

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Optimización de un método de formación y cuantificación de biopelículas *in vitro* en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) aisladas de clínicas odontológicas de la ciudad de Cuenca

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico


Autores:

Maydelin Jasley Barrera Castillo

Daniela Alexandra Morocho Patiño

Director:

María Paz Moscoso Romo

ORCID:  0000-0002-5736-6201

Cuenca, Ecuador

2026 - 02 - 23

Resumen

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) es un patógeno con elevada capacidad para formar biopelículas, favoreciendo su persistencia y resistencia a la desinfección. La optimización de métodos *in vitro* para su formación y cuantificación permite obtener modelos experimentales reproducibles y comparables para evaluar de forma confiable agentes con actividad anti-biopelículas. **Objetivo:** Establecer un protocolo para la formación y cuantificación de biopelículas *in vitro* en cepas de SARM, así como determinar su capacidad formadora y comparar métodos colorimétricos para su cuantificación. **Metodología:** Se desarrolló un estudio experimental estructurado en tres fases. En la primera fase se estableció el protocolo experimental utilizando seis cepas de SARM (23, 61, 122, 259, 1037 y 1098), y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923™ y BAA-44™ como controles positivos. En la segunda fase se evaluó la capacidad formadora de biopelículas mediante la cuantificación de biomasa con cristal violeta y la determinación de la actividad metabólica mediante MTT y resazurina, con lecturas espectrofotométricas. En la tercera fase se compararon los métodos mediante análisis estadístico ANOVA – Tukey para evaluar la reproducibilidad y la correlación entre las técnicas. **Resultados:** Las cepas tuvieron una capacidad formadora diferente en donde se clasificaron como no productoras, productoras débiles, moderadas y fuertes con el método de cristal violeta. El ensayo con MTT evaluó los porcentajes de viabilidad celular de cada cepa de forma eficaz. Se observó una correlación entre los resultados en ambos ensayos, mientras que el ensayo con resazurina no fue reproducible estadísticamente. **Conclusión:** Los protocolos de cristal violeta y MTT fueron reproducibles y confiables para la formación y cuantificación de biopelículas evaluando la biomasa y viabilidad, representando una herramienta clave para investigaciones futuras sobre el comportamiento bacteriano y estrategias antimicrobianas.

Palabras clave del autor: cristal violeta, resazurina, MTT



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a pathogen with a high capacity to form biofilms, which promotes its persistence and resistance to disinfection. Optimizing *in vitro* methods for biofilm formation and quantification allows for the development of reproducible and comparable experimental models to reliably evaluate agents with antibiofilm activity. **Objective:** To establish a protocol for the *in vitro* formation and quantification of biofilms in MRSA strains, as well as to determine their biofilm-forming capacity and compare colorimetric methods for their quantification. **Methodology:** A structured experimental study was developed in three phases. In the first phase, the experimental protocol was established using six MRSA strains (23, 61, 122, 259, 1037, and 1098), and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923™ and BAA-44™ as positive controls. In the second phase, biofilm-forming capacity was evaluated by quantifying biomass with crystal violet and determining metabolic activity using MTT and resazurin, with spectrophotometric readings. In the third phase, the methods were compared using ANOVA – Tukey statistical analysis to assess reproducibility and correlation between the techniques. **Results:** The strains exhibited varying biofilm-forming capacity, classified as non-producers, weak producers, moderate producers, and strong producers using the crystal violet method. The MTT assay effectively evaluated the cell viability percentages of each strain. A correlation was observed between the results of both assays, while the resazurin assay was not statistically reproducible. **Conclusion:** The crystal violet and MTT protocols were reproducible and reliable for biofilm formation and quantification by evaluating biomass and viability, representing a key tool for future research on bacterial behavior and antimicrobial strategies.

Author keywords: crystal violet, resazurin, MTT.



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen.....	2
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
Dedicatoria.....	9
Agradecimientos.....	11
Introducción.....	12
Objetivos.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
1. Marco teórico.....	16
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SARM).....	16
1.2.1. Mecanismo de resistencia.....	17
1.2.2. Epidemiología.....	17
1.2.3. Impacto de biopelículas de SARM.....	18
1.2.3.1. Superficies y fómites más frecuentemente contaminados.....	18
1.2.3.2. Fuentes y vías de transmisión.....	19
1.2.3.3. Importancia clínica y repercusiones en odontología.....	19
1.3. Biopelículas bacterianas.....	19
1.3.1. Definición y estructura.....	19
1.3.2. Etapas de formación de la biopelícula.....	20
1.3.3. Genes y mecanismos de regulación de <i>S. aureus</i> implicado en biopelículas.....	22
1.3.4. Factores ambientales y de superficie que favorecen la formación de biopelículas.....	23
1.3.5. Resistencia de las biopelículas a antimicrobianos y desinfectantes.....	23
1.4. Métodos para la formación y cuantificación <i>in vitro</i> de biopelículas.....	24
1.4.1. Formación <i>in vitro</i> de biopelículas.....	25
1.4.2. Cuantificación de biopelículas.....	26
2. Metodología.....	28
2.1. Tipo y diseño de investigación.....	28
2.2. Muestras y controles.....	28
2.3. Formación de biopelículas.....	28
2.3.1. Reactivación y preparación de cepas bacterianas y controles.....	28
2.3.2. Formación de biopelículas.....	29

2.3.3. Cuantificación de biopelículas	29
2.4. Análisis estadístico	31
3. Resultados	33
4. Discusión	41
Conclusiones.....	45
Referencias	47
Anexos	55
Anexo A. Distribución de muestras y controles en microplaca de 96 pocillos.....	55
Anexo B. Tinción con cristal violeta 1%.....	56
Anexo C. Tinción con MTT	57
Anexo D. Tinción con resazurina (PrestoBlue).....	58
Anexo E. Lecturas de densidad óptica	59
Anexo F. Lecturas de fluorescencia	62

Índice de figuras

Figura 1. Etapas de formación de la biopelícula.....	21
Figura 2. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de SARM determinada por cristal violeta (OD ₅₇₀).....	34
Figura 3. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de SARM determinada por cristal violeta (OD ₅₈₅).....	35
Figura 4. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD ₅₇₀ a los 30 minutos.....	38
Figura 5. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD ₅₉₅ a los 30 minutos.....	38
Figura 6. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD ₅₇₀ a las 2 horas.....	39
Figura 7. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD ₅₉₅ a las 2 horas.....	39
Figura 8. Distribución de muestras en microplaca para la tinción con cristal violeta y MTT.	55
Figura 9. Distribución de muestras en microplaca para la tinción con resazurina.....	55
Figura 10. Tinción con cristal violeta al 1%.....	56
Figura 11. Tinción con MTT.....	57
Figura 12. Tinción con resazurina.....	58

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de clasificación de capacidad formadora de biopelículas.....	32
Tabla 2. Resultados de la lectura a OD ₅₇₀ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.	33
Tabla 3. Resultados de la lectura a OD ₅₈₅ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.	34
Tabla 4. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD ₅₇₀ y porcentaje de viabilidad celular.	35
Tabla 5. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD ₅₉₅ y porcentaje de viabilidad celular.	36
Tabla 6. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD ₅₇₀ y porcentaje de viabilidad celular. .	36
Tabla 7. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD ₅₉₅ y porcentaje de viabilidad celular...	37
Tabla 8. Resultados de una hora de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión).	40
Tabla 9. Resultados de la lectura a OD ₅₇₀ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.	59
Tabla 10. Resultados de la lectura a OD ₅₈₅ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.....	59
Tabla 11. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD ₅₇₀ y porcentaje de viabilidad celular.	60
Tabla 12. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD ₅₉₅ y porcentaje de viabilidad celular.	60
Tabla 13. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD ₅₇₀ y porcentaje de viabilidad celular.	61
Tabla 14. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD ₅₉₅ y porcentaje de viabilidad celular.	61
Tabla 15. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 23.....	62
Tabla 16. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 61.....	62
Tabla 17. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 122.....	63
Tabla 18. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 259.....	63
Tabla 19. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 1037.....	64
Tabla 20. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 1098.....	64

Tabla 21. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SAU BAA.....	65
Tabla 22. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SAU ATCC.....	65
Tabla 23. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para Esterilidad.....	66

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a todos quienes me ayudaron a llegar hasta aquí. Los llevo en mi alma y mi corazón. Gracias infinitas.

A mis perritos, mis compañeros más leales, quienes nunca me juzgaron y sólo supieron amarme.

A Baby Black que llegó a mí en mi niñez y estuvo a mi lado en mis primeros años lejos de casa; te amo y te sigo extrañando mi Babysito.

A Ghost, que ha estado a mi lado acompañándome durante casi toda la carrera, cuidándome en mis desvelos, siendo mi paño de lágrimas y sosteniéndome cuando más lo necesitaba, me has salvado de maneras inexplicables y que sólo el amor verdadero sabe hacerlo.

A mis padres, ustedes son mis pilares más fuertes.

A mi mamá, que me dio todo desde que tengo memoria. Gracias por darme tu inmenso amor, por tu entrega y por ser la mujer más fuerte, valiente y cariñosa. Gracias por darme todo sin esperar nada a cambio, por estar siempre dispuesta a ser el soporte para nosotros aun cuando parecía que las fuerzas no alcanzarían. Todo lo que soy nace de ti.

A mi papá, que aun sin comprender siempre mis decisiones o a mí misma, nunca dejó de apoyarme y confiar en mí, acompañándome con su cariño y constancia.

Cada uno de mis logros lleva un pedacito de ustedes. Espero ser la hija que merecen.

A mi hermana, mi ejemplo de fortaleza y crecimiento. Desde pequeña he admirado su carácter, dedicación y ganas de salir adelante; siempre ha demostrado que, sin importar lo que necesite, ella siempre estará para mí. Eres un fuerte impulso para mí ñaña.

A mis nenas, que crecieron mientras yo perseguía mis sueños desde la distancia. Aunque no formé parte de cada etapa, siempre fueron, son y serán mi motivación y una razón más para no rendirme. Sin importar qué, nunca les faltará su tía.

A mis amigos, por el cariño sincero, por cada palabra y motivación para seguir adelante, por incluirme en sus familias y por la compañía, juntos aprendimos a sostenernos, acompañarnos y querernos incluso en los momentos más difíciles.

Y finalmente, a una persona muy importante y especial que formó parte esencial de este camino. Gracias por el apoyo, por acompañarme y sostenerme cuando más lo necesitaba, por ser el refugio en una etapa profundamente difícil en mi vida. Gracias por el amor compartido y por mostrarme cosas que marcaron mi vida.

Maydelin J. Barrera

Dedicatoria

A Dios y a la Virgen, por ser mi guía y mi protección en cada paso que doy.

A mis papis, Ximena y Milton, por su amor incondicional, su apoyo permanente y su paciencia infinita. Gracias por acompañarme en cada decisión, cada logro y fracaso; y por enseñarme, con su ejemplo, el valor del esfuerzo, la perseverancia y la humildad. Cada sacrificio que han realizado es parte fundamental de este logro, y todo lo que soy se lo debo a ustedes.

A mis hermanos, Juandi y Dome, por estar presentes en mis noches de desvelo, por escucharme, animarme y recordarme siempre que soy capaz de lograr todo lo que me propongo. Gracias por su cariño y por ser una fuente constante de motivación y alegría.

A mi abuelita Olga, a mi tío Pachi y a mi tía Eliza, por su cariño sincero, por su preocupación constante y por brindarme siempre un abrazo reconfortante, una palabra de aliento o una sonrisa en los momentos en que más lo necesitaba. Su apoyo ha sido un pilar fundamental durante esta etapa.

A mi compañera de tesis y amiga, May, por caminar y correr a mi lado durante este proceso, por compartir cada esfuerzo, cada desvelo y cada desafío. Gracias por tu compromiso y esfuerzo constante. Este logro es fruto de tu dedicación y valentía.

Finalmente, agradezco de manera especial a toda mi familia y a mis amigos, quienes siempre creyeron en mí, me brindaron su apoyo y formaron parte de esta hermosa etapa de mi vida. Este logro también les pertenece a ustedes.

Con cariño,

Daniela Morocho Patiño

Agradecimientos

A nuestras familias por brindarnos todo, su apoyo constante e incondicional, por ser esa luz cuando creíamos no poder continuar. Esto es posible gracias a ustedes. Los amamos.

A nuestra tutora, la Doctora Pazita, por aceptar guiarnos en este proceso sobre todo en una etapa tan importante de su vida personal. Gracias por su compromiso, dedicación y entrega, por enseñarnos que con esfuerzo y confianza en uno mismo siempre podremos cumplir lo que nos proponíamos. Cada palabra de aliento, cada "tranquilas, chicas, si pueden" nos ha llevado a este momento y quedarán grabadas para siempre en nuestros corazones y nuestras memorias. Un abracito al pequeño.

Además, agradecemos de manera especial y profunda, a la Doctora Jessica, al Doctor Fabián León y al Ingeniero David Vanegas por su disposición, tiempo y apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Su guía y conocimiento fueron enriquecedores en nuestro trabajo y aprendizaje.

Finalmente, a nuestra querida Universidad de Cuenca, por abrirnos las puertas al conocimiento y formarnos en una institución de gran prestigio. Aunque el camino fue largo y exigente, nos ayudó a forjar nuestro carácter; cada momento y persona contribuyeron a nuestra formación y crecimiento, tanto profesional como personal.

Gracias por todo,
May y Dani

Introducción

La resistencia microbiana representa un importante problema de salud pública que está en constante crecimiento. Entre los principales agentes patógenos involucrados se encuentra *Staphylococcus aureus*, el cual expresa una amplia gama de factores de virulencia como adhesinas intercelulares de polisacáridos o proteínas ancladas a la pared celular que promueven la producción de biopelículas como mecanismo de supervivencia (Carrera-Salinas et al., 2022)

Las biopelículas son estructuras tridimensionales complejas constituidas por comunidades de microorganismos principalmente bacterias, aunque también hongos y protistas, embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por los propios microorganismos (Gondil & Subhadra, 2023; Shineh et al., 2023). Este modo de organización representa un mecanismo de supervivencia, ya que confiere protección frente a condiciones ambientales adversas, agentes antimicrobianos y la respuesta inmunitaria del hospedador, al proporcionar un entorno óptimo para el intercambio de material genético y colonización, provocando, el desarrollo de infecciones adquiridas y resistencia a gran variedad de desinfectantes y antibióticos (Carrera-Salinas et al., 2022; Gondil & Subhadra, 2023).

La capacidad de formar biopelículas está ampliamente distribuida entre bacterias grampositivas y gramnegativas (Shineh et al., 2023). Entre los principales microorganismos asociados a la formación de biopelículas de importancia clínica se incluyen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* del grupo viridans, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridioides difficile* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gondil & Subhadra, 2023; Shineh et al., 2023).

Staphylococcus aureus meticilino resistente (SARM) se considera un contaminante ambiental común que coloniza aproximadamente el 30% de la población humana y desempeña un papel fundamental en el desarrollo de infecciones asociadas a la atención médica, teniendo una alta tasa de mortalidad (Trosch et al., 2024). De las infecciones adquiridas, casi el 80% están implicadas a la exposición con biopelículas, tanto dentro como fuera del área hospitalaria (Pokharel, 2022; Carrera-Salinas et al., 2022; Mahdavi & Aliakbarlu, 2024). *Staphylococcus aureus* meticilino resistente es capaz de resistir a múltiples antibacterianos como los β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, fenicoles y fluoroquinolonas, que son usados en el tratamiento de las infecciones, ocasionando serios problemas de salud (Sanmartín et al., 2021).

Para el estudio SARM, se ha empleado un amplio repertorio de técnicas *in vitro* orientadas a la evaluación de la formación y cuantificación de biopelículas. No obstante, hasta la actualidad no existe un protocolo universalmente estandarizado y aceptado por la comunidad científica, situación que se atribuye, en parte, a las limitaciones tecnológicas presentes en países en vías de desarrollo. Adicionalmente, la elevada variabilidad e inconsistencias observadas entre las distintas metodologías, e incluso dentro de una misma técnica, dificultan la comparación de resultados y comprometen su reproducibilidad (Azeredo et al., 2017).

