



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas

**Determinación del efecto de precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas preparadas a partir de ellos sobre la formación de biopelículas *in vitro* de las bacterias asociadas a cáncer colorrectal *Escherichia coli* 25922, *Bacteroides fragilis* 25285 y *Fusobacterium nucleatum* 25586 y de las bacterias probióticas *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C y *Lacticaseibacillus rhamnosus* UCO-25A**

**POR BÁRBARA ANDREA BERRÍOS HENRÍQUEZ**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

**Profesor Tutor(a)**

Dra. Apolinaria García Cancino  
Universidad de Concepción

**Profesor co-tutor(a)**

Dr. Edgar Pastene Navarrete  
Universidad del Bío-Bío

Noviembre, 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© (2023), Bárbara Andrea Berríos Henríquez

A mis padres, hermanos, amigos y todos los que nuevamente creyeron en mi

## **AGRADECIMIENTOS**

Este magíster comenzó cuando aún no lograba defender mi título de bioquímica debido a la pandemia y, en cierto grado, me ayudó a superar ese año. Pude aprender nuevas cosas y superarme personalmente, pero también me permitió conocer y reencontrarme con mucha gente que me ha acompañado hasta hoy. Quiero comenzar agradeciendo nuevamente a mis padres que me han apoyado y permitido continuar mis estudios de postgrado, así como a mis hermanos y resto de mi familia que han estado preocupados por mí y que todo salga bien. A mis amigos de bioquímica, del colegio, de Chillán y de la u, que siempre preguntaban cómo iba todo y daban ánimos para continuar. A mis compañeros y por supuesto, ahora amigos del magíster, Lupi, Héctor, Christian y Soraya, con quienes nos dimos ánimo en los ramos y a terminar al fin la infinita tesis. A todo el conjunto del Lab de Patogenicidad Bacteriana, que me ayudaron y guiaron con protocolos y dudas, con quienes pasé días enteros acompañándonos haciendo ensayos, incluso durante noches, fin de semanas y vacaciones, pero por sobre todo a la profe Pola, quién se preocupó cada semana de que avanzara correctamente, que aprendiera y me superara académica y profesionalmente, pero también en lo personal. Al profe Edgar y al Lab de Síntesis y Biotransformación de productos naturales de la UBB, que me permitió ser parte de su proyecto y así volver a reencontrarme con la química. Finalmente, agradecer al proyecto FONDECYT 1211119 y a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Biopelículas.....	1
2. Cáncer colorrectal (CCR).....	4
3. Carcinogénesis y bacterias asociadas.....	6
3.1. Bacterias pro-tumorigénicas.....	10
3.2. Bacterias anti-tumorigénicas.....	15
4. Teaflavinas.....	18
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
1. Pregunta de investigación.....	23
2. Hipótesis.....	23
3. Objetivos.....	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas.....	25
2. Cepas y condiciones de cultivo.....	26
3. Ensayo de inhibición por difusión en pocillo.....	27
4. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	29
5. Concentración mínima bactericida (CMB).....	30
6. Ensayo sobre formación de biopelículas.....	31

7. Análisis estadísticos.....	33
RESULTADOS.....	34
1. Efecto de teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas sobre el crecimiento y viabilidad de cepas probióticas y patógenas.....	34
1.1. Ensayo de inhibición por difusión en pocillo .....	34
1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).....	36
2. Efecto de teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas sobre la formación de biopelículas y su viabilidad.....	41
2.1. Cuantificación de biopelícula mediante ensayo de cristal violeta .....	41
2.2. Viabilidad de biopelícula mediante resazurina.....	51
DISCUSIÓN .....	53
CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos utilizados. ....	26
Tabla 2. Espectro de actividad antibacteriana exhibida por teaflavinas naturales a 500 µg/mL y antibióticos a 100 µg/mL. ....	35
Tabla 3. Espectro de actividad antibacteriana exhibida por precursores semisintéticos de epicatequina a 500 µg/mL y antibióticos a 100 µg/mL.....	35
Tabla 4. Espectro de actividad antibacteriana exhibida por teaflavinas lipofílicas a 500 µg/mL y antibióticos a 100 µg/mL. ....	36
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria exhibida por teaflavinas naturales desde 2000 µg/mL y antibióticos desde 1000 µg/mL.....	37
Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria exhibida por precursores semisintéticos de epicatequina desde 2000 µg/mL; antibióticos desde 1000 µg/mL y DMSO 80%. ....	37
Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria exhibida por teaflavinas lipofílicas desde 2000 µg/mL; amoxicilina desde 750 µg/mL; metronidazol desde 100 µg/mL y DMSO 80%. ....	38
Tabla 8. Concentración mínima bactericida exhibida.....	40
Tabla 9. Compuestos utilizados y sus estructuras. ....	80

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Etapas de formación de una biopelícula. ....	1
Figura 2. Posible escenario que explica cómo las biopelículas bacterianas, la inflamación y las células tumorales del colon pueden interactuar para formar un tumor mucinoso (S. Li <i>et al.</i> , 2019). ....	5
Figura 3. Progresión del cáncer de colon afectada por bacterias (Bennedsen <i>et al.</i> , 2022). ....	8
Figura 4. Impacto de bacterias en carcinogénesis (Lopez <i>et al.</i> , 2021). ....	10
Figura 5. Principales mecanismos de acción de los probióticos (Bermudez-Brito <i>et al.</i> , 2012). ....	16
Figura 6. Estructuras moleculares de teaflavinas (S. Wang <i>et al.</i> , 2019). ....	19
Figura 7. Estructuras químicas de las principales catequinas y teaflavinas del té verde y el té negro. El sombreado azul de la estructura de la teaflavina resalta el característico anillo 1',2'-dihidroxi-3,4-benzotropolona (Liu <i>et al.</i> , 2021). ....	20
Figura 8. Efectos del extracto de té verde, extracto de té negro, EGCG y teaflavinas sobre el crecimiento y la formación de biopelículas por <i>F. nucleatum</i> (Lagha <i>et al.</i> , 2017). ....	21
Figura 9. CMI de cepas en ausencia y presencia de teaflavinas lipofílicas desde 2000 µg/mL hasta 250 µg/mL. A) <i>L. fermentum</i> UCO-979C; B) <i>L. rhamnosus</i> UCO-25A; C) <i>L. monocytogenes</i> 19115; D) <i>E. coli</i> 25922; E) <i>B. fragilis</i> 25285 y F) <i>F. nucleatum</i> 25586. ....	39
Figura 10. Cuantificación de la densidad óptica a 590 nm (DO <sub>590nm</sub> ) y viabilidad de la biopelícula formada en ausencia y presencia de teaflavinas naturales a 500 µg/mL. A) <i>L. fermentum</i> UCO-979C; B) <i>L. rhamnosus</i> UCO-25A; C) <i>L. monocytogenes</i> 19115; D) <i>E. coli</i> 25922; E) <i>B. fragilis</i> 25285 y F) <i>F. nucleatum</i> 25586. ....	42
Figura 11. Cuantificación de la densidad óptica a 590 nm (DO <sub>590nm</sub> ) y viabilidad de la biopelícula formada en ausencia y presencia de precursores semisintéticos de epicatequina a 500 µg/mL. A) <i>L. fermentum</i> UCO-979C; B) <i>L. rhamnosus</i> UCO-25A; C) <i>L. monocytogenes</i> 19115; D) <i>E. coli</i> 25922; E) <i>B. fragilis</i> 25285 y F) <i>F. nucleatum</i> 25586. ....	46
Figura 12. Cuantificación de la densidad óptica a 590 nm (DO <sub>590nm</sub> ) y viabilidad de la biopelícula formada en ausencia y presencia de teaflavinas lipofílicas a 500 µg/mL. A) <i>L. fermentum</i> UCO-979C; B) <i>L. rhamnosus</i> UCO-25A; C) <i>L. monocytogenes</i> 19115; D) <i>E. coli</i> 25922; E) <i>B. fragilis</i> 25285 y F) <i>F. nucleatum</i> 25586. ....	49
Figura 13. Formación y viabilidad de biopelículas de cepas en presencia de teaflavinas lipofílicas a 500 µg/mL. ....	51

## RESUMEN

La formación de biopelículas de *B. fragilis* enterotoxigénica, *E. coli pks+* y *F. nucleatum* se han asociado epidemiológicamente con el cáncer colorrectal (CCR), sin embargo, con bacterias probióticas como *Lactobacillus* spp. se considera una propiedad beneficiosa. En este trabajo de tesis se ensayó el efecto antibacteriano y sobre biopelículas de teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas sintetizadas a partir de ellos, sobre las cepas probióticas *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C, *Lacticaseibacillus rhamnosus* UCO-25A y patógenas *Listeria monocytogenes* 19115, *Escherichia coli* 25922, *Bacteroides fragilis* 25285 y *Fusobacterium nucleatum* 25586. Para esto, se realizaron ensayos de difusión en agar, CMI y CMB, en la que ninguno de los 3 grupos de compuestos presentó actividad antibacteriana; seguido de ensayos de formación de biopelículas mediante tinción con cristal violeta, en que todas las cepas fueron capaces de formar biopelículas *in vitro* en presencia y ausencia de los compuestos a la concentración de 500 µg/mL. Se observó estimulación en las biopelículas de las bacterias probióticas, principalmente por las teaflavinas lipofílicas, y, contrario a lo esperado, se obtuvo el mismo resultado para las cepas patógenas, siendo significativos sobre *E. coli* 25922 en presencia de los 3 compuestos. De esta forma, los compuestos produjeron un efecto mayormente estimulante que inhibitorio sobre la formación de biopelículas de las cepas ensayadas.

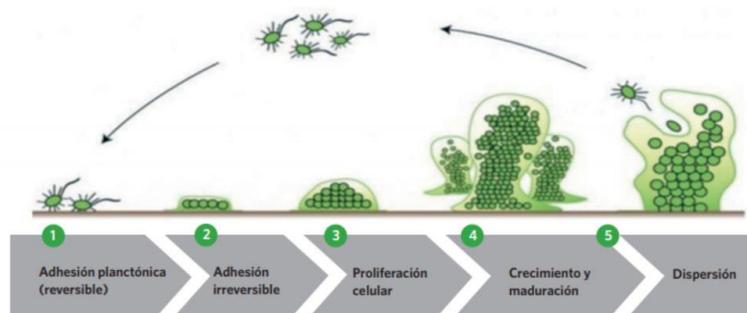
## ABSTRACT

Biofilm formation of enterotoxigenic *B. fragilis*, *E. coli pks+* and *F. nucleatum* have been epidemiologically associated with colorectal cancer (CRC), however, with probiotic bacteria such as *Lactobacillus* spp. it is considered a beneficial property. In this thesis work, the antibacterial and biofilm effects of natural theaflavins, semisynthetic epicatechin precursors and lipophilic theaflavins synthesized from them were tested, on probiotic strains *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C, *Lactocaseibacillus rhamnosus* UCO-25A and pathogenic strains *Listeria monocytogenes* 19115, *Escherichia coli* 25922, *Bacteroides fragilis* 25285 and *Fusobacterium nucleatum* 25586. For this, agar diffusion, CMI and CMB assays were performed, in which none of the 3 groups of compounds showed antibacterial activity; followed by biofilm formation assays by crystal violet staining, in which all strains were able to form biofilms *in vitro* in the presence and absence of the compounds at a concentration of 500 µg/mL. Stimulation was observed in the biofilms of probiotic bacteria, mainly by lipophilic theaflavins, and, contrary to expectations, the same result was obtained for pathogenic strains, being significant on *E. coli* 25922 in the presence of the 3 compounds. Thus, the compounds produced a stimulatory rather than an inhibitory effect on the biofilm formation of the tested strains.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Biopelículas

Las bacterias persisten en dos formas básicas, como células de replicación planctónicas de vida libre (que corresponde solo al 1%) y formando parte de biopelículas que se encuentran en la naturaleza, así como en el entorno industrial y clínico. Las bacterias viven de forma preferencial como comunidades adheridas a una superficie, donde las células bacterianas se establecen y se organizan dentro de una sustancia polimérica extracelular (EPS) de producción propia que incluye exopolisacárido, proteínas y ADN extracelular. Esta matriz formada, brinda protección contra las amenazas ambientales, proporcionando así una estrategia de supervivencia extremadamente efectiva (Bowler, Murphy, & Wolcott, 2020; Mittal, 2019).



**Figura 1. Etapas de formación de una biopelícula.**

Durante la formación de la biopelícula, las células bacterianas experimentan cambios, pasando de formas planctónicas a formas agregadas en que las células

bacterianas individuales se adhieren a un sustrato. Esta unión es reversible y luego, una vez que las bacterias comienzan a producir EPS, incluido el exopolisacárido, el ADN extracelular (eDNA) y las proteínas, se vuelve irreversible (Mirzaei *et al.*, 2020) (Figura 1).

Para poder proliferar y persistir en el entorno, estas comunidades microbianas deben reconocer y responder adecuadamente a cambios en las fuentes de carbono, micronutrientes, redox y pH, a la presencia de agentes antimicrobianos y antibióticos, y a la dinámica cambiante del medio ambiente (Katharios-Lanwermeier & O'Toole, 2022). Estos cambios se perciben a través de diversas quinasas sensoriales que inician una serie de mecanismos de transducción de señales que modulan las concentraciones intracelulares de diferentes sistemas de segundos mensajeros (Mahto, Kumari, & Das, 2022). Se ha reportado que las bacterias utilizan segundos mensajeros basados en nucleótidos, entre los que destacan los dinucleótidos cíclicos guanosina 3',5'-monofosfato cíclico dimérico (c-di-GMP) y adenosina 3',5'-monofosfato cíclico dimérico (c-di-AMP), que han surgido como reguladores centrales de la fisiología bacteriana (Opoku-Temeng, Zhou, Zheng, Su, & Sintim, 2016). c-di-GMP es reconocido por coordinar el cambio de estilo de vida de móvil a sésil y viceversa. El aumento del nivel intracelular de c-di-GMP se asocia con la disminución de la motilidad y la producción de EPS, mientras que su descenso está relacionado con la dispersión de las biopelículas y la motilidad. Por otra parte, el c-di-AMP regula el desarrollo de biopelículas; sin embargo, el efecto difiere entre las distintas especies

bacterianas. Por lo tanto, el mecanismo preciso de la señalización de c-di-AMP sigue siendo objeto de investigación y parece que hay varias maneras en las que ejerce su efecto sobre el fenotipo de biopelícula (Mahto *et al.*, 2022). Otro de los mecanismos involucrados en la formación de las biopelículas es el denominado quorum sensing (QS), sistema regulador de la densidad celular que regula la expresión génica detectando la concentración de pequeñas moléculas de señalización denominadas autoinductores (AI), que son sintetizadas y liberadas por las células bacterianas, y que ha sido ampliamente descrito en *E. coli*, en que cada etapa de la formación de biopelículas está asociada a la activación de un conjunto diferente de genes como *luxS*, *fimH*, *csgD* y *bolA*, que regulan la expresión de sus factores de virulencia (Alshammari *et al.*, 2023).

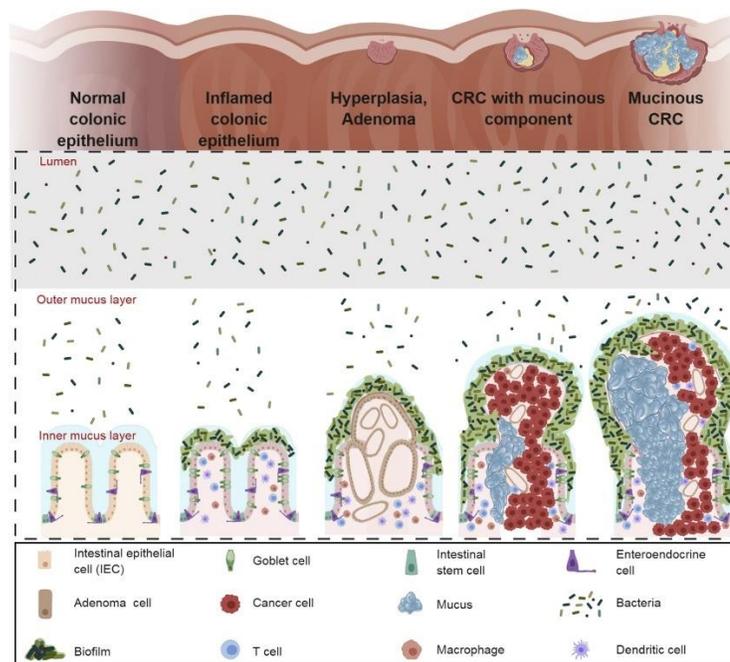
Las bacterias presentes en una biopelícula son más tolerantes a la respuesta inmunitaria del huésped y a los fármacos antibacterianos, además de favorecer la disponibilidad de nutrientes y agua debido a que estos son retenidos por la matriz extracelular. Gracias a estas características, la formación de biopelículas es una de las estrategias que aplican los organismos para la persistencia en humanos y la progresión de enfermedades crónicas tales como periodontitis, neumonía, fibrosis quística y numerosas infecciones asociadas a dispositivos como el catéter, las válvulas cardíacas y las prótesis (Mirzaei *et al.*, 2020; Mittal, 2019). Actualmente, la biopelícula se ha relacionado con la iniciación y el desarrollo del cáncer colorrectal, generalmente en el colon derecho de los seres humanos (proximal al ángulo hepático), debido a que se ha encontrado que las

biopelículas son mucho más comunes en muestras de tejido de individuos con cáncer colorrectales en comparación con los controles normales (Mirzaei *et al.*, 2020).

## **2. Cáncer colorrectal (CCR)**

En el colon sano, el mucus secretado se organiza en una capa de mucus firme adherida directamente a las células epiteliales (interna) seguida de una capa más suelta (externa), las cuales interactúan entre sí y generan un gradiente ascendente de viscosidad mucosa desde la luz hasta el epitelio intestinal. La capa interna está mayoritariamente desprovista de bacterias, mientras que la capa externa está colonizada por bacterias comensales que ayudan en la digestión del contenido luminal y la exclusión de patógenos potenciales (eubiosis). Sin embargo, esta situación homeostática puede cambiar cuando hay una modificación en la diversidad o funcionalidad microbiana (disbiosis), así como cuando el intestino se inflama o se daña temporalmente, permitiendo que las bacterias entren en contacto directo con las células epiteliales y obtengan un nicho para crecer (S. Li, Peppelenbosch, & Smits, 2019). Las posibilidades de un establecimiento exitoso aumentan con la formación de biopelículas bacterianas, debido a que las células se agregan sobre la mucosa, permitiendo que las especies bacterianas cooperen entre sí y vivan en las proximidades de las barreras epiteliales intestinales del huésped, lo que es significativo para la invasión y la estimulación de reacciones inflamatorias adicionales, agravando la disbiosis (Figura 2) (S. Li *et al.*, 2019; Mirzaei *et al.*, 2020). La disbiosis generada

puede promover el desarrollo de enfermedades, incluidos varios cánceres, a través de cambios en la genética, el medio ambiente (por ejemplo, inflamación, medicación, dieta) o infecciones por patógenos. No obstante, todavía se debate si las alteraciones de la comunidad microbiana son una causa o un efecto de la carcinogénesis (Lopez, Bleich, & Arthur, 2021).



**Figura 2. Posible escenario que explica cómo las biopelículas bacterianas, la inflamación y las células tumorales del colon pueden interactuar para formar un tumor mucinoso (S. Li et al., 2019).**

El cáncer colorrectal (CCR) es el cuarto cáncer más frecuente, responsable del 10% de todos los nuevos casos de cáncer en 2020, y la segunda causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo. Dentro de las causas se encuentran factores ambientales y genéticos, destacando la conexión genética entre la dieta

y el CCR, y por tanto la implicación de la microbiota intestinal, la cual se ha relacionado con la carcinogénesis del CCR, en la que factores bacterianos conocidos desempeñan un papel importante en la inducción de mutaciones genómicas en células humanas o en la exacerbación de la inflamación promotora de tumores (Bennedsen *et al.*, 2022).

Previamente, Dejea *et al.* reportaron hallazgos de formación de biopelículas bacterianas en la superficie del epitelio colónico en casi todos los casos examinados de cáncer de colon del lado derecho (89%), mientras que solo un pequeño porcentaje de los cánceres del lado izquierdo fueron positivos para biopelícula (12%). Hubo una concordancia del 100% entre la positividad de la biopelícula en el tejido tumoral y el tejido del colon en el margen de resección, y un análisis metabolómico posterior reveló que la formación de biopelículas en el colon contribuye significativamente a un estado pro-oncogénico (Dejea & Sears, 2016). Posteriormente, Raskov *et al.* en 2018 examinaron el tejido colónico de un paciente con cáncer de colon del lado derecho, en el cual encontraron formación de biopelícula en el epitelio de la superficie, pero también en las criptas. Por lo tanto, se sugiere que la formación de biopelículas dentro de las criptas colónicas podría acelerar la carcinogénesis colorrectal (Raskov, Kragh, Bjarnsholt, Alamili, & Gogenur, 2018).

