



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LÍQUIDOS IÓNICOS
DERIVADOS DE ÁCIDO BENZOICO CON DIFERENTES LONGITUDES DE CADENA
FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

ALUMNO: JENIFER MUÑOZ MEZA

PROFESOR GUIA: TM. Mg Cs. CAROLINA ESPINOZA R.

PROFESOR CO-TUTOR: TM. DR. LUIS GUZMAN J.

TALCA-CHILE
2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 5 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 2.1 Hipótesis..... | 8 |
| 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 9 |
| 3.1 Generalidades de la caries dental | 9 |
| 3.2 <i>Streptococcus mutans</i> y la formación de biofilm | 10 |
| 3.3 Factores de virulencia..... | 13 |
| 3.4 Otro cuadro clínico..... | 15 |
| 3.5 Ácido benzoico..... | 15 |
| 3.6 Líquidos iónicos y sus propiedades..... | 16 |
| 3.7 Estructura de los cationes | 17 |
| 3.8 Estructura de los aniones..... | 18 |
| 3.9 Aplicaciones de líquidos iónicos..... | 19 |
| 4. OBJETIVOS | 22 |
| 4.1 Objetivo general | 22 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 22 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| 5.1 Obtención de las sales derivadas del ácido benzoico | 23 |
| 5.2 Aislamiento de microorganismo | 27 |
| 5.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria | 27 |
| 6. RESULTADOS | 29 |
| 6.1 Aislamiento de microorganismo | 29 |
| 6.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria | 30 |
| 7. DISCUSIÓN | 32 |
| 8. CONCLUSIÓN | 35 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA..... | 37 |

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Resumen de los factores de virulencia de <i>Streptococcus mutans</i> implicados en la formación del biofilm | 14 |
| Figura 2: Estructura del Ácido Benzoico | 16 |
| Figura 3: Derivados del catión Imidazolio y aniones más utilizados en la síntesis de LI. | 18 |
| Figura 4. Estructura química de cationes más utilizados en investigaciones con sus posibles aniones coordinantes presentes en los LI | 19 |
| Figura 5: Síntesis de N-benzoilimidazoles. | 23 |
| Figura 6: En la imagen se observa una placa de agar mitis salivarius con una cepa de <i>Streptococcus mutans</i> | 29 |
| Figura 7: Pruebas de identificación de <i>Streptococcus mutans</i> (Medio TSI y bilis esculina.) | 30 |
| Figura 8: Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria | 31 |
| Tabla 1: LIs utilizados con mayor frecuencia en Investigación | 21 |
| Tabla 2: Caracterización química y nomenclatura de los Líquidos Iónicos derivados que se utilizaran en este estudio..... | 25 |
| Tabla 3: Determinación de concentración mínima inhibitoria de los líquidos iónicos frente a una cepa de <i>S. mutans</i> , mediante microdilución en caldo..... | 31 |

1. RESUMEN

En la actualidad la caries dental, representan un problema de salud pública, debido a su gran prevalencia en la población. Una de las causas es la formación de placa bacteriana. Dentro de las bacterias que se encuentran en esta es el *Streptococcus mutans*, el cual presenta como característica, la formación de biofilm. En el último tiempo, se han realizado diversas investigaciones, que buscan esclarecer las propiedades que tienen los Líquidos Iónicos (LIs), tales como su toxicidad, reciclabilidad, baja presión de vapor, alta estabilidad química y térmica, entre otras, potenciando y masificando con ello la aplicación de estos en diversas investigaciones experimentales y usos industriales. En el presente trabajo se buscará identificar una propiedad específica de los LIs derivados del ácido benzoico; la actividad antibacteriana, que presentan estos líquidos en una muestra de *Streptococcus mutans* auto-extraída, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Los benzoimidazoles fueron obtenidos como aceites de color amarillo y fueron empleados sin previa purificación en la formación final de los LIs. La reacción de cuaternización se llevó a cabo por reacción de los diferentes *N*-benzoimidazoles con los diferentes bromuros de alquilo (hexil, octil y decil) en una proporción 1:1,2 eq. Luego, los LIs fueron purificados por decantación en tolueno con el fin de eliminar excesos de reactantes y solvente. Finalmente, los LIs fueron lavados con hexano y dietiléter y aislados por decantación. Esta investigación tiene como objeto determinar empíricamente la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un grupo de LIs, mediante microtitulación. Como ya mencioné anteriormente la actividad antibacteriana se evaluó en una cepa de *Streptococcus mutans* auto-extraída.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la caries dental, es considerada una de las enfermedades crónicas más frecuentes, además es considerada como un problema de salud pública, es por ello que dentro del ministerio de salud existen programas para garantizar la salud bucal de la población.