En este contexto, resulta fundamental implementar una técnica *in vitro* accesible, reproducible y de fácil aplicación para el estudio de biopelículas, así como estandarizar los parámetros críticos que influyen en su formación. En el presente estudio se emplea la técnica de formación de biopelículas *in vitro* en microplacas, mediante la estandarización de condiciones como el medio de cultivo suplementado con glucosa al 10%, temperatura de incubación (37 °C), el tiempo de cultivo (24 horas) y la preparación del inóculo bacteriano ajustado a la escala de 0,5 McFarland. Asimismo, la cuantificación de las biopelículas formadas se realiza mediante espectrofotometría a diferentes longitudes de onda, comparando tres métodos: cristal violeta, resazurina y MTT, con el objetivo de evaluar su aplicabilidad y desempeño en la determinación de la biomasa total y la viabilidad celular.

Esta investigación es fundamental ya que tiene un enfoque que permite conocer y comprender de mejor manera los mecanismos de adhesión y formación de biopelículas, lo que facilita la prevención y erradicación de estas. Otro aspecto importante es que puede contribuir en la disminución del uso indiscriminado de bactericidas, lo que a su vez ayuda a prevenir la formación de cepas multirresistentes, mediante el uso de estrategias de control más eficaces. Este tema merece atención prioritaria, ya que se ha evidenciado a lo largo de los años un incremento de la resistencia de las bacterias a los antibacterianos y se convierte cada vez más en un problema grave para la salud pública. Por ello, la estandarización de métodos de formación y cuantificación de biopelícula puede constituir una herramienta valiosa de investigación de nuevas estrategias antimicrobianas, incluyendo metabolitos secundarios como aceites esenciales, dentro del área de farmacología (Mahdavi & Aliakbarlu, 2024; Jean-Pierre et al., 2023).

Por lo expuesto, se plantea optimizar una técnica de formación de biopelículas en microplacas y su cuantificación *in vitro* mediante cristal violeta y ensayos de viabilidad celular con MTT y resazurina, ya que se trata de un método sencillo y de fácil implementación. La optimización de esta técnica permite estandarizar las condiciones experimentales, mejorar la sensibilidad y comparabilidad de los resultados, y contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos

de formación de biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Asimismo, proporciona una base metodológica sólida para futuras investigaciones microbiológicas, orientadas a la evaluación de metabolitos o sustancias con actividad anti-biopelículas dirigidas al control de microorganismos resistentes.

Objetivos

Objetivo General

Establecer un protocolo para la formación y cuantificación de biopelículas *in vitro* en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM).

Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de formación de biopelículas de las cepas bacterianas de SARM aisladas de superficies inertes en clínicas odontológicas.
- Comparar la eficacia de diferentes métodos colorimétricos para la cuantificación de biopelículas, considerando su reproducibilidad experimental y su aplicabilidad en futuras investigaciones microbiológicas.

1. Marco teórico

1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa que se presenta a manera de racimos, tétradas, diplococos o cocos individualizados ante un frotis o tinción de Gram. Además, produce enzimas como la catalasa y coagulasa importantes para diferenciar de otras especies, en agar sangre presenta una β -hemólisis produciendo colonias con pigmentaciones doradas, rasgos empleados para su identificación microbiológica (Tang et al., 2024; Sizar et al., 2023).

Staphylococcus aureus puede estar presente de manera normal formando parte de la microbiota bacteriana en zonas como piel y nasofaringe; sin embargo, es una de las principales causas de infecciones en la piel, tejidos blandos, oste articulaciones, pulmones y aquellas causadas por dispositivos médicos como válvulas o prótesis (Calderón Parra, Ramos Martínez, & de la Fuente-Moral, 2022).

La capacidad de este microorganismo para producir enfermedad se debe a que manifiesta una gran variedad de factores de virulencia entre los que se encuentran las adhesinas y exoproteínas (exotoxinas y enzimas como nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas), mismas que facilitan su adhesión a superficies inertes, invasión de tejidos o la evasión de la respuesta inmune del huésped (Gonçalves et al., 2020).

A lo largo de los años, *S. aureus* ha desarrollado mecanismos de resistencia frente a diversos agentes antimicrobianos. Inicialmente, adquirió resistencia a la penicilina G, posteriormente a la meticilina y a otros antibióticos β -lactámicos. Asimismo, se han descrito cepas resistentes a macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol, antibióticos que aún se emplean con frecuencia en la práctica clínica. Esta capacidad adaptativa ha dado lugar a la aparición de cepas multirresistentes (MDR), entre ellas *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, que representan un desafío significativo para la salud pública y el tratamiento de infecciones (Pasachova Garzón et al., 2019; Piechota et al., 2018).

1.2. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM)

SARM es un estafilococo que ha desarrollado una resistencia a antibióticos como la penicilina y, posteriormente, la meticilina. Contrario a lo que se cree, SARM no desarrolló su resistencia tras la introducción del antibiótico, sino que, los genes responsables de este comportamiento

aparecieron al menos 20 años antes de la introducción de la meticilina como antibacteriano en 1960. Inicialmente se usó la penicilina y, se cree que, con ello los genes *mecA*, fueron adaptándose hasta generar una resistencia a la meticilina (Harkins et al., 2017).

1.2.1. Mecanismo de resistencia

El mecanismo principal de resistencia a los antibióticos en *S. aureus* es la adquisición de genes de resistencia, como el gen *mecA*, que confiere resistencia a la meticilina, el cual es un β -lactámico. Otros mecanismos incluyen la síntesis de bombas de eflujo, enzimas betalactamasas, modificaciones en las dianas farmacológicas y la disminución de la permeabilidad farmacológica debido a cambios en la pared celular bacteriana (Abebe & Birhanu, 2023; Vindel & Cercenado, 2016).

La resistencia de SARM ante los β -lactámicos está ligada al cromosoma de casete estafilocócico (SCC) portador de genes como *mecA* y *mecC*, este último codifica una proteína ligadora de penicilina alterada (PBP2a/PBP2c), que disminuye la acción de antibióticos como la meticilina que actúan en la pared celular bacteriana (García et al., 2019; Hou, Liu, Wei, & Xu, 2023).

Por otra parte, el mecanismo del gen *mecA*, cuyo precursor es el gen *mecA1*, es la codificación de PBP2a, con actividad de las enzimas transglicosilasa y transpeptidasa, logrando así que SARM continúe sintetizando su pared celular y logre sobrevivir ante la presencia del β -lactámico. Otro factor importante para la resistencia a los β -lactámicos es el estrés, ya que se presenta una mejor transcripción y traducción del gen (Hou et al., 2023).

Los genes *fem* (factor esencial para la resistencia a la meticilina) y los factores auxiliares (*aux*) participan en la síntesis de peptidoglicano y estabilizan los ácidos lipídicos en la pared celular, respectivamente; están relacionados con la resistencia a la meticilina (García et al., 2019; Hou, Liu, Wei, & Xu, 2023).

1.2.2. Epidemiología

Staphylococcus aureus meticilino resistente es un patógeno importante que causa infecciones adquiridas en la comunidad (CA) y adquiridas en la atención médica (HA). En las últimas décadas, tanto el SARM-HA como el SARM-CA se han propagado por todo el mundo. Aún más preocupante es que los clones de SARM-CA se han diseminado en hospitales y el SARM-HA ha ingresado a la comunidad (Lynch & Zhanel, 2022).

SARM-CA afecta principalmente a piel y pulmones, expresando el gen de resistencia SCCmec tipo IV y V, siendo la población de riesgo pacientes jóvenes sin hospitalizaciones recientes, sobre todo en deportistas en contacto cercano con otras personas y en personas que viven en hacinamiento (Abebe & Birhanu, 2023; Donkor & Kotey, 2020).

Mientras que SARM-HA ocasiona infecciones al torrente sanguíneo, sitios que han sido sometidos a procesos quirúrgicos o contienen un implante y neumonía, este tipo de variante expresa el gen de resistencia SCCmec tipo I, II y III, afectando principalmente a pacientes inmunodeprimidos, en diálisis, hospitalización o cirugía reciente (Abebe & Birhanu, 2023; Donkor & Kotey, 2020).

Un estudio realizado por Duran, Tacuri y Espinoza (2024), en una clínica de la ciudad de Cuenca, evidenció la presencia de cepas SARM en el 51,2% de los aislados clínicos, siendo las secreciones las muestras clínicas más frecuentes. Del total de casos identificados, el 54,76% correspondió a infecciones adquiridas en la comunidad, mientras que el 45,23% se originó dentro del área hospitalaria. De manera similar, el análisis de las superficies de teléfonos móviles de estudiantes de la carrera de Enfermería en Cuenca realizado por Tenezaca et al. (2025) evidenció que, de las 76 muestras evaluadas, el 11,84% correspondió a *S. aureus*, y de estas, el 44,44% presentó resistencia a la meticilina.

1.2.3. Impacto de biopelículas de SARM

1.2.3.1. Superficies y fómites más frecuentemente contaminados

El hallazgo de *S. aureus* incluye entornos atléticos, ambulancias, baños públicos, playas, refugios, hoteles, guarderías, transporte, dispositivos médicos y electrónicos, entornos hospitalarios e industrias alimentarias (cárnicos y lácteos) siendo una amenaza a la salud pública y alimenticia (Jaradat et al., 2020; Schmidlin et al., 2010; Rodríguez-Lázaro et al., 2018).

De acuerdo con un estudio realizado por Gonçalves et al. (2020), se recolectaron 354 muestras de instrumentos y equipos odontológicos como escupidera dental, mesa, jeringa de aire y agua, luz, cabecera y apoyabrazos de silla, de las cuales 157 se encontraban contaminadas y de estas, SARM se presentó en 62 muestras y *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) en 139; la superficie con mayor contaminación con SARM fue el apoyabrazos (29,7%), seguida de escupidera dental (24,3%) y la cabecera (27%).

1.2.3.2. Fuentes y vías de transmisión

SARM puede ser transferido directa e indirectamente de las superficies, en donde, puede encontrarse de manera prolongada (horas, días o meses) según la cantidad del patógeno presente, la característica de la superficie y de los factores ambientales (Jaradat et al., 2020). Mayoritariamente se han encontrado biopelículas fijadas en múltiples materiales como vidrio, caucho, acero inoxidable, superficies alimentarias, madera, plástico y polipropileno (Han & Lee, 2023).

A pesar de las medidas higiénico-sanitarias aplicadas por el personal, evitar completamente la transmisión cruzada de estos microorganismos es realmente complicado, debido a que, durante la atención odontológica, el paciente no solo está expuesto al contacto directo, sino también a bioaerosoles generados en la unidad dental como una de las principales vías de contaminación, seguido del equipo de protección personal (EPP), manos del dentista y superficies los cuales son considerados reservorios de SARM que incrementan el riesgo de diseminación microbiana (Teles et al., 2024).

1.2.3.3. Importancia clínica y repercusiones en odontología

Dentro de clínicas dentales, *S. aureus* y su variante SARM colonizan la cavidad bucal, generando en los pacientes patologías orales y periorales como xerostomía, úlceras orales, abscesos faciales, entre otros (Gonçalves et al., 2020). Aunque el riesgo de infección es menor que en hospitales debido a que el tiempo de contacto odontólogo-paciente es relativamente corto, debe considerarse como un problema de salud pública. Es importante que el odontólogo mantenga una ética de trabajo con protocolos clínicos estrictos, ya que la limpieza y el cuidado dentro de las instalaciones y de los materiales son significativos para prevenir al paciente de futuras infecciones (Teles et al., 2024).

1.3. Biopelículas bacterianas

1.3.1. Definición y estructura

Las biopelículas son estructuras formadas por células microbianas que se adhieren entre sí y a superficies tanto vivas como inertes, se encuentran rodeadas por una matriz extracelular autogenerada (Payne & Boles, 2016; Idrees, Sawant, Karodia, & Rahman, 2021; Pasachova, Ramírez, & Muñoz, 2019). Esta estructura les confiere a las bacterias una notable capacidad para resistir condiciones adversas, persistir en el huésped y evadir tanto la respuesta inmune como los tratamientos antimicrobianos convencionales (Payne & Boles, 2016).

En *Staphylococcus aureus*, la matriz extracelular, también conocida como sustancia polimérica extracelular (EPS), constituye entre el 50 y el 90% de la masa total de la biopelícula y está compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (eDNA) (Payne & Boles, 2016; Idrees, Sawant, Karodia, & Rahman, 2021). La composición de esta matriz varía según la cepa y las condiciones ambientales, lo que explica las diferencias en la persistencia de las biopelículas entre cepas del mismo microorganismo (Payne & Boles, 2016).

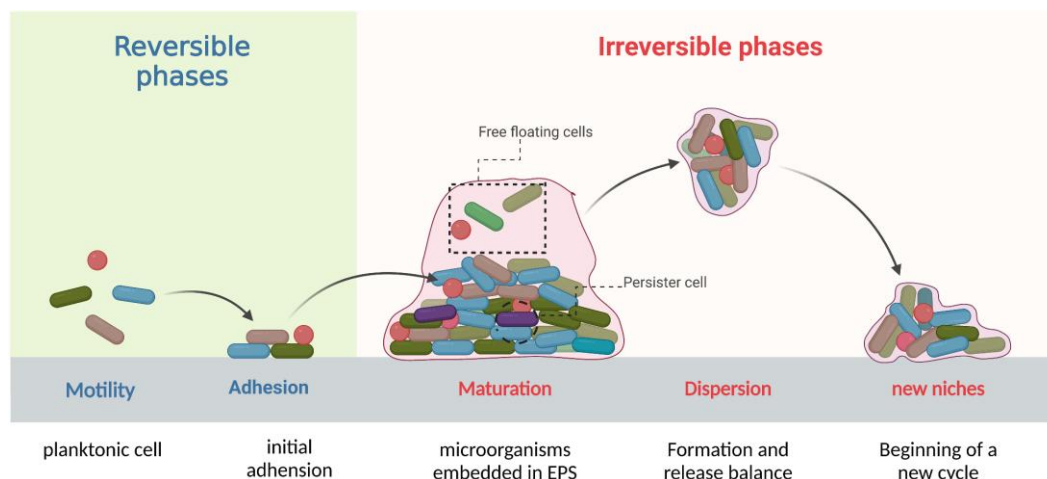
El principal polisacárido presente en la matriz es el polisacárido de adhesina intercelular (PIA) o poli-N-acetilglucosamina (PNAG), sintetizado por las enzimas codificadas en el operón *ica*; este es importante en la formación de biopelículas y en la resistencia frente a antimicrobianos (Payne & Boles, 2016; Idrees, Sawant, Karodia, & Rahman, 2021). En algunas cepas, sin embargo, la formación de biopelículas puede ser independiente de polisacáridos, predominando las proteínas y el eDNA como componentes estructurales principales (Payne & Boles, 2016).

Las proteínas de superficie, tales como la proteína asociada a la biopelícula (BAP), proteína de unión a la superficie de *S. aureus* (SasG), proteína de unión a la superficie A (Spa) y las proteínas de unión a fibronectina (FnBP), favorecen la interacción célula-célula y la adhesión a superficies (Payne & Boles, 2016; Idrees, Sawant, Karodia, & Rahman, 2021). Adicionalmente, las modulinas solubles en fenol (PSM) forman fibras amiloides en *S. aureus* que aportan resistencia a detergentes y proteasas (Payne & Boles, 2016). El ADN extracelular cumple una función esencial como transmisor horizontal de genes, de adhesión célula-célula y ha superficies, de estructura, y de resistencia tanto al sistema inmune como a antibacterianos (Payne & Boles, 2016; Idrees, Sawant, Karodia, & Rahman, 2021).

1.3.2. Etapas de formación de la biopelícula

La formación de una biopelícula de *S. aureus* es un proceso dinámico y formado de varias etapas que comprenden: adhesión inicial, proliferación, maduración y dispersión (Pasachova, Ramírez, & Muñoz, 2019; Bhattacharya & Horswill, 2024). Este proceso es reversible en la fase inicial de fijación y adhesión, pero una vez que las colonias pasan la fase inicial, puede conducirse a una fijación irreversible a diferentes superficies (Figura 1) (Pai et al., 2023).

Figura 1. Etapas de formación de la biopelícula.



Nota. Adaptado de *A growing battlefield in the war against biofilm-induced antimicrobial resistance: insights from reviews on antibiotic resistance*, por Liu, P., Patil, S., Liu, S. & Wen, F., 2023, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1327069>). Licencia CC.