### **3. Carcinogénesis y bacterias asociadas**

En la última década, se han publicado estudios que describen cepas bacterianas individuales y perfiles alterados de expresión génica en relación con el CCR. En

la Figura 3, se observa la influencia bacteriana en las principales vías de señalización, desde el epitelio normal (Wnt), pasando por los focos de criptas aberrantes displásicas y el adenoma temprano (PI3K-Akt) hasta el adenoma intermedio (MAPK), el adenoma tardío (TGF- $\beta$ ) y, por último, el desarrollo del carcinoma (EGFR, mTOR y p53), dividiendo a las bacterias en pro-tumorigénicas (patógenas y oncogénicas) y anti-tumorigénicas (beneficiosas y probióticas) (Bennedsen *et al.*, 2022).

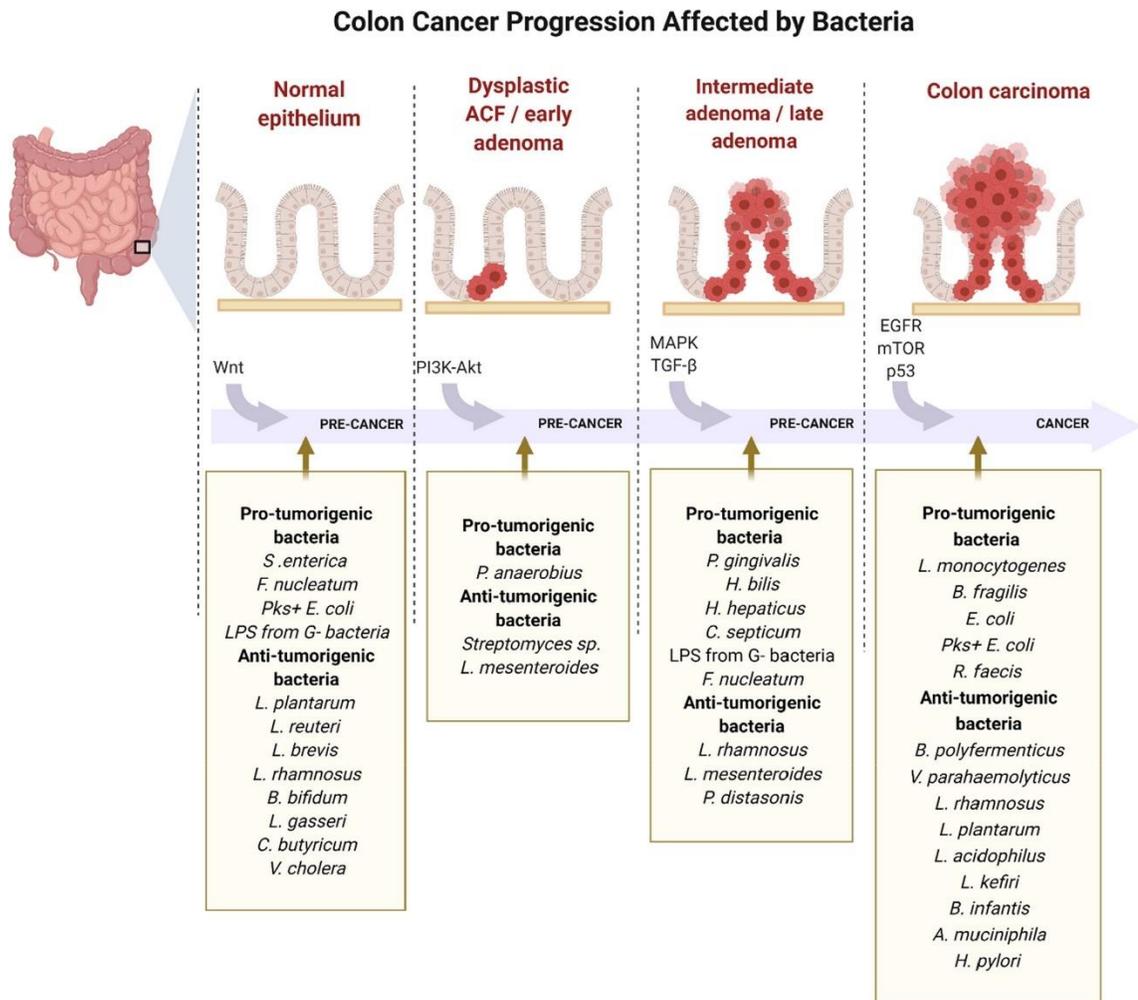


Figura 3. Progresión del cáncer de colon afectada por bacterias (Bennedsen *et al.*, 2022).

Según lo expuesto previamente, el CCR no se atribuye sólo a un microorganismo patógeno, si no que requiere una comunidad bacteriana intestinal compleja, con diferencias sustanciales en la composición del microbioma intestinal humano comparado con pacientes sanos y caracterizada por disbiosis microbiana (S. Li, Konstantinov, Smits, & Peppelenbosch, 2017).

La carcinogénesis del CCR se puede dividir en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura 4). La iniciación se define por alteraciones genéticas espontáneas o inducidas, como la exposición a un agente cancerígeno, que altera la capacidad de respuesta de las células a su entorno y proporciona una ventaja proliferativa. La promoción es un período de proliferación y acumulación de células preneoplásicas, que induce daño genético adicional y amplifica mutaciones. Y la progresión está marcada por una mayor expansión neoplásica, con una mayor tasa de crecimiento tumoral, invasividad y metástasis (Lopez *et al.*, 2021).

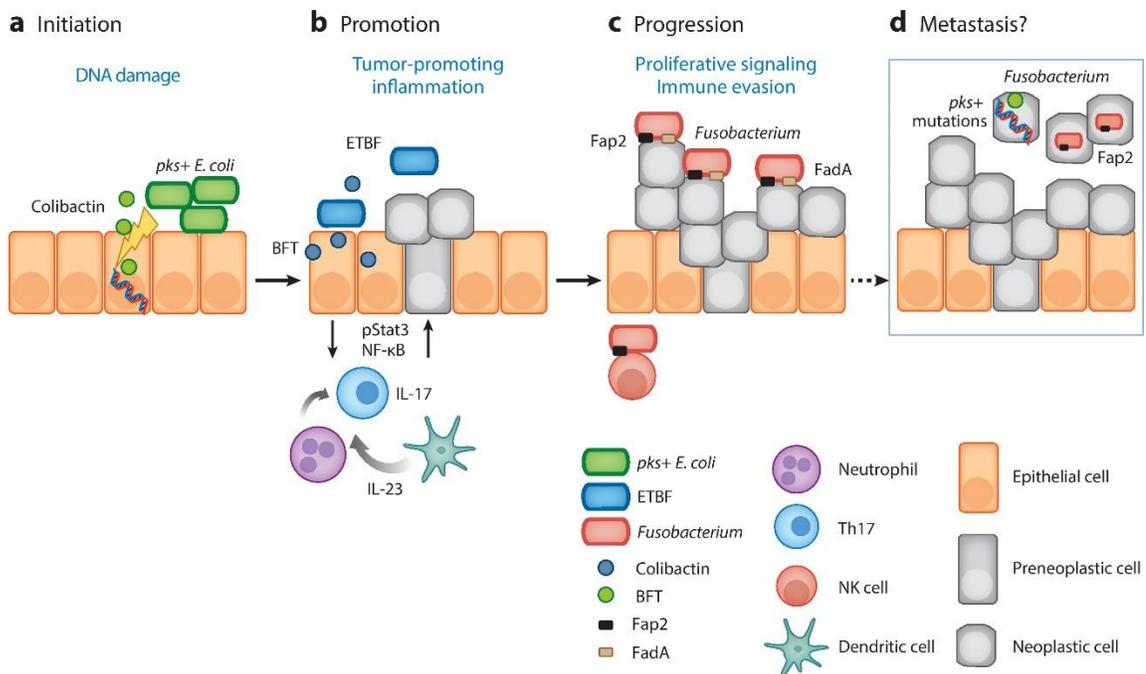


Figura 4. Impacto de bacterias en carcinogénesis (Lopez *et al.*, 2021).

### 3.1. Bacterias pro-tumorigénicas

Las investigaciones se han centrado en conectar factores bacterianos particulares y sus respectivas toxinas con el cáncer colorrectal. Entre las bacterias que se han relacionado epidemiológicamente con cáncer colorrectal humano se encuentran *Bacteroides fragilis* enterotoxigénica que produce la toxina *B. fragilis* (BFT), *Escherichia coli pks+* (productora de colibactina) y *Fusobacterium nucleatum*, que contiene una serie de factores de virulencia como la adhesina *Fusobacterium*-adhesin A (FadA) (Mirzaei *et al.*, 2020).

La carcinogénesis comúnmente se inicia por la acción de una molécula que induce genotoxicidad o daño al ADN (Figura 4a). Una genotoxina asociada a CCR

es la colibactina, codificada en la isla de patogenicidad *pks* presente en ciertas cepas de *Escherichia coli* (Lopez *et al.*, 2021) pertenecientes al filogrupo B2 (Raskov, Burcharth, & Pommergaard, 2017). A estas cepas se les denomina *E. coli pks+* y prevalecen en la microbiota de los pacientes con CCR en un 66,7% mientras que en pacientes sanos solo es de un 20,8%. Además, inducen CCR en modelos de ratón y dejan una huella mutacional distintiva en los tumores colorrectales humanos, lo que indica una exposición anterior y apunta a un rol en la iniciación del cáncer (Lopez *et al.*, 2021). La colibactina es un metabolito secundario producido por la isla genómica *pks* de 54 kb que codifica una línea de ensamblaje híbrida de péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) - policétido sintetasa (PKS) y proteínas accesorias (*clbA-S*). Este ensamblaje de proteínas NRPS-PKS produce el intermediario biosintético lineal precolibactina que posteriormente se transforma en colibactina genotóxica, que estructuralmente se compone de dos subunidades casi simétricas, cada una de las cuales contiene una ojiva de ciclopropano electrofílico que une los residuos de adenina en el ADN para generar enlaces cruzados entre cadenas (Dougherty & Jobin, 2021). Esta actividad genotóxica requiere del contacto célula a célula para que sea efectiva y, para esto, *E. coli* posee varias adhesinas fimbriales que promueven la unión e internalización en la mucosa colónica, permitiendo el contacto directo con las células epiteliales. Como se mencionó anteriormente, la formación de biopelículas aumenta la profundidad de la invasión de la mucosa, lo que puede facilitar el suministro de colibactina a las células epiteliales del huésped. Se ha

identificado la composición de biopelículas de mucosas en pacientes con CCR, en la que se ha encontrado una alta prevalencia de *E. coli pks+* (68%) (Dougherty & Jobin, 2021). De igual forma se ha reportado la co-infección con la cepa iniciadora de biopelículas *Bacteroides fragilis* enterotoxigénica (ETBF), la cual puede promover aún más la interacción entre *E. coli pks+* y las células epiteliales del huésped al degradar la capa protectora de moco a través de un mecanismo indeterminado (Dougherty & Jobin, 2021).

La segunda etapa de promoción carcinogénica tiene relación con el sistema inmune, ya que casi todas las lesiones neoplásicas contienen células inmunitarias. Existe una estrecha proximidad entre la microbiota y el sistema inmunológico de las mucosas, lo cual brinda la oportunidad para que los microbios residentes provoquen respuestas inmunitarias protumorigénicas. *Bacteroides* spp. son habitantes normales de la microbiota intestinal, que representan aproximadamente el 30% de los miembros de la comunidad intestinal y ayudan a moldear las respuestas inmunitarias de las mucosas (Lopez *et al.*, 2021). *Bacteroides fragilis* constituye el 1-2% de las bacterias residentes en el intestino y se aísla del cultivo anaeróbico de heces humanas (Yekani *et al.*, 2020). *B. fragilis* enterotoxigénica (ETBF) produce una enterotoxina proteolítica, denominada toxina de *B. fragilis* (BFT) o fragilisina, la cual es una metaloproteasa termolábil de 21 kDa que se produce como una protoxina y se activa mediante la fragipaína, una cisteína proteasa de *B. fragilis* (Lopez *et al.*, 2021). BFT es una molécula biológicamente activa que genera efectos morfológicos sobre las

células epiteliales intestinales, induce la liberación de cloruro y aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal humana y las monocapas de células epiteliales (Yekani *et al.*, 2020). ETBF promueve la inflamación y el CCR a través de BFT, debido a que induce la vía nuclear de la  $\beta$ -catenina dependiente del factor de células T (TSF) de las células epiteliales intestinales por el clivaje de E-cadherina, lo que da como resultado una proliferación celular persistente. La alteración de la integridad epitelial desencadena una cascada proinflamatoria procarcinogénica dominante de células T-helper 17 (Th17). Las células epiteliales, los neutrófilos y las células dendríticas producen citocinas que activan las células T para promover la inflamación Th17 y la liberación de IL-17 induce la proliferación de células epiteliales impulsada por las vías pStat3 y NF- $\kappa$ B (Figura 4b) (Lopez *et al.*, 2021). Con respecto a la formación de biopelículas, *B. fragilis* presenta pili y fimbrias, las cuales favorecen la adhesión a los colonocitos, además de la producción de las enzimas extracelulares hialuronidasa, condroitin sulfatasa, desoxirribonucleasa, proteasas, fosfatasas y lipasas que permiten el ataque y la penetración de la capa protectora de mucus. Se ha reportado que *B. fragilis* es responsable de >60% de la masa de biopelícula en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), por lo que la detección de biopelículas en la mucosa del colon es útil para predecir el riesgo de desarrollo de CCR (Yekani *et al.*, 2020).

La etapa de progresión se caracteriza por el crecimiento y la invasión del tumor, así como la evasión del sistema inmune, lo que conduce a metástasis.

*Fusobacterium nucleatum*, un bacilo Gram negativo anaerobio, es un habitante normal de la microbiota oral que puede causar inflamación en el tejido gingival y afecciones inflamatorias infecciosas en múltiples sitios del cuerpo. La localización de *F. nucleatum* en el colon se asocia con CCR y su abundancia se correlaciona positivamente con la gravedad del cáncer. Los efectos carcinogénicos están relacionados con las adhesinas *Fusobacterium* autotransporter protein 2 (Fap2) y *Fusobacterium* adhesin A (FadA) (Figura 4c) (Lopez *et al.*, 2021). Fap2 es una hemaglutinina y adhesina sensible a la galactosa que desempeña un papel en la coagregación bacteriana, favoreciendo la formación de biopelículas y la adhesión celular (Copenhagen-Glazer *et al.*, 2015). Se une a Gal-GalNAc, un disacárido altamente expresado en tumores y metástasis de CCR, por lo tanto, puede albergarse en tumores en desarrollo y establecidos, lo que contribuye a la progresión del cáncer. Además, Fap2 se une al receptor TIGIT, que inhibe la activación de células NK y permite que las células tumorales eviten la eliminación (Lopez *et al.*, 2021). Por su parte, FadA es una adhesina e invasina que se une a E-cadherina, un supresor de tumores que funciona a través de  $\beta$ -catenina, por lo que la pérdida o expresión heterogénea de E-cadherina se correlaciona con estadios avanzados de CCR y mal pronóstico (Rubinstein *et al.*, 2013). Debido a que es una bacteria con una serie de adhesinas, *F. nucleatum* forma biopelículas fácilmente y se ha reportado como un patógeno “puente” en biopelículas dentales (Brennan & Garrett, 2019).

Finalmente, en relación con la etapa final, aún no está claro el papel bacteriano en la metástasis; sin embargo, se ha sugerido que *F. nucleatum* desempeña un papel en las metástasis del CCR. Se reportó que cepas de *Fusobacterium* clonales fueron identificadas tanto en los tumores primarios como en metástasis hepáticas. Además, cuando se encontró en metástasis de CCR, también estaba presente gran parte del microbioma del tumor primario, lo que sugiere que *F. nucleatum* puede ser un centro de actividades procarcinogénicas de múltiples especies (Lopez *et al.*, 2021).

### **3.2. Bacterias anti-tumorigénicas**

Los probióticos se definen como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (FAO/WHO, 2002). Últimamente, los probióticos han recibido mucha atención debido a la reconocida relación entre los estilos de vida alimentarios, la microbiota intestinal y el desarrollo del CCR (Bennedsen *et al.*, 2022).

La formación de biopelículas por bacterias no patógenas como los probióticos del género *Lactobacillus*, se considera una propiedad beneficiosa, debido a que la adhesión preferencial de bacterias al epitelio específico, como la mucosa intestinal, prolonga y estabiliza su colonización y residencia, ayudando a excluir bacterias patógenas por inhibición competitiva o impedimento estérico y teniendo la posibilidad de desencadenar la respuesta inmune de la célula huésped (Figura 5) (Bermudez-Brito, Plaza-Díaz, Muñoz-Quezada, Gómez-Llorente, & Gil, 2012; Salas-Jara, Ilabaca, Vega, & García, 2016).

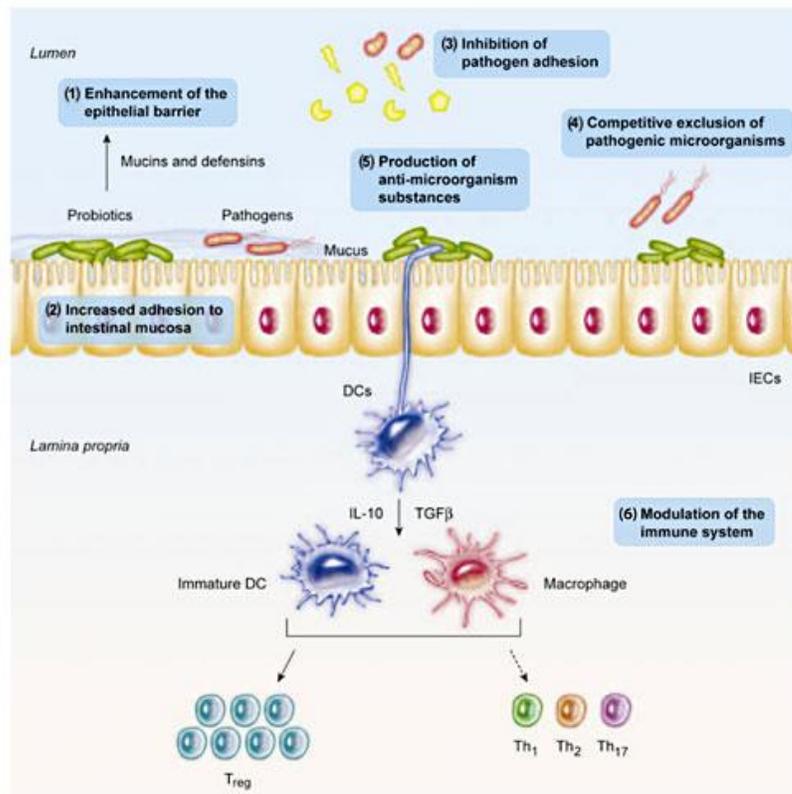


Figura 5. Principales mecanismos de acción de los probióticos (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Algunos estudios han informado de efectos antitumorígenicos bacterianos a través de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. En un estudio, los resultados *in vitro* mostraron que la administración de *Lactobacillus* spp. (*L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. brevis*, y *L. rhamnosus*) tenía un efecto antitumorígeno en líneas celulares, en las cuales se observó una disminución del gen que codifica la  $\beta$ -catenina, CTNNB1, y un aumento de la expresión de los genes que controlan la degradación del complejo  $\beta$ -catenina de forma dependiente del tiempo. El efecto beneficioso se comprobó además en un modelo de ratón inducido para CCR en

el que se observó una reducción de la inflamación y del desarrollo tumoral en el grupo de tratamiento. Por otra parte, en otro estudio se investigó el efecto sinérgico de los exopolisacáridos secretados (EPS) de *Lactobacillus rhamnosus* en combinación con la radiación en un modelo de rata con CCR inducido. Como resultado del tratamiento con EPS o radiación, se redujo la concentración de  $\beta$ -catenina en las ratas, y el efecto se potenció aún más cuando se administró un tratamiento combinado. Dado que el aumento de  $\beta$ -catenina está implicado en el aumento de la proliferación, se espera que una reducción de la cantidad de  $\beta$ -catenina resulte en una tasa de proliferación reducida (Bennedsen *et al.*, 2022).

