,988	0,925	0,909
94103	1,326	0,161	1,073	1,272	1,064	1,013	0,965	0,943	0,944	0,885	0,810	0,800	0,754	0,662

Anexo 1: Valores de absorbancia para el método de microdilución. Ctrol Crec: control de crecimiento; Ctrol Positivo: control positivo; Uro: Urocultivo.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

EXTRACTO DE SEMILLA EN BENZINA DE PETRÓLEO

CONCENTRACIÓN (PPM)

	MO	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
66354	0,058	0,047	0,032	0,043	0,054	0,092	0,089	0,126	0,191	0,182	0,258	0,301	0,345
68803	0,092	0,044	0,036	0,033	0,026	0,086	0,090	0,070	0,063	0,073	0,067	0,071	0,130
68920	0,184	0,018	0,041	0,316	0,520	0,601	0,444	0,574	0,607	0,689	0,737	0,704	0,868
69854	0,075	0,052	0,082	0,512	0,544	0,646	0,698	1,687	1,422	1,192	1,396	2,150	1,535
70034	0,115	0,514	0,256	0,370	0,497	0,702	0,625	0,617	0,538	0,645	0,636	0,584	0,693
75783	0,114	0,451	0,457	0,376	0,291	0,355	0,334	0,401	0,641	0,560	0,615	0,796	0,922
94103	0,060	1,105	0,275	0,698	0,955	1,059	1,054	0,999	1,085	1,245	1,200	1,325	1,598
27852	0,099	0,037	0,031	0,033	0,034	0,228	0,155	0,348	0,282	0,187	0,218	0,313	0,443
URO	0,306	0,039	0,044	0,028	0,032	0,089	0,151	0,138	0,307	0,320	0,323	0,359	0,474

EXTRACTO DE CARPELO EN ETANOL

CONCENTRACIÓN (PPM)

	MO	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
66354	0,060	0,022	0,042	0,051	0,031	0,196	0,049	0,049	0,113	0,353	0,299	0,261	0,297
68803	0,059	0,146	0,115	0,125	0,095	0,107	0,108	0,210	0,225	0,423	0,321	0,314	0,557
68920	0,006	0,020	0,018	0,047	0,068	0,082	0,094	0,164	0,205	0,248	0,208	0,288	0,470
69854	0,043	0,568	0,740	0,746	0,513	0,650	0,830	0,816	1,270	1,173	1,582	1,053	1,209
70034	0,077	0,129	0,142	0,150	0,150	0,193	0,213	0,208	0,207	0,235	0,258	0,256	0,355
75783	0,118	0,064	0,049	0,058	0,045	0,146	0,123	0,093	0,124	0,097	0,095	0,097	0,165
94103	0,109	0,165	0,162	0,165	0,163	0,230	0,225	0,224	0,227	0,239	0,245	0,237	0,392
27852	0,108	0,049	0,043	0,072	0,072	0,108	0,089	0,152	0,156	0,233	0,256	0,342	0,346
URO	0,174	0,105	0,135	0,101	0,079	0,169	0,177	0,168	0,217	0,209	0,249	0,151	0,405

EXTRACTO DE SEMILLA EN ETANOL

CONCENTRACIÓN (PPM)

	MO	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
66354	0,127	0,353	0,314	0,188	0,208	0,241	0,219	0,181	0,287	0,218	0,213	0,293	0,592
68803	0,068	0,098	0,113	0,216	0,269	0,353	0,330	0,347	0,397	0,592	0,446	0,543	1,230
68920	0,045	0,457	0,518	0,687	0,602	0,697	0,746	0,847	0,815	0,969	0,869	1,114	1,489
69854	0,008	1,041	1,081	1,046	1,315	1,470	1,014	1,007	0,957	0,998	1,165	1,024	1,787
70034	0,065	0,348	0,410	0,266	0,295	0,334	0,344	0,390	0,395	0,382	0,483	0,483	0,739
75783	0,090	0,068	0,122	0,228	0,304	0,309	0,326	0,305	0,326	0,390	0,304	0,280	0,343
94103	0,127	0,699	0,735	0,786	0,899	0,938	1,023	0,990	1,021	1,007	0,994	1,048	0,971
27852	0,137	0,186	0,197	0,298	0,232	0,306	0,346	0,334	0,355	0,350	0,387	0,427	0,486
URO	0,117	0,155	0,136	0,160	0,149	0,137	0,185	0,279	0,188	0,250	0,283	0,267	0,539

Anexo 2: Valores de absorbancia para el método de antibiopelícula. MO: Microorganismo sin sustancia.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.