- A. Adhesión inicial:** Esta etapa comprende la fijación y adhesión de las células planctónicas que han sido transportadas a una superficie de soporte biótica (tejidos vivos como células epiteliales del intestino, tracto urinario) o abiótica (dispositivos médicos), por convección, movimiento browniano o sedimentación (Zhao et al., 2023; Liu et al., 2024). La adhesión se ve facilitada por las interacciones de van der Waals y las fuerzas no covalentes, y reforzada mediante adhesinas estructurales como pilis y flagelos que forman parte de la envoltura celular, de esta forma, las células microbianas planctónicas se transforman en células estables (Shineh et al., 2023). Sin embargo, este proceso puede ser reversible y la adhesión débil ya que otros factores pueden modificar la adhesión (Zhao et al., 2023). Entre los factores ambientales que permiten una mejor adhesión se encuentran superficies rugosas, hidrofóbicas y de carga superficial positiva (Pasachova, Ramírez, & Muñoz, 2019; Bhattacharya & Horswill, 2024).
- B. Proliferación:** Tras la adhesión, se consolidan las interconexiones bacterianas mediante la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana, los enlaces de hidrógeno, los enlaces covalentes, los enlaces iónicos y las interacciones dipolo-dipolo (Zhao et al., 2023). Dando así inicio a la replicación bacteriana, desarrollo de microcolonias y producción de la matriz extracelular compuesta de PIA, proteínas y

eDNA (Bhattacharya & Horswill, 2024; Payne & Boles, 2016). En esta etapa, se inicia la secreción de sustancias exopoliméricas que conduce a una adhesión irreversible y, al ser hidrofóbicas, forman puentes iónicos, lo que favorece la condensación bacteriana y estabiliza la estructura tridimensional de la biopelícula (Shineh et al., 2023; Zhao et al., 2023). De igual forma, mediante la detección de quórum (QS) las células bacterianas sintetizan y liberan monofosfato de diguanilato cíclico intracelular (c-di-GMP), un segundo mensajero.

C. Maduración: En esta etapa las células forman interconexiones bacterianas y secretan matriz extracelular iniciando la formación de microcolonias. Durante este proceso, las bacterias continúan replicándose y aumentando la producción de la matriz extracelular favoreciendo así el crecimiento de microcolonias (Zhao et al., 2023; Shineh et al., 2023). Conforme la matriz de EPS se acumula y se forman las colonias bacterianas, se produce una alteración en la expresión génica y se generan canales de agua que suministran nutrientes disponibles a la comunidad celular y eliminan los productos extraños (Zhao et al., 2023).

D. Dispersión: De la biopelícula madura, células bacterianas o microcolonias se desprenden de la superficie retornando al estado planctónico para colonizar nuevas superficies mediante la interacción que se ve regulada por señales químicas (Pasachova, Ramírez, & Muñoz, 2019; Zhao et al., 2023). La dispersión puede ser ocasionada por un mecanismo activo o pasivo (Liu et al., 2024; Luo et al., 2022). El mecanismo activo se debe a la dispersión por siembra, en la cual las células bacterianas se desprenden dejando cavidades huecas en su interior; este proceso suele presentarse cuando se ven afectadas por enzimas degradadoras de la matriz, antimicrobianos, falta de nutrientes y bajos niveles de c-di-GMP (Zhao et al., 2023; Liu et al., 2024). Por otro lado, el mecanismo pasivo corresponde a la dispersión por desprendimiento, provocada por la pérdida repentina de una gran parte de la biopelícula o por procesos de erosión donde fragmentos más pequeños se desprenden, este último está inducido por fuerzas externas, como el cizallamiento (Zhao et al., 2023; Liu et al., 2024).

1.3.3. Genes y mecanismos de regulación de *S. aureus* implicado en biopelículas

La formación y regulación de biopelículas en *S. aureus* depende de la expresión coordinada de diversos genes, entre los que destacan genes de proteínas de unión al fibrinógeno (*fib*), FnBP, adhesión intercelular (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*), factor de aglutinación (*clf*), proteína de

unión a elastina (*ebps*) y proteína de unión a laminina (*eno*), todos estos genes participan en la adherencia, penetración y colonización hacia el huésped (superficies vivas), por otra parte, y el gen de la proteína de unión al colágeno (*can*) está implicado en la adherencia a superficies inertes. La dispersión de la biopelícula está mediada por genes del sistema regulador de genes accesorios (*agr*) que regulan proteasas y PSM, que actúan en consecuencia a la activación del péptido autoinductor o AIP (Idrees, Sawant, Karodia, & Rahman, 2021).

1.3.4. Factores ambientales y de superficie que favorecen la formación de biopelículas

Diversos factores físicos, químicos y ambientales influyen en la capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas. Las temperaturas elevadas, glucosa y concentraciones subinhibitorias de antibióticos pueden estimular la síntesis de PIA y favorecer el desarrollo de biopelículas. De igual manera, la rugosidad, la porosidad y la naturaleza hidrofóbica de las superficies, como las de catéteres o prótesis, facilitan la adhesión inicial (Pasachova, Ramírez, & Muñoz, 2019; Liu, Zhang, & Ji, 2020; Shineh et al., 2023).

El incremento en la concentración de cloruro de sodio o glucosa y la limitación de nutrientes promueven la expresión del operón *icaADBC* y la producción de matriz extracelular. Estos factores explican la persistencia de *S. aureus* en ambientes hospitalarios y dispositivos médicos (Liu, Zhang, & Ji, 2020; Idrees, Sawant, Karodia, & Rahman, 2021).

1.3.5. Resistencia de las biopelículas a antimicrobianos y desinfectantes

La formación de biopelículas asociada a los cambios genéticos y fenotípicos dentro de las bacterias encapsuladas en la matriz es una de las estrategias que emplea SARM para resistir los efectos de los agentes antimicrobianos (Pai et al., 2023; Aboelnaga et al., 2024). Las biopelículas de *S. aureus* muestran una resistencia hasta mil veces superior a la de las bacterias planctónicas frente a antimicrobianos y desinfectantes (Tuon et al., 2023). Esta resistencia puede ser intrínseca o extrínseca y se debe a los siguientes mecanismos:

a. Mecanismos físicos

- **Sustancia Polimérica Extracelular (EPS):** al ser una barrera física, impide la difusión eficiente de los agentes antimicrobianos ya que limitan su transporte y penetración (Almatroudi, 2025; Pai et al., 2023). De esta forma, la baja tasa de penetración provoca concentraciones insuficientes de agentes antimicrobianos dentro de la biopelícula y reduce su eficacia (Silva et al., 2021).

- **Captación iónica:** el eDNA y los polisacáridos pueden quelar cationes alterando la superficie y acidificando la biopelícula, lo que se traduce en un aumento de la resistencia antibacteriana (Ibáñez, Zafra, & González, 2017).

b. Mecanismo biológicos

- **Bombas de eflujo:** la sobreexpresión de bombas de eflujo como NorA, da lugar a la expulsión de fármacos reduciendo su concentración, de igual forma expulsa moléculas de detección de quórum sensing (QS) para regular el sistema QS (Liu et al., 2024).
- **Segundos mensajeros:** el di-GMP cíclico (c-di-GMP) influye en la formación de biopelículas y el metabolismo bacteriano. De modo que una alta concentración de c-di-GMP promueve la formación de biopelículas, provocando un rápido consumo de energía en la producción de los componentes de la matriz y reduciendo el estado metabólico en las bacterias de las biopelículas maduras (Liu et al., 2024). Al presentar tasas metabólicas más bajas, entran en estados de latencia y se disminuye la velocidad de absorción de antimicrobianos, limitando su eficacia (Shineh et al., 2023).
- **Transferencia horizontal de genes:** la transferencia de genes mediada por elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones, permite que genes de resistencia antimicrobiana sean transferidos entre especies y cepas bacterianas dentro de las biopelículas, dando lugar a la aparición de cepas multirresistentes (Pai et al., 2023; Tran et al., 2023). Además, la proximidad celular y la presencia de eDNA facilitan la conjugación y diseminación de genes de resistencia antimicrobiana (Ibáñez, Zafra, & González, 2017; Silva et al., 2021).

1.4. Métodos para la formación y cuantificación *in vitro* de biopelículas

El estudio de biopelículas *in vitro* en modelos estáticos como placas de microtitulación multipocillo es relativamente económico y de alto rendimiento; sin embargo, su alcance puede estar limitado ya que muy pocos entornos *in vivo* son constantemente estáticos (Grossman et al., 2021).

Además, al tratarse de cultivos discontinuos con un único aporte de nutrientes al final del período de incubación, existe la posibilidad de que dichos nutrientes se agoten y sean reemplazados por metabolitos bacterianos. Si bien esto puede no afectar a los ensayos con tiempos de incubación relativamente cortos (24 horas o menos), debe tenerse en cuenta al realizar experimentos con tiempos de incubación prolongados (Grossman et al., 2021).

A pesar de que los métodos *in vitro* son técnicas rápidas, fáciles de replicar y que permiten a los investigadores manipular y adaptar el crecimiento de biopelículas a cada experimento, no representan adecuadamente el crecimiento de biopelículas en una superficie biótica, donde la actividad metabólica del entorno (microbiota del huésped y/o superficies sobre las que crecen) puede afectar su desarrollo (Grossman et al., 2021).

1.4.1. Formación *in vitro* de biopelículas

– Medios de cultivo empleados

Los medios de cultivo empleados dependen del objetivo de estudio y del agente patógeno utilizado. El caldo tripticasa soya (TSB) es un medio comúnmente utilizado dentro de la formación de biopelículas de *S. aureus* y su suplementación con glucosa mejora la producción y estabilización de la biomasa de las biopelículas (Han & Lee, 2023; Lade et al., 2019). Por otro lado, la infusión cerebro-corazón (BHI) es utilizada en especies más exigentes como *Leuconostoc mesenteroides* para observar cómo interfiere la composición de la matriz (dextrano y algunas enzimas) en el desarrollo de las biopelículas (Han & Lee, 2023). Para un ensayo de investigación sobre el tiempo en el que mejor se produce una biopelícula en especies como *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* se ha empleado caldo Mueller-Hinton (MHB), además puede emplearse para detectar el efecto antimicrobiano de antibióticos como vancomicina y ciprofloxacino en biopelículas de SARM, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* (Han & Lee, 2023).

– Tipos de superficies para cultivo (*in vitro*)

Las placas de microtitulación son las más usadas en la formación de biopelículas y en la evaluación de sustancias anti-biopelículas; a pesar de tener un alto rendimiento, representan una gran variabilidad entre ensayos. Las microplacas tienen pocillos de poliestireno con fondo en U o en fondo plano y representan un medio estático (Kragh, Alhede, Kvich, & Bjarnsholt, 2019).

– Condiciones de incubación y estandarización de inóculo

Estandarizar el inóculo y las condiciones de incubación es importante para lograr y garantizar ensayos reproducibles en la formación de biopelículas de *S. aureus*. De acuerdo con Singh et al. (2017), uno de los aspectos críticos es la estandarización del inóculo bacteriano en solución salina al 0,9% a una turbidez equivalente a 0,5 McFarland, permitiendo que se mantenga una concentración bacteriana uniforme para otros ensayos o la utilización de otras cepas. Tras esto, es recomendable la dilución

en un medio de cultivo para obtener una densidad celular apta para la adhesión y formación de biopelículas.

Por otro lado, Tiberiu et al. (2025) mencionan que las microplacas deben mantenerse estáticas por un periodo de 18-24 horas a 37 °C para que se formen biopelículas maduras y detectables ante una tinción y lectura.

Ambos autores mencionan volúmenes de 100-200 µL para la inoculación de los micropocillos, además, resaltan la importancia de incluir controles positivos y negativos, siendo así que el conjunto de todo lo anteriormente mencionado ayuda a que los ensayos generen resultados consistentes y comparables entre estudios.

1.4.2. Cuantificación de biopelículas

La determinación de las biopelículas se puede realizar mediante métodos directos e indirectos. Entre los métodos directos se incluyen técnicas microscópicas como la microscopía óptica, microscopía de fluorescencia avanzada, microscopía confocal de barrido láser (CLSM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y la microscopía electrónica de barrido, las cuales a menudo no son viables debido a su elevado costo y complejidad (Nirmala et al., 2024). En cuanto a los métodos indirectos, se encuentran técnicas de tinción con cristal violeta y rojo Congo, el ensayo con resazurina y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de genes asociados a biopelículas (Nirmala et al., 2024; Grossman et al., 2021).

- **Cristal violeta (CV):** El ensayo con cristal violeta se emplea para medir la biomasa total y visualizar la distribución de la biopelícula (Haval et al., 2025; Grossman et al., 2021; Gascón et al., 2021). De tal forma que el colorante se adhiere a las células microbianas y a los componentes de la matriz extracelular (Nirmala et al., 2024; Haval et al., 2025). Este método se considera una técnica sencilla, de bajo costo y versátil; no obstante, presenta limitaciones, ya que no permite diferenciar entre células viables y no viables, ni aporta información sobre la estructura, composición o dinámica de la biopelícula (Haval et al., 2025).
- **Sal de tetrazolio (MTT):** El 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, o también llamado MTT, es un reactivo colorante empleado para evaluar la actividad metabólica de células bacterianas vivas adheridas en biopelículas *in vitro* por micropocillos. Las enzimas deshidrogenasas de las bacterias convierten el colorante MTT en cristales de formazán de color púrpura, lo cual permite estimar indirectamente el número de células viables/metabólicamente activas (Domnin et al., 2025; Benov, L., 2019).

Los resultados del ensayo con MTT deben ser interpretados y analizados adecuadamente, la reducción de MTT puede depender de la composición del medio (aminoácidos principalmente), la densidad celular y la solución apropiada del formazán (Benov, L., 2019).

- **Resazurina:** El colorante resazurina es ampliamente utilizado, se puede manejar en el área de microbiología, biología celular y en farmacéutica. La resazurina se reduce a resorufina fluorescente debido a la actividad metabólica de las células viables mediante enzimas mitocondriales, pasando de una coloración azul a una coloración rosada. Es un ensayo más sensible que el que se realiza con MTT debido a que con la resazurina se detectan cambios metabólicos por más bajos que sean (Petiti, Revel, & Divieto, 2024).

2. Metodología

2.1. Tipo y diseño de investigación

El presente estudio fue una investigación experimental de tipo cuantitativo y correlacional. Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca. En este estudio se controlaron diferentes factores como el tiempo de incubación a 24 horas, la temperatura a 37 °C, el inóculo bacteriano a 0,5 MacFarland, las longitudes de onda fueron seleccionadas de acuerdo con la técnica de cuantificación (cristal violeta, MTT y resazurina), para observar su influencia en la formación y cuantificación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

2.2. Muestras y controles

Se utilizaron seis cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente recuperadas de clínicas odontológicas de la ciudad de Cuenca confirmadas como SARM por métodos moleculares mediante amplificación de genes *nucA* y *femB*. Las cepas empleadas se identificaron como: SARM 23, 61, 122, 259, 1037 y 1098. Como controles positivos de la formación de biopelículas se utilizaron las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923™ y *Staphylococcus aureus* BAA-44™, mientras que la esterilidad del medio se empleó como control negativo. Para los ensayos de cuantificación mediante cristal violeta y MTT se realizaron doce réplicas por cada muestra, seis réplicas para los controles positivos y dos réplicas correspondientes a los controles de esterilidad. En el caso del ensayo con resazurina, se efectuaron seis réplicas tanto para las muestras como para los controles positivos y de esterilidad. El control de esterilidad se realizó, con el fin de asegurar la confiabilidad y validez de los resultados obtenidos.

2.3. Formación de biopelículas

2.3.1. Reactivación y preparación de cepas bacterianas y controles

Las cepas bacterianas utilizadas fueron aisladas en una investigación previa, independiente del desarrollo de este trabajo, y se encontraban criopreservadas a -80 °C junto con los controles. Por lo que fue necesaria su reactivación y posterior aislamiento desde los crioviales. Para ello, cada muestra y control se descongeló de manera gradual y se sembró en agar Tripticasa de Soya (Becton Dickinson®), incubándose en un ambiente aerobio a 37

°C durante 18-24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se verificó la pureza del crecimiento bacteriano y las características macroscópicas de cada cepa bacteriana.