Además, varios estudios han investigado el papel beneficioso de los probióticos en relación con la vía p53. Por ejemplo, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LrGG) se administró por vía oral en un modelo de rata con CCR inducido por DMH, y se observó que disminuía la incidencia tumoral, aumentaba la expresión de p53 e inducía la apoptosis en células colónicas. Otros estudios han descubierto que las bacterias lácticas afectan a la expresión de p53, ya sea a través de la síntesis de EPS o mediante mecanismos no especificados. Además, estudios *in vitro* han demostrado que el n-butirato, un derivado alimentario común metabolizado por los lactobacilos, puede inducir la apoptosis en líneas celulares de CCR mediante la estimulación de p21 (Bennedsen *et al.*, 2022).

Por lo tanto, es importante que los agentes que inhiban o afecten la formación de biopelículas de patógenos no afecten la microbiota intestinal al inhibir dicha propiedad en los probióticos (Dueñas *et al.*, 2015).

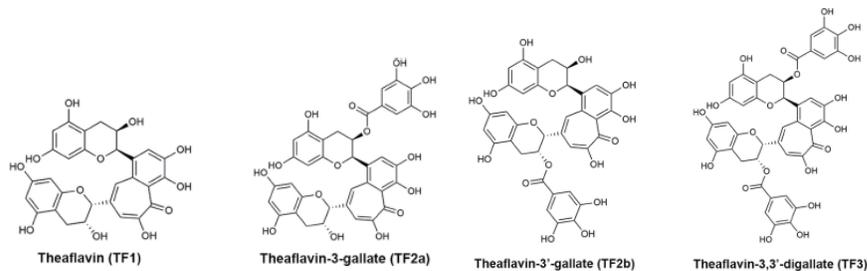
Además de las infecciones, los antibióticos son los manipuladores más comunes de la microbiota intestinal, y su uso a largo plazo debe evitarse en la medida de lo posible. Un reciente metaanálisis de estudios retrospectivos descubrió que la exposición prolongada a antibióticos aumentaba el riesgo de CCR. Sin embargo, en el futuro, nuevas clases de antibióticos como los inhibidores de la biopelícula y del quorum sensing pueden convertirse en herramientas esenciales para manipular la virulencia y la resistencia de impulsores bacterianos específicos y, por tanto, la carcinogénesis de origen bacteriano (Bennedsen *et al.*, 2022).

#### **4. Teaflavinas**

La composición de la microbiota intestinal puede ser modulada por compuestos fitoquímicos como los polifenoles, por lo que las investigaciones se han centrado en las interacciones entre compuestos fenólicos y bacterias intestinales, específicamente en relación con las propiedades antimicrobianas contra patógenos, así como la influencia sobre microorganismos benéficos. Se han descrito ciertos compuestos naturales, entre los que encuentran derivados polifenólicos presentes en el té como las catequinas (flavan-3-oles) y teaflavinas, los cuales inhiben o estimulan el crecimiento de diferentes bacterias patógenas o probióticas (Hervert-Hernández & Goñi, 2011).

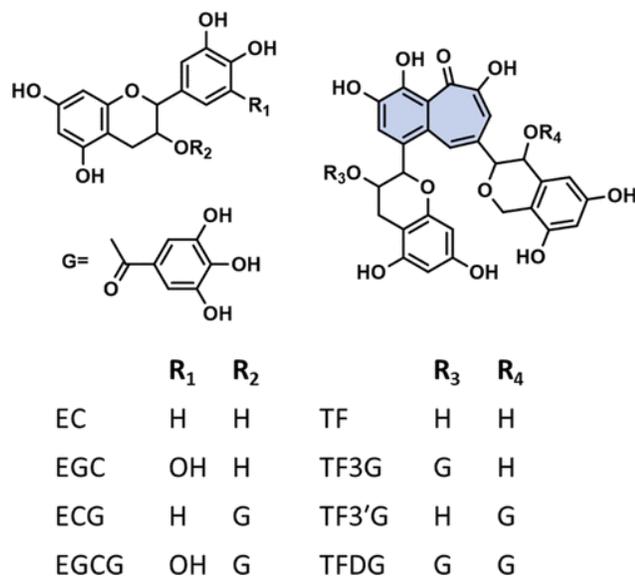
Tanto el té negro como el verde se derivan de las hojas de *Camellia sinensis*, pero difieren en el nivel de oxidación debido a la fermentación. Mientras el té negro contiene un menor nivel de catequinas que el té verde, presenta una mayor cantidad de teaflavinas y, en comparación con el galato de epigallocatequina

(EGCG), principal catequina extraída del té verde, las teaflavinas son más estables en condiciones no favorables como pH ácido y alta temperatura y humedad (de Oliveira, Prince, Lo, Lee, & Chu, 2015; Yussof, Cammalleri, Fayemiwo, Lopez, & Chu, 2022). Las teaflavinas son uno de los principales compuestos fenólicos característicos que contribuyen al color, sabor y efectos beneficiosos del té negro (Liu, de Bruijn, Bruins, & Vincken, 2021). Se ha descrito que son una mezcla de 4 compuestos: teaflavina (TF1 o TF), teaflavina-3-galato (TF2a o TF3G), teaflavina-3'-galato (TF2b o TF3'G) y teaflavina-3,3'-digalato (TF3 o TFDG) (Figura 6) (S. Wang *et al.*, 2019).



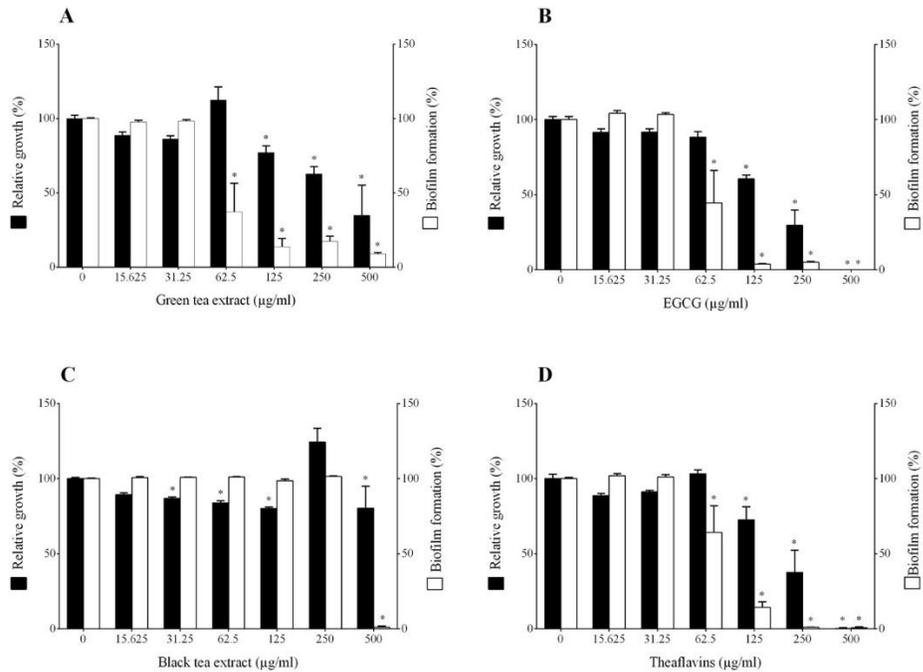
**Figura 6. Estructuras moleculares de teaflavinas (S. Wang *et al.*, 2019).**

Caracterizadas por su fracción 1',2'-dihidroxi-3,4-benzotropolona, son productos de la oxidación y dimerización de las catequinas, un proceso promovido por polifenoloxidasas y peroxidases endógenas que ocurre durante el proceso de fermentación del té negro (Figura 7). De las cuatro teaflavinas, la TFDG es la más abundante en el té negro y se forma por la condensación del galato de epicatequina (ECG) y el galato de epigallocatequina (EGCG) mediante la fusión de sus respectivos anillos B de tipo catecol y pirogalol (Liu *et al.*, 2021).



**Figura 7. Estructuras químicas de las principales catequinas y teaflavinas del té verde y el té negro. El sombreado azul de la estructura de la teaflavina resalta el característico anillo 1',2'-dihidroxi-3,4-benzotropolona (Liu *et al.*, 2021).**

Se han reportado actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales de las teaflavinas, y se han asociado con la disminución de la formación de biopelículas de bacterias patógenas. Kong *et al.*, en 2021 reportaron que las teaflavinas inhibían la formación de biopelículas de *S. mutans* UA159, bacteria asociada a caries dentales (Kong *et al.*, 2021). En 2017 Lagha *et al.* describieron que los polifenoles del té (teaflavinas, extracto de té negro, EGCG y extracto de té verde) inhibían el crecimiento y las propiedades virulentas de *F. nucleatum*, entre los que se encuentra una disminución en la formación de biopelículas (Figura 7), la adherencia a células epiteliales y la actividad hemolítica (Lagha, Haas, & Grenier, 2017).



**Figura 8. Efectos del extracto de té verde, extracto de té negro, EGCG y teaflavinas sobre el crecimiento y la formación de biopelículas por *F. nucleatum* (Lagha *et al.*, 2017).**

Además, Opoku-Temeng *et al.* en 2016 dilucidaron un posible mecanismo de acción por el cual los polifenoles del té inhibían la formación de biopelículas. Se ensayaron las teaflavinas TF2b y TF3, las cuales exhibieron un efecto inhibitorio de forma específica sobre la c-di-AMP sintasa de *B. subtilis* denominada DisA, modulando la concentración de c-di-AMP en la bacteria. Sin embargo, otros estudios han informado de concentraciones mínimas inhibitorias elevadas para dichas moléculas contra otras bacterias, lo que podría deberse a la dificultad de las moléculas para penetrar la membrana debido a su alta hidrofiliicidad (Opoku-Temeng & Sintim, 2016).

Por otro lado, la microbiota intestinal es capaz de degradar el TF3 a TF1, TF2A y TF2B y, más tarde, tras la degalilación (escisión del ácido gálico desde la posición C-3), las TF se convierten en compuestos fenólicos más simples como la 5-(3,4-dihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona y el ácido 3-(3,4dihidroxifenil) propiónico. Por lo tanto, el consumo de TF puras y té negro podría modificar la estructura y las acciones metabólicas de la microbiota intestinal hacia perfil saludable. Además, se reportó, que la ingesta de té verde o negro ejerció efectos moduladores en la microbiota intestinal, incluidos los efectos promotores del crecimiento en *Lachnospiraceae* y *Akkermansia* y los efectos inhibidores en *Clostridium leptum* (Shan, Nisar, Li, Zhang, & Wan, 2021).

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1. Pregunta de investigación

¿Qué efecto tendrán precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas preparadas a partir de ellos sobre la formación de biopelículas *in vitro* de bacterias asociadas a cáncer colorrectal y probióticas?

### 2. Hipótesis

Teaflavinas lipofílicas preparadas a partir de precursores semisintéticos de epicatequina inhiben la formación de biopelículas *in vitro* de las bacterias asociadas a cáncer colorrectal *Escherichia coli* 25922, *Bacteroides fragilis* 25285 y *Fusobacterium nucleatum* 25586 sin afectar la formación de biopelículas de las bacterias probióticas *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C y *Lactocaseibacillus rhamnosus* UCO-25A.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

Determinar el efecto de precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas preparadas a partir de ellos sobre la formación de biopelículas *in vitro* de las bacterias asociadas a cáncer colorrectal y de las bacterias probióticas.

### 3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la actividad antibacteriana de precursores semisintéticos de epicatequina y las teaflavinas lipofílicas preparadas a partir de ellos sobre las bacterias asociadas a cáncer colorrectal *E. coli* 25922, *B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 y las bacterias probióticas *L. fermentum* UCO-979C y *L. rhamnosus* UCO-25A.
- 2) Determinar la capacidad de formar biopelículas *in vitro* de las bacterias probióticas *L. fermentum* UCO-979C y *L. rhamnosus* UCO-25A en ausencia o presencia de precursores semisintéticos de epicatequina y las teaflavinas lipofílicas.
- 3) Determinar la capacidad de formar biopelículas *in vitro* de las bacterias asociadas a cáncer colorrectal *E. coli* 25922, *B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 en ausencia o presencia de precursores semisintéticos de epicatequina y las teaflavinas lipofílicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se detalla la metodología experimental llevada a cabo junto con la instrumentación utilizada para realizar los correspondientes ensayos y análisis.

### **1. Teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas**

Se utilizaron 6 teaflavinas naturales, 3 precursores semisintéticos de epicatequina y 5 teaflavinas lipofílicas, que fueron sintetizados y purificados en el Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de productos naturales de la Facultad de Ciencias de la Universidad del Bío-Bío (Tabla 1).

Las teaflavinas naturales de té negro se obtuvieron de *Camellia sinensis*, mientras que las galocatequinas fueron extraídas desde té verde tipo Matcha; y las fracciones se purificaron mediante cromatografía de partición centrífuga (CPC) (Torres *et al.*, 2018). Los precursores semisintéticos de epicatequina fueron obtenidos por sustitución nucleofílica de aductos de epicatequina con diferentes agentes nucleofílicos de naturaleza fenólica. Finalmente, las teaflavinas lipofílicas se generaron posterior a la reacción de condensación oxidativa enzimática (polifenol oxidasa de palta) de los precursores semisintéticos de epicatequina con galocatequinas de té verde.

A partir de los compuestos sólidos se generaron soluciones stock de 10.000 µg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) al 20%, exceptuando una de las teaflavinas lipofílicas (T6) que fue en DMSO al 40%.

**Tabla 1. Compuestos utilizados.**

<b>Grupo</b>	<b>Nombre Compuesto/Mezcla</b>	<b>N° trabajo</b>	<b>Pureza</b>
Teaflavinas naturales (Fracciones obtenidas de té negro)	Ácido gálico + Teobromina	TF10	91%/9%
	Mezcla Epigallocatequina + Epicatequina	TF11	50%/50%
	Teaflavina-1 (TF1)	TF12	98%
	Teaflavina-3-galato (TF2a)	TF13	95%
	Teaflavina-3'-gallato (TF2b)	TF14	90%
	Teaflavina-3,3'-digalato (TF3)	TF15	97%
Precusores semi-sintéticos de epicatequina	Epicatequina pirogalol	C1	100%
	Epicatequina resorcinol	C2	100%
	Epicatequina fluoroglucinol	C3	100%
Teaflavinas lipofílicas	Ácido gálico + Impurezas	T2	91%/9%
	Mezcla Epigallocatequina + Epicatequina	T3	50%/50%
	Teaflavina fluoroglucinol	T4	98%
	Teaflavina pirogalol	T5	96%
	Teaflavina resorcinol	T6	92%

## **2. Cepas y condiciones de cultivo**

Se utilizaron como cepas probióticas *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C y *Lacticaseibacillus rhamnosus* UCO-25A, que fueron activadas desde cepario (Glicerol 20% v/v, crioconservado a -80°C; Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana) y se cultivaron en condiciones de microaerobiosis (10% CO<sub>2</sub>) en caldo Mann-Rogosa Sharpe (MRS; BD©) a 37°C durante 24 h, seguido de cultivo en agar MRS (BD©) en las mismas condiciones (Garcia-Castillo *et al.*, 2019; Garcia-Castillo *et al.*, 2018).

Las cepas patógenas aerobias *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (utilizada como control patógeno formador de biopelícula) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (bacteria asociada a CCR) se activaron desde cepario (Glicerol 20% v/v, criopreservado a -80°C; Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana) y se cultivaron en condiciones de aerobiosis en caldo tripticasa de soya (TSA; BD©) a 37°C durante 24 h, seguido de cultivo en agar PALCAM (Merck©) y TSA (BD©), respectivamente, en las mismas condiciones (Castro-Seriche, Jerez-Morales, Smith, Sanchez-Alonzo, & Garcia-Cancino, 2021).

Las cepas patógenas anaerobias *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (bacterias asociadas a CCR) fueron activadas desde cultivo Culti-Loops™ (Thermo Scientific™) en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, BD©) y agar TSA (BD©) suplementado con 5% sangre, respectivamente, a 37°C durante 2-4 días en condiciones de anaerobiosis (en jarras de anaerobiosis utilizando GasPak™, BD©), seguido de traspaso a agar sangre (agar TSA suplementado con 5% sangre) en las mismas condiciones (Tang *et al.*, 2016).

### **3. Ensayo de inhibición por difusión en pocillo**

Se realizó de forma primaria para analizar la susceptibilidad de las cepas probióticas y patógenas a los compuestos ensayados. Se utilizaron placas de 100 mm y 25 mL de agar MRS, PALCAM, Müeller-Hinton (BD©) y TSA-5% sangre, a las cuales se les realizaron 7 a 9 pocillos (6 mm de diámetro) equidistantes con una pipeta Pasteur estéril. Se prepararon suspensiones bacterianas en suero

fisiológico estéril ajustadas a McFarland 0,5 para las cepas *L. fermentum* UCO 979C, *L. rhamnosus* UCO 25A, *L. monocytogenes* 19115 y *E. coli* 25922, y se diseminaron en tapiz en placas de agar MRS, PALCAM y Müeller-Hinton respectivamente, utilizando tórula estéril. Para las cepas anaerobias *B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 se prepararon suspensiones bacterianas en caldo BHI ajustadas a McFarland 2, de las cuales se tomaron 200  $\mu$ L que se depositaron en placas de agar TSA-5% sangre y se diseminaron en tapiz con tórula estéril. Posteriormente, los pocillos realizados se llenaron con alícuotas de 50  $\mu$ L de los compuestos en las superficies de agar inoculadas. Las placas se incubaron durante 24 h para las cepas probióticas y patógenas aerobias; y durante 48 h para las cepas anaerobias a 37°C en condiciones de aerobiosis/microaerobiosis/anaerobiosis según *corresponda* (Hebel-Gerber *et al.*, 2021).

La actividad antibacteriana se probó a una sola concentración de 500  $\mu$ g/mL para cada compuesto y se utilizaron teaflavinas del té negro como productos naturales de control. Como control de antibióticos se utilizó amoxicilina (AMX) y metronidazol (MTZ) (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 100  $\mu$ g/mL, y como control negativo DMSO 20% y agua destilada estéril. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y la actividad antibacteriana observada se expresa como la media de los diámetros de inhibición (mm) producidos por las muestras ensayadas.

#### 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó para cada cepa mediante método de dilución en caldo de 96 micropocillos. Se utilizaron los stock de los compuestos teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas de concentración 10.000 µg/mL. Como control los antibióticos amoxicilina y metronidazol se utilizaron a 1.000 µg/mL y DMSO al 100%. El inóculo bacteriano se preparó en caldo estéril a McFarland 0,5 para las cepas probióticas y patógenas aerobias (*L. fermentum* UCO 979C y *L. rhamnosus* UCO 25A en caldo MRS; *L. monocytogenes* 19115 en caldo BHI y *E. coli* 25922 en caldo TSA) y a McFarland 2 para las cepas anaerobias (*B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 en caldo BHI). La distribución en la placa de 96 pocillos fue la siguiente:

Las filas B, C, D, F, G y H de los micropocillos se llenaron con 100 µL de caldo correspondiente, mientras que a los pocillos de las filas A y E se añadieron 40 µL de los compuestos a 10.000 µg/mL en triplicado y 160 µL de caldo correspondiente a la cepa. Los pocillos de las filas A y E se mezclaron y se llevaron 100 µL a la siguiente fila, diluyendo en serie dos veces hasta la fila D y H, respectivamente. Posteriormente, se agregaron 100 µL del inóculo bacteriano correspondiente a todas las filas. En otra placa, como control negativo se usaron 200 µL de caldo correspondiente estéril y como control positivo 100 µL de caldo y 100 µL de inóculo bacteriano. Además, como control antibiótico se usaron amoxicilina y metronidazol, junto con DMSO como control de solvente. Las placas se incubaron durante 24 h para las cepas probióticas y patógenas aerobias; y

durante 48 h para las cepas anaerobias a 37°C en condiciones de aerobiosis/microaerobiosis/anaerobiosis según corresponda.

Se ensayaron 4 concentraciones para cada compuesto y control. Las teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas se probaron desde 2.000 hasta 250 µg/mL, los antibióticos entre 1.000 - 175 µg/mL y 100 - 17,5 µg/mL según la susceptibilidad de la cepa, mientras que DMSO desde 80% hasta 10%.

La CMI se definió como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano. Para esto, se usaron 20 µL de resazurina (Sigma-Aldrich®) al 0,01% (azul) disuelta en PBS y se incubó en condiciones aerobiosis/microaerobiosis/anaerobiosis según corresponda durante 2 h a 37°C. Si el pocillo cambia de color azul a rosado, significa que las bacterias siguen siendo viables debido a que son capaces de reducir la resazurina (azul) a resorufina (rosado) (Hebel-Gerber *et al.*, 2021).