Se ha comprobado que algunas bacterias, tienen la capacidad de adaptarse al medio ambiente, mediante diferentes estructuras que les permiten adherirse a las diferentes superficies, colonizando estos sitios, ya sean de tipo celular o no. Es decir, presentan mecanismo para adaptarse al medio que los rodea, esta es una de las razones por las que las bacterias incrementan sus mecanismos de resistencia bacteriana, lo que aumenta por el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos. Este es un problema de salud, que afecta principalmente a huéspedes que son susceptibles a la invasión de ciertas bacterias a lo largo de sus vidas, ya sea por presentar inmunosupresión (pacientes con VIH), enfermedades genéticas, o el uso de prótesis. Además, factores como la edad, sexo y etnia pueden incidir en el desarrollo de infecciones bacterianas.

Uno de los factores que permiten el desarrollo de caries, es la formación de la placa bacteriana. Esto tiene importancia en la salud bucal, donde *Streptococcus mutans* preferiblemente coloniza las superficies de dientes y aparatos prostéticos. Para poder colonizar e invadir, las bacterias presentan factores de virulencia como la formación de biofilm, el cual consiste en una matriz formada por exopolisacáridos que permite el desarrollo de múltiples poblaciones bacterianas de forma organizada, promoviendo un rol protector frente al uso de antibióticos en el ser humano, y desarrollan a su vez una persistencia bacteriana, que impide la erradicación del microorganismo e incluso ocasionando cuadros graves para el huésped, que incluso pueden terminar en una falla multisistémica (placa dental).

El *Streptococcus mutans*, esta descrito como una cocácea gram positivo y conocido como patógeno principal en la formación de caries dental, por la producción de ácidos, al fermentar carbohidratos como la sacarosa. La creciente resistencia bacteriana, ha llevado a la búsqueda de nuevas terapias alternativas para erradicar infecciones bacterianas de distinta índole.

En el presente trabajo se utilizarán como alternativa a los antimicrobianos, el uso de Líquidos Iónicos (LIs) que son sustancias químicas que se mantienen en estado líquido a temperatura ambiente, su estructura está compuesta por iones con cargas positivas y negativas, siendo sales con bajo punto de fusión. Esto debido a su gran estabilidad térmica y química se puede emplear en procesos a altas temperaturas hasta de 300 °C, temperaturas superiores a esta, inducen su descomposición. Debido a su naturaleza iónica y a su composición los LIs son capaces de disolver compuestos polares, no polares, orgánicos, inorgánicos y materiales poliméricos. Se ha informado la actividad antibacteriana de los LIs, describiéndose su amplio espectro de inhibición, sobre bacterias Gram positivo, Gram negativo, micobacterias y hongos, pero esta actividad es dependiente de su estructura molecular y principalmente por el largo de la cadena de alquilo que presenta, otorgándole una mayor característica lipofílica, que se asocia a su actividad antibacteriana, representadas por cadenas entre 10 y 16 carbonos. Esta actividad se evalúa mediante técnicas de dilución en caldo, determinando sus respectivas CMI.

Diversos compuestos se han analizados en los últimos años, estudiando por sus propiedades antioxidantes y quelantes, características benéficas para la salud, a su vez se han descrito propiedades antibacterianas atribuidas a su grupo éster, se ha visto que estas propiedades se potencian al añadir grupos halógenos a la cadena lateral de estos.