2.3.2. Formación de biopelículas

Para la formación de biopelículas, se utilizó la metodología sugerida por Rimi et al. (2024) con modificaciones. A partir de cada cepa bacteriana (muestras y controles) se preparó un inóculo bacteriano equivalente a 0,5 en escala McFarland en solución salina estéril; posteriormente se realizó una dilución 1:10 en caldo Trypticase Soya (TM Media™) suplementado con D-glucosa al 10% (p/v) a partir de reactivo grado analítico (Merck®) y se dispensaron 200 µL de cada cultivo diluido en microplacas estériles de 96 pocillos fondo plano (Greiner™) (Anexo A). Cada microplaca se incubó en ambiente aerobio a 37 °C por 24 horas sin agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, el crecimiento bacteriano se estimó mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda 600 nm (OD₆₀₀) utilizando un lector de microplacas multimodelo Synergy (BioTek Instruments) (Nirmala et al., 2024; Moreno et al., 2023).

La suplementación con glucosa se encuentra ampliamente descrita en protocolos para la formación de biopelículas, debido a su papel como fuente esencial de carbono y energía. Este sustrato favorece la síntesis de polisacáridos extracelulares y la producción de ATP necesaria para la proliferación celular, lo que promueve la adhesión inicial de las bacterias y la formación de la matriz extracelular polimérica, procesos fundamentales en el desarrollo y maduración de biopelículas en *Staphylococcus aureus*.

2.3.3. Cuantificación de biopelículas

Para realizar la cuantificación de la formación de biopelícula de las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, se utilizaron tres metodologías:

2.3.3.1. Método 1: Cuantificación de biopelículas mediante cristal violeta

Para la cuantificación por cristal violeta se aplicó una metodología combinada por Rimi et al. (2024), Notcovich et al. (2018) y George et al. (2025).

En la microplaca, el medio de cultivo se eliminó por decantación mediante inversión. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich®) por inmersión durante 5 segundos, aplicando movimientos de vaivén suaves. La microplaca se dejó secar en posición invertida durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las bacterias adheridas se fijaron mediante la adición de 200 µL de etanol al 95% (Merck®)

en cada micropocillo, con un tiempo de incubación de 15 minutos. Posteriormente, el etanol se eliminó por decantación y la microplaca se dejó secar nuevamente bajo las mismas condiciones.

A continuación, se adicionaron 200 μ L de violeta cristal al 1% (Sigma-Aldrich®) a cada micropocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó por decantación, seguido de un lavado con agua destilada estéril. La microplaca se dejó secar en posición invertida durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de secado, el colorante retenido se disolvió mediante la adición de 200 μ L de ácido acético al 33% (Merck®) durante 10 minutos. Finalmente, la cuantificación de la biopelícula se estimó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 570 nm y 585 nm utilizando un lector de microplacas multimodelo Synergy (BioTek Instruments) (Anexo B).

2.3.3.2. Método 2: Cuantificación de biopelículas mediante sal de tetrazolio (MTT)

Para la cuantificación de biopelículas mediante MTT se aplicó la metodología empleada por Tian et al. (2025), Akter et al. (2025), Thermo Fisher Scientific (2021) y Domnin et al. (2025).

En la microplaca, el medio de cultivo se eliminó por decantación mediante inversión. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich®) por inmersión durante 5 segundos, aplicando movimientos de vaivén suaves. La microplaca se dejó secar en posición invertida durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 10 μ L de MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) a cada micropocillo, realizándose dos incubaciones a 37 °C en oscuridad: la primera durante 30 minutos y la segunda durante 2 horas, hasta observar el cambio de color de amarillo a púrpura. Es importante mantenerlo fuera del alcance de la luz para evitar la fotodegradación del reactivo y la reducción del tetrazolio, lo que podría interferir en la formación del formazán y en la precisión de las lecturas espectrofotométricas.

Transcurrido el tiempo de incubación, el MTT se eliminó por decantación mediante inversión y el formazán formado se disolvió con 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) durante 30 minutos en un agitador orbital a 200 r.p.m. El volumen disuelto se transfirió a una nueva microplaca y la cuantificación de la biopelícula se realizó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 570 nm y 595 nm utilizando un lector de microplacas multimodelo Synergy (BioTek Instruments) (Anexo C).

2.3.3.3. Método 3: Cuantificación de biopelículas mediante resazurina

Para la cuantificación de biopelículas mediante resazurina se aplicó la metodología empleada por Longhin et al. (2022).

En la microplaca, el medio de cultivo se eliminó por decantación mediante inversión. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich®) por inmersión durante 5 segundos, aplicando movimientos de vaivén suaves. La microplaca se dejó secar en posición invertida durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se adicionaron 20 μ L de PrestoBlue™ (40 mg/mL) (Invitrogen) a cada micropocillo y se incubó a 37 °C con agitación continua a 150 r.p.m. durante 10 minutos, hasta observar el cambio de color de azul a rojo (resorufina). La cuantificación de la biopelícula se realizó mediante espectrofotometría, midiendo la fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) a los 10 minutos y, posteriormente, cada 10 minutos hasta completar 2 horas (Anexo D).

2.4. Análisis estadístico

Los valores de densidad óptica (OD) obtenidos tras la cuantificación de la formación de biopelícula de cepas SARM con cristal violeta y con MTT fueron organizados en tablas de Excel. Para la identificación y eliminación de datos atípicos, se calculó el promedio (\bar{x}), la desviación estándar (s) y coeficiente de variación (%CV), a partir de los cuales se realizaron los diagramas de cajas y bigotes para evaluar la dispersión de datos.

Los datos fueron analizados mediante el software estadístico InfoStat, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se realizaron comparaciones entre longitudes de onda para el cristal violeta, tiempos y longitudes de onda en el MTT y, finalmente, se compararon las tinciones a 570 nm.

Debido a la elevada variabilidad registrada en las lecturas obtenidas mediante el ensayo con resazurina, no se realizó el análisis estadístico correspondiente, ya que los resultados carecieron de consistencia y reproducibilidad a nivel experimental. Esta falta de confiabilidad se evidenció tanto en los controles positivos como en los controles negativos que contenían únicamente el medio de cultivo, lo que sugiere interferencias metodológicas o reacciones no específicas del indicador. En consecuencia, dicha variabilidad impidió una interpretación objetiva de los datos y limitó la validez de la resazurina como método de cuantificación de biopelículas.

2.5. Cálculos para la clasificación según la capacidad de producción de biopelículas y viabilidad celular.

Tras la selección de las lecturas de densidad óptica (OD), se calculó el promedio de las réplicas y se restó el valor del blanco. Posteriormente, se aplicaron las fórmulas correspondientes para determinar la capacidad de formación de biopelículas. Según George et al. (2025), la cuantificación de la biomasa mediante cristal violeta se basa en criterios que permiten clasificar la capacidad formadora de biopelículas, como se muestra en la Ecuación 1 y la Tabla 2. De manera análoga, el ensayo MTT permite cuantificar la viabilidad celular, siguiendo la Ecuación 2 (Tambone et al., 2021).

Ecuación 1. Fórmula para cuantificación de biomasa con cristal violeta

$$ODc = OD \text{ control negativo} + 3 s \text{ control negativo}$$

Donde:

ODc: densidad óptica del control

ODT: densidad óptica de la muestra

s: desviación estándar

Tabla 1. Criterios de clasificación de capacidad formadora de biopelículas.

Criterios de clasificación	Interpretación
ODT < ODc	No productor
ODc < ODT < 2 x ODc	Productor débil
2 x ODc < ODT < 4 x ODc	Productor moderado
4 x ODc < ODT	Productor fuerte

Ecuación 2. Fórmula para cuantificación de viabilidad celular con MTT.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control positivo}} \times 100\%$$

3. Resultados

3.1. Cuantificación de formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente con cristal violeta

Se realizó la cuantificación de biopelículas de SARM por medio de la tinción con cristal violeta al 1%, se obtuvieron OD a 570 y 585 nm. Los resultados de las lecturas a 570 nm y 585 nm se presentan en la Tabla 2 y 3, respectivamente, donde se muestra el número de réplica (R), media aritmética (\bar{x}), desviación estándar (s), OD de la muestra (ODT), OD de los controles (ODc) y la clasificación según su capacidad formadora de biopelícula.

Tabla 2. Resultados de la lectura a OD₅₇₀ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.

Cepas bacterianas	\bar{x} OD ₅₇₀	s	ODT	ODC	Clasificación
SARM 23	0,19	0,01	0,098		No productor
SARM 61	0,16	0,02	0,069		No productor
SARM 122	0,24	0,01	0,147		Productor débil
SARM 259	0,68	0,01	0,587		Productor fuerte
SARM1037	0,78	0,06	0,688		Productor fuerte
SARM1098	0,30	0,01	0,210		Productor débil
SAU BAA 44	0,23	0,02	0,141		Productor débil
SAU ATCC 25923	0,79	0,05	0,699		Productor fuerte
Esterilidad	0,09	0,01		0,112	

Nota. SAU: *Staphylococcus aureus*. SARM: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

En la Figura 2 y 3 se muestra la capacidad formadora de biopelículas de cada cepa de SARM a 570 y 585 nm, respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,0001$), evidenciándose una mayor producción de biomasa en las cepas SARM 259, SARM 1037 y el control positivo (*S. aureus* ATCC 25923™), en comparación con el resto de las cepas analizadas. En ANOVA-Tukey, las letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$); por otro lado, las barras que comparten una letra tienen similitudes entre sí ($p > 0,05$).

Tabla 3. Resultados de la lectura a OD₅₈₅ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.

Cepas bacterianas	\bar{x} OD ₅₈₅	s	ODT	ODC	Clasificación
SARM 23	0,270	0,012	0,146		Productor débil
SARM 61	0,204	0,038	0,079		No productor
SARM 122	0,298	0,009	0,173		Productor débil
SARM 259	0,962	0,072	0,838		Productor fuerte
SARM1037	1,074	0,141	0,950		Productor fuerte
SARM1098	0,372	0,023	0,247		Productor débil
SAU BAA 44	0,304	0,020	0,179		Productor débil
SAU ATCC 25923	1,099	0,027	0,974		Productor fuerte
Esterilidad	0,125	0,003		0,133	

Nota. SAU: *Staphylococcus aureus*. SARM: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Figura 2. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de SARM determinada por cristal violeta (OD₅₇₀).

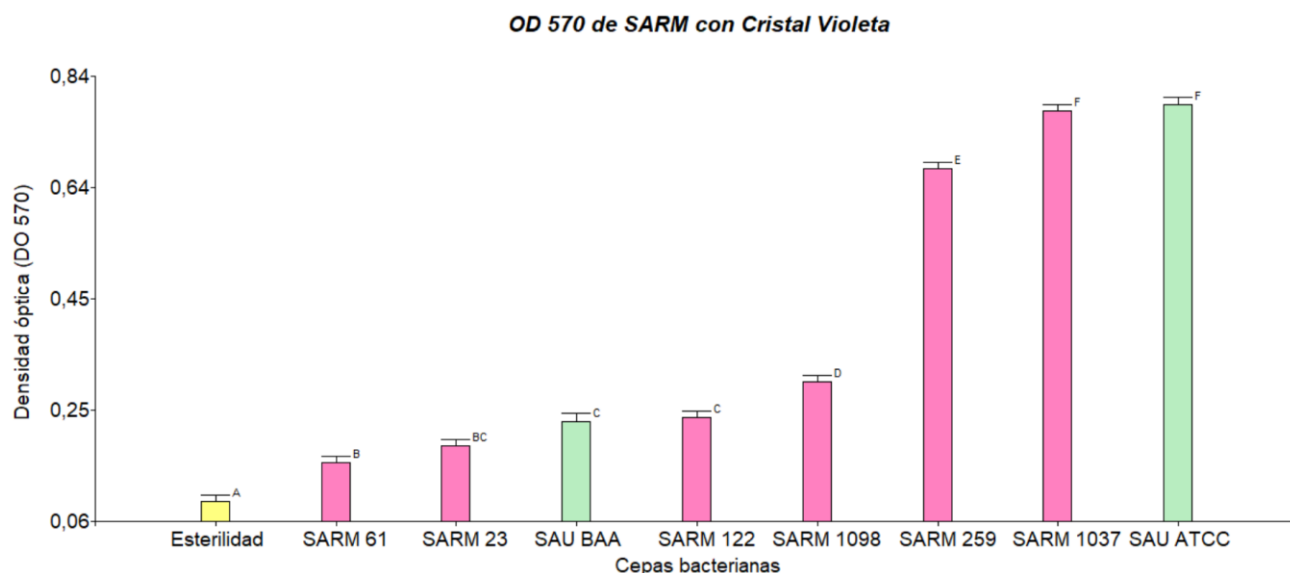
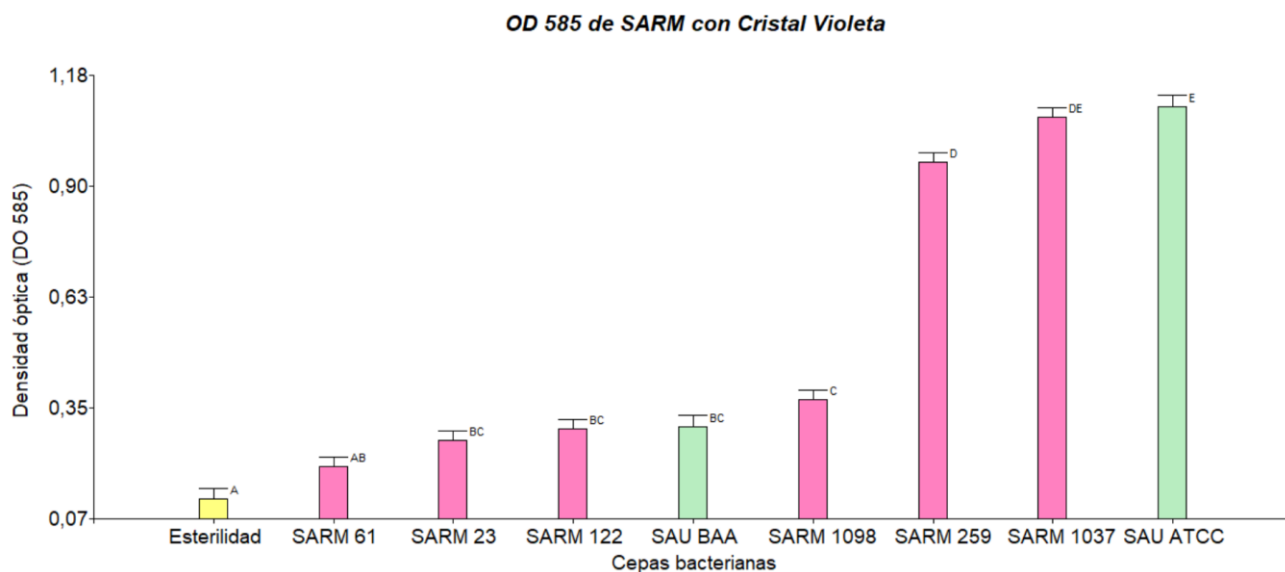


Figura 3. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de SARM determinada por cristal violeta (OD_{585}).



3.2. Cuantificación con MTT

La cuantificación con MTT se realizó a dos longitudes de onda (570 y 595 nm) a los 30 minutos y a las 2 horas, los resultados presentan en las Tablas 4, 5, 6 y 7 en donde se indica de cada análisis el número de réplica (R), media aritmética (\bar{x}), desviación estándar (s), OD de la muestra (ODT) y el porcentaje de viabilidad celular de cada cepa.

Tabla 4. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD_{570} y porcentaje de viabilidad celular.

Cepas bacterianas	\bar{x} OD_{570}	s	ODT	ODC
SARM 23	1,16	0,05	1,092	51,71
SARM 61	0,66	0,07	0,592	28,03
SARM 122	0,99	0,04	0,922	43,68
SARM 259	1,30	0,04	1,229	58,20
SARM 1037	1,27	0,05	1,196	56,66
SARM 1098	0,93	0,02	0,863	40,90
SAU BAA	1,46	0,07	1,389	65,80
SAU ATCC	2,18	0,11	2,111	100,00
Esterilidad	0,07	0,01		

Nota. SAU: *Staphylococcus aureus*. SARM: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 5. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD_{595} y porcentaje de viabilidad celular.