## **5. Concentración mínima bactericida (CMB)**

Para obtener la CMB, se seleccionaron los pocillos que no mostraron crecimiento (turbidez) en el ensayo de CMI. Se tomaron 10 µL de cada muestra (antes de la adición de resazurina) y se sembraron en triplicado en placas de agar MRS, PALCAM, TSA y sangre, según cada cepa, y se incubaron durante 24 y 48 h a 37°C en condiciones de microaerobiosis/aerobiosis/anaerobiosis según corresponda. La CMB se definirá como la concentración mínima de muestra requerida inhibir el crecimiento bacteriano (Hebel-Gerber *et al.*, 2021).

## 6. Ensayo sobre formación de biopelículas

Para analizar la formación de biopelículas se utilizaron placas de 96 pocillos con inóculos bacterianos en ausencia o presencia de compuestos y controles.

Se prepararon diluciones de los compuestos teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas de concentración 5.000 µg/mL, mientras que los controles antibióticos amoxicilina y metronidazol se diluyeron a 1.000 µg/mL y DMSO al 20%. Los inóculos bacterianos se prepararon en caldo estéril a McFarland 0,5 para las cepas probióticas y patógenas aerobias (*L. fermentum* UCO 979C y *L. rhamnosus* UCO 25A en caldo MRS + glucosa 2%; *L. monocytogenes* 19115 en caldo BHI y *E. coli* 25922 en caldo TSA) y a McFarland 2 para las cepas patógenas anaerobias (*B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 en caldo BHI). La distribución en la placa de 96 pocillos fue la siguiente: A la fila A que corresponde al control negativo, se le agregaron 100 µL del caldo respectivo a la cepa, mientras que a la fila B, correspondiente al control sin compuesto, se le añadieron 100 µL del inóculo bacteriano. A las filas C, D y E correspondientes a los controles, se les agregaron 10 µL de DMSO, amoxicilina y metronidazol, para obtener concentraciones de 2% y 100 µg/mL respectivamente en cada pocillo, y 90 µL del inóculo bacteriano. Finalmente, desde la fila F se ensayaron los compuestos de concentración inicial 5.000 µg/mL, añadiendo 10 µL de las soluciones y 90 µL del inóculo bacteriano para obtener una concentración en pocillo de 500 µg/mL (Paytubi *et al.*, 2017). Las placas se incubaron a 37°C durante 12 h para las cepas *L. fermentum* UCO 979C,

*L. rhamnosus* UCO 25A y *L. monocytogenes* 19115; y durante 24 h para las cepas *E. coli* 25922, *B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586, en condiciones microaerobiosis/aerobiosis/anaerobiosis, según corresponda.

Después de la incubación, utilizando micropipeta multicanal de 8 canales mediante aspiración, se retiran 100  $\mu$ L de medio de cultivo y células no unidas y se deja secar durante 10 min. Posteriormente, se lavaron las biopelículas obtenidas 3 veces con 200  $\mu$ L de tampón fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich®) para eliminar las células no unidas y se deja secar por 10 min. La biomasa de la biopelícula formada se cuantificó utilizando el ensayo de cristal violeta (CV, Merck®), para el cual se agregaron 200  $\mu$ L de CV 0,1% durante 10 min, que posteriormente se descarta por aspiración y se deja secar 10 min. Para eliminar el exceso de CV, se lavan 4 veces las biopelículas teñidas con 200  $\mu$ L de PBS y se deja secar por 10 min. Finalmente, se adicionan 200  $\mu$ L de mezcla etanol:acetona (80:20) durante 10 min y se leyó la densidad óptica (DO) a 590 nm en lector de microplaca Infinite® M200 Pro (TECAN®) utilizando el software i-control 1.9 for Infinite Reader (M. J. Salas-Jara *et al.*, 2016). Se estableció el valor de corte (DOc), que se define como tres desviaciones estándar (SD) por encima de la DO media del control negativo:  $DOc = DO \text{ media del control negativo} + (3 \times SD \text{ del control negativo})$ . Las cepas se clasifican en las categorías no productor de biopelículas (0), productor débil de biopelículas (+ o 1), productor moderado de biopelículas (++ o 2) y productor fuerte de biopelículas (+++ o 3), según los valores de DO obtenidos:  $DO \leq DOc = \text{no productor}$ ;  $DOc < DO \leq 2 \times DOc$

= débil;  $2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$  = moderado y  $4 \times DO_c < DO$  = fuerte (Stepanovic *et al.*, 2007).

De forma paralela al ensayo de CV, se analizó la viabilidad de la biopelícula formada mediante la adición de resazurina (RSZ) al 0,02% disuelta en PBS. Para ello, a las biopelículas lavadas 3 veces con PBS, se les adicionaron 100  $\mu$ L de caldo estéril correspondiente y 25  $\mu$ L de resazurina 0,02% y se incubó a 37°C en condiciones aerobiosis/microaerobiosis/anaerobiosis según corresponda durante 1-2 h. Si el pocillo cambia de color azul (resazurina) a rosado (resorufina), significa que las bacterias siguen siendo viables (Paytubi *et al.*, 2017).

Todos los ensayos se realizaron en triplicado en tres ensayos independientes.

## **7. Análisis estadísticos**

Los datos fueron ingresados a Excel y procesados utilizando el Software GraphPad Prism versión 8.0.1 para los análisis estadísticos. Se utilizó two-way ANOVA con el método de Dunnett de múltiples comparaciones y se consideró diferencia significativa con  $p < 0.05$ . Los valores informados corresponden a la media aritmética de las determinaciones y su desviación estándar (SD).

## RESULTADOS

### **1. Efecto de teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas sobre el crecimiento y viabilidad de cepas probióticas y patógenas**

Para analizar de forma preliminar la actividad que presentaban los compuestos sobre las cepas, se realizaron ensayos de actividad antibacteriana por difusión en agar y microdilución en caldo.

#### **1.1. Ensayo de inhibición por difusión en pocillo**

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en las Tablas 2, 3 y 4 para teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas, respectivamente, ninguno de los compuestos presentó actividad antibacteriana a la concentración de 500 µg/mL frente a las 6 cepas bacterianas ensayadas. Con respecto a los antibióticos control, las cepas *L. fermentum* UCO 979C, *L. rhamnosus* UCO 25A y *L. monocytogenes* 19115 fueron sensibles a amoxicilina, mientras que *B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 presentaron sensibilidad a metronidazol y *E. coli* 25922 fue resistente a ambos antimicrobianos ensayados.

**Tabla 2. Espectro de actividad antibacteriana exhibida por teaflavinas naturales a 500 µg/mL y antibióticos a 100 µg/mL.**

Cepa	Halo de inhibición (mm ± SD)							
	TF10	TF11	TF12	TF13	TF14	TF15	AMX	MTZ
<i>L. fermentum</i> UCO 979C	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	7 ± 1	S/I
<i>L. rhamnosus</i> UCO 25A	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	7 ± 1	S/I
<i>L. monocytogenes</i> 19115	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	7 ± 1	S/I
<i>E. coli</i> 25922	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>B. fragilis</i> 25285	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	32 ± 3
<i>F. nucleatum</i> 25586	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	12 ± 2	57 ± 3

Valores correspondientes a ensayos en triplicado expresados como la media aritmética ± SD.  
S/I: Sin inhibición.

**Tabla 3. Espectro de actividad antibacteriana exhibida por precursores semisintéticos de epicatequina a 500 µg/mL y antibióticos a 100 µg/mL.**

Cepa	Halo de inhibición (mm ± SD)				
	C1	C2	C3	AMX	MTZ
<i>L. fermentum</i> UCO 979C	S/I	S/I	S/I	11 ± 1	7 ± 1
<i>L. rhamnosus</i> UCO 25A	S/I	S/I	S/I	10 ± 1	7 ± 1
<i>L. monocytogenes</i> 19115	S/I	S/I	S/I	15 ± 1	S/I
<i>E. coli</i> 25922	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>B. fragilis</i> 25285	S/I	S/I	7 ± 1	S/I	33 ± 3
<i>F. nucleatum</i> 25586	S/I	S/I	S/I	12 ± 2	54 ± 1

Valores correspondientes a ensayos en triplicado expresados como la media aritmética ± SD.  
S/I: Sin inhibición.

**Tabla 4. Espectro de actividad antibacteriana exhibida por teaflavinas lipofílicas a 500 µg/mL y antibióticos a 100 µg/mL.**

Cepa	Halo de inhibición (mm ± SD)						
	T2	T3	T4	T5	T6	AMX	MTZ
<i>L. fermentum</i> UCO 979C	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	24 ± 5	S/I
<i>L. rhamnosus</i> UCO 25A	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	21 ± 1	S/I
<i>L. monocytogenes</i> 19115	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	26 ± 2	S/I
<i>E. coli</i> 25922	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>B. fragilis</i> 25285	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	45 ± 3
<i>F. nucleatum</i> 25586	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	12 ± 2	60 ± 3

Valores correspondientes a ensayos en triplicado expresados como la media aritmética ± SD.  
S/I: Sin inhibición.

## **1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)**

En concordancia con los resultados obtenidos en difusión en agar, en el ensayo de CMI realizado mediante microdilución en caldo, los compuestos teaflavinas naturales, precursores sintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas, no presentaron una actividad antibacteriana sobre las cepas ensayadas a las concentraciones de 2000 – 1000 – 500 - 250 µg/mL (Tabla 5, 6 y 7). Con respecto al control DMSO, se ensayó desde una concentración de 80%v/v hasta 10%v/v para observar el efecto del solvente sobre las cepas sin presencia de los compuestos (Figura 9). *L. fermentum* UCO 979C, *L. rhamnosus* UCO 25A y *L. monocytogenes* 19115 presentaron una mayor tolerancia al solvente, siendo su CMI de 80%v/v, mientras que para *B. fragilis* 25285 y *E. coli* 25922 fue de 40%v/v.

La cepa en que se observó una menor tolerancia fue *F. nucleatum* 25586 que tuvo una CMI variable entre 10-20%v/v.

**Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria exhibida por teaflavinas naturales desde 2000 µg/mL y antibióticos desde 1000 µg/mL.**

Cepa	CMI (µg/mL)							
	TF10	TF11	TF12	TF13	TF14	TF15	AMX	MTZ
<i>L. fermentum</i> UCO 979C	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>L. rhamnosus</i> UCO 25A	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>L. monocytogenes</i> 19115	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>E. coli</i> 25922	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>B. fragilis</i> 25285	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I
<i>F. nucleatum</i> 25586	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	1000

S/I: Sin inhibición. AMX: Amoxicilina; MTZ: Metronidazol. Valores correspondientes a ensayos en triplicado.

**Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria exhibida por precursores semisintéticos de epicatequina desde 2000 µg/mL; antibióticos desde 1000 µg/mL y DMSO 80%.**

Cepa	CMI (µg/mL)						DMSO (%)
	C1	C2	C3	AMX	MTZ		
<i>L. fermentum</i> UCO 979C	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	80	
<i>L. rhamnosus</i> UCO 25A	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	80	
<i>L. monocytogenes</i> 19115	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	80	
<i>E. coli</i> 25922	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	40	
<i>B. fragilis</i> 25285	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	40	
<i>F. nucleatum</i> 25586	S/I	S/I	S/I	S/I	7,81	20	

S/I: Sin inhibición. AMX: Amoxicilina; MTZ: Metronidazol; DMSO: Dimetilsulfóxido. Valores correspondientes a ensayos en triplicado.

**Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria exhibida por teaflavinas lipofílicas desde 2000 µg/mL; amoxicilina desde 750 µg/mL; metronidazol desde 100 µg/mL y DMSO 80%.**

Cepa	CMI (µg/mL)							
	T2	T3	T4	T5	T6	AMX	MTZ	DMSO (%)
<i>L. fermentum</i> UCO 979C	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	-	80
<i>L. rhamnosus</i> UCO 25A	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	-	80
<i>L. monocytogenes</i> 19115	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	-	80
<i>E. coli</i> 25922	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	-	40
<i>B. fragilis</i> 25285	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	-	S/I	40
<i>F. nucleatum</i> 25586	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	-	12,5	10

S/I: Sin inhibición. AMX: Amoxicilina; MTZ: Metronidazol; DMSO: Dimetilsulfóxido. - : Ensayos no realizados. Valores correspondientes a ensayos en triplicado.

En la Figura 9 se observa el ensayo CMI de las cepas con las teaflavinas lipofílicas desde una concentración de 2000 µg/mL hasta 250 µg/mL. Ninguna de las cepas fue inhibida a la mayor concentración ensayada.

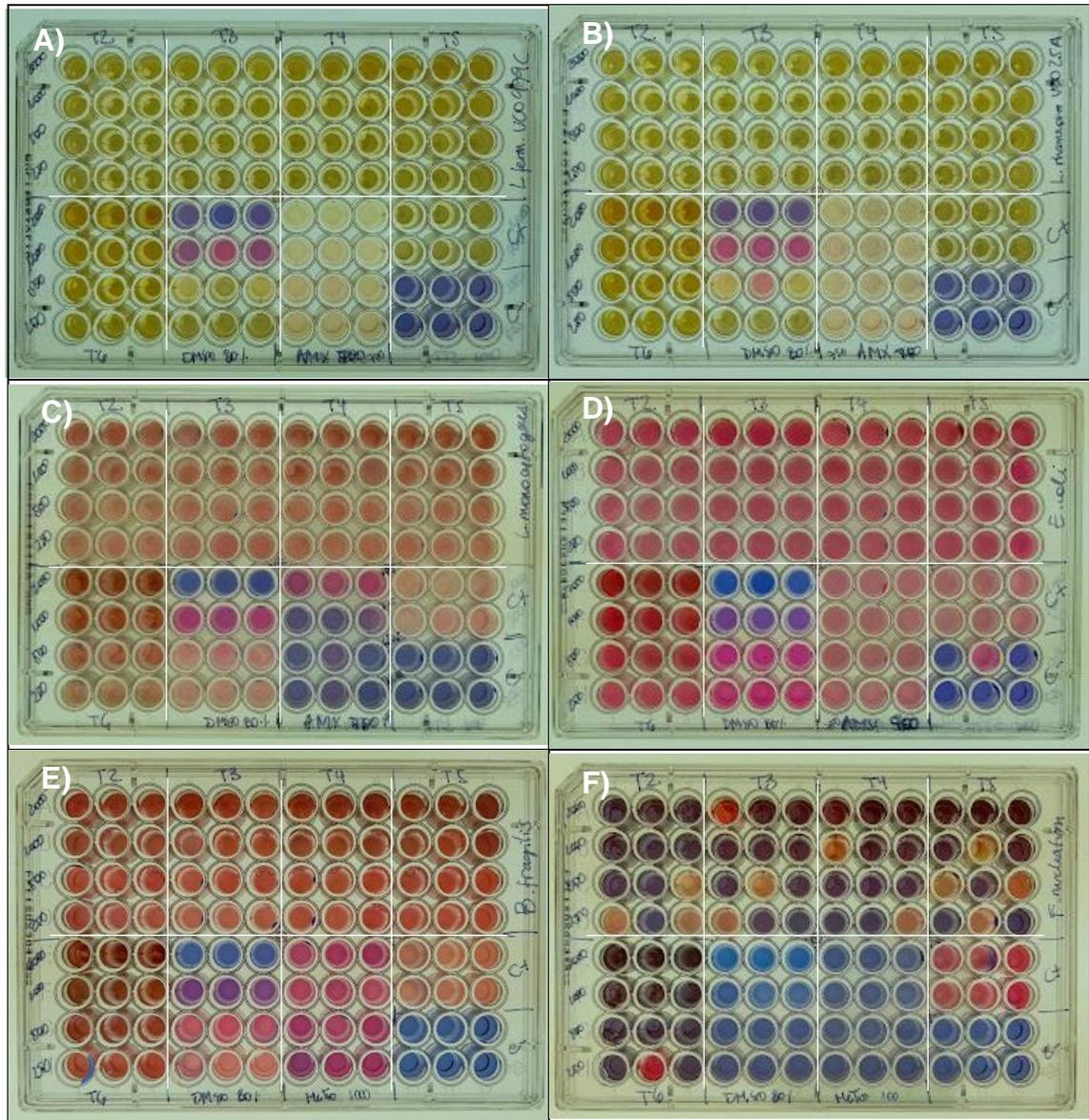


Figura 9. CMI de cepas en ausencia y presencia de teaflavinas lipofílicas desde 2000  $\mu\text{g/mL}$  hasta 250  $\mu\text{g/mL}$ . A) *L. fermentum* UCO-979C; B) *L. rhamnosus* UCO-25A; C) *L. monocytogenes* 19115; D) *E. coli* 25922; E) *B. fragilis* 25285 y F) *F. nucleatum* 25586.

Cada placa se dividió a la mitad para ensayar 4 diluciones de cada compuesto en triplicado. En filas A-D: T2 en columnas 1-3, T3 4-6, T4 7-9 y T5 10-12. En filas E-H: T6 en columnas 1-3, DMSO 4-6 y Amoxicilina (AMX) o Metronidazol (MTZ) 7-9. Control positivo (C+) en filas E-F columnas 10-12; y Control negativo (C-) en filas G-H columnas 10-12. Si pocillo cambia de azul a rosado o amarillo/naranja, resazurina fue reducida a resorufina indicando

viabilidad bacteriana, por el contrario, si permanece azul, indica inhibición del crecimiento bacteriano.

Con respecto a la CMB, como ninguno de los compuestos presentó actividad inhibitoria sobre las cepas, solo se ensayaron los controles antibióticos y DMSO (Tabla 8). Para *L. fermentum* UCO 979C, *L. rhamnosus* UCO 25A, *B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 la CMB de DMSO fue igual que la CMI, mientras que en *L. monocytogenes* 19115 y *E. coli* 25922 no fue posible determinar la CMB a las concentraciones ensayadas.

**Tabla 8. Concentración mínima bactericida exhibida.**

Cepa	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	AMX	MTZ	DMSO (%)
<i>L. fermentum</i> UCO 979C	62,5	-	80
<i>L. rhamnosus</i> UCO 25A	31,25	-	80
<i>L. monocytogenes</i> 19115	1000	-	S/M
<i>E. coli</i> 25922	S/M	-	S/M
<i>B. fragilis</i> 25285	-	250	40
<i>F. nucleatum</i> 25586	-	< 12,5	20

S/M: Sin muerte bacteriana. AMX: Amoxicilina; MTZ: Metronidazol; DMSO: Dimetilsulfóxido.

- : Ensayo no realizado. Valores correspondientes a ensayos en triplicado.

## **2. Efecto de teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas sobre la formación de biopelículas y su viabilidad**

### **2.1. Cuantificación de biopelícula mediante ensayo de cristal violeta**

Se analizó el efecto de los compuestos sobre las biopelículas de las diferentes cepas comparando las densidades ópticas a 590 nm ( $DO_{590nm}$ ) obtenidas de la formación de la biopelícula en ausencia y en presencia de los compuestos a una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  y antibióticos amoxicilina y metronidazol a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **2.1.1. Teaflavinas naturales**

Como se observa en la Figura 10, todas las cepas en ausencia de compuesto presentaron valores de DO por sobre el valor de corte  $DO_c$ , indicando que todas ellas son productoras de biopelícula en distintos niveles. Con respecto a las teaflavinas naturales, estas no tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre la formación de biopelículas. Para las cepas probióticas *L. fermentum* UCO-979C y *L. rhamnosus* UCO-25A (Figura 10 A y B), los compuestos generaron una estimulación de la biopelícula, siendo TF10 el que aumentó la formación de la biopelícula hasta un 163,4% y 141,9%, respectivamente, pasando de una  $DO_{590nm}$  de  $2,44 \pm 1,60$  y  $2,80 \pm 1,66$  sin compuesto hasta valores de  $3,98 \pm 0,03$  y  $3,98 \pm 0,04$ . Por su parte, TF12 mantuvo el porcentaje de formación cercano a un 112,9% y 104,5% para cada cepa. Sin embargo, para *L. monocytogenes* 19115, los compuestos TF13, TF14 y TF15 generaron una disminución de la biomasa de

biopelícula, aunque no significativo, a un 80,4%, 63,2% y 75,6% respectivamente, llegando a valores de  $DO_{590nm}$  de  $1,61 \pm 0,37$ ;  $1,26 \pm 0,39$  y  $1,51 \pm 0,63$  versus el control sin compuesto que fue de  $1,99 \pm 1,22$  (Figura 10 C).