Este es el motivo principal por el que se busca estudiar los LIs derivados del ácido benzoico con distintas longitudes de cadena, y así poder utilizarlas como posibles terapias alternativas por sus características antibacterianas.

2.1 Hipótesis

Las sales derivadas del ácido benzoico con diferentes longitudes de cadena, tienen actividad antibacteriana frente a una cepa de *Streptococcus mutans*.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Generalidades de la caries dental

La caries dental, es una de las enfermedades crónicas más comunes a nivel mundial, y principal causa de pérdidas dentales y dolor a nivel dental(1). Es una enfermedad que presenta una mayor prevalencia en los niños, esto producto de un mayor consumo de alimentos azucarados y de malos hábitos de higiene dental, generándose la placa dental o biofilm, formado por bacterias orales en la superficie de los dientes, que juegan un papel importante en el proceso de caries (2). Las caries no solo afectan la salud oral, sino que también se relacionan con algunas enfermedades sistémicas, como la diabetes, lo que indica que la prevención y el tratamiento de la caries dental son emergentes (3).

En la cavidad oral existen diversas bacterias que presentan variadas características que les brindan capacidad de adaptación al medio ambiente. Existen determinados elementos que fomentan esta situación, pero al uso excesivo de agentes antimicrobianos es considerado la principal causa. Se han diseñado diversos programas para la administración de antimicrobianos con el fin de una correcta utilización y evitar la aparición de microorganismos resistentes (4). Una de las características que pueden presentar las bacterias es la capacidad de formar biopelículas, las que presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del huésped; se consideran estructuras demasiado grandes para ser fagocitadas, pues ofrecen resistencia a la opsonización y lisis por complemento. El biofilm provoca respuestas inmunes celular y humoral, demostradas por la identificación de citosinas liberadas por leucocitos expuestos a estos patógenos (5). Las biopelículas son muy resistentes a los antibióticos, como resultado de la penetración lenta e incompleta del medicamento, debido a la resistencia que ofrece la barrera de exopolisacáridos. Existe, además, una baja actividad metabólica de las bacterias por limitación de oxígeno y nutrientes que pueden conducir a un estado de lentificación o cese de sus mitosis, así como a la formación de nichos anaeróbicos en zonas profundas de la biopelícula. La acumulación

de productos ácidos puede conducir a diferencias significativas de pH que interfiere con la acción del antibiótico. La aparición de genes específicos y un fenotipo altamente protegido, con una diferenciación similar a esporas garantiza, además, la resistencia de la biopelícula (5).

La población mundial es afectada por las bacterias de manera asintomática y no solo a pacientes hospitalizados, inmunodeprimidos, o con alguna característica hereditaria que limita su salud. Entre los patógenos responsables de la salud dental, tenemos a *Streptococcus mutans*, quien desempeña un rol fundamental en la iniciación de la caries en superficies lisas y fisuras de las coronas dentarias, resultando como protagonista etiológico potente en la inducción de la caries tanto en la superficie como raíz del diente (6).

3.2 *Streptococcus mutans* y la formación de biofilm

El *Streptococcus mutans* es una cocócea Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativa, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7,0 a pH 4,2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoníaco. Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas (7). *Streptococcus mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *S. mutans* es la cavidad oral humana, en la cual las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones de caries (8).

En la cavidad oral, se encuentra una gran cantidad de bacterias de diversas especies, como, por ejemplo, el *Streptococcus mutans* que se encuentra en menor concentración que otras. Se cree que cuando existe un desequilibrio entre *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans* es decir que aumente el *S. mutans* y el *S. sanguinis* disminuya, se aumenta la generación de biofilms, formando la placa dental, la cual es uno de los factores de riesgo para desarrollo de caries dental (9).