Cepas bacterianas	\bar{x} OD_{595}	s	ODT	ODC
SARM 23	1,041	0,046	0,978	52,094
SARM 61	0,588	0,058	0,525	27,947
SARM 122	0,888	0,034	0,825	43,950
SARM 259	1,160	0,038	1,096	58,399
SARM 1037	1,133	0,055	1,070	56,987
SARM 1098	0,816	0,021	0,752	40,078
SAU BAA	1,286	0,067	1,223	65,153
SAU ATCC	1,940	0,095	1,877	100,000
Esterilidad	0,064	0,005		

Nota. SAU: *Staphylococcus aureus*. SARM: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 6. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD_{570} y porcentaje de viabilidad celular.

Cepas bacterianas	\bar{x} OD_{570} - 2 horas	s	ODT	%VIABILIDAD
SARM 23	2,14	0,06	2,072	67,104
SARM 61	1,82	0,18	1,749	56,644
SARM 122	2,25	0,11	2,176	70,472
SARM 259	2,82	0,13	2,747	88,957
SARM 1037	2,92	0,06	2,850	92,277
SARM 1098	2,14	0,04	2,069	67,012
SAU BAA	2,45	0,26	2,385	77,243
SAU ATCC	3,16	0,1	3,088	100,000
Esterilidad	0,07	0,01		

Nota. SAU: *Staphylococcus aureus*. SARM: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 7. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD_{595} y porcentaje de viabilidad celular

Cepas bacterianas	\bar{x} OD_{595} - 2 horas	s	ODT	%VIABILIDAD
SARM 23	1,94	0,05	1,878	69,222
SARM 61	1,64	0,17	1,579	58,191
SARM 122	2,05	0,11	1,982	73,036
SARM 259	2,56	0,12	2,493	91,880
SARM 1037	2,62	0,06	2,554	94,122
SARM 1098	1,92	0,04	1,859	68,515
SAU BAA	2,21	0,23	2,143	78,975
SAU ATCC	2,78	0,11	2,714	100,000
Esterilidad	0,06	0,01		

Nota. SAU: *Staphylococcus aureus*. SARM: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

En las Figuras 4 y 5, se muestra la viabilidad celular de cada cepa de SARM a 570 y 595 nm a los 30 minutos, respectivamente. En tanto que, las Figuras 6 y 7, muestran la viabilidad celular a 570 y 595 nm a las 2 horas. En el análisis ANOVA unidireccional indicó la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ($p < 0,0001$), observándose un aumento dependiente del tiempo en la actividad metabólica de las cepas evaluadas. A los 30 minutos, tanto las cepas SARM 259, SAU BAA y SAU ATCC presentaron valores mayores de viabilidad celular, por otro lado, a las 2 horas los valores de SARM 259 y SAU ATCC permanecieron elevados mientras que SARM 1037 mostró un incremento significativo. En el análisis por el método de Tukey, las letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$), mientras que las barras que comparten una misma letra no presentan diferencias estadísticas entre sí ($p > 0,05$).

Figura 4. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD₅₇₀ a los 30 minutos.

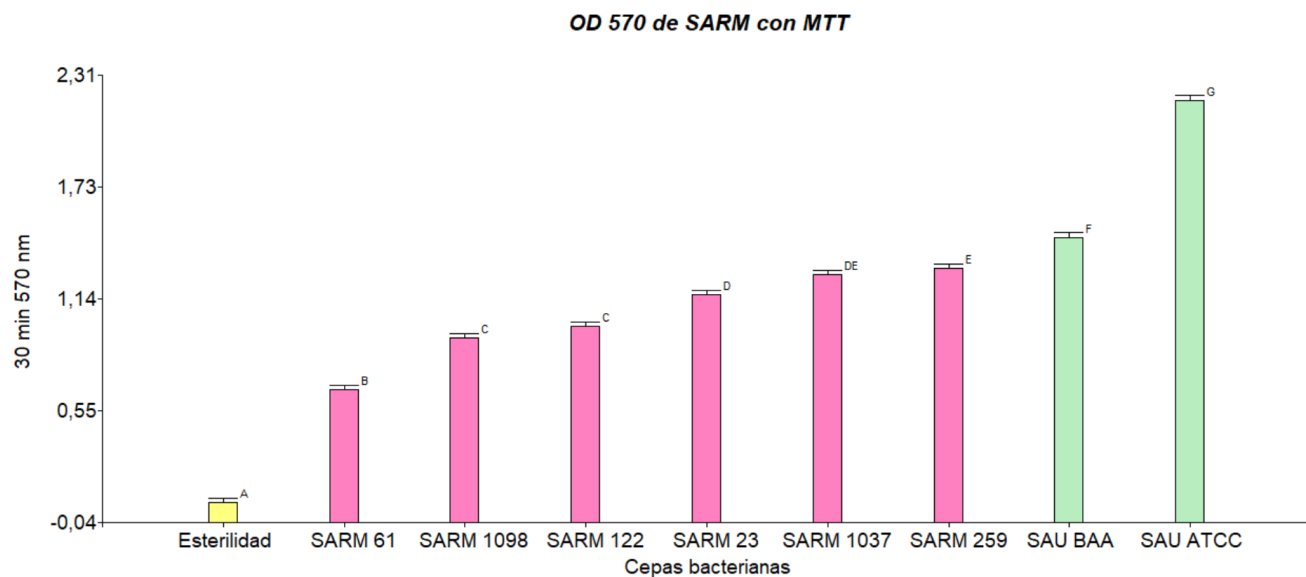


Figura 5. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD₅₉₅ a los 30 minutos.

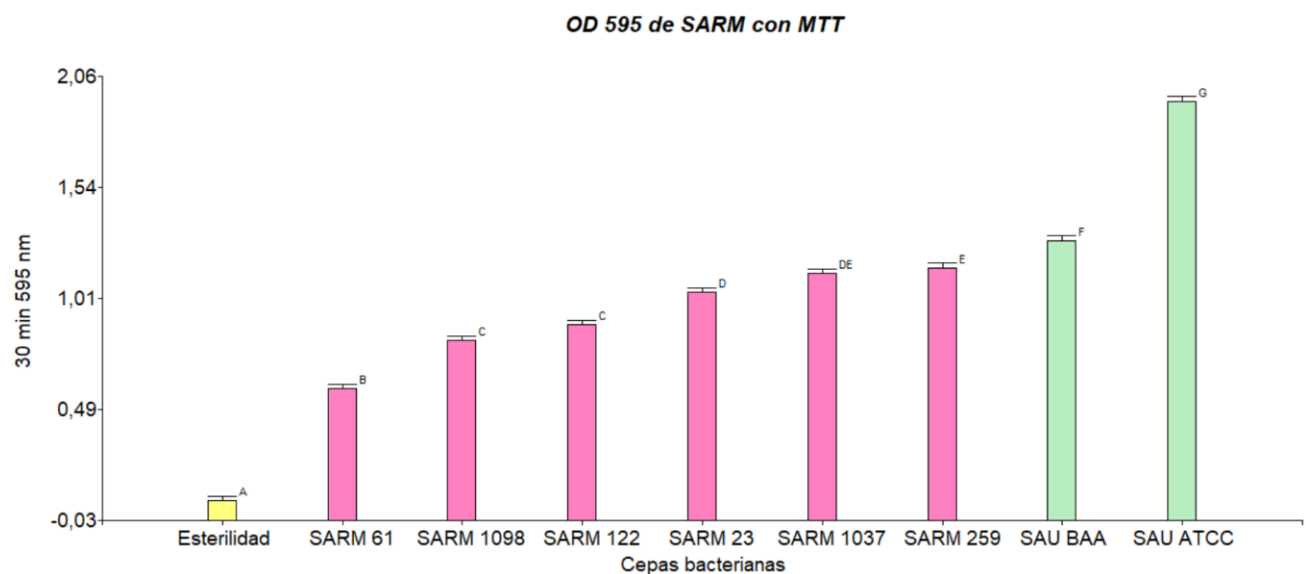


Figura 6. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD₅₇₀ a las 2 horas.

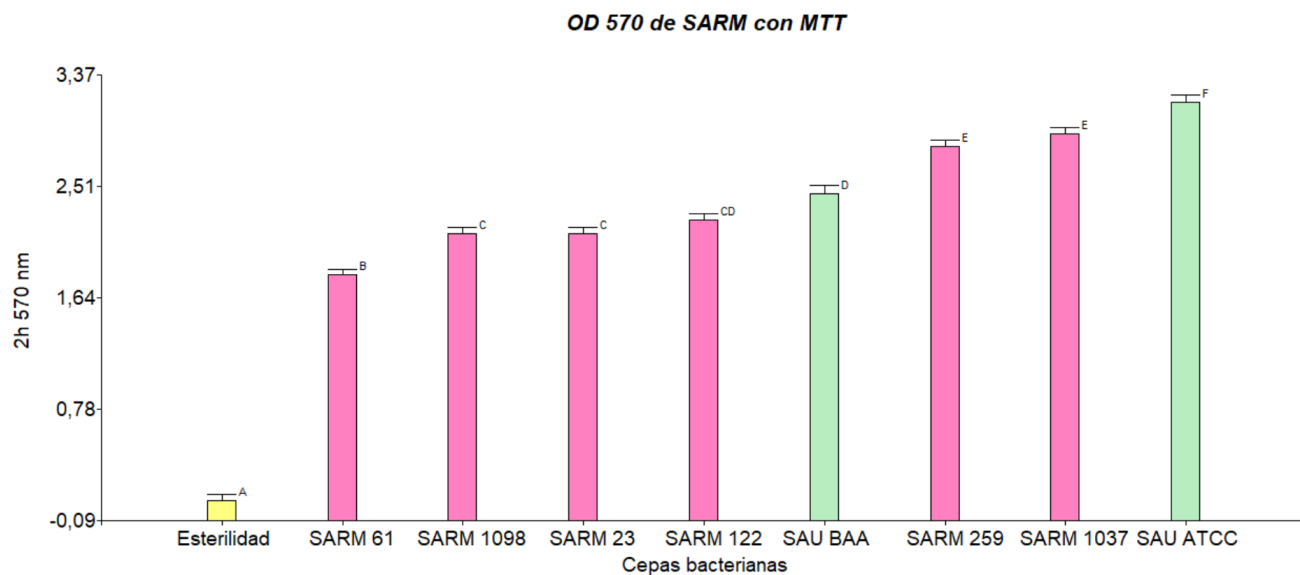
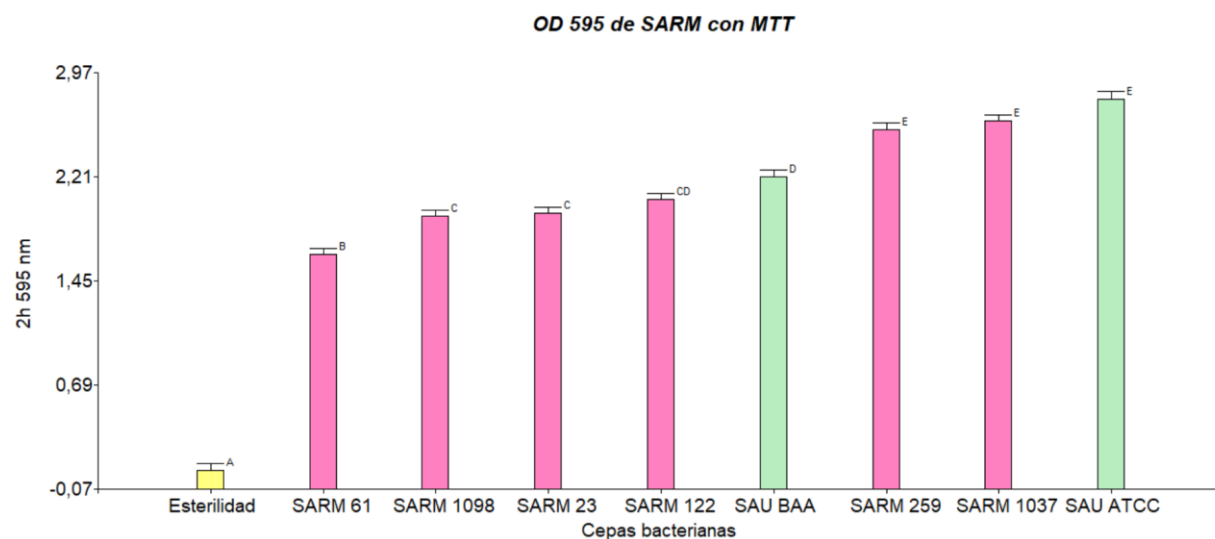


Figura 7. Viabilidad celular de biopelículas de cepas de SARM determinada mediante el ensayo MTT a OD₅₉₅ a las 2 horas.



3.3. Cuantificación con resazurina

La medición de fluorescencia se realizó a 560/590 nm (excitación/emisión) durante un período inicial de 2 horas. No obstante, debido a la elevada variabilidad observada en las primeras lecturas, se efectuaron tres mediciones adicionales a intervalos de 10 minutos, completando

un tiempo total de lectura de 2 horas y 30 minutos. A pesar de esta medida aplicada tanto en las muestras como en los controles, la variabilidad en las lecturas se mantuvo.

A partir de los valores de fluorescencia obtenidos se calcularon la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV), evidenciándose una marcada dispersión de los datos en todas las lecturas realizadas, tanto en las cepas evaluadas como en los controles positivos y negativo. Como constancia de esta variabilidad, las lecturas correspondientes a los controles positivo y negativo se presentan en la Tabla 9, mientras que los resultados completos se incluyen en el Anexo G.

Tabla 8. Resultados de una hora de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión).

Cepas bacterianas	Tiempo (min)	Fluorescencia 560/590 nm						\bar{x}	s	CV
ATCC	90	8794	7301	6408	6221	8902	6888	7419,00	1169,88	15,77
	100	7322	5927	5172	4771	7343	4933	5911,33	1169,96	19,79
	110	6347	5077	4343	3782	6184	3885	4936,33	1127,50	22,84
	120	5634	4369	3740	2910	5365	3013	4171,83	1159,49	27,79
	130	4581	3272	2883	1992	4198	2033	3159,83	1078,92	34,14
	140	4412	2916	2572	1761	3788	1632	2846,83	1101,88	38,71
	150	4191	2655	2347	1518	3566	1425	2617,00	1102,82	42,14
Esterilidad	90	23485	2432	6502	3364	62296	28362	21073,5	22942,07	108,87
	100	17802	1385	3767	2122	37948	1304	10721,33	14762,06	137,69
	110	12189	834	2091	1501	1841	761	3202,83	4434,23	138,45
	120	8041	672	1543	1124	1299	549	2204,67	2883,71	130,80
	130	3378	404	845	752	776	285	1073,33	1151,07	107,24
	140	2658	367	745	659	588	229	874,33	894,47	102,30
	150	2175	325	614	608	480	143	724,17	733,11	101,24

4. Discusión

La tinción con cristal violeta es uno de los métodos más empleados para la cuantificación de biomasa total en biopelículas bacterianas por su bajo costo, baja complejidad y adecuada reproducibilidad. Por ello, es una técnica aceptada y recomendada en estudios *in vitro*, permitiendo una medición confiable de la biomasa adherida (Stephens, S., Mhadevan, R. y Grant, D., 2025).

En el presente estudio se evaluó la capacidad formadora de biopelículas de SARM a 570 y 585 nm con el objetivo de estudiar su comportamiento frente a estas dos longitudes de onda comúnmente utilizadas en otros estudios similares. Los resultados obtenidos (Tabla 3 y Tabla 4) mostraron diferencias significativas entre las cepas evaluadas ($p < 0,0001$), las cepas fuertemente productoras coinciden a ambas longitudes de onda (SAU ATCC, SARM 1037 y SARM 259), presentando OD más altas y, por ende, una mayor capacidad de producción de biomasa adherida.