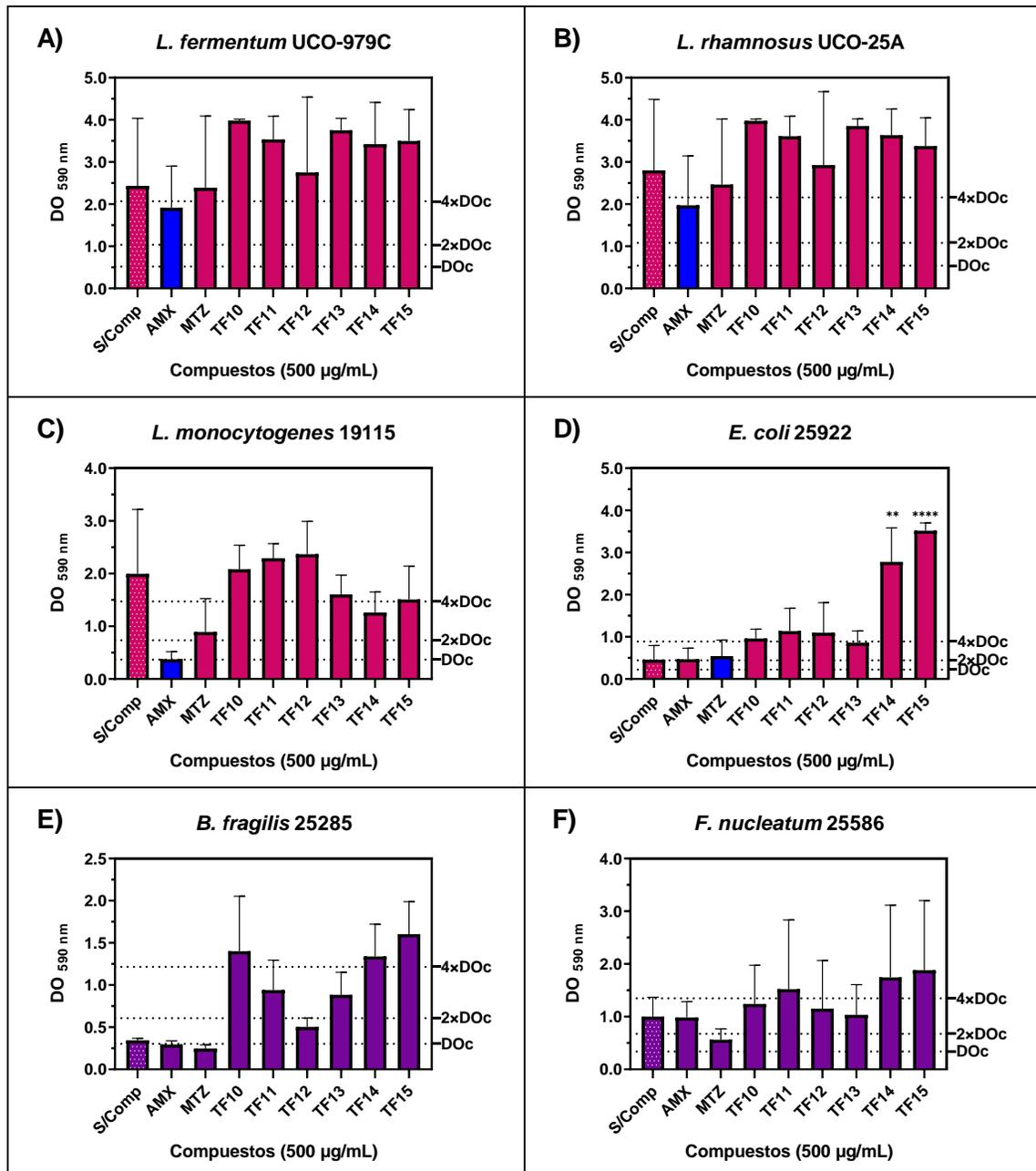


Figura 10. Cuantificación de la densidad óptica a 590 nm ( $DO_{590nm}$ ) y viabilidad de la biopelícula formada en ausencia y presencia de teaflavinas naturales a 500  $\mu\text{g/mL}$ . A) *L.*

*fermentum* UCO-979C; B) *L. rhamnosus* UCO-25A; C) *L. monocytogenes* 19115; D) *E. coli* 25922; E) *B. fragilis* 25285 y F) *F. nucleatum* 25586.

Valores expresados como la media aritmética  $\pm$  SD de tres ensayos independientes. Significancia estadística comparado al control sin compuesto (S/Comp): \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . DOc: Densidad óptica control de corte correspondiente a la media aritmética + 3SD del blanco/control negativo.  $DO \leq DOc$  = no productor;  $DOc < DO \leq 2 \times DOc$  = débil;  $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$  = moderado y  $4 \times DOc < DO$  = fuerte. Código de colores: Azul - muerte bacteriana; Rosado - viabilidad bacteriana; Morado - resultado sin determinar en ensayo con resazurina. S/Comp: Sin compuesto; AMX: Amoxicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; MTZ: Metronidazol 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

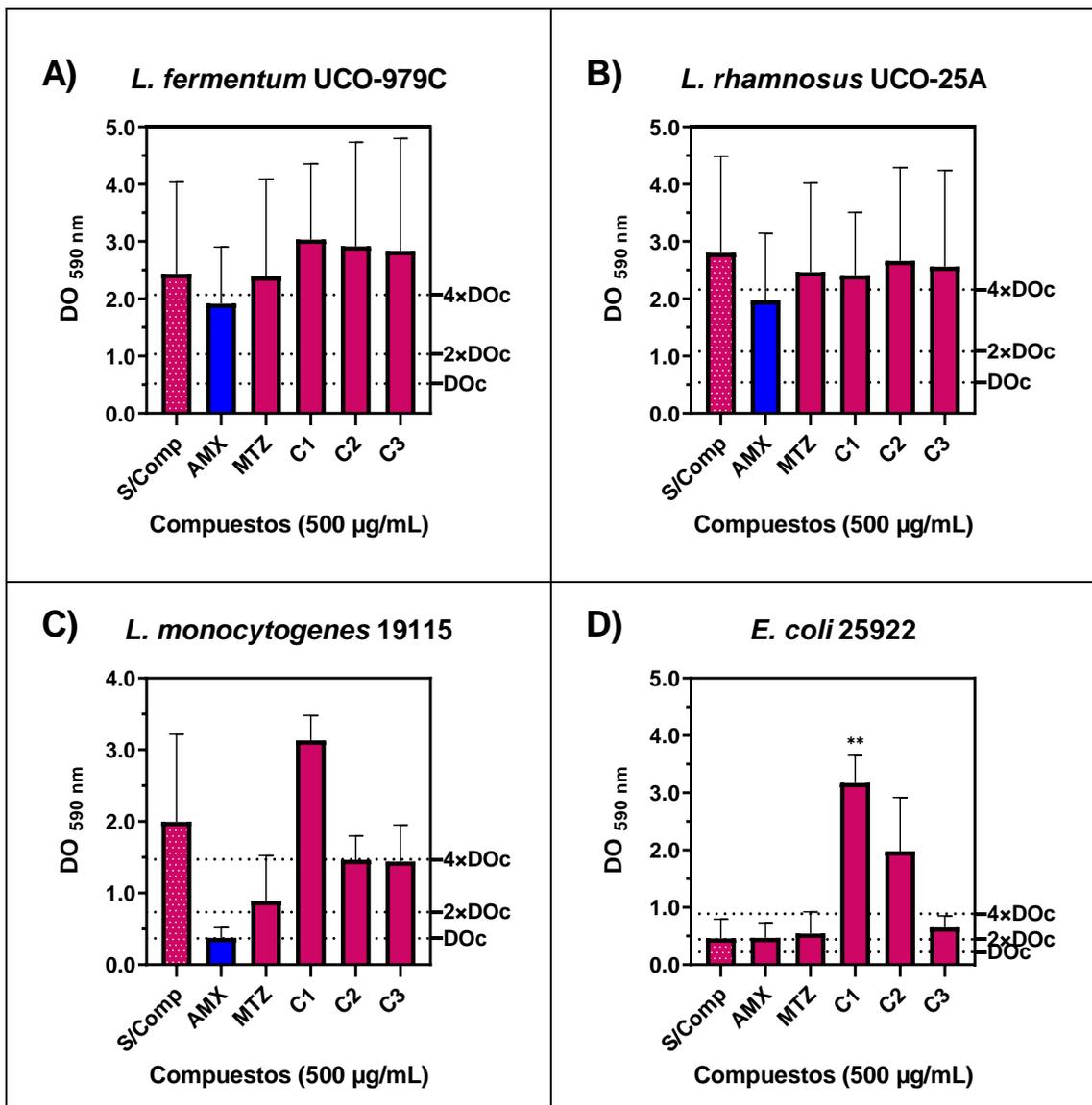
Para las cepas asociadas a cáncer colorrectal, solo se observó estimulación de la biomasa de biopelícula con todos los compuestos ensayados. Es de destacar la diferencia significativa que generó para *E. coli* 25922 TF14 y TF15, siendo TF15 el que produjo un mayor aumento de la  $DO_{590\text{nm}}$  de  $0,46 \pm 0,33$  sin compuesto hasta  $3,52 \pm 0,18$ , siendo así un aumento hasta un 761,3%. Por su parte, TF14 generó un incremento hasta un 600,3%, aumentando la  $DO_{590\text{nm}}$  hasta  $2,78 \pm 0,81$ . Todas las teaflavinas ocasionaron que *E. coli* 25922 pasara de ser una cepa productora de biopelícula moderada a fuerte (Figura 10 D). En el caso de las cepas anaerobias, para *B. fragilis* 25285 TF10, TF14 y TF15 fueron los compuestos que incrementaron en mayor porcentaje a la biomasa de la biopelícula, llevando desde una  $DO_{590\text{nm}}$  sin compuesto de  $0,34 \pm 0,02$  a valores de  $1,40 \pm 0,65$ ,  $1,34 \pm 0,38$  y  $1,60 \pm 0,38$ , respectivamente, pasando a ser de una productora débil de biopelícula a una fuerte en presencia de estos compuestos (Figura 10 E). Efecto similar se observó en *F. nucleatum* 25586 con TF14 y TF15, pero fue TF11 también el que estimuló la formación de biopelícula llegando a

valores de  $DO_{590nm}$   $1,74\pm 1,37$ ,  $1,88\pm 1,32$  y  $1,52\pm 1,31$ , respectivamente, versus  $1,00\pm 0,37$  sin compuesto (Figura 10 F).

### **2.1.2. Precursores semisintéticos de epicatequina**

En concordancia con el ensayo anterior, todas las cepas presentaron valores de DO por sobre el valor de corte DOc en ausencia de compuesto, indicando que todas ellas son productoras de biopelícula en distintos niveles (Figura 11). Con respecto al efecto de los precursores semisintéticos de epicatequina (C1, C2 y C3), estos tampoco tuvieron un efecto inhibitorio estadísticamente significativo sobre las biopelículas formadas, siendo más estimulantes en forma general. Solo se vio disminuida la biomasa de la película cuantificada en presencia del correspondiente antibiótico al cual la cepa es sensible. En las cepas probióticas *L. fermentum* UCO-979C y *L. rhamnosus* UCO-25A, el efecto de los compuestos mantuvo la formación de biopelícula similar al control sin compuesto con valores de  $DO_{590nm}$  sobre 4 veces la DOc, demostrando así ser cepas fuertes formadoras de biopelícula (Figura 11 A y B). Para *L. monocytogenes* 19115 que, si bien C1 presentó un efecto estimulador hasta un 157,0%, este aumento de la  $DO_{590nm}$  de  $1,99\pm 1,22$  a  $3,13\pm 0,35$  no fue estadísticamente significativo con respecto al control sin compuesto. Sin embargo, C2 y C3 presentaron una inhibición leve hasta un 73,4% y 72,3% respectivamente, pasando a ser cepas productoras de biopelículas moderado en presencia de estos compuestos (Figura 11 C). En *E. coli* 25922, por otro lado, dos de los tres compuestos generaron un aumento de la biomasa de la biopelícula, siendo C1 el que generó una estimulación

significativa con respecto al control sin compuesto, pasando de valores de  $DO_{590nm}$  de  $0,46 \pm 0,33$  a  $3,17 \pm 0,50$ , presentando un incremento hasta un 686,4%. C2 si bien no generó un aumento estadísticamente significativo, fue hasta un 428,7% con un valor de  $DO_{590nm}$  de  $1,98 \pm 0,94$  (Figura 11 D).



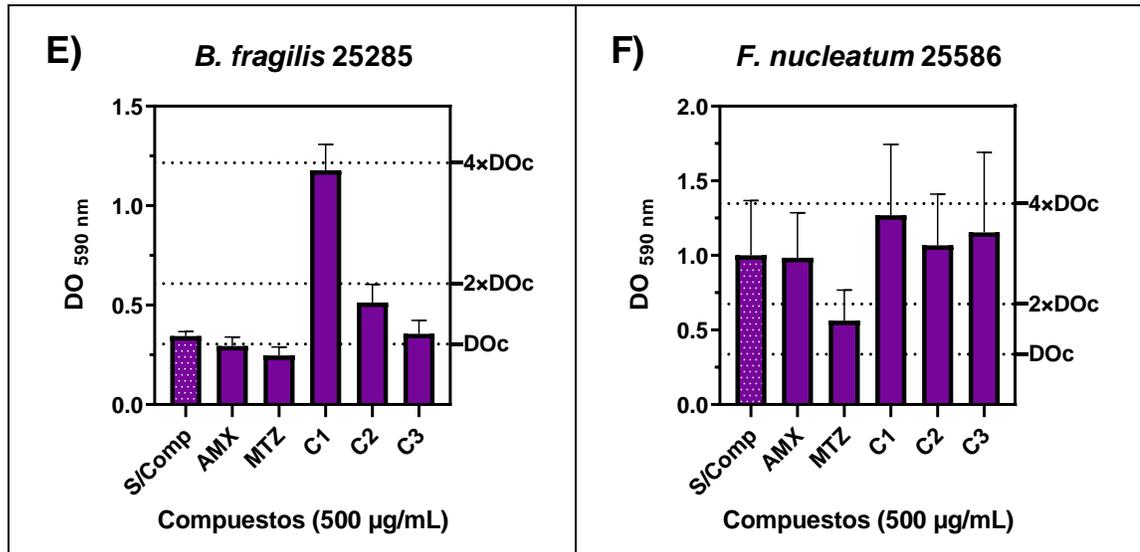


Figura 11. Cuantificación de la densidad óptica a 590 nm ( $DO_{590nm}$ ) y viabilidad de la biopelícula formada en ausencia y presencia de precursores semisintéticos de epicatequina a 500 µg/mL. A) *L. fermentum* UCO-979C; B) *L. rhamnosus* UCO-25A; C) *L. monocytogenes* 19115; D) *E. coli* 25922; E) *B. fragilis* 25285 y F) *F. nucleatum* 25586.

Valores expresados como la media aritmética  $\pm$  SD de tres ensayos independientes. Significancia estadística comparado al control sin compuesto (S/Comp): \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . DOc: Densidad óptica control de corte correspondiente a la media aritmética + 3SD del blanco/control negativo.  $DO \leq DOc$  = no productor;  $DOc < DO \leq 2 \times DOc$  = débil;  $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$  = moderado y  $4 \times DOc < DO$  = fuerte. Código de colores: Azul - muerte bacteriana; Rosado - viabilidad bacteriana; Morado - resultado sin determinar en ensayo con resazurina. S/Comp: Sin compuesto; AMX: Amoxicilina 100 µg/mL; MTZ: Metronidazol 100 µg/mL.

Para la cepa anaerobia *B. fragilis* 25285 los 3 compuestos estimularon la biopelícula, siendo C1 el que lo hizo con mayor notoriedad (Figura 11 E). Alcanzó valores de  $DO_{590nm}$  de  $1,18 \pm 0,13$  mientras que sin compuesto era de  $0,34 \pm 0,02$ , lo que corresponde a un incremento hasta un 341,6%. Sin embargo, aunque este compuesto ocasiona el cambio que la cepa sea productora débil a moderado de biopelícula, el valor presentado no es significativo. Finalmente, en *F. nucleatum*

25586, ninguno de los compuestos generó un efecto significativo comparado con el control sin compuesto, manteniéndose el nivel moderado de producción de biopelícula (Figura 11 F).

### 2.1.3. Teaflavinas lipofílicas

A diferencia de las teaflavinas naturales y precursores semisintéticos, las teaflavinas lipofílicas sintetizadas (T2 a T6) en su mayoría tuvieron un efecto significativo sobre 4 de las 6 cepas ensayadas (Figura 12). Al igual que en ensayos previos, las cepas sin presencia de compuesto presentaron una  $DO_{590nm}$  mayor a la  $DO_c$ , por lo que todas son productoras de biopelícula a distintos niveles. En las cepas probióticas todos los compuestos estimularon la producción de biopelícula, siendo mayores los efectos de T2, T4, T5 y T6 en ambas a la concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$ . La mayor diferencia significativa se presentó en *L. rhamnosus* UCO-25A, llegando a incrementar hasta un 478,2% en presencia de T4. El valor de  $DO_{590nm}$  sin compuesto de  $0,83\pm 0,59$  aumentó hasta  $3,79\pm 0,16$ ;  $2,92\pm 0,18$ ;  $3,98\pm 0,02$ ;  $3,97\pm 0,06$  y  $3,79\pm 0,06$  para T2, T3, T4, T5 y T6 respectivamente (Figura 12 B). Para *L. fermentum* UCO-979C las  $DO_{590nm}$  para T2, T3, T4, T5 y T6 fueron, respectivamente, de  $3,75\pm 0,21$ ;  $3,19\pm 0,50$ ;  $3,99\pm 0,01$ ;  $3,96\pm 0,03$  y  $3,88\pm 0,04$  versus  $DO_{590nm}$  de  $1,58\pm 1,17$  sin compuesto (Figura 12 A). En el caso de *L. monocytogenes* 19115 solo amoxicilina a la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  tuvo un efecto inhibitorio significativo, mientras que el resto de los compuestos ensayados mantuvo porcentajes similares al control sin compuesto (Figura 12 C).

Similar a los resultados con los grupos anteriores, nuevamente en *E. coli* 25922 se observó una estimulación de la producción y, por consiguiente, un aumento de la biomasa de la biopelícula cuantificada a 590 nm. Los compuestos T3, T4 y T5 lograron incrementos significativos con respecto al control sin compuesto, con valores de DO<sub>590nm</sub> de 3,15±0,72; 3,63±0,36 y 3,88±0,11 versus 1,06±0,34 respectivamente (Figura 12 D). Solo el antibiótico metronidazol a 100 µg/mL generó un efecto inhibitor.

En las cepas anaerobias, para *F. nucleatum* 25586 nuevamente ninguno de los compuestos generó un efecto significativo comparado con el control sin compuesto, manteniéndose el nivel moderado de producción de biopelícula para la mayoría de los compuestos, a excepción de T3, que generó que la cepa alcanzara una producción fuerte biopelícula, obteniéndose valores de DO<sub>590nm</sub> de 1,64±0,86 para el control sin compuesto a 2,75±0,70 (Figura 12 F). Por el contrario, en *B. fragilis* 25285, los 5 compuestos estimularon la biopelícula, pero T4, T5 y T6 lo hicieron de forma significativa. Los valores de DO<sub>590nm</sub> de forma respectiva fueron 2,45±1,39; 2,64±1,23 y 2,57±1,33 mientras que sin compuesto fue de 0,92±0,97, lo que implica aumentos hasta 287,6% para el caso de T5 (Figura 12 E).