Mientras se desarrolla el biofilm, se elaboran señales químicas o “quorum sensing”, para coordinar funciones y así adaptarse a fluctuaciones del medio ambiente dentro de la cavidad oral, tales como cambios en el pH, disminución de oxígeno y variaciones cíclicas en la disponibilidad de nutrientes. La formación del biofilm y adhesión de este a las superficies consta de las siguientes etapas:

Paso 1: Adsorción de moléculas del huésped y bacterias a la superficie, en la mayoría de los casos, las superficies expuestas absorben moléculas que forman una película condicionante a la cual se adhieren las bacterias. Adicionalmente, los productos del metabolismo bacteriano y las enzimas bacterianas específicas presentes en la saliva, también son incorporados a la película, y de esta forma promueven la adherencia de especies bacterianas específicas. Esta película condicionante (película adquirida) se forma inmediatamente después de que el material entra en contacto con el ambiente. Su formación genera una alteración de la energía superficial y de la carga de las superficies, las películas proveen receptores específicos para la adherencia bacteriana. La formación de la película adquirida permite la adhesión bacteriana, pues provee sitios de anclaje para los microorganismos, permitiendo que éstos se adhieran y colonicen superficies. El rol de la película condicionante es vital, pues muchos microorganismos no tienen mecanismos de adhesión que les permitan colonizar ciertas superficies. Como se dijo anteriormente, la película adquirida no sólo facilita la adherencia bacteriana, sino que también funciona como fuente de nutrientes a las bacterias que se adhieren a ella.

Paso 2: Adhesión bacteriana primaria que consiste en el encuentro entre una superficie y una bacteria planctónica. Esta fase es reversible y está basada en una serie de variables fisicoquímicas que definen la interacción entre la pared bacteriana y la superficie en cuestión. En principio, la bacteria tiene que acercarse a la superficie, bien a través de una corriente de flujo, o de forma más directa, por quimiotaxis o por movilidad de la propia bacteria. Una vez que está extremadamente

cerca de la superficie (a menos de 1 nm), lo que determina que se produzca la unión, es la suma de fuerzas atractivas o repulsivas en ambas superficies. Entre ellas se encuentran las interacciones electrostáticas que tienden a favorecer la repulsión ya que la mayoría de las bacterias y las superficies inertes están cargadas negativamente.

Paso 3: Adhesión bacteriana secundaria, que es la unión entre ambas superficies, se consolida por la producción de exopolisacáridos por parte de las bacterias, que se acoplan con los materiales de la superficie, por ligandos específicos de receptores localizados en los pilis, fimbrias y fibrillas de las bacterias, o la unión de ambos procesos a la vez. Esta unión es irreversible y las bacterias quedan firmemente unidas a la superficie inerte. Durante esta fase, las bacterias planctónicas se pueden unir también unas a otras (Co-agregación), y a diferentes especies que estén ya unidas al material (Co-adhesión), formando las llamadas microcolonias de sustrato.

Paso 4: Maduración del biofilm, donde una vez que las bacterias se han unido a la superficie de forma irreversible, comienza el proceso de maduración de biofilm. La densidad y la complejidad del biofilm aumentan cuando las bacterias que lo forman comienzan a dividirse activamente (o morir) y los compuestos extracelulares originados por unión de ellas, interaccionan con las moléculas orgánicas e inorgánicas del medio y crean el glicocálix. El crecimiento de cualquier biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes, la difusión de nutrientes hasta las células y la eliminación de los productos de desechos. Además, existe un flujo hidrodinámico que atraviesa el biofilm que favorece el crecimiento y la difusión más que la erosión de las capas más externas. Otros factores que controlan la maduración del biofilm son el pH, la difusión del oxígeno, la fuente de carbono y la osmolaridad.

Paso 5: Desprendimiento activo donde equilibrio dinámico de un biofilm se alcanza cuando las capas más externas de éste comienzan a generar células planctónicas metabólicamente activas y capaces de dividirse, las cuales pueden colonizar nuevas superficies. Esta liberación de bacterias se puede dar por dos mecanismos, por erosión (pérdida de células individuales) y por migración (pérdida de agregados mayores) (10). Es decir, un biofilm es un grupo de bacterias que interactúan entre sí y con su medio ambiente en pro de la sobrevivencia de la población.