Sin embargo, al comparar las OD obtenidas en ambas longitudes de onda se evidenció de manera consistente que las mediciones realizadas a 585 nm presentan valores de absorbancia mayores. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por George et al. (2025), quienes determinaron la longitud de onda máxima (λ_{max}) y la máxima absorción del violeta cristal solubilizado en ácido acético al 33%, evidenciando un espectro de absorción entre 200 a 800 nm, con un pico máximo a 585 nm. En base a esto, se puede confirmar que a 585 nm se presenta una mayor sensibilidad para la cuantificación de la biopelícula y atribuirse a una mayor interacción entre el colorante y la matriz extracelular.

Además de las cepas clasificadas como fuertemente productoras, se identificaron cepas con una baja o nula capacidad formadora de biopelículas, así como cepas moderadamente productoras, dependiendo de la longitud de onda empleada. La presencia de estas diferencias permite afirmar que SARM no presenta un mismo comportamiento, sino que depende de las diferencias genéticas y de las condiciones experimentales para la formación de biopelículas. Estos hallazgos se respaldan con el estudio realizado por Lavoie et al. (2025), en el cual se evaluó el desarrollo de biopelículas de *Staphylococcus aureus* a distintos tiempos de incubación (0–6 h, 6–16 h, 16–24 h y ≥ 24 h) mediante la tinción con cristal violeta. Los autores demostraron cambios significativos en la densidad óptica (OD) a lo largo del tiempo, evidenciando un incremento progresivo conforme se acumulaba la biomasa adherida. No obstante, tras las 24 horas de incubación, la OD tendió a estabilizarse o dejó de aumentar de manera significativa, lo que indica que la biopelícula alcanzó un estado maduro y que tras el agotamiento de nutrientes se da lugar a una liberación parcial o completa de la biopelícula.

Adicionalmente, el estudio evidenció que las cepas clasificadas como formadoras débiles de biopelículas inician la adhesión a la superficie con una carga electrostática negativa más elevada, mientras que las cepas formadoras fuertes presentan inicialmente una carga menos negativa, la cual aumenta de forma gradual durante las primeras 24 horas de incubación. En este sentido, los aislados con valores de cargas electrostática menos negativas mostraron una mayor capacidad de formación de biopelículas, en contraste con aquellos con cargas más negativas, que exhibieron una menor biomasa adherida.

Los resultados obtenidos con el ensayo MTT demuestran diferencias y similitudes entre las longitudes de onda (570 y 595 nm) como entre los tiempos de incubación (30 minutos y 2 horas). La sensibilidad para evaluar la viabilidad celular de cada cepa puede depender de la longitud de onda empleada para medir la absorbancia del formazán reducido. Un estudio elaborado por Stindlova et al. (2024), menciona que la absorción óptima puede variar según las características del formazán y las condiciones de experimentación, recomendando rangos de 595 nm para la obtención de resultados más robustos en biopelículas bacterianas. Aún pese a las recomendaciones del autor, los resultados obtenidos en este estudio a los 30 minutos tanto a 570 como 595 muestran porcentajes de viabilidad muy similares entre cada cepa, las cepas con una mayor absorbancia fueron SAU ATCC, SAU BAA y SARM 259. Por otra parte, los resultados a las 2 horas siguen siendo muy similares, aunque con una leve variación del $\pm 3\%$ y las cepas con absorbancias más altas fueron SAU ATCC, SARM 1037 y SARM 259.

El incremento de las lecturas a las 2 horas en comparación a los 30 minutos, sugieren una mayor reducción del MTT por parte de las células metabólicamente activas presentes en la biopelícula. Stindlova et al. (2025) mencionan que es recomendable incubar hasta 2 horas para obtener resultados más sensibles que permitan distinguir mejor la actividad metabólica celular. En biopelículas maduras, como las evaluadas en este estudio, las células presentan una variabilidad metabólica, lo que puede generar diferencias en la velocidad de reducción del MTT entre cepas. Siendo así, que la cepa SARM 1037 requiere un tiempo de incubación más prolongado ya que presenta una reducción metabólica más lenta del MTT para alcanzar valores máximos de absorbancia.

Los análisis estadísticos demuestran la existencia de diferencias significativas entre las cepas, en algunas de ellas se observa una alta actividad metabólica. Al aumentar la longitud de onda aumenta también la absorbancia de cada muestra de manera proporcional, por lo que, el porcentaje de viabilidad varía levemente. Las cepas SAU ATCC y SARM 259 presentan OD altas tanto a corto como a largo plazo, mientras que, cepas como SARM 1037 requieren de mayores tiempos de incubación para que se dé la reacción de reducción del

reactivo y, por ende, su viabilidad celular aumente. Es importante considerar las limitaciones del ensayo con MTT para ponerlo en práctica, principalmente el tiempo de incubación.

Los métodos evaluados de cristal violeta y MTT presentaron resultados reproducibles y consistentes, permitiendo la comparación entre ensayos y demostrando que, aunque cada uno evalúa un aspecto diferente pueden ser complementarios. Se identificaron cepas fuertemente productoras de biopelículas (SAU ATCC, SARM 1037 y SARM 259) por medio del cristal violeta, las mismas que reportaron altos valores de viabilidad celular en el ensayo MTT a las 2 horas de incubación, lo que coincide en ambos ensayos. Esta concordancia indica que las cepas con una alta biomasa adherida tienen también una actividad metabólica elevada una vez que se han desarrollado. No obstante, al analizar los resultados del MTT a los 30 minutos, se observó una diferencia, donde las cepas SAU ATCC, SARM 259 y SAU BAA presentaron los valores más altos. Este cambio puede deberse a que el ensayo MTT evalúa la actividad metabólica de células viables que puede estar presente antes de que las mismas hayan reaccionado completamente con el MTT.

Con relación a la determinación de viabilidad celular mediante el ensayo de resazurina, no todas las lecturas se obtuvieron en los primeros 50 minutos incubación, ya que muchos de ellos se presentaron como valores fuera del límite de detección. De los resultados de fluorescencia obtenidos se evidenció una elevada variabilidad con coeficientes de variación superiores al 10%, lo que compromete la precisión de la cuantificación. Esta variabilidad se corrobora al observar que las lecturas de fluorescencia del control negativo presentaron diferencias significativas desde la primera medición, lo cual invalida la cuantificación de la viabilidad celular.

En condiciones ideales, la resazurina presente en el control negativo no debería mostrar variaciones a lo largo del tiempo, dado que, al no presentar actividad metabólica no se da la reducción a resorufina, manteniendo valores de fluorescencia o absorbancia estables durante el tiempo de incubación. Por tanto, las fluctuaciones observadas en las lecturas del control negativo sugieren la influencia de factores experimentales que afectan la estabilidad y reproducibilidad del ensayo.

La variabilidad registrada en las lecturas de fluorescencia de la resorufina, pueden estar asociadas a varios parámetros como concentración de resazurina, tiempo de incubación y número de células. En este contexto, cultivos con densidades celulares elevadas pueden saturar la señal o provocar efectos de difusión que aumentan la variabilidad, dado que el número de células está fuertemente correlacionado con el grado de reducción de la resazurina (Petiti et al., 2024). De manera similar, un tiempo de incubación prolongado en

muestras con concentraciones celulares altas puede conducir al agotamiento de la resazurina disponible, afectando la relación directa entre su reducción y el número de células viables, además de favorecer la reducción de la resorufina y formar productos no detectables (Petiti et al., 2024). Por el contrario, un tiempo de incubación demasiado corto no puede resultar insuficiente para detectar de forma precisa la actividad metabólica cuando la densidad celular es baja.

No obstante, a pesar de las dificultades observadas en esta investigación, el ensayo de resazurina en comparación con otros colorantes exhibe un rango dinámico de detección más amplio y una elevada sensibilidad.

Conclusiones

Se establecieron dos protocolos reproducibles y adecuados para la cuantificación *in vitro* de biopelículas para cepas de SARM 23, 61, 122, 259, 1037 y 1098 con microplacas de 96 pocillos; un modelo cuantificó biomasa y el otro actividad metabólica. Las cepas aisladas de clínicas odontológicas presentaron una capacidad variable, pero significativa, para la formación de biopelículas. Únicamente la cepa de SARM 61 fue clasificada como no productora de biopelícula con una viabilidad celular baja.

La tinción con cristal violeta permitió la cuantificación y clasificación de las cepas como formadoras de biopelículas, mientras que el ensayo con MTT permitió evaluar la viabilidad celular. Ambos ensayos se correlacionan entre sí, confirmando los resultados el uno del otro y respaldando su aplicabilidad complementaria. Estos protocolos pueden ser empleados para la evaluación de estrategias antimicrobianas frente a biopelículas de SARM.

Recomendaciones

Mantener las condiciones de incubación controladas durante la formación de las biopelículas, evitando movimientos violentos que puedan afectar la adherencia bacteriana y realizar réplicas en cada ensayo para fortalecer los resultados estadísticos.

Para el lavado posterior al periodo de incubación, aplicar movimientos circulares y suaves. Además, asegurarse que los pocillos no contengan medio o solución de lavado en el secado.

Previo a la cuantificación y tinción realizar una inspección visual, determinar la OD a 600 nm tras la incubación para evaluar el crecimiento bacteriano y determinar la viabilidad celular con resazurina a diferentes concentraciones.

Referencias

- Abadal, E. (2017). *Revistas científicas: situación actual y retos de futuro*. Universitat de Barcelona Edicions.
- Abebe, A. A., & Birhanu, A. G. (2023). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular mechanisms underlying drug resistance development and novel strategies to combat. *Infect Drug Resist*, 16, 7641–7662. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428103>
- Aboelnaga, N., Elsayed, S. W., Abdelsalam, N. A., Salem, S., Saif, N. A., Elsayed, M., Ayman, S., Nasr, M., & Elhadidy, M. (2024). Deciphering the dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: From molecular signaling to nanotherapeutic advances. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01511-2>
- Allel, K., García, P., Labarca, J., Munita, J. M., Rendic, M., Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana, & Undurraga, E. A. (2020). Socioeconomic factors associated with antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* in Chilean hospitals (2008–2017). *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44, e30. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.30>
- Almatroudi, A. (2025). Biofilm Resilience: Molecular Mechanisms Driving Antibiotic Resistance in Clinical Contexts. *Biology*, 14(2), 165. <https://doi.org/10.3390/biology14020165>
- Akter, S., Rahman, M. A., Ashrafudoulla, M., & Ha, S.-D. (2025). *Biofilm formation and analysis of EPS architecture comprising polysaccharides and lipids by Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli on food processing surfaces*. *Food Research International*, 209, 116274. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116274>
- Thermo Fisher Scientific. (2021). *CyQUANT™ MTT Cell Proliferation Assay Kit Protocol*. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/vybrant-mtt-cell-proliferation-assay-protocol.html>
- Benov, L. (2019). Effect of growth media on the MTT colorimetric assay in bacteria. *PLoS ONE*, 14(8), e0219713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219713>
- Bhattacharya, M., & Horswill, A. R. (2024). *The role of human extracellular matrix proteins in defining Staphylococcus aureus biofilm infections*. *FEMS Microbiology Reviews*, 48(1), fuae002. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuae002>

- Calderón Parra, J., Ramos Martínez, A., & de la Fuente-Moral, S. (2022). Infecciones por estafilococos. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(49), 2873–2882. <https://doi.org/10.1016/j.med.2022.02.013>
- Domnin, P. A., Grishin, S. Y., Surin, A. K., Ermolaeva, S. A., & Galzitskaya, O. V. (2025). *In vitro evaluation of amyloidogenic antimicrobial peptides for the treatment of early and mature bacterial biofilms*. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(18), 8767. <https://doi.org/10.3390/ijms26188767>
- Donkor, E. S., & Kotey, F. C. N. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: Implications for antibiotic prophylaxis and surveillance. *Infectious Diseases (Auckland)*, 13, 1178633720976581. <https://doi.org/10.1177/1178633720976581>
- Duran Sarango, M. B., Tacuri Agurto, A. R., & Espinoza Pesantez, D. I. (2024). *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en pacientes de la Clínica Santa Ana, Cuenca. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca*, 42(1), 17–24. <https://doi.org/10.18537/RFCM/41.01.05>
- Ehsan, H. (2025). Resistencia a los antibióticos en los países en desarrollo: amenazas emergentes y respuestas políticas. *Public Health Challenges*, 4(1), e70034. <https://doi.org/10.1002/puh2.70034>
- García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. D. R., & Giono, S. (2019). Methicillin resistance and biofilm production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* in México. *Biomedica*, 39(3), 513-523. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4131>
- Gascón, E., Merino, N., Pagán, E., Berdejo, D., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2021). Assessment of In Vitro Biofilms by Plate Count and Crystal Violet Staining: Is One Technique Enough? En M. Magnani (Ed.), *Detection and Enumeration of Bacteria, Yeast, Viruses, and Protozoan in Foods and Freshwater* (pp. 53-63). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1932-2_6
- George, T., Sivam, V., Vaiyapuri, M., et al. (2025). *Standardizing biofilm quantification: Harmonizing crystal violet absorbance measurements through extinction coefficient ratio adjustment*. *Archives of Microbiology*, 207, 59. <https://doi.org/10.1007/s00203-025-04251-0>
- Gonçalves, E., Carvalhal, R., Mesquita, R., Azevedo, J., Coelho, M. J., Magalhães, R., Ferraz, M. P., Manso, M. C., Gavinha, S., Pina, C., & Lopes Cardoso, I. (2020). Detection of

- Staphylococcus aureus* (MRSA/MSSA) in surfaces of dental medicine equipment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), 1003–1008. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.003>
- Gondil, V. S., & Subhadra, B. (2023). Biofilms and their role on diseases. *BMC Microbiology*, 23(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02954-2>
- Han, A., & Lee, S. Y. (2023). An overview of various methods for in vitro biofilm formation: A review. *Food Science and Biotechnology*, 32(12), 1617–1629. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01425-8>
- Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., de Lencastre, H., Bentley, S. D., Kearns, A. M., & Holden, M. T. G. (2017). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice*. *Genome Biology*, 18(1), Article 130. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1252-9>
- Haval, M., Unakal, C., Ghagane, S. C., Pandit, B. R., Daniel, E., Siewdass, P., Ekimeri, K., Rajamanickam, V., Justiz-Vaillant, A., Lootawan, K.-A. A., Oliveira, F. M. D., Bashetti, N., Naqvi, T. A., Shettar, A., & Bhasme, P. (2025). Biofilms Exposed: Innovative Imaging and Therapeutic Platforms for Persistent Infections. *Antibiotics*, 14(9), 865. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14090865>
- Hou, Z., Liu, L., Wei, J., & Xu, B. (2023). Progress in the prevalence, classification, and drug resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection and Drug Resistance*, 16, 3271–3292. <https://doi.org/10.2147/IDR.S412308>
- Ibáñez, A., Zafra, O., & González, J. (2017). *Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1390. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01390>
- Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). *Staphylococcus aureus biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis, and treatment strategies*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>
- Jaradat, Z. W., Ababneh, Q. O., Sha'aban, S. T., Alkofahi, A. A., Assaleh, D., & Al Shara, A. (2020). *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y fómites públicos: una revisión. *Global Health & Pathogens*, 114(8), 426–450. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1824112>

- 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, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100006>
- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., & Kim, J. S. (2019). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1853. <https://doi.org/10.3390/jcm8111853>
- Lavoie, T., Daffinee, K., Vicent, M., & LaPlante, K. (2025). Staphylococcus biofilm dynamics and antibiotic resistance: Insights into biofilm stages, zeta potential dynamics, and antibiotic susceptibility. *Microbiology Spectrum*, 13(5), e02915-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02915-24>
- Liu, Y., Zhang, J., & Ji, Y. (2020). Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Science Progress*, 103(1). <https://doi.org/10.1177/0036850419898659>
- Liu, H. Y., Prentice, E. L., & Webber, M. A. (2024). Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00046-3>
- Luo, A., Wang, F., Sun, D., Liu, X., & Xin, B. (2022). Formation, Development, and Cross-Species Interactions in Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.757327>
- Lynch, J. P., & Zhanel, G. G. (2022). Escalation of antimicrobial resistance among MRSA part 1: focus on global spread. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 21(2), 99–113. <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2154653>
- Molés Gascón, C., Garrido Merino, M. del M., Arias Pérez, J., Montero Bermejo, D., & Muñoz Lapeña, M. (2025). Revisión bibliográfica de la resistencia antimicrobiana: principales patógenos farmacorresistentes y abordaje terapéutico. *Revista Electrónica de PortalesMedicos.com*, 20(5), 177. <https://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/revision-bibliografica-de-la-resistencia-antimicrobiana-principales-patogenos-farmacorresistentes-y-abordaje-terapeutico/>
- Moreno-Delgado, A., Orduña Malea, E. y Repiso, R. (2020). Relevancia de la ubicación en la relación Universidad-Empresa: análisis de la procedencia de los egresados de

universidades españolas en empresas del IBEX35. *Revista General de Información y Documentación*, 30(1), 297-312. <https://doi.org/10.5209/rgid.70071>