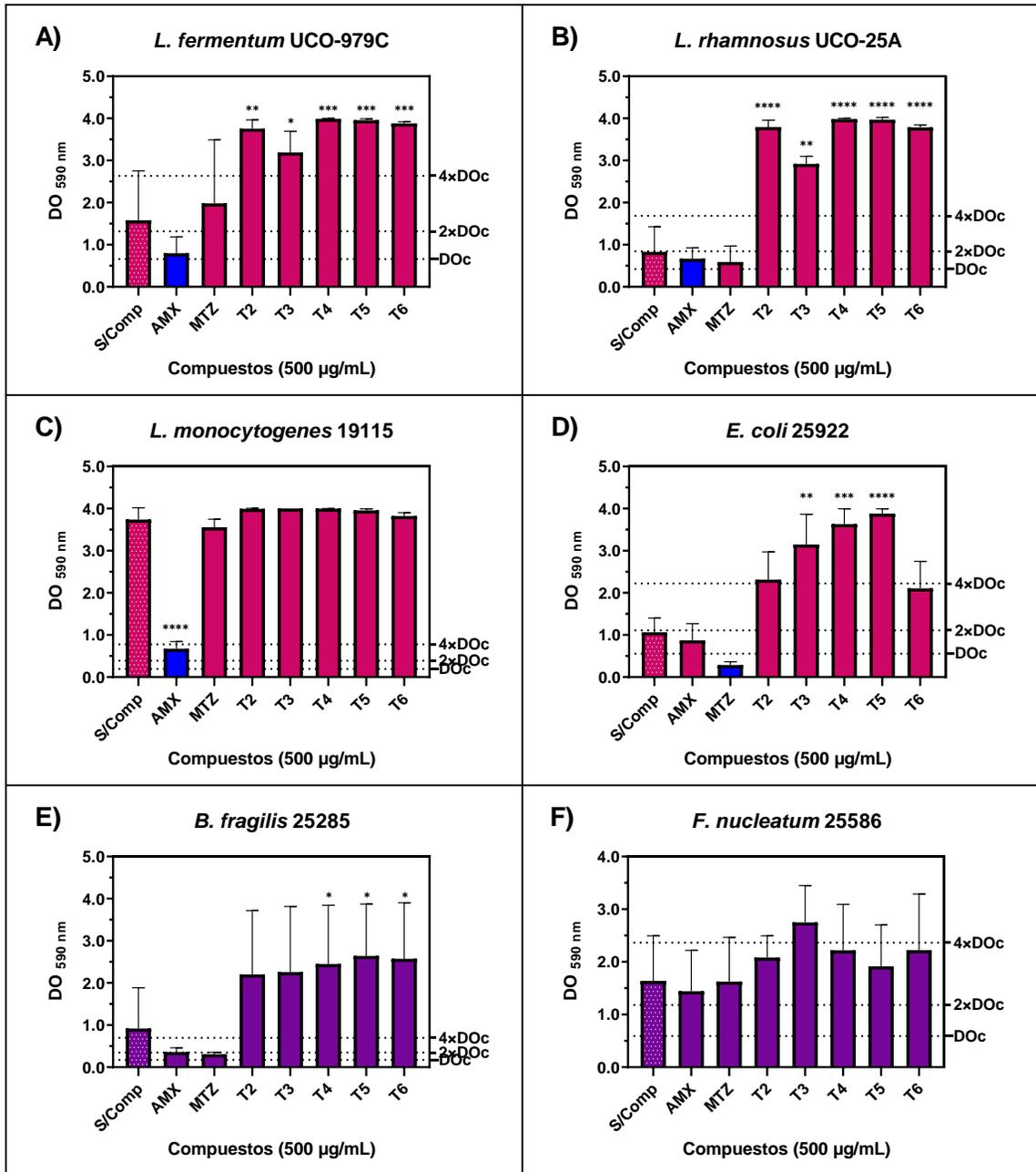


Figura 12. Cuantificación de la densidad óptica a 590 nm (DO<sub>590nm</sub>) y viabilidad de la biopelícula formada en ausencia y presencia de teaflavinas lipofílicas a 500 µg/mL. A) *L. fermentum* UCO-979C; B) *L. rhamnosus* UCO-25A; C) *L. monocytogenes* 19115; D) *E. coli* 25922; E) *B. fragilis* 25285 y F) *F. nucleatum* 25586.

Valores expresados como la media aritmética ± SD de tres ensayos independientes. Significancia estadística comparado al control sin compuesto (S/Comp): \* $p \leq 0.05$ ;

**\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . DOc: Densidad óptica control de corte correspondiente a la media aritmética + 3SD del blanco/control negativo.  $DO \leq DOc$  = no productor;  $DOc < DO \leq 2 \times DOc$  = débil;  $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$  = moderado y  $4 \times DOc < DO$  = fuerte. Código de colores: Azul - muerte bacteriana; Rosado - viabilidad bacteriana; Morado - resultado sin determinar en ensayo con resazurina. S/Comp: Sin compuesto; AMX: Amoxicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; MTZ: Metronidazol 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .**

En la Figura 13 se observa una de las repeticiones del ensayo sobre formación de biopelículas en presencia de las teaflavinas lipofílicas, cuantificando la biomasa con cristal violeta (CV) y analizando la viabilidad con resazurina (RSZ). En concordancia con la Figura 12, se observa una estimulación de la biopelícula en las cepas probióticas *L. fermentum* UCO-979C y *L. rhamnosus* UCO-25A. Para el caso de *L. monocytogenes* 19115 también se ve un efecto estimulador con los compuestos; sin embargo, este no es notoriamente mayor al control sin compuesto (Figura 13 A-B). Para las bacterias asociadas con CCR, en *E. coli* 25922 predomina el efecto estimulador, viéndose solo disminuido en presencia del antibiótico metronidazol. Para *B. fragilis* 25285 también se observa un efecto estimulador; sin embargo, en *F. nucleatum* 25586 el efecto es inhibitorio en presencia de los compuestos como con los antibióticos amoxicilina y metronidazol (Figura 13 C-D).

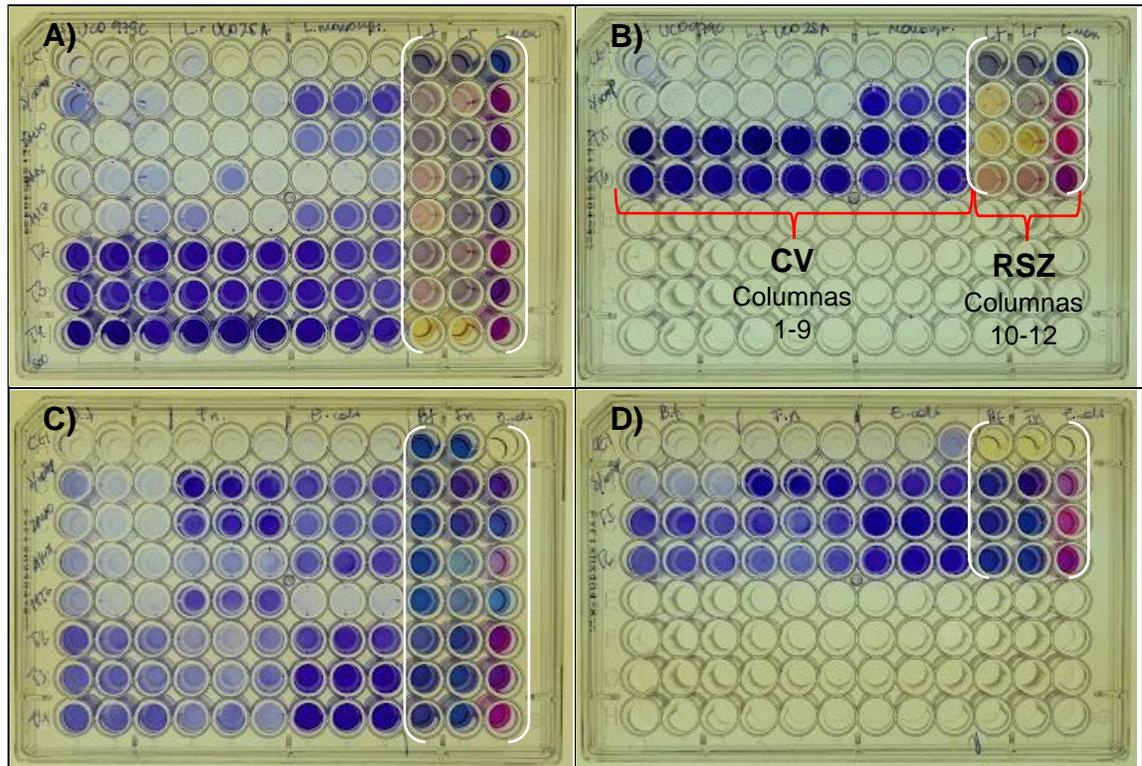


Figura 13. Formación y viabilidad de biopelículas de cepas en presencia de teaflavinas lipofílicas a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En columnas 1-9 se observa la cuantificación mediante método con cristal violeta (CV), y en columnas 10-12 la viabilidad utilizando resazurina (RSZ; paréntesis blancos). En filas de A) y C) se encuentran en orden: Control negativo (C-), sin compuesto (S/comp), DMSO, AMX, MTZ, T2, T3 y T4. En filas de B) y D): C-, S/comp, T5 y T6. A) y B) Columnas 1-3 y 10 *L. fermentum* UCO-979C, 4-6 y 11 *L. rhamnosus* UCO-25A y 7-9 y 12 *L. monocytogenes* 19115; C) y D) Columnas 1-3 y 10 *B. fragilis* 25285, 4-6 y 11 *F. nucleatum* 25586 y 7-9 y 12 *E. coli* 25922. Si pocillo cambia de azul a rosado o amarillo/naranja, resazurina fue reducida a resorufina indicando viabilidad bacteriana, por el contrario, si permanece azul, indica muerte bacteriana.

## 2.2. Viabilidad de biopelícula mediante resazurina

Se analizó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad de las bacterias presentes en las biopelículas en ausencia y en presencia de los compuestos a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y antibióticos amoxicilina y metronidazol a 100

µg/mL. Sin embargo, no fue posible realizarlo para las cepas patógenas anaerobias debido al extenso tiempo de tratamiento de las biopelículas en que estaban expuestas al oxígeno ambiental, lo que ocasionó la muerte bacteriana independiente del compuesto que se adicionara y el pocillo permaneciera azul (Figura 13 C-D).

Según los resultados (observados en las Figuras 10, 11 y 12), ninguno de los compuestos teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina o teaflavinas lipofílicas, fue capaz de generar la muerte bacteriana en la biopelícula. Solo los controles antibióticos a 100 µg/mL tuvieron un efecto sobre la viabilidad bacteriana: Para *L. fermentum* UCO-979C, *L. rhamnosus* UCO-25A y *L. monocytogenes* 19115, susceptibles a amoxicilina, se observó un efecto inhibitorio por parte de éste ocasionando que los pocillos permanecieran azules (resazurina), mientras que en el caso de *E. coli* 25922, solo se vio afectada su viabilidad por metronidazol.

## DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es reconocido como el tercer tipo de cáncer más prevalente y corresponde al cuarto lugar entre los principales contribuyentes a la mortalidad relacionada con el cáncer (W. X. Li *et al.*, 2023). En 2023, Santucci *et al.* reportaron las proyecciones de mortalidad por cáncer y las tasas de mortalidad para el año 2023 en hombres y mujeres de los siete países más poblados de América Latina. Acorde a sus resultados, la mortalidad por CCR ocupó el tercer lugar en los países analizados, siendo Argentina el que presentó las tasas más altas. En el caso de Chile, entre 2015 y 2019 se reportaron 1382 muertes de hombres y 1414 de mujeres con tasas de mortalidad estandarizada por edad (población mundial) observadas entre los mismos años de 10.86 y 8.15 por cada 100000 personas, respectivamente (Santucci *et al.*, 2023). Se ha reportado que existe una correlación entre la progresión de la enfermedad y las biopelículas, por lo que éstas, que combinan la composición y la estructura de la microbiota, se reconocen ahora como una etapa potencialmente pro-carcinogénica (Dejea & Sears, 2016; Mirzaei *et al.*, 2020; Y. M. Wang *et al.*, 2023). Epidemiológicamente, se han relacionado 3 especies bacterianas con el desarrollo de CCR: *Bacteroides fragilis* enterotoxigénica (ETBF), *Escherichia coli pks+* (productora de colibactina) y *Fusobacterium nucleatum* (Dejea & Sears, 2016; S. Li *et al.*, 2019; Lopez *et al.*, 2021; Mirzaei *et al.*, 2020; Motta, Wallace, Buret, Deraison, & Vergnolle, 2021; Raskov *et al.*, 2017). Sin embargo, los probióticos también presentan una gran

capacidad para formar biopelículas, lo que favorece la colonización y mayor permanencia en la mucosa del huésped, manteniendo así a su población y evitando la colonización por bacterias patógenas (María José Salas-Jara *et al.*, 2016). Por tanto, es importante que agentes que afecten la formación de biopelículas de patógenos no lo hagan sobre la microbiota intestinal al inhibir dicha propiedad en los probióticos (Dueñas *et al.*, 2015). Los polifenoles del té pueden modular la composición de la microbiota intestinal (Hervert-Hernández & Goñi, 2011), y se han reportado efectos sobre las biopelícula de especies como *S. mutans* (Kong *et al.*, 2021; S. Wang *et al.*, 2019) y *F. nucleatum* (Lagha *et al.*, 2017). Debido a la posible dificultad de las moléculas para penetrar la membrana debido a su alta hidrofiliidad (Opoku-Temeng & Sintim, 2016), en este trabajo de tesis se ensayaron precursores semisintéticos de epicatequina y las correspondientes teaflavinas lipofílicas sintetizadas para comparar su efecto con teaflavinas naturales sobre la viabilidad y las biopelículas de las siguientes especies bacterianas: como control patógeno formador de biopelícula la cepa *Listeria monocytogenes* 19115; como cepas probióticas a *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C y *Lacticaseibacillus rhamnosus* UCO-25A y; como parte de las especies asociadas a CCR a la cepa *pkst+* *Escherichia coli* 25922 y las cepas anaerobias *Bacteroides fragilis* 25285 y *Fusobacterium nucleatum* 25586. Con el objetivo de conocer las concentraciones iniciales a experimentar posteriormente en los ensayos de biopelículas, se determinó en primera instancia la actividad antibacteriana que presentaban los compuestos sobre las cepas

elegidas. A modo de screening inicial se eligió el método de difusión en pocillo de agar, ya que se utiliza ampliamente para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas o extractos microbianos (Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda, 2016). Se seleccionó solo una concentración de 500 µg/mL en vista de que para *F. nucleatum*, Lagha *et al.* reportó CMI y CMB  $\geq$  500 µg/mL para teaflavinas, EGCG, extractos de té verde y té negro (Lagha *et al.*, 2017). Según los resultados observados en las Tablas 2, 3 y 4, tanto las teaflavinas naturales, como los precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas, no presentaron actividad antibacteriana a la concentración de 500 µg/mL frente a las 6 cepas bacterianas ensayadas. Posteriormente, debido a que no se observó inhibición en el crecimiento bacteriano en medio sólido y para complementar, se procedió a realizar ensayos mediante microdilución en caldo y así conocer el comportamiento de los compuestos en medio líquido y obtener los valores de CMI y CMB. En las tablas 5, 6 y 7 se observan los resultados de CMI para los compuestos a las concentraciones de 2000 – 1000 – 500 - 250 µg/mL. Ninguno de los compuestos, teaflavinas naturales, precursores sintéticos de epicatequina ni teaflavinas lipofílicas, generaron una inhibición en el crecimiento bacteriano incluso a 2000 µg/mL, observándose los pocillos color rosado debido a la reducción activa de resazurina (azul) en resorufina (rosado/amarillo) indicando así actividad metabólica (Figura 9). Fue indispensable utilizar resazurina como indicador para evitar falsos positivos en el crecimiento bacteriano, debido a que los compuestos precipitaban cuando se agregaban al pocillo y entraban en

contacto con el caldo, lo cual podía confundirse con turbidez por crecimiento bacteriano.

A pesar de que desde hace años se le reconocen propiedades antibacterianas al té y sus flavonoides sobre cepas patógenas como *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *H. pylori*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *S. aureus*, *S. mutans*, entre otras (Friedman, 2007; Siddiqui *et al.*, 2016), la tolerancia de las bacterias a los polifenoles depende de la especie bacteriana y de la estructura del polifenol (Almajano, Carbo, Jimenez, & Gordon, 2008), ya que se han reportado estudios en que la acción antibacteriana de los polifenoles difiere en función de la composición fosfolipídica de la membrana citoplasmática bacteriana así como según la posición y el número de moléculas de galloilo presentes en la estructura (Sato, Tomita, Sonoda, & Miyamoto, 2022). Por ejemplo, contra *S. aureus* meticilino resistente se informaron rangos de CMI variables entre diferentes tipos de té de 1250-5000 µg/mL para el té verde, 1250-5000 µg/mL para el té oolong, 625-2500 µg/mL para el té blanco, 2500-5000 µg/mL para el té negro chino y de 5000 µg/mL para el té negro (Bansal *et al.*, 2013); mientras que para el caso de *B. coagulans*, la actividad antibacteriana de las catequinas polimerizadas fue mayor según la estructura (TF3 > TF2B > TF2A > TF), al igual que los cambios en la fluidez de las membranas citoplasmáticas, concluyendo que las catequinas polimerizadas con uno o más restos de galloilo (TF2A, TF2B y TF3) provocaron una reducción significativa de la fluidez de la membrana (Sato *et al.*, 2022). Los resultados obtenidos sobre las cepas de *E. coli* 25922 y probióticas concuerdan

con lo reportado por Almajano *et al.*, en que ensayaron la actividad antimicrobiana de infusiones de té negro sobre cepas de *Escherichia coli* y *Lactobacillus acidophilus* y no obtuvieron inhibición por parte de estos. Además, concluyeron que la actividad antimicrobiana es mayor en el té no fermentado (verde - catequinas) que en el té fermentado (negro - teaflavinas), por lo que no todos los polifenoles del té tienen efectos antimicrobianos (Almajano *et al.*, 2008). En 2011, Ankolekar *et. al.* ensayaron distintos extractos de té sobre *H. pylori* y bacterias lácticas, y encontraron que, si bien fueron capaces de inhibir a *H. pylori* mediante posibles mecanismos de alteración de la membrana, daño del ADN o inhibición de la ureasa, no inhibieron especies de bacterias lácticas beneficiosas, como *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *B. longum* (Ankolekar *et al.*, 2011). Se ha reportado, además, que la microbiota juega un rol importante en la metabolización de las teaflavinas, lo que podría explicar el efecto estimulante de los fenoles del té sobre determinadas bacterias intestinales (Liu, Bruins, Ni, & Vincken, 2018). Chen y colaboradores demostraron que las cepas bacterianas puras *Lactobacillus plantarum* 299v y *Bacillus subtilis*, consideradas comensales intestinales y/o probióticos, son capaces de metabolizar el TFDG en pirogalol (PG), ácido gálico (GA), TF, TF3G y TF3'G, posiblemente debido a que *L. plantarum* presenta galloil-esterasa y descarboxilasa, que hidrolizan los polifenoles de la semilla de uva y forman ácido gálico y pirogalol, respectivamente, y que también se han aislado diferentes tipos de esterases de *B. subtilis* capaces de hidrolizar varios ésteres (Chen *et al.*, 2012). Esta estimulación selectiva del crecimiento mediante

compuestos fenólicos en géneros como *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. es similar al efecto estimulante de los prebióticos como la inulina y los galactooligosacáridos (Liu *et al.*, 2018). No obstante, a pesar de que se ha informado que el té negro estimula el crecimiento de *Lactobacillus*, Gao *et al.* en 2020 reportaron una disminución en la abundancia relativa de *Lactobacillus*, sin embargo, concluyeron que la supresión fue inducida por el aumento del ácido biliar total luminal más que por el té negro (Gao, Xu, & Yin, 2020). Para la especie patógena *L. monocytogenes*, generalmente se han informado efectos inhibitorios de las teaflavinas sobre ella. Vodnar reportó que la incorporación de extractos de té a las películas recubiertas de quitosano aumentó considerablemente su eficacia contra *L. monocytogenes* ATCC 19115 (Vodnar, 2012), mientras que Du *et al.* reportó CMI de EGCG para *L. monocytogenes* ATCC 19114 de 200 µg/mL (Du, Zhou, Liu, Chen, & Li, 2018). Sin embargo, en contraste con lo anterior y en concordancia con los resultados obtenidos, Oh y colaboradores en 2013 observaron que extractos de té negro no generaron inhibición contra los patógenos orales *S. mutans* y *S. sobrinus* y los patógenos transmitidos por los alimentos *L. monocytogenes*, *S. flexneri* y *S. entérica*. Esto refuerza lo concluido por Almajano, ya que sólo el extracto etanólico de té verde inhibió el crecimiento de todos los patógenos ensayados a pesar de tener resultados similares en la actividad antioxidante, demostrando así que presentan actividades antimicrobianas diferentes, lo que puede deberse al cambio de los compuestos químicos de catequinas a teaflavinas (Oh, Jo, Cho, Kim, & Han, 2013). El

mecanismo involucrado mejor aceptado en la inhibición de los compuestos del té sobre las bacterias es su capacidad de alterar o dañar las membranas celulares (Ankolekar *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018). Estos compuestos generan la ruptura de los enlaces cruzados del peptidoglicán, lo que disminuye su capacidad protectora y aumenta la permeabilidad llevando a la muerte bacteriana. Las bacterias Gram negativas son menos susceptibles que las Gram positivas, debido a que su membrana externa, además de proteger a la capa de peptidoglicano periplásmica, repele a los polifenoles del té gracias a su contenido de lipopolisacáridos cargados negativamente (Liu *et al.*, 2018). Este mecanismo explicaría la no inhibición observada de los compuestos sobre las cepas Gram negativas ensayadas *E. coli* 25922, *B. fragilis* 25285 y *F. nucleatum* 25586 incluso a concentraciones hasta 2000 µg/mL, lo cual es similar a los resultados obtenidos contra *F. nucleatum* por Bedran *et al.* con CMI para extracto de té negro de 2000 µg/mL y CMB de 4000 µg/mL (Bedran, Morin, Spolidorio, & Grenier, 2015); o Higuchi *et al.*, con valores de CMI de EGCG de 2500 µg/mL (Higuchi *et al.*, 2019). No obstante, la susceptibilidad del peptidoglicano no puede explicar completamente los efectos de los polifenoles del té, en vista de que ciertas bacterias Gram positivas como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lachnospiraceae* y *Oscillospira*, parecen no ser susceptibles a las catequinas (Liu *et al.*, 2018), como lo observado para *L. fermentum* UCO-979C y *L. rhamnosus* UCO-25A. También se ha planteado que podrían inducir daño por estrés oxidativo en bacterias Gram positivas como Gram negativas al producir peróxido de hidrógeno

a partir del oxígeno disuelto. Sin embargo, considerando el entorno mayoritariamente anaeróbico del tracto intestinal, la importancia de la formación de peróxido de hidrógeno es discutible (Liu *et al.*, 2018), lo cual se podría asociar con el efecto observado sobre las cepas anaerobias, las cuales, si bien no se encuentran en el hábitat natural colónico, sí son cultivadas en condiciones de anaerobiosis donde el oxígeno escasea impidiendo la formación de estos compuestos oxidantes.