3.3 Factores de virulencia

Las bacterias presentan diversos factores de virulencia, que les permiten desarrollar características, que les dan resistencia a los tratamientos o les permiten invadir o adherirse para realizar una óptima colonización en su hospedero.

Las cepas de *S. mutans* son fenotípicamente homogéneas. Sin embargo, recientes investigaciones han revelado un gran nivel de la heterogeneidad serológica, genética y bioquímica de *S. mutans*. La heterogeneidad también se observa a nivel de enzimas producidas por las diferentes especies de *S. mutans* tales como las deshidrogenasas, glucosiltransferasas, aldolasas e invertasas. La serotipificación es un procedimiento rutinario y de mucho valor para determinar otros tipos de *Streptococcus spp.* (9).

Para la formación del biofilm en el *S. mutans* existen 2 mecanismos: Uno sacarosa dependiente y otro sacarosa independiente (11). Los sacarosa independiente son proporcionadas gracias a sus factores de virulencia que se presentan en la Figura 1; en ausencia de sacarosa, el microorganismo puede adherirse, ya sea a la aglutinina salivar, a otras bacterias, a la matriz extracelular, o a los receptores de la superficie celular epitelial usando interacciones iónicas similares a las lectinas. Además en su superficie presente varias adhesinas principales, entre estos el antígeno proteico estreptocócico P (SpaP, conocido como antígeno I/II)(12), el que puede unirse a una glucoproteína de aglutinina salivar(SAG) o también denominado componente salivar específico, el antígeno proteico estreptocócico P SpaP, está anclado a la superficie celular a través de un motivo de anclaje LPXTG(el cual permite la unión a la sortasa), para que este proceso de anclaje ocurra se requiere de una enzima sortasa, es por ello que las células mutantes que no presentan esta enzima no pueden anclar la proteína a la superficie de la célula y por lo mismo se reduce la adhesión a la hidroxiapatita(13).

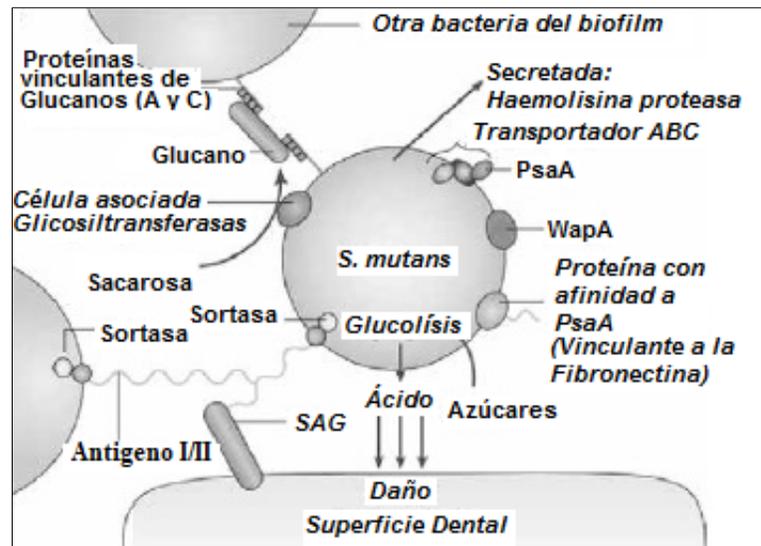


Figura 1: Resumen de los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* implicados en la formación del biofilm (Adaptación desde “The Pathogenesis of Streptococcal infections: from tooth decay to meningitis.”, revista Nature, 2003) (11).

El mecanismo sacarosa dependiente se basa en la presencia de glicosiltransferasas. Se ha comprobado que las glicosiltransferasas (Gtfs) presentes en *S. mutans* son de gran importancia para en el desarrollo de la placa dental virulenta. Las Gtfs se adsorben para producir glucano sobre el esmalte, proporcionando los sitios para la colonización por microorganismos y una matriz insoluble para la formación de la placa(14).