Nirmala, B., Manhas, P. L., Jadli, M., Sharma, R., Manhas, H., & Omar, B. J. (2024). A novel dual-staining method for cost-effective visualization and differentiation of microbial biofilms. *Scientific Reports*, 14(1), 29169. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80644-3>

Organización Mundial de la Salud. (2022). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) report: 2022* (Informe GLASS). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>

Organización Mundial de la Salud. (2023). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Pai, L., Patil, S., Liu, S., & Wen, F. (2023). A growing battlefield in the war against biofilm-induced antimicrobial resistance: Insights from reviews on antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1327069>

Pasachova Garzón, J., Ramírez Martínez, S., & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. *Nova*, 17(32), 25–38. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en&tlng=es

Payne, D. E., & Boles, B. R. (2016). *Emerging interactions between matrix components during biofilm development*. *Current Genetics*, 62, 137–141. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0527-5>

Petiti, J., Revel, L., & Divieto, C. (2024). *Standard operating procedure to optimize resazurin-based viability assays*. *Biosensors*, 14(4), 156. <https://doi.org/10.3390/bios14040156>

Piechota, M., Kot, B., Frankowska-Maciejewska, A., Gruzewska, A., & Woźniak-Kosek, A. (2018). Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains from hospitalized patients in Poland. *BioMed Research International*, 2018, 4657396. <https://doi.org/10.1155/2018/4657396>

Rodríguez-Lázaro, D., Alonso-Calleja, C., Oniciuc, E. A., Capita, R., Gallego, D., González-Machado, C., Wagner, M., Barbu, V., Eiros-Bouza, J. M., Nicolau, A. I., & Hernández, M. (2018). Caracterización de biopelículas formadas por *Staphylococcus aureus*

- resistente a la meticilina transmitida por alimentos. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3004. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>
- Sizar, O., Leslie, S. W., & Unakal, C. G. (2023). *Gram-Positive Bacteria*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>
- Shineh, G., Mobaraki, M., Bappy, M. J. P., Mills, D. K., Shineh, G., Mobaraki, M., Bappy, M. J. P., & Mills, D. K. (2023). Biofilm Formation, and Related Impacts on Healthcare, Food Processing and Packaging, Industrial Manufacturing, Marine Industries, and Sanitation—A Review. *Applied Microbiology*, 3(3), 629-665. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3030044>
- Singh, A. K., Prakash, P., Achra, A., Singh, G. P., Das, A., & Singh, R. K. (2017). Standardization and classification of in vitro biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 9(3), 93–101. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_91_16
- Silva, V., Almeida, L., Gaio, V., Cerca, N., Manageiro, V., Caniça, M., Capelo, J. L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Biofilm Formation of Multidrug-Resistant MRSA Strains Isolated from Different Types of Human Infections. *Pathogens*, 10(8), 970. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080970>
- Stephens, S., Mhadevan, R. y Grant, D. (2025). Establishing a quantitative link between crystal violet absorbance and biomass in biofilms. *MethodsX*. doi: 10.1016/j.mex.2025.103630.
- Stindlova, M., Peroutka, V., Jencova, V., Havlickova, K., & Lencova, S. (2024). *Application of MTT assay for probing metabolic activity in bacterial biofilm-forming cells on nanofibrous materials*. *Journal of Microbiological Methods*, 224, 107010. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.107010>
- Stindlova, M., Peroutka, V., Zdenkova, K., & Lencova, S. (2025). *Assessing metabolic activity of yeast biofilm-forming cells on nanofibrous materials using MTT assay*. *Folia Microbiologica*. <https://doi.org/10.1007/s12223-025-01304-1>
- Tang, W., Liu, Y., Li, X., Leng, G., Gao, J., Wang, Y., Yao, J., Liu, Z., Zhou, Q., & Xu, Y. (2024). Microbiological characteristics of clinically isolated *Staphylococcus aureus* with different hemolytic phenotypes in China. *Infectious Drug Resistance*, 17, 3273-3287. <https://doi.org/10.2147/IDR.S466416>

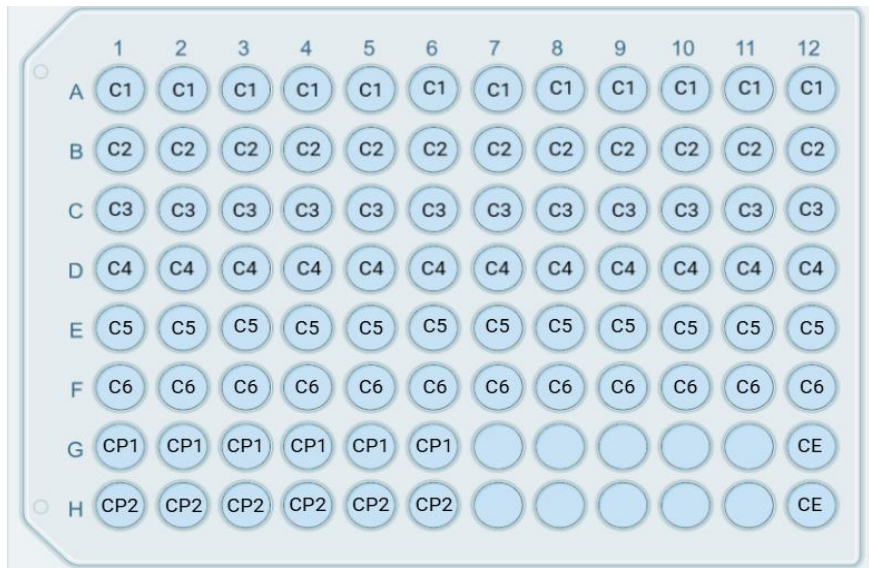
- Tambone, E., Marchetti, A., Ceresa, C., Piccoli, F., Anesi, A., Nollo, G., Caola, I., Bosetti, M., Fracchia, L., Ghensi, P., & Tessarolo, F. (2021). Biofilm mezclado *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* en biofilm mezclado en implantes de titanio utilizando biosurfactantes microbianos. *Polímeros*, 13(15), 2420. <https://doi.org/10.3390/polym13152420>
- Teles, A. M., Pina, C., Cardoso, I. L., Tramontana, A., Cardoso, M., Duarte, A. S., Bartolomeu, M., & Noites, R. (2024). Degree of contamination of gutta-percha points by *Staphylococcus aureus* (MRSA/MSSA) strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8566. <https://doi.org/10.3390/ijms25168566>
- Tenezaca Lliguin, N. M., Orellana Bravo, P. P., Andrade Tacuri, C. F., & Ortiz Tejedor, J. G. (2025). *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina aislados de teléfonos móviles de estudiantes de Enfermería en Cuenca, Ecuador. *Revista Argentina de Microbiología*, 57(1), 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.12.002>
- Thermo Fisher Scientific. (2021). *CyQUANT™ MTT Cell Proliferation Assay Kit Protocol*. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/vybrant-mtt-cell-proliferation-assay-protocol.html>
- Tian, L., Sun, J., Jiang, H., Wang, H., Zheng, J., Wang, D., & Zhang, L. (2025). *Isoliquiritigenin attenuates Staphylococcus aureus adhesion and invasion to counteract Staphylococcus aureus pathogenicity and infection*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, Article 1686699. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1686699>
- Tiberiu-Alexa, V., Obistioiu, D., Dumitrescu, R., Cretescu, I., Hulea, A., Bolchis, V., Balean, O., Jumanca, D., & Galuscan, A. (2025). *In vitro evaluation of biofilm formation by oral microorganisms on clear aligner materials: Influence of mouthwash exposure*. *Journal of Functional Biomaterials*, 16(11), 424. <https://doi.org/10.3390/jfb16110424>
- Tran, N. N., Morrisette, T., Jorgensen, S. C. J., Orench-Benvenutti, J. M., & Kebriaei, R. (2023). Current therapies and challenges for the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 43(8), 816-832. <https://doi.org/10.1002/phar.2806>
- Tuon, F. F., Suss, P. H., Telles, J. P., Dantas, L. R., Borges, N. H., & Ribeiro, V. S. T. (2023). *Antimicrobial treatment of Staphylococcus aureus biofilms*. *Antibiotics*, 12(1), 87. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010087>

- Vindel, A., & Cercenado, E. (2016). Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina portadores del gen mecC: un problema emergente? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(5), 277-279. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.01.01>
- Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>

Anexos

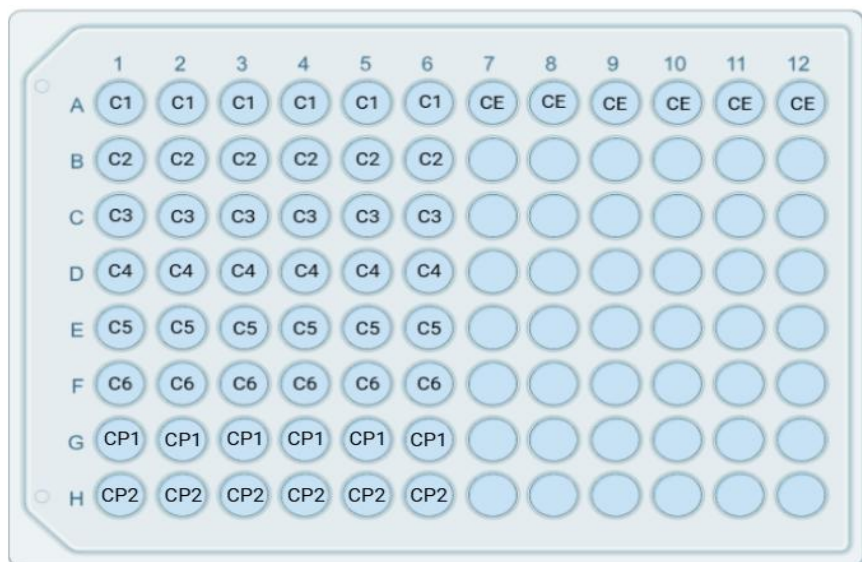
Anexo A. Distribución de muestras y controles en microplaca de 96 pocillos

Figura 8. Distribución de muestras en microplaca para la tinción con cristal violeta y MTT.



Distribución de siembra en microplacas para la tinción con cristal violeta y MTT. C1: cepa 23 SARM. C2: cepa 61 SARM. C3: cepa 122 SARM. C4: cepa 259 SARM. C5: cepa 1037 SARM. C6: cepa 1098 SARM. CP1: *S. aureus* BAA 44. CP2: SARM ATCC 25923. CE: TSB con glucosa al 10%

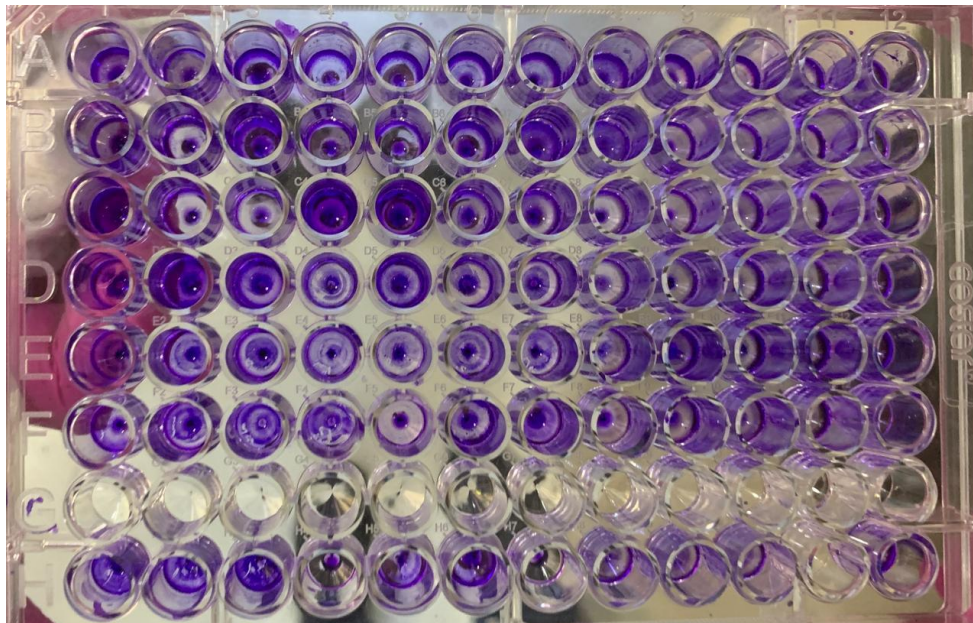
Figura 9. Distribución de muestras en microplaca para la tinción con resazurina.



Distribución de siembra en microplaca para la tinción con resazurina. C1: cepa 23 SARM. C2: cepa 61 SARM. C3: cepa 122 SARM. C4: cepa 259 SARM. C5: cepa 1037 SARM. C6: cepa 1098 SARM. CP1: *S. aureus* BAA 44. CP2: *S. aureus* ATCC 25923. CE: TSB con glucosa al 10%.

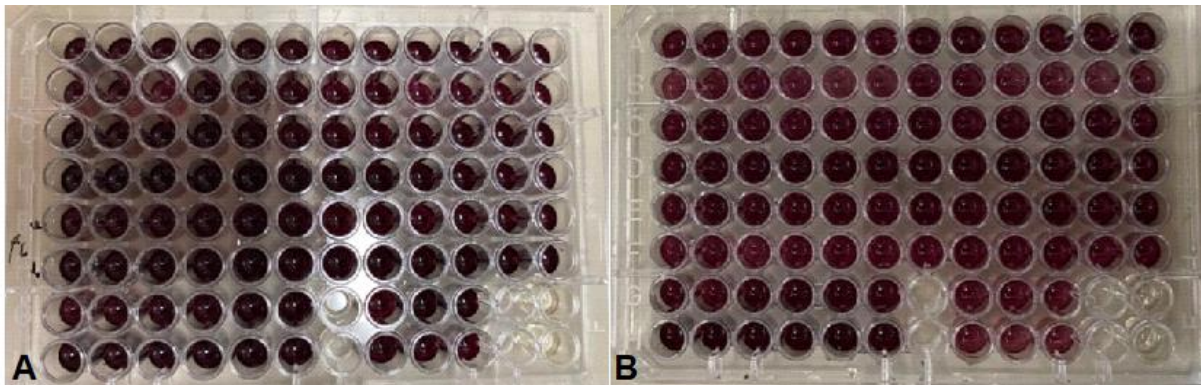
Anexo B. Tinción con cristal violeta 1%

Figura 10. Tinción con cristal violeta al 1%



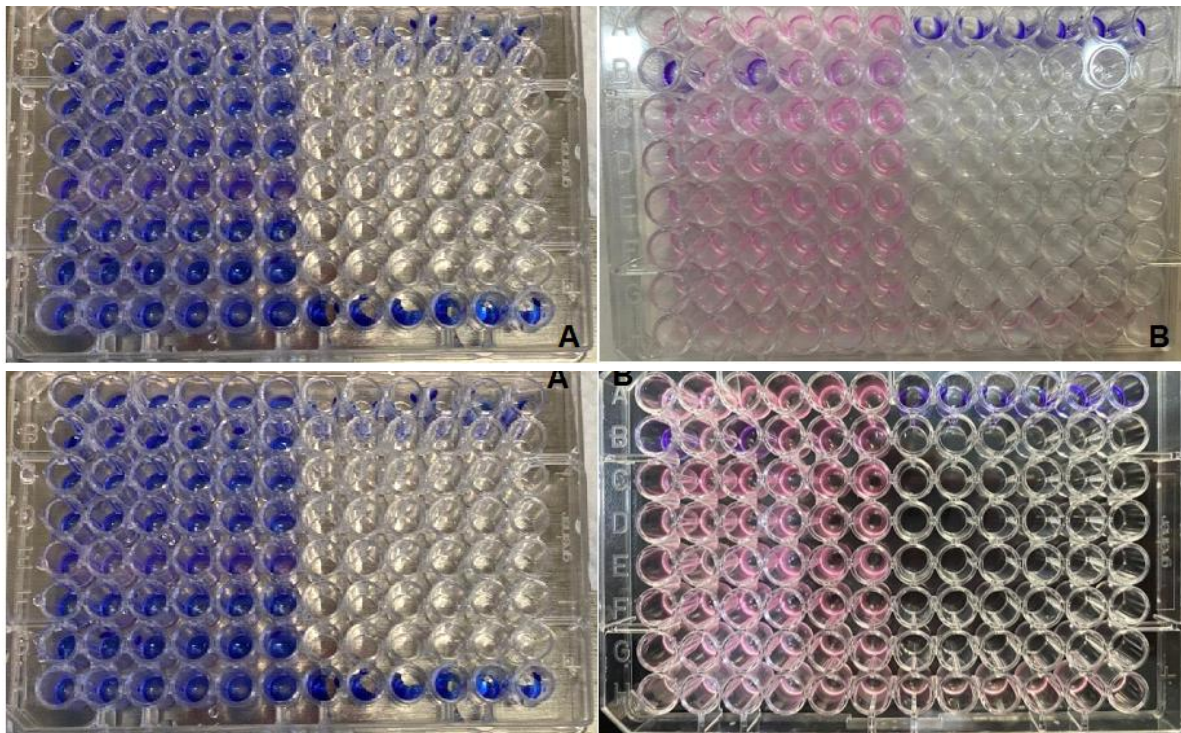
Microplaca con cristal violeta al 1%.