Conocidas las concentraciones sub inhibitorias que permitieran observar el comportamiento de las biopelículas de las cepas sin inhibir su crecimiento o afectar su viabilidad, se procedió a cuantificar la biomasa de la biopelícula formada y analizar su viabilidad en ausencia y presencia de cada uno de los compuestos a una sola concentración de 500 µg/mL en pocillo mediante el ensayo con cristal violeta y resazurina. Este modelo en microplaca de 96 pocillos es ampliamente utilizado y constituye un sistema de alto rendimiento, que es adecuado para analizar la capacidad de formación de biopelículas de bacterias y el ensayo de compuestos anti-biopelícula. Se cultivan en pocillos de fondo plano llenos de medios estáticos, y las biopelículas se forman en los lados y el fondo del pocillo, así como en la interfaz aire-líquido. La acumulación de biomasa en los pocillos se cuantifica mediante tinción con cristal violeta (CV) (Kragh, Alhede, Kvich, & Bjarnsholt, 2019), colorante proteico básico capaz de teñir las moléculas con carga negativa de la superficie y la matriz extracelular de polisacáridos, sin embargo, tanto las células viables, las células muertas y la matriz extracelular

pueden teñirse con CV, lo que demuestra que el ensayo CV tiene ventajas para cuantificar la biopelícula, pero tiene limitaciones para distinguir las células viables (Lin *et al.*, 2017). Por otra parte, el ensayo de resazurina cuantifica rápidamente la actividad metabólica celular, es sensible, sencillo y se utiliza ampliamente en estudios asociados a biopelículas (Shinde, Lee, & Chu, 2021). La resazurina es un indicador redox capaz de cambiar de color azul a rosa, debido a que las células viables convierten la resazurina en resorufina produciendo fuertes señales fluorescentes de color rosa que pueden observarse a simple vista o con instrumentos basados en fluorescencia o absorbancia a 530-560 nm. Las principales ventajas de la tinción con resazurina es que es más fácil de manejar y no es tóxica para la biopelícula, además, es soluble en agua (Lin *et al.*, 2017). El EGCG, catequina más abundante del té verde, fue uno de los primeros polifenoles cuyos efectos se probaron y, aunque concentraciones relativamente altas se han informado tóxicas para varias especies bacterianas, concentraciones sub-inhedorias se han mostrado a menudo con actividad antibiopelícula (Hengge, 2019). Se ha demostrado que el EGCG inhibe la formación de biopelículas en diversas bacterias como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcal* spp., *S. mutans*, *P. gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Shinde *et al.*, 2021). Por su parte, el té negro, cuyo principal componente son las teaflavinas, presenta efectos antimicrobianos contra las células planctónicas y las biopelículas de *P. gingivalis* mediante un mecanismo de inhibición de las actividades de proteinasa de las gingipainas y la secreción

de MMP-1 y MMP-2 a nivel transcripcional (Y. Li, Jiang, Hao, Zhang, & Huang, 2019). Sin embargo, al igual que la actividad antimicrobiana, la actividad anti-biopelícula tanto de los extractos de té verde como té negro parece variar con respecto al polifenol presente y a la cepa estudiada. Con anterioridad se reportó que, si bien extractos fueron capaces de impedir el crecimiento de los estreptococos orales *S. mutans* ATCC 25175, *S. mitis* ATCC 9811 y *S. sanguis* ATCC 10556, a la concentración de 1000 µg/mL solo el extracto de té negro inhibió por completo la formación de biopelículas, mientras que el extracto de té verde fue incapaz de inhibirla a la misma concentración (Bansal *et al.*, 2013). Las cepas probióticas *L. fermentum* UCO-979C y *L. rhamnosus* UCO-25A no presentaron una disminución en la biomasa de la biopelícula cuantificada con ninguno de los 3 grupos de compuestos probados (Figuras 10, 11 y 12) y, en ausencia de estos, tal como lo reportado por Salas-Jara, *et al.* y Garcia-Castillo, *et al.*, respectivamente, fueron formadoras fuertes de biopelícula (Garcia-Castillo *et al.*, 2019; M. J. Salas-Jara *et al.*, 2016). Con las teaflavinas naturales y precursores semisintéticos de epicatequina no se observaron aumentos significativos con respecto al control sin compuesto; sin embargo, las teaflavinas lipofílicas sí generaron un aumento considerable de la biomasa de biopelícula. Esto concuerda con lo reportado por Wu y colaboradores en 2018, en que *Lactobacillus casei* de la bebida a base de leche fermentada Yakult® (LcY), fue cultivada en presencia de EGCG y se observó un aumento de la biomasa de las biopelículas de LcY en presencia de concentraciones crecientes de EGCG,

presentando valores de  $DO_{600nm}$  cercanas a 0,1 a 62,5  $\mu g/mL$  hasta 1,0 a 500  $\mu g/mL$  (Wu *et al.*, 2018). Esto podría explicarse debido a que se ha encontrado que los polifenoles del té se comportarían como prebióticos debido a su efecto modulador sobre la microbiota intestinal (Liu, Vincken, & de Bruijn, 2022), sobre todo por su estimulación de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* sp. y la inhibición de bacterias patógenas como *Clostridium* spp (Liu *et al.*, 2018). Con respecto al aumento de la biomasa de la biopelícula en presencia de las nuevas teaflavinas sintetizadas, Wang *et al.* reportó en 2021 el efecto de 5 tipos de té (verde, oolong, negro, pu-erh y crisantemo) sobre la formación de biopelículas de tres especies de estreptococos (*S. mutans*, *S. salivarius* y *S. mitis*) en cuatro superficies duras dispareas (vidrio, acero inoxidable, hidroxiapatita y titanio). Se observó que el extracto de té oolong favorecía la agregación celular y formación de biopelículas para todas las cepas en todas las superficies y, por el contrario, que el té pu-erh tuvo un comportamiento inhibitorio. Esto permitió deducir que los productos intermedios del proceso de fermentación del té como los oligómeros de flavon-3-oles (teaflavinas), presentes en abundancia en el té oolong y no en el té pu-erh, pueden haber contribuido a la agregación estreptocócica y la posterior formación de biopelículas (Y. Wang, Samaranayake, & Dykes, 2021), mismo fenómeno que pudo haberse producido en las cepas ensayadas. Para *Listeria monocytogenes*, Lencova *et al.* informaron que extractos de té verde inhibieron el crecimiento bacteriano y la formación de biopelícula de *L. monocytogenes* ATCC 13932, considerando al galato de

epigallocatequina como el principal compuesto del té verde con actividad inhibidora (Lencova, Stiborova, Munzarova, Demnerova, & Zdenkova, 2022); mientras que, por otro lado, Du y colaboradores reportaron que concentraciones subinhibitorias de EGCG (20, 40 y 200 µg/mL) podían reducir significativamente la formación de biopelícula en comparación con el control (Du *et al.*, 2018). Esto contrasta con los resultados obtenidos, ya que ninguno de los 3 grupos de compuestos fue capaz de inhibir la biopelícula de forma significativa. Sin embargo, en el estudio, también se observó que el ensayo a 200 µg/mL generó una mayor absorbancia en comparación a las otras concentraciones, por lo que se hipotetizó que una mayor concentración de EGCG podría combinarse con las proteínas de membrana de *L. monocytogenes* ocasionando un aumento en la absorbancia (Du *et al.*, 2018), lo cual explicaría la leve pero no significativa estimulación observada por parte de los compuestos ensayados a 500 µg/mL como C1. Para el caso de las cepas anaerobias, la biopelícula de *Bacteroides fragilis* no fue inhibida por los compuestos y solo logró ser estimulada. No existen reportes que indiquen actividad específica de los fenoles del té sobre las biopelículas de *B. fragilis*, sin embargo, se ha reportado que moléculas similares como ácido gálico, no generan una inhibición sobre la cepa ATCC 25285, mientras que galato de metilo y galato de propilo si lo hacen (Chung, Lu, & Chou, 1998). Por otro lado, el ácido 3-O-metil-gálico y ácido cafeico, estimularon el crecimiento hasta un 119% y 145% respectivamente (Lee, Jenner, Low, & Lee, 2006). En *Fusobacterium nucleatum*, por el contrario, existe una serie estudios

sobre sus biopelículas y los polifenoles del té. Lagha y colaboradores reportaron que extractos de té verde, té negro, EGCG y teaflavinas eran capaces de inhibir significativamente la formación de biopelícula de la cepa ATCC 25586 a la concentración de 500 µg/mL (Lagha *et al.*, 2017), mientras que Duque *et al.* informaron que EGCG fue capaz de inhibir completamente la biopelícula a 620 µg/mL (Duque *et al.*, 2023). No obstante, de los compuestos ensayados en este trabajo de tesis, ninguno fue capaz de generar un efecto significativo sobre la biopelícula, manteniendo niveles similares a los observados para el control sin compuesto. Finalmente, para *Escherichia coli* se vio estimulada la biopelícula con todos los compuestos probados. Esto se ha reportado con anterioridad por Samoilova y colaboradores, en que la formación de biopelícula de *E. coli* fue expuesta a extractos de té verde y té negro, resultando en que ambos estimularon la biopelícula, siendo significativo el efecto producido por el té negro, además de disminuir la movilidad, que acompaña a la formación de la biopelícula, y estimular la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que sugiere que las propiedades prooxidantes de los polifenoles vegetales pueden estar implicadas en su efecto estimulante sobre la formación de biopelículas (Samoilova, Muzyka, Lepekhina, Oktyabrsky, & Smirnova, 2014). En contraste, en 2016 Serra *et al.* reportaron que EGCG, té verde y té negro inhiben la formación de biopelícula mediante el impedimento de la producción de fibras de curli amiloide y de celulosa de diversas cepas de *E. coli* comensales y patógenas. No obstante, al probar otras catequinas presentes en el té verde (epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC) y galato de

epicatequina (ECG)), ECG fue muy eficaz en la supresión de la formación de fibras de curli, mientras que EGC y EC apenas tuvieron efecto. Por lo tanto, concluyeron que la fracción de galato en EGCG y ECG es claramente esencial para el fuerte efecto inhibidor (Serra, Mika, Richter, & Hengge, 2016).

En 2008 Naves y colaboradores informaron que la formación de biopelículas por cualquier organismo debe interpretarse con cautela, teniendo en cuenta todas las variables del entorno experimental. Esto debido a que en ensayos realizados sobre *E. coli* concluyeron que el proceso de formación de biopelículas depende de las propiedades de la cepa y está fuertemente modulado por las condiciones de cultivo, los factores ambientales y la metodología utilizada, además de que el uso de diferentes fórmulas matemáticas para la cuantificación también es de importancia no sólo para estudiar dicha capacidad, sino también para comparar los resultados entre laboratorios (Naves *et al.*, 2008). Esto se vio reforzado por Zanetta *et. al.* en ensayos de biopelícula y co-agregación de probióticos viables con *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, en que los resultados para el control en el mismo medio de cultivo (BHI) fueron significativamente diferentes entre cada repetición. Por esta razón concluyeron que no sólo existe variabilidad dentro de la misma especie según el tipo de cepa, sino también que las mismas bacterias en las mismas condiciones de cultivo no siempre crecen y se comportan de forma específica idéntica, como ocurre en la vida real (Zanetta *et al.*, 2023). Aunque las biopelículas bacterianas se investigan en entornos de laboratorio, a veces no está clara la relevancia de estos estudios para los entornos naturales o del huésped,

por lo que es crítico el poder reproducir las propiedades físicas de los tejidos, capas de mucosidad, respuestas inmunitarias o los gradientes de nutrientes y oxígeno de esos entornos en condiciones controladas en el laboratorio (Wong *et al.*, 2021). Se ha descrito que la inhibición de la vía de señalización del c-di-GMP puede disminuir la formación de biopelículas bacterianas y promover su dispersión, por lo tanto, cambios en factores ambientales (que pueden variar con las condiciones de cultivo en el laboratorio) también afectan el ciclo de las biopelículas bacterianas, como el caso de entornos con poco oxígeno que pueden facilitar la dispersión de las biopelículas bacterianas al acelerar la velocidad de degradación del c-di-GMP (Zhao, Sun, & Liu, 2023), así como, por el contrario, antibióticos como el levofloxacino se ha reportado aumenta la concentración intracelular de c-di-GMP, con lo cual aumenta la producción de EPS y estimula la formación de biopelículas, favoreciendo así la resistencia a los antibióticos (Y. Y. Li, Feng, & Wang, 2022). De esta forma, la integración de modelos biológicos y físicos es la clave para comprender la dinámica de las biopelículas bacterianas (Wong *et al.*, 2021). Por otro lado, una de las desventajas observadas para el ensayo de biopelícula en placa de 96 pocillos, es que la biopelícula formada al fondo del pocillo, puede ser una mezcla de biomasa fuertemente adherida y suelta de origen más indefinido, por lo que, al vaciar los pocillos de sobrenadante, sumado al factor humano durante la eliminación del sobrenadante, esta mezcla puede dar lugar a cantidades muy fluctuantes de biomasa restante para la cuantificación generando grandes

variaciones que a menudo se registran en los experimentos (Kragh *et al.*, 2019). Esto hace al ensayo CV relativamente propenso a errores (Shinde *et al.*, 2021) y con limitaciones, como reducir el número de biopelículas bacterianas después de múltiples lavados además de un tiempo de incubación más largo (Zhao *et al.*, 2023). Todo esto concuerda con las altas desviaciones estándar obtenidas entre los resultados de las repeticiones, por lo tanto, a pesar de ser una herramienta rápida y de alto rendimiento, es importante tener en cuenta la complejidad de la biopelícula y las limitaciones de la técnica al momento de querer simular biopelículas del mundo real, además de la variedad intrínseca presentada por las diferentes cepas bacterianas incluso dentro de la misma especie, para lo cual, más estudios en diferentes condiciones y cepas son necesarios.

## CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

En conclusión, se ensayó el efecto antibacteriano y sobre biopelículas de teaflavinas naturales, precursores semisintéticos de epicatequina y teaflavinas lipofílicas sintetizadas a partir de ellos, sobre las cepas probióticas *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C, *Lactocaseibacillus rhamnosus* UCO-25A y patógenas *Listeria monocytogenes* 19115, *Escherichia coli* 25922, *Bacteroides fragilis* 25285 y *Fusobacterium nucleatum* 25586.

Como resultado, ninguno de los 3 grupos de compuestos presentó actividad antibacteriana a las concentraciones probadas, ya sea en medio sólido por difusión en agar o en medio líquido por microdilución en caldo. Además, todas las cepas fueron capaces de formar biopelículas *in vitro* en presencia y ausencia de los compuestos ensayados a través del ensayo de cristal violeta. El efecto sobre la formación de biopelículas a la concentración ensayada de 500 µg/mL tuvo efectos variados, observándose estimulación para las biopelículas de las bacterias probióticas *L. fermentum* UCO-979C, *L. rhamnosus* UCO-25A, principalmente por las teaflavinas lipofílicas, lo cual es beneficioso para la colonización de estas especies. Sin embargo, y, contrario a lo esperado, también se estimuló la formación de la biopelícula de las cepas patógenas en presencia de los compuestos, observándose resultados significativos sobre *E. coli* 25922 en presencia de los 3 compuestos, lo que sería una desventaja con respecto a

las cepas asociadas a enfermedades que se requieren prevenir o tratar. De esta forma y, en base a los resultados obtenidos, se refuta la hipótesis propuesta.

Como proyección, son necesarios más ensayos de biopelículas con diferentes condiciones de cultivo y cepas, metodologías complementarias y diferentes concentraciones de los compuestos, ya que todas estas variaciones podrían generar diferentes estímulos en las bacterias que se asocien a la formación de la biopelícula.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almajano, M. P., Carbo, R., Jimenez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, *108*(1), 55-63. doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.040
- Alshammari, M., Ahmad, A., AlKhulaifi, M., Al Farraj, D., Alsudir, S., Alarawi, M., . . . Alyamani, E. (2023). Reduction of biofilm formation of *Escherichia coli* by targeting quorum sensing and adhesion genes using the CRISPR/Cas9-HDR approach, and its clinical application on urinary catheter. *Journal of Infection and Public Health*, *16*(8), 1174-1183. doi:10.1016/j.jiph.2023.05.026
- Ankolekar, C., Johnson, D., Pinto, M. D., Johnson, K., Labbe, R., & Shetty, K. (2011). Inhibitory Potential of Tea Polyphenolics and Influence of Extraction Time Against *Helicobacter pylori* and Lack of Inhibition of Beneficial Lactic Acid Bacteria. *Journal of Medicinal Food*, *14*(11), 1321-1329. doi:10.1089/jmf.2010.0237
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S. S., Lohan, S., Bhardwaj, V., . . . Jyoti, S. (2013). Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research International*, *53*(2), 568-584. doi:10.1016/j.foodres.2013.01.032
- Bedran, T. B. L., Morin, M. P., Spolidorio, D. P., & Grenier, D. (2015). Black Tea Extract and Its Theaflavin Derivatives Inhibit the Growth of Periodontopathogens and Modulate Interleukin-8 and beta-Defensin Secretion in Oral Epithelial Cells. *Plos One*, *10*(11), 11. doi:10.1371/journal.pone.0143158
- Bennedsen, A. L. B., Furbo, S., Bjarnsholt, T., Raskov, H., Gogenur, I., & Kvich, L. (2022). The gut microbiota can orchestrate the signaling pathways in colorectal cancer. *Apmis*, *130*(3), 121-139. doi:10.1111/apm.13206
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(2), 160-174. doi:10.1159/000342079

- Bowler, P., Murphy, C., & Wolcott, R. (2020). Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 5. doi:10.1186/s13756-020-00830-6
- Brennan, C. A., & Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 156-166. doi:10.1038/s41579-018-0129-6
- Castro-Seriche, S., Jerez-Morales, A., Smith, C. T., Sanchez-Alonzo, K., & Garcia-Cancino, A. (2021). *Candida albicans*, a reservoir of *Listeria monocytogenes*? *Infection Genetics and Evolution*, 90, 8. doi:10.1016/j.meegid.2021.104779
- Chen, H. D., Hayek, S., Guzman, J. R., Gillitt, N. D., Ibrahim, S. A., Jobin, C., & Sang, S. M. (2012). The Microbiota Is Essential for the Generation of Black Tea Theaflavins-Derived Metabolites. *Plos One*, 7(12), 10. doi:10.1371/journal.pone.0051001
- Chung, K. T., Lu, Z., & Chou, M. W. (1998). Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 36(12), 1053-1060. doi:10.1016/s0278-6915(98)00086-6
- Copenhagen-Glazer, S., Sol, A., Abed, J., Naor, R., Zhang, X., Han, Y. W., & Bachrach, G. (2015). Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* Is a Galactose-Inhibitable Adhesin Involved in Coaggregation, Cell Adhesion, and Preterm Birth. *Infection and Immunity*, 83(3), 1104-1113. doi:10.1128/iai.02838-14
- de Oliveira, A., Prince, D., Lo, C. Y., Lee, L. H., & Chu, T. C. (2015). Antiviral activity of theaflavin digallate against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*, 118, 56-67. doi:10.1016/j.antiviral.2015.03.009
- Dejea, C. M., & Sears, C. L. (2016). Do biofilms confer a pro-carcinogenic state? *Gut Microbes*, 7(1), 54-57. doi:10.1080/19490976.2015.1121363
- Dougherty, M. W., & Jobin, C. (2021). Shining a Light on Colibactin Biology. *Toxins*, 13(5), 15. doi:10.3390/toxins13050346
- Du, W. F., Zhou, M., Liu, Z. G., Chen, Y., & Li, R. (2018). Inhibition effects of low concentrations of epigallocatechin gallate on the biofilm formation and hemolytic activity of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 85, 119-126. doi:10.1016/j.foodcont.2017.09.011