Las Gtfs también se adsorben a las superficies de otros microorganismos orales convirtiéndolos en productores de glucano. *S. mutans* expresa 3 Gtfs genéticamente distintas; cada una con un papel diferente pero que en su conjunto llevan a la formación de la placa virulenta. La GtfC se adsorbe dentro de la película mientras que la GtfB se liga fuertemente a las bacterias promoviendo una apretada fusión celular incrementando la cohesión de la placa. La GtfD forma un polisacárido soluble, fácilmente metabolizable y sirve de iniciador de la GtfB (9). El comportamiento de Gtfs solubles no refleja lo observado con enzimas adsorbidas en la superficie. Además, la estructura de la matriz de polisacárido cambia con el tiempo a consecuencia de la acción de mutanasas y dextranasas, enzimas presentes en la placa. Las Gtfs en diferentes lugares ofrecen blancos quimioterapéuticos para prevenir la caries dental. Sin embargo, los agentes que inhiben las Gtfs

en solución, con frecuencia tienen efecto reducido o ninguno sobre las enzimas adsorbidas. Se han identificado otros productos bacterianos solubles usando técnicas inmunológicas, entre otros, fructosiltransferasa, glucosiltransferasa (Gtf) y ácido lipoteicoico en la película formada in vitro e in vivo a partir de saliva entera. Se ha observado que las enzimas cuando se insolubilizan permanecen muy activas en una amplia gama de valores de pH. Está claro que la presencia activa de Gtf, dentro de la película dental, facilita la formación de glucanos, proporcionando sitios de unión para los microorganismos orales (14).

3.4 Otro cuadro clínico

El *Streptococcus mutans*, se encuentra colonizando la cavidad oral, sin embargo existen registros de casos de endocarditis bacteriana, la cual se puede producir por el traspaso de la bacteria al torrente sanguíneo, en el caso de *S. mutans* esto puede haber ocurrido durante un procedimiento odontológico, que haya salido mal o en el que se hayan incumplido normas de asepsia (15). La endocarditis infecciosa, es una enfermedad mortal, que con las nuevas terapias ha mejorado su pronóstico. En cambio, cuando el diagnóstico de la enfermedad es tardío o el tratamiento no es el oportuno, la mortalidad es más elevada. Existen factores predisponentes dados por la interacción de alteraciones estructurales cardíacas y extracardíacas que favorecen la colonización. Además, existen procedimientos diagnósticos y terapéuticos que promueven el desarrollo de la bacteriemia, tal como los dentales con riesgo de traumatismo gingival y mucosa, a través de los cuales el *Streptococcus mutans* puede ingresar a circulación (16).

3.5 Ácido benzoico

El ácido benzoico (C_6H_5COOH) es un ácido carboxílico aromático que tiene un grupo carboxilo unido a un anillo fenólico, tal como se observa en la Figura 2. Fue descubierto en el siglo XVI en la goma de benjuí una resina extraída de la corteza de varias especies de árboles del género *Styrax*.

Se produce naturalmente como lo hacen sus ésteres en muchas especies animales y vegetales, reportándose en estos últimos en frutas y bayas (17).

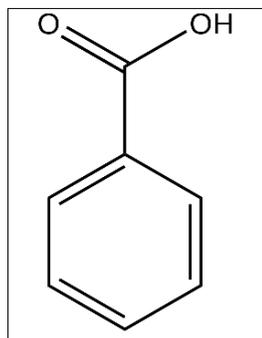


Figura 2: Estructura del Ácido Benzoico (Extraído desde <https://www.acidobenzoico.com/formula/>(18))

3.6 Líquidos iónicos y sus propiedades

En los últimos años se ha incrementado significativamente el número de publicaciones relacionadas con los Líquidos Iónicos (LIs) (19). Los principales tópicos abarcan desde mediciones experimentales de sus propiedades fisicoquímicas y de transporte, estudios teóricos que tratan de explicar su comportamiento, hasta nuevas aplicaciones en donde se ha demostrado su versatilidad.