Anexo C. Tinción con MTT

Figura 11. Tinción con MTT

A. Microplaca con MTT para lectura a los 30 minutos. B. Microplaca con MTT para lectura a las 2 horas.

Anexo D. Tinción con resazurina (PrestoBlue)

Figura 12. Tinción con resazurina

A. Microplaca con tinción de resazurina antes de incubar B. Microplaca con tinción de resazurina después de incubar.

Anexo E. Lecturas de densidad óptica

Tabla 9. Resultados de la lectura a OD₅₇₀ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.

Cepas bacterianas	OD ₅₇₀						\bar{x}	s	ODT	ODC	Clasificación
	R1	R2	R3	R4	R5	R6					
SARM 23	0,184	0,184	0,199	0,183	0,188	0,191	0,19	0,01	0,098		No productor
SARM 61	0,178	0,148	0,143	0,139	0,197	0,149	0,16	0,02	0,069		No productor
SARM 122	0,232	0,242	0,244	0,231	0,244	0,232	0,24	0,01	0,147		Productor débil
SARM 259	0,691	0,652	0,673	0,688	0,685	0,675	0,68	0,01	0,587		Productor fuerte
SARM1037	0,785	0,852	0,718	0,747	0,843	0,724	0,78	0,06	0,688		Productor fuerte
SARM1098	0,303	0,291	0,294	0,291	0,302	0,321	0,30	0,01	0,210		Productor débil
SAU BAA	0,22	0,224	0,264	0,219			0,23	0,02	0,141		Productor débil
SAU ATCC	0,734	0,757	0,856	0,812			0,79	0,05	0,699		Productor fuerte
Esterilidad	0,084	0,097	0,084	0,097	0,084	0,097	0,09	0,01		0,112	

Tabla 10. Resultados de la lectura a OD₅₈₅ y clasificación de cepas SARM según su capacidad de formar biopelículas.

Cepas bacterianas	OD ₅₈₅						\bar{x}	s	ODT	ODC	Clasificación
	R1	R2	R3	R4	R5	R6					
SARM 23	0,265	0,251	0,273	0,287	0,272	0,273	0,270	0,012	0,146		Productor débil
SARM 61	0,225	0,185	0,171	0,158	0,254	0,229	0,204	0,038	0,079		No productor
SARM 122	0,309	0,293	0,296	0,302	0,303	0,282	0,298	0,009	0,173		Productor débil
SARM 259	1,038	0,886	1,034	0,888	0,92	1,006	0,962	0,072	0,838		Productor fuerte
SARM1037	1,025	1,127	0,917	0,954	1,118	1,304	1,074	0,141	0,950		Productor fuerte
SARM1098	0,353	0,359	0,388	0,366	0,354	0,41	0,372	0,023	0,247		Productor débil
SAU BAA	0,296	0,327	0,28	0,312			0,304	0,020	0,179		Productor débil
SAU ATCC	1,131	1,105	1,067	1,092			1,099	0,027	0,974		Productor fuerte
Esterilidad	0,127	0,122	0,127	0,122	0,127	0,122	0,125	0,003		0,133	

Tabla 11. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD₅₇₀ y porcentaje de viabilidad celular.

Cepas bacterianas	OD ₅₇₀ - 30 min						\bar{x}	s	ODT	%VIABILIDAD
	R1	R2	R3	R4	R5	R6				
SARM 23	1,166	1,129	1,224	1,08	1,154	1,21	1,16	0,05	1,092	51,71
SARM 61	0,744	0,654	0,59	0,62	0,615	0,741	0,66	0,07	0,592	28,03
SARM 122	0,952	1,024	0,973	1,031	1,016	0,951	0,99	0,04	0,922	43,68
SARM 259	1,348	1,321	1,286	1,288	1,227	1,315	1,30	0,04	1,229	58,20
SARM 1037	1,318	1,209	1,229	1,222	1,274	1,339	1,27	0,05	1,196	56,66
SARM 1098	0,957	0,946	0,911	0,924	0,952	0,904	0,93	0,02	0,863	40,90
SAU BAA	1,498	1,507	1,479	1,348			1,46	0,07	1,389	65,80
SAU ATCC	2,245	2,046	2,145	2,284			2,18	0,11	2,111	100,00
Esterilidad	0,074	0,064	0,074	0,064	0,074	0,064	0,07	0,01		

Tabla 12. Resultados de la lectura a los 30 minutos a OD₅₉₅ y porcentaje de viabilidad celular.

Cepas bacterianas	OD ₅₉₅ - 30 min						\bar{x}	s	ODT	%VIABILIDAD
	R1	R2	R3	R4	R5	R6				
SARM 23	1,044	1,014	1,089	0,971	1,036	1,093	1,041	0,046	0,978	52,094
SARM 61	0,665	0,578	0,521	0,562	0,549	0,653	0,588	0,058	0,525	27,947
SARM 122	0,847	0,921	0,873	0,923	0,91	0,856	0,888	0,034	0,825	43,950
SARM 259	1,202	1,187	1,139	1,145	1,101	1,183	1,160	0,038	1,096	58,399
SARM 1037	1,176	1,075	1,091	1,095	1,147	1,214	1,133	0,055	1,070	56,987
SARM 1098	0,84	0,826	0,802	0,806	0,833	0,787	0,816	0,021	0,752	40,078
SAU BAA	1,32	1,33	1,309	1,186			1,286	0,067	1,223	65,153
SAU ATCC	2,001	1,821	1,909	2,03			1,940	0,095	1,877	100,000
Esterilidad	0,068	0,059	0,068	0,059	0,068	0,059	0,064	0,005		

Tabla 13. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD₅₇₀ y porcentaje de viabilidad celular.

Cepas bacterianas	OD ₅₇₀ - 2 horas						\bar{x}	s	ODT	%VIABILIDAD
	R1	R2	R3	R4	R5	R6				
SARM 23	2,063	2,12	2,146	2,137	2,145	2,236	2,14	0,06	2,072	67,104
SARM 61	1,608	1,694	2,066	1,977	1,852	1,712	1,82	0,18	1,749	56,644
SARM 122	2,453	2,174	2,284	2,211	2,159	2,19	2,25	0,11	2,176	70,472
SARM 259	2,95	2,751	2,895	2,935	2,684	2,681	2,82	0,13	2,747	88,957
SARM 1037	2,924	2,967	2,868	2,833	2,927	2,992	2,92	0,06	2,850	92,277
SARM 1098	2,086	2,088	2,165	2,162	2,148	2,181	2,14	0,04	2,069	67,012
SAU BAA	2,131	2,496	2,437	2,753			2,45	0,26	2,385	77,243
SAU ATCC	3,243	3,212	3,146	3,027			3,16	0,1	3,088	100,000
Esterilidad	0,075	0,063	0,075	0,063	0,075	0,063	0,07	0,01		

Tabla 14. Resultados de la lectura a las 2 horas a OD₅₉₅ y porcentaje de viabilidad celular.

Cepas bacterianas	OD ₅₉₅ - 2 horas						\bar{x}	s	ODT	%VIABILIDAD
	R1	R2	R3	R4	R5	R6				
SARM 23	1,873	1,912	1,954	1,932	2,035	1,945	1,94	0,05	1,878	69,222
SARM 61	1,449	1,53	1,883	1,807	1,648	1,538	1,64	0,17	1,579	58,191
SARM 122	2,237	1,974	2,097	2,018	1,961	1,985	2,05	0,11	1,982	73,036
SARM 259	2,678	2,494	2,632	2,671	2,436	2,429	2,56	0,12	2,493	91,880
SARM 1037	2,625	2,653	2,553	2,538	2,693	2,643	2,62	0,06	2,554	94,122
SARM 1098	1,868	1,872	1,951	1,941	1,94	1,964	1,92	0,04	1,859	68,515
SAU BAA	1,915	2,244	2,192	2,475			2,21	0,23	2,143	78,975
SAU ATCC	2,889	2,831	2,65	2,738			2,78	0,11	2,714	100,000
Esterilidad	0,069	0,058	0,069	0,058	0,069	0,058	0,06	0,01		

Anexo F. Lecturas de fluorescencia

Tabla 15. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 23.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SARM 23	0	0	0	0	61178	28253	14910	9123	6345	4553	3396	2440	1261	1012	765
SARM 23	0	0	0	0	0	46649	24622	14488	9294	6780	5161	3746	2122	1708	1296
SARM 23	0	0	0	0	0	57463	34608	21845	14006	9687	7245	5589	3202	2611	2175
SARM 23	0	0	0	0	94886	61982	39561	25282	16866	11365	8397	6449	3752	3103	2479
SARM 23	0	0	0	0	0	82830	51989	32671	21328	14449	10312	7731	4514	3806	3071
SARM 23	0	0	0	0	0	0	0	0	76769	52657	33235	21320	8745	6774	5406

Tabla 16. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 61.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SARM 61	89939	0	0	0	0	0	95487	69050	43283	22148	9408	3673	853	625	506
SARM 61	0	0	0	0	63689	40225	26136	18107	13458	10407	8645	7101	4015	4204	3680
SARM 61	94432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	68897	32376	10090	8588	7190
SARM 61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91370	64033	16061	12606	10011
SARM 61	98721	0	0	0	0	0	0	0	0	0	79374	58033	14715	11452	8759
SARM 61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48549	38696	29042

Tabla 17. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 122

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SARM 122	○	○	○	○	74586	42527	26621	17030	11893	8533	6524	5284	3158	2727	2266
SARM 122	○	○	○	○	○	73227	51040	37014	26511	19284	14071	10715	5723	5154	4458
SARM 122	○	○	○	○	○	80467	57884	43445	32301	24503	18479	14242	7733	6924	5871
SARM 122	○	○	○	○	○	○	89611	65229	50216	38789	29932	23335	11158	9484	8131
SARM 122	○	○	○	○	○	○	83984	64396	50198	39485	31251	24395	12297	10542	8813
SARM 122	○	○	○	○	○	○	88454	66836	50709	38996	29121	21621	10606	8892	7427

Tabla 18. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 259.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SARM 259	○	○	○	○	60506	37100	22514	13386	8638	5999	4512	3528	2335	2059	1761
SARM 259	○	○	○	○	94524	63869	42587	28778	19269	12985	9024	6976	4333	3930	3407
SARM 259	○	○	○	○	○	78394	55153	38331	27481	19691	14075	10238	5781	5042	4421
SARM 259	○	○	○	○	○	90734	63805	44481	32132	23237	16989	12412	6507	5719	4740
SARM 259	○	○	○	○	○	○	91877	63620	44181	31668	22937	16906	8151	6711	5625
SARM 259	○	○	○	○	○	○	○	65793	43555	29071	20010	14026	6571	5434	4484

Tabla 19. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 1037.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SARM 1037	○	78619	64333	58160	50680	45071	40875	37353	34688	30501	27294	24473	19318	17838	16763
SARM 1037	46608	19408	18268	18609	17951	17275	16628	15934	14896	14108	13578	12732	11881	11191	10435
SARM 1037	○	○	95091	78832	63393	50422	37225	28164	21742	17884	14987	13096	8435	8091	7452
SARM 1037	○	88932	72919	60090	48058	38879	30992	24428	20433	17065	15009	12905	8050	7829	7376
SARM 1037	○	○	95322	77969	63654	51465	42122	32705	24114	19147	15804	13738	8752	8267	7914
SARM 1037	○	○	83045	65350	48822	36124	27180	20325	15770	12825	10773	9219	5972	5773	5051

Tabla 20. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SARM 1098.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SARM 1098	68433	○	○	56883	30616	19153	12988	9623	7650	6078	4976	4042	2369	2060	1697
SARM 1098	○	○	○	79123	48265	32946	23549	17382	13302	10551	8550	7027	4427	4144	3622
SARM 1098	○	○	○	○	○	76169	51841	37073	27235	20296	15852	12188	7273	6473	5625
SARM 1098	○	○	○	○	73924	49324	35772	26720	20501	16107	12603	10269	6314	5828	5086
SARM 1098	○	○	○	○	○	71357	51412	38416	28957	21922	16888	12946	7473	6695	5876
SARM 1098	○	○	○	○	53545	33412	22290	15293	11357	8767	6912	5844	3637	3352	2889

Tabla 21. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SAU BAA.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SAU BAA	0	0	0	0	0	0	23448	15177	10650	7994	5770	4405	2657	2351	2090
SAU BAA	0	0	0	0	0	0	69531	45718	34365	28481	20949	15371	8257	7734	7003
SAU BAA	0	0	0	0	0	0	66656	38031	22853	14545	10337	7711	3757	3309	2740
SAU BAA	0	0	0	0	90421	52709	32910	22063	14231	10414	7843	6089	3789	3534	3088
SAU BAA	0	0	0	0	0	92654	54592	34159	22953	16133	12160	8908	5204	4854	4285
SAU BAA	0	0	0	0	0	0	60713	36069	22157	13962	9690	6636	3685	3539	3034

Tabla 22. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para SAU ATCC.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
SAU ATCC	0	0	55213	37902	29765	18994	13707	10890	8794	7322	6347	5634	4581	4412	4191
SAU ATCC	0	0	72459	46660	32680	20443	12894	9226	7301	5927	5077	4369	3272	2916	2655
SAU ATCC	0	0	62289	39046	25715	16097	10653	7877	6408	5172	4343	3740	2883	2572	2347
SAU ATCC	0	0	92025	52802	34725	24332	14750	8776	6221	4771	3782	2910	1992	1761	1518
SAU ATCC	0	0	89249	60816	40087	24451	15850	11337	8902	7343	6184	5365	4198	3788	3566
SAU ATCC	0	0	0	86161	56106	35557	21735	10837	6888	4933	3885	3013	2033	1632	1425

Tabla 23. Resultados completos de una hora y media de lectura de fluorescencia a 560/590 nm (excitación/emisión) para Esterilidad.

Cepa	Fluorescencia														
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min	130 min	140 min	150 min
Esterilidad	36326	37143	37838	37387	37672	36610	33403	28641	23485	17802	12189	8041	3378	2658	2175
Esterilidad	15614	15295	14683	12715	9842	8174	6989	6314	2432	1385	834	672	404	367	325
Esterilidad	29055	27651	26410	24292	21424	17464	13499	9552	6502	3767	2091	1543	845	745	614
Esterilidad	32617	33644	34078	28891	26192	25869	16061	7062	3364	2122	1501	1124	752	659	608
Esterilidad	84071	89201	93688	97368	98809	98996	95136	82802	62296	37948	1841	1299	776	588	480
Esterilidad	83013	87032	89211	89399	88805	84107	72753	48315	28362	1304	761	549	285	229	143