- Dueñas, M., Muñoz-González, I., Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., . . . Bartolomé, B. (2015). A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. *BioMed Research International*, 2015, 850902. doi:10.1155/2015/850902
- Duque, C., Souza, A. C. A., Aida, K. L., Pereira, J. A., Caiaffa, K. S., Santos, V. R. D., . . . Prakki, A. (2023). Synergistic antimicrobial potential of EGCG and fosfomycin against biofilms associated with endodontic infections. *Journal of Applied Oral Science*, 31, 13. doi:10.1590/1678-7757-2022-0282
- FAO/WHO. (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*.
- Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 116-134. doi:10.1002/mnfr.200600173
- Gao, Y., Xu, Y. Q., & Yin, J. F. (2020). Black tea benefits short-chain fatty acid producers but inhibits genus *Lactobacillus* in the gut of healthy Sprague-Dawley rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5466-5475. doi:10.1002/jsfa.10598
- García-Castillo, V., Marin-Vega, A. M., Ilabaca, A., Albarracín, L., Marcial, G., Kitazawa, H., . . . Villena, J. (2019). Characterization of the immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* properties of the human gastric isolate *Lactobacillus rhamnosus* UCO-25A. *Biofouling*, 35(8), 922-937. doi:10.1080/08927014.2019.1675153
- García-Castillo, V., Zelaya, H., Ilabaca, A., Espinoza-Monje, M., Komatsu, R., Albarracín, L., . . . Villena, J. (2018). *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Beneficial Microbes*, 9(5), 829-841. doi:10.3920/bm2018.0019
- Hebel-Gerber, S., García-Cancino, A., Urbina, A., Simirgiotis, M. J., Echeverría, J., Bustamante-Salazar, L., . . . Pastene-Navarrete, E. (2021). Chilean Rhubarb, *Gunnera tinctoria* (Molina) Mirb. (Gunneraceae): UHPLC-ESI-Orbitrap-MS Profiling of Aqueous Extract and its Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 15. doi:10.3389/fphar.2020.583961

- Hengge, R. (2019). Targeting Bacterial Biofilms by the Green Tea Polyphenol EGCG. *Molecules*, 24(13), 18. doi:10.3390/molecules24132403
- Hervert-Hernández, D., & Goñi, I. (2011). Dietary Polyphenols and Human Gut Microbiota: a Review. *Food Reviews International*, 27(2), 154-169. doi:10.1080/87559129.2010.535233
- Higuchi, T., Suzuki, N., Nakaya, S., Omagari, S., Yoneda, M., Hanioka, T., & Hirofuji, T. (2019). Effects of Lactobacillus salivarius WB21 combined with green tea catechins on dental caries, periodontitis, and oral malodor. *Archives of Oral Biology*, 98, 243-247. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.11.027
- Katharios-Lanwermeyer, S., & O'Toole, G. A. (2022). Biofilm Maintenance as an Active Process: Evidence that Biofilms Work Hard to Stay Put. *Journal of Bacteriology*, 204(4), 17. doi:10.1128/jb.00587-21
- Kong, J., Xia, K., Su, X., Zheng, X., Diao, C., Yang, X., . . . Liang, X. (2021). Mechanistic insights into the inhibitory effect of theaflavins on virulence factors production in Streptococcus mutans. *AMB Express*, 11(1), 102. doi:10.1186/s13568-021-01263-z
- Kragh, K. N., Alhede, M., Kvich, L., & Bjarnsholt, T. (2019). Into the well-A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, 1, 9. doi:10.1016/j.biofilm.2019.100006
- Lagha, A. B., Haas, B., & Grenier, D. (2017). Tea polyphenols inhibit the growth and virulence properties of Fusobacterium nucleatum. *Scientific Reports*, 7, 10. doi:10.1038/srep44815
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157(9), 876-884. doi:10.1016/j.resmic.2006.07.004
- Lencova, S., Stiborova, H., Munzarova, M., Demnerova, K., & Zdenkova, K. (2022). Potential of Polyamide Nanofibers With Natamycin, Rosemary Extract, and Green Tea Extract in Active Food Packaging Development: Interactions With Food Pathogens and Assessment of Microbial Risks Elimination. *Frontiers in Microbiology*, 13, 15. doi:10.3389/fmicb.2022.857423

- Li, S., Konstantinov, S. R., Smits, R., & Peppelenbosch, M. P. (2017). Bacterial Biofilms in Colorectal Cancer Initiation and Progression. *Trends in Molecular Medicine*, 23(1), 18-30. doi:10.1016/j.molmed.2016.11.004
- Li, S., Peppelenbosch, M. P., & Smits, R. (2019). Bacterial biofilms as a potential contributor to mucinous colorectal cancer formation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1872(1), 74-79. doi:10.1016/j.bbcan.2019.05.009
- Li, W. X., Zhou, X., Yuan, S., Wang, L. J., Yu, L. L., Sun, J., . . . Li, X. (2023). Exploring the Complex Relationship between Gut Microbiota and Risk of Colorectal Neoplasia Using Bidirectional Mendelian Randomization Analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 32(6), 809-817. doi:10.1158/1055-9965.Epi-22-0724
- Li, Y., Jiang, X. G., Hao, J. Q., Zhang, Y. F., & Huang, R. J. (2019). Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Archives of Oral Biology*, 102, 74-82. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.03.027
- Li, Y. Y., Feng, T., & Wang, Y. (2022). The role of bacterial signaling networks in antibiotics response and resistance regulation. *Marine Life Science & Technology*, 4(2), 163-178. doi:10.1007/s42995-022-00126-1
- Lin, S. Q., Yang, L., Chen, G., Li, B., Chen, D. Q., Li, L., & Xu, Z. B. (2017). Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix. *Microbial Pathogenesis*, 111, 285-291. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.005
- Liu, Z. B., Bruins, M. E., Ni, L., & Vincken, J. P. (2018). Green and Black Tea Phenolics: Bioavailability, Transformation by Colonic Microbiota, and Modulation of Colonic Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(32), 8469-8477. doi:10.1021/acs.jafc.8b02233
- Liu, Z. B., de Bruijn, W. J. C., Bruins, M. E., & Vincken, J. P. (2021). Microbial Metabolism of Theaflavin-3,3'-digallate and Its Gut Microbiota Composition Modulatory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(1), 232-245. doi:10.1021/acs.jafc.0c06622
- Liu, Z. B., Vincken, J. P., & de Bruijn, W. J. C. (2022). Tea phenolics as prebiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 127, 156-168. doi:10.1016/j.tifs.2022.06.007

- Lopez, L. R., Bleich, R. M., & Arthur, J. C. (2021). Microbiota Effects on Carcinogenesis: Initiation, Promotion, and Progression. In M. E. Klotman (Ed.), *Annual Review of Medicine, Vol 72, 2021* (Vol. 72, pp. 243-261). Palo Alto: Annual Reviews.
- Mahto, K. U., Kumari, S., & Das, S. (2022). Unraveling the complex regulatory networks in biofilm formation in bacteria and relevance of biofilms in environmental remediation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 57*(3), 305-332. doi:10.1080/10409238.2021.2015747
- Mirzaei, R., Mirzaei, H., Alikhani, M. Y., Sholeh, M., Arabestani, M. R., Saidijam, M., . . . Yousefimashouf, R. (2020). Bacterial biofilm in colorectal cancer: What is the real mechanism of action? *Microbial Pathogenesis, 142*, 9. doi:10.1016/j.micpath.2020.104052
- Mittal, V. (2019). *Biofilm and Antimicrobial Resistance*. Cham: Springer International Publishing Ag.
- Motta, J. P., Wallace, J. L., Buret, A. G., Deraison, C., & Vergnolle, N. (2021). Gastrointestinal biofilms in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 18*(5), 314-334. doi:10.1038/s41575-020-00397-y
- Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., . . . Soriano, F. (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology, 105*(2), 585-590. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x
- Oh, J., Jo, H., Cho, A. R., Kim, S. J., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control, 31*(2), 403-409. doi:10.1016/j.foodcont.2012.10.021
- Opoku-Temeng, C., & Sintim, H. O. (2016). Inhibition of cyclic diadenylate cyclase, DisA, by polyphenols. *Scientific Reports, 6*, 8. doi:10.1038/srep25445
- Opoku-Temeng, C., Zhou, J., Zheng, Y., Su, J. M., & Sintim, H. O. (2016). Cyclic dinucleotide (c-di-GMP, c-di-AMP, and cGAMP) signalings have come of age to be inhibited by small molecules. *Chemical Communications, 52*(60), 9327-9342. doi:10.1039/c6cc03439j
- Paytubi, S., de La Cruz, M., Tormo, J. R., Martin, J., Gonzalez, I., Gonzalez-Menendez, V., . . . Balsalobre, C. (2017). A High-Throughput Screening

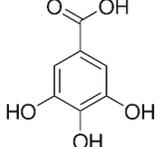
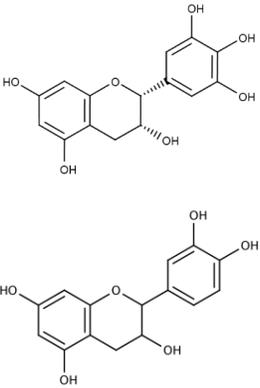
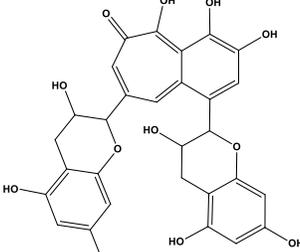
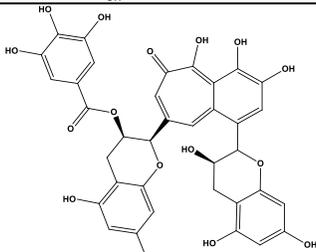
- Platform of Microbial Natural Products for the Discovery of Molecules with Antibiofilm Properties against Salmonella. *Frontiers in Microbiology*, 8, 13. doi:10.3389/fmicb.2017.00326
- Raskov, H., Burcharth, J., & Pommergaard, H. C. (2017). Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*, 8(17), 3378-3395. doi:10.7150/jca.20497
- Raskov, H., Kragh, K. N., Bjarnsholt, T., Alamili, M., & Gogenur, I. (2018). Bacterial biofilm formation inside colonic crypts may accelerate colorectal carcinogenesis. *Clinical and Translational Medicine*, 7. doi:10.1186/s40169-018-0209-2
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M., & García, A. (2016). Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35. doi:10.3390/microorganisms4030035
- Salas-Jara, M. J., Sanhueza, E. A., Retamal-Diaz, A., Gonzalez, C., Urrutia, H., & Garcia, A. (2016). Probiotic Lactobacillus fermentum UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and Helicobacter pylori inhibition. *Biofouling*, 32(10), 1245-1257. doi:10.1080/08927014.2016.1249367
- Samoilova, Z., Muzyka, N., Lepekhina, E., Oktyabrsky, O., & Smirnova, G. (2014). Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in Escherichia coli. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 105(4), 709-722. doi:10.1007/s10482-014-0126-3
- Santucci, C., Malvezzi, M., Levi, F., Camargo, M. C., Boffetta, P., La Vecchia, C., & Negri, E. (2023). Cancer mortality predictions for 2023 in Latin America with focus on stomach cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 32(4), 310-321. doi:10.1097/cej.0000000000000806
- Sato, J., Tomita, A., Sonoda, T., & Miyamoto, T. (2022). Theaflavin and its derivatives exert antibacterial action against Bacillus coagulans through adsorption to cell surface phospholipids. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1781-1790. doi:10.1111/jam.15690
- Serra, D. O., Mika, F., Richter, A. M., & Hengge, R. (2016). The green tea polyphenol EGCG inhibits E-coli biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the biofilm regulator CsgD via the sigma(E)-dependent sRNA RybB. *Molecular Microbiology*, 101(1), 136-151. doi:10.1111/mmi.13379

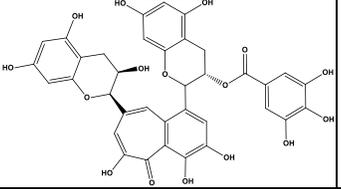
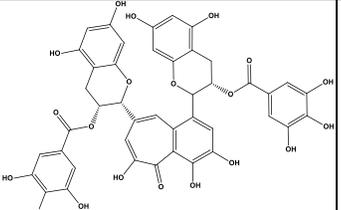
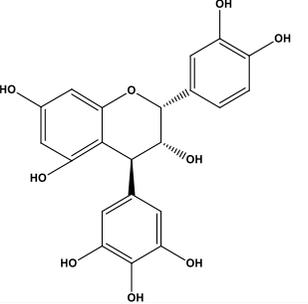
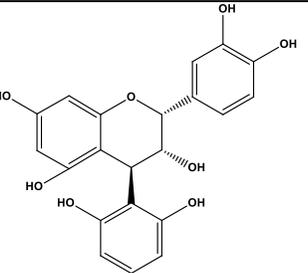
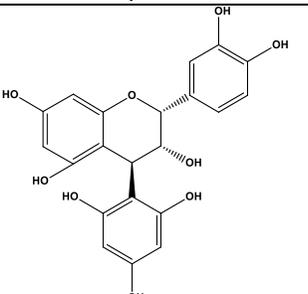
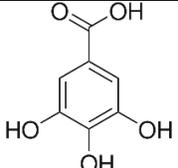
- Shan, Z. G., Nisar, M. F., Li, M. X., Zhang, C. H., & Wan, C. P. (2021). Theaflavin Chemistry and Its Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 16. doi:10.1155/2021/6256618
- Shinde, S., Lee, L. H., & Chu, T. C. (2021). Inhibition of Biofilm Formation by the Synergistic Action of EGCG-S and Antibiotics. *Antibiotics-Basel*, 10(2), 20. doi:10.3390/antibiotics10020102
- Siddiqui, M. W., Sharangi, A. B., Singh, J. P., Thakur, P. K., Ayala-Zavala, J. F., Singh, A., & Dhua, R. S. (2016). Antimicrobial Properties of Teas and Their Extracts in vitro. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1428-1439. doi:10.1080/10408398.2013.769932
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x
- Tang, B., Wang, K., Jia, Y. P., Zhu, P., Fang, Y., Zhang, Z. J., . . . Zeng, D. Z. (2016). Fusobacterium nucleatum-Induced Impairment of Autophagic Flux Enhances the Expression of Proinflammatory Cytokines via ROS in Caco-2 Cells. *Plos One*, 11(11), 13. doi:10.1371/journal.pone.0165701
- Torres, E., Garcia, A., Aranda, M., Saez, V., Zuniga, F., Alarcon, J., . . . Pastene, E. (2018). ONE-STEP PURIFICATION OF TWO SEMI-SYNTHETIC EPICATECHIN ADDUCTS PREPARED FROM AVOCADO PEELS PROCYANIDINS BY CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY AND EVALUATION OF THEIR ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS ON ADENOCARCINOMA GASTRIC CELLS INFECTED WITH Helicobacter pylori. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 63(4), 4222-4228. doi:10.4067/s0717-97072018000404222
- Vodnar, D. C. (2012). Inhibition of Listeria monocytogenes ATCC 19115 on ham steak by tea bioactive compounds incorporated into chitosan-coated plastic films. *Chemistry Central Journal*, 6, 6. doi:10.1186/1752-153x-6-74
- Wang, S., Wang, Y., Wang, Y., Duan, Z., Ling, Z., Wu, W., . . . Deng, S. (2019). Theaflavin-3,3'-Digallate Suppresses Biofilm Formation, Acid Production, and Acid Tolerance in Streptococcus mutans by Targeting Virulence Factors. *Frontiers in Microbiology*, 10(1705). doi:10.3389/fmicb.2019.01705

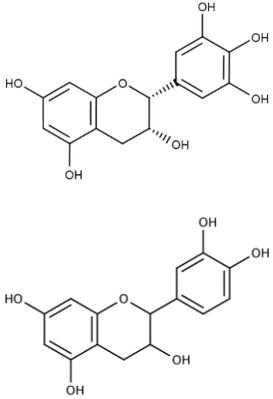
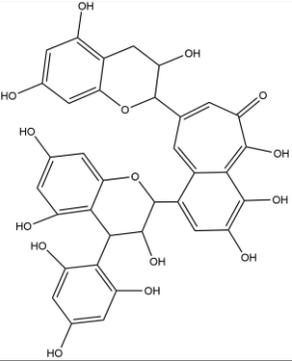
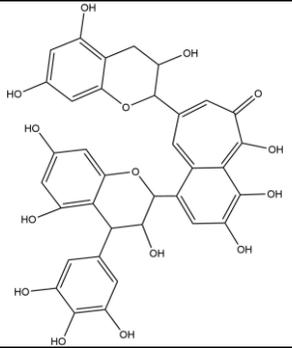
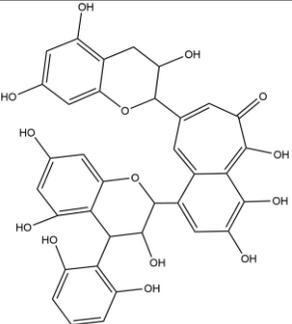
- Wang, Y., Samaranayake, L. P., & Dykes, G. A. (2021). Tea extracts modulate oral biofilm development by altering bacterial hydrophobicity and aggregation. *Archives of Oral Biology*, 122, 7. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.105032
- Wang, Y. M., Xu, S. X., He, Q. R., Sun, K., Wang, X. W., Zhang, X. R., . . . Zeng, J. M. (2023). Crosstalk between microbial biofilms in the gastrointestinal tract and chronic mucosa diseases. *Frontiers in Microbiology*, 14, 9. doi:10.3389/fmicb.2023.1151552
- Wong, G. C. L., Antani, J. D., Lele, P. P., Chen, J., Nan, B. Y., Kuhn, M. J., . . . Dunkel, J. (2021). Roadmap on emerging concepts in the physical biology of bacterial biofilms: from surface sensing to community formation. *Physical Biology*, 18(5), 49. doi:10.1088/1478-3975/abdc0e
- Wu, C. Y., Su, T. Y., Wang, M. Y., Yang, S. F., Mar, K., & Hung, S. L. (2018). Inhibitory effects of tea catechin epigallocatechin-3-gallate against biofilms formed from *Streptococcus mutans* and a probiotic *Lactobacillus* strain. *Archives of Oral Biology*, 94, 69-77. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.06.019
- Yekani, M., Baghi, H. B., Naghili, B., Vahed, S. Z., Soki, J., & Memar, M. Y. (2020). To resist and persist: Important factors in the pathogenesis of *Bacteroides fragilis*. *Microbial Pathogenesis*, 149, 9. doi:10.1016/j.micpath.2020.104506
- Yussof, A., Cammalleri, B., Fayemiwo, O., Lopez, S., & Chu, T. C. (2022). Antibacterial and Sporocidal Activity Evaluation of Theaflavin-3,3'-digallate. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 21. doi:10.3390/ijms23042153
- Zanetta, P., Squarzanti, D. F., di Coste, A., Amoruso, A., Pane, M., & Azzimonti, B. (2023). Growth Conditions Influence *Lactobacillus* Cell-Free Supernatant Impact on Viability, Biofilm Formation, and Co-Aggregation of the Oral Periodontopathogens *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Biomedicines*, 11(3), 16. doi:10.3390/biomedicines11030859
- Zhao, A. L., Sun, J. Z., & Liu, Y. P. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 23. doi:10.3389/fcimb.2023.1137947

## ANEXOS

**Tabla 9. Compuestos utilizados y sus estructuras.**

Grupo	Nombre Compuesto / Mezcla	N° trabajo	Estructura	Pureza
Teaflavinas naturales (Fracciones obtenidas de té negro)	Ácido gálico + Teobromina	TF10		91% / 9%
	Mezcla Epigallocatequina + Epicatequina	TF11		50% / 50%
	Teaflavina-1 (TF1)	TF12		98%
	Teaflavina-3-galato (TF2a)	TF13		95%

	Teaflavina-3'-gallato (TF2b)	TF14		90%
	Teaflavina-3,3'-digalato (TF3)	TF15		97%
Precusores semi-sintéticos de epicatequina	Epicatequina pirogalol	C1		100%
	Epicatequina resorcinol	C2		100%
	Epicatequina fluoroglucinol	C3		100%
Teaflavinas lipofílicas	Ácido gálico + Impurezas	T2		91% / 9%

<p>Mezcla Epigallocatequina + Epicatequina</p>	<p>T3</p>		<p>50% / 50%</p>
<p>Teaflavina fluoroglucinol</p>	<p>T4</p>		<p>98%</p>
<p>Teaflavina pirogalol</p>	<p>T5</p>		<p>96%</p>
<p>Teaflavina resorcinol</p>	<p>T6</p>		<p>92%</p>