Los LIs son sales con bajo punto de fusión, menor a 100°C. Están compuestos por una parte aniónica y otra catiónica y debido a su gran estabilidad térmica y química se pueden emplear en procesos a altas temperaturas hasta de 300 °C, temperaturas superiores a esta, inducen su descomposición. Los LIs son disolventes que tienen mejores propiedades fisicoquímicas en comparación con los disolventes orgánicos convencionales como alcoholes, éteres y cetonas. Debido a su naturaleza iónica y a su composición los líquidos iónicos son capaces de disolver compuestos polares, no polares, orgánicos, inorgánicos y materiales poliméricos (20).

Algunas de las ventajas de los LIs es que se mantienen a temperaturas por encima de la temperatura ambiente, no reaccionan o se alteran en presencia de los reactivos, productos o catalizadores de una reacción. Muchos de los líquidos iónicos están formados por un catión orgánico y un anión que puede ser orgánico o inorgánico. Algunas propiedades tales como la estabilidad térmica y la miscibilidad dependen principalmente del anión, mientras que otras propiedades como la viscosidad, tensión superficial y densidad dependen de la longitud del grupo alquilo del catión y/o su forma y simetría. Una gran parte de los cationes tienen naturaleza aromática con átomos de nitrógeno en el anillo o heterociclos nitrogenados; mientras que los aniones suelen estar constituidos por diferentes elementos químicos como Cl, P, F, Br entre otros. En los LIs los iones son muy asimétricos, siendo generalmente el catión más voluminoso, esto origina que las fuerzas atractivas catión-anión sean débiles y no se logre un empaquetamiento ordenado como el que ocurre en las sales iónicas convencionales. Se les considera disolventes verdes de diseño debido a que sus propiedades se pueden ajustar o modificar variando el catión y/o el anión, además de que no generan emisiones contaminantes a la atmósfera (19).

3.7 Estructura de los cationes

Los Líquidos Iónicos presentan cationes en su estructura, el catión es una estructura orgánica con baja simetría; la mayoría de los cationes utilizados para el desarrollo de LIs constan de amonio, sulfonio, fosfonio, imidazolio, piridinio, picolinio, pirrolidinio, tiazolio, oxazolio y pirazolio. Las estructuras catiónicas más investigadas con los líquidos iónicos son con compuestos catiónicos asimétricos *N, N*-dialquilimidazolio, el cual puede asociarse una diversidad de aniones, entre las más investigadas, 1-*n*-butil-3-metilimidazolio y 1-*n*-etil-3-metilimidazolio (21). Según Chiappe y Pieraccini(2005) (21), en sus estudios de LIs han concluido algunas de las propiedades de los cationes imidazolio que a medida que el tamaño y la asimetría de los cationes aumentan, el punto de fusión disminuye, sin embargo, indicaron que los puntos de fusión de los LIs son la mayoría inestables. Otro aspecto importante de los cationes es que un aumento en la ramificación en la cadena de alquilo provocara un aumento en el punto de fusión. Como se mencionó previamente el punto de fusión es una propiedad de los LIs, este es esencial, ya que representa el límite inferior del estado líquido y la estabilidad térmica que se define como el intervalo de temperaturas dentro del

cual es posible usar los LIs como disolventes (21).

| R | X |
|--------------|---|
| Metil | CH ₃ OSO ₃ ⁻ , Cl ⁻ |
| Etil | BR ⁻ , NO ₃ ⁻ , BF ₄ ⁻ , PF ₆ ⁻ , CF ₃ SO ₃ ⁻ |
| Butil | BR ⁻ , Cl ⁻ , BF ₄ ⁻ , PF ₆ ⁻ , CH ₃ OSO ₃ ⁻ |
| Hexil | Cl ⁻ , BF ₄ ⁻ , PF ₆ ⁻ |
| Octil | Cl ⁻ , BF ₄ ⁻ |
| Decil | Cl ⁻ , BF ₄ ⁻ |

Figura 3: Derivados del catión Imidazolio y aniones más utilizados en la síntesis de LI.