EXTRACTO SEMILLA EN BENZINA DE PETRÓLEO

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN												
	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
66354	19%	46%	27%	8%	-58%	-53%	-115%	-227%	-212%	-343%	-416%	-492%
68803	53%	61%	64%	72%	6%	3%	24%	32%	21%	27%	23%	-41%
68920	90%	78%	-72%	-183%	-227%	-141%	-212%	-230%	-274%	-300%	-282%	-372%
69854	31%	-8%	-579%	-623%	-758%	-827%	-2140%	-1788%	-1482%	-1754%	-2754%	-1938%
70034	-348%	-124%	-222%	-333%	-512%	-445%	-438%	-369%	-462%	-455%	-409%	-504%
75783	-297%	-302%	-231%	-156%	-213%	-194%	-253%	-464%	-393%	-441%	-600%	-711%
94103	-1742%	-358%	-1064%	-1492%	-1665%	-1656%	-1565%	-1709%	-1975%	-1899%	-2109%	-2563%
27852	63%	69%	67%	66%	-131%	-56%	-252%	-185%	-89%	-121%	-216%	-347%
URO	87%	86%	91%	89%	71%	51%	55%	0%	-4%	-5%	-17%	-55%

EXTRACTO DE CARPELO EN ETANOL

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN												
	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
66354	63%	30%	15%	47%	-228%	17%	17%	-89%	-492%	-402%	-338%	-398%
68803	-147%	-94%	-112%	-60%	-82%	-83%	-256%	-282%	-617%	-444%	-433%	-844%
68920	-228%	-194%	-678%	-1039%	-1261%	-1472%	-2628%	-3322%	-4028%	-3361%	-4700%	-7739%
69854	-1212%	-1608%	-1621%	-1083%	-1401%	-1815%	-1782%	-2831%	-2606%	-3551%	-2329%	-2691%
70034	-68%	-86%	-96%	-96%	-151%	-178%	-172%	-170%	-207%	-237%	-233%	-363%
75783	46%	59%	50%	61%	-24%	-5%	21%	-6%	18%	19%	17%	-40%
94103	-51%	-48%	-51%	-49%	-110%	-105%	-105%	-107%	-118%	-124%	-116%	-258%
27852	54%	60%	33%	33%	0%	17%	-41%	-45%	-117%	-138%	-218%	-222%
URO	40%	22%	42%	55%	3%	-2%	4%	-24%	-20%	-43%	13%	-132%

EXTRACTO DE SEMILLA EN ETANOL

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN												
	50	100	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
66354	-179%	-148%	-48%	-64%	-90%	-73%	-43%	-127%	-72%	-68%	-131%	-368%
68803	-43%	-65%	-216%	-294%	-416%	-383%	-408%	-481%	-767%	-553%	-695%	-1700%
68920	-908%	-1043%	-1415%	-1227%	-1438%	-1546%	-1768%	-1697%	-2038%	-1818%	-2357%	-3184%
69854	-13474%	-13996%	-13539%	-17057%	-19078%	-13122%	-13039%	-12383%	-12917%	-15100%	-13261%	-23213%
70034	-438%	-535%	-311%	-356%	-416%	-432%	-503%	-511%	-491%	-647%	-646%	-1043%
75783	24%	-36%	-154%	-237%	-243%	-262%	-239%	-263%	-333%	-238%	-211%	-281%
94103	-449%	-477%	-518%	-606%	-637%	-703%	-677%	-702%	-691%	-681%	-723%	-663%
27852	-36%	-44%	-117%	-69%	-123%	-152%	-143%	-158%	-155%	-182%	-211%	-254%
URO	-32%	-16%	-37%	-27%	-17%	-58%	-138%	-60%	-113%	-141%	-127%	-359%

Anexo 3: Porcentaje de inhibición (valores positivos) y formación (valores negativos) de biopelícula.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Trichilia hirta* L. FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MONTERÍA-CÓRDOBA.