(Adaptación desde <http://www.sigmaaldrich.com>) (22).

3.8 Estructura de los aniones

Por años, los LIs más estudiados y utilizados son aquellos basados en los aniones tetracloroaluminato (AlCl₄⁻); hexafluorofosfato (PF₆⁻) y tetrafluoroborato (BF₄⁻). Este tipo de LI siguen siendo muy empleados hoy en día, ya que son sencillos de preparar y purificar. Sin embargo, el uso de LIs con este tipo de aniones puede ser muy problemático en ciertas condiciones, especialmente en presencia de agua, ya que pueden hidrolizarse liberando ácidos tóxicos y corrosivos como HCl o HF. Por ejemplo, el hexafluorofosfato de 1-butil-metilimidazolio, [C₄ClIm][PF₆], se hidroliza completamente tras 8 horas cuando se calienta a 100 °C en presencia de un exceso de agua, formándose HF y H₃PO₄.

La estructura final del LI, es decir la combinación entre los cationes asimétricos y los aniones regulares involucrados en la síntesis determinan, las propiedades físico-químicas del LI; al variar el anión en la composición, es posible cambiar la hidrofobicidad, viscosidad, densidad y solvatación (23). Algunos aniones que están más estudiados son los fluorados, entre los que se encuentran el hexafluorofosfato (PF₆⁻) y el tetrafluoroborato (BF₄⁻). También están los LIs que

poseen aniones no fluorados, tales como el tetracloroaluminato (AlCl_4^-). Los aniones más frecuentemente utilizados en los LIs son cloruro, nitrato, acetato, hexafluorofosfato y de tetrafluoroborato. La química de los aniones tiene un gran efecto sobre las propiedades de los LIs. Por ejemplo, los LIs con cationes 1-n-butil-3-metilimidazolio y aniones (PF_6^-), son inmiscibles (es decir, no solubles en agua) en agua, sin embargo, los LIs con el mismo catión, pero con el anión (BF_4^-) es soluble en agua, tal como se señala en la Figura 4. Lo que indica que se pueden generar muchas combinaciones entre cationes y aniones, generando diferentes LIs con diversas propiedades físico-químicas.

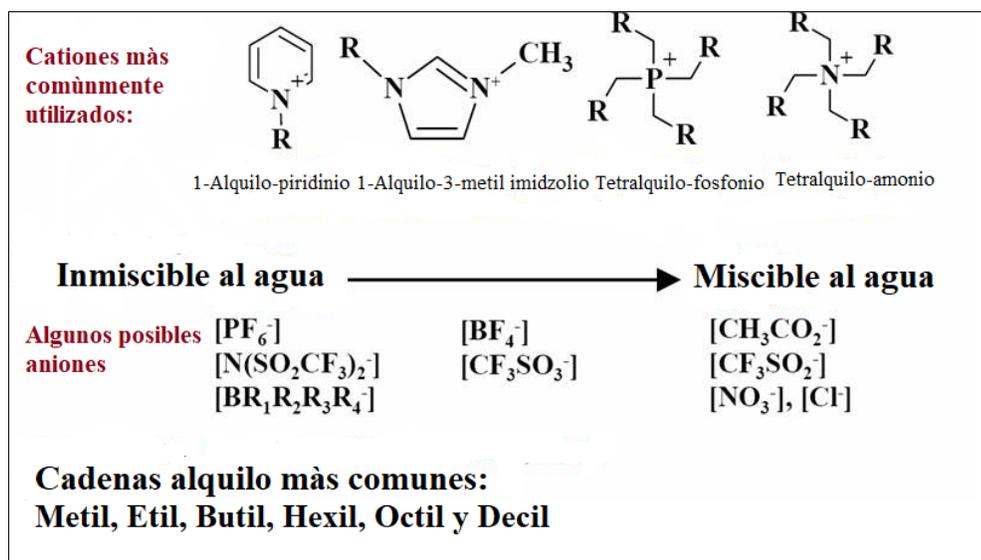


Figura 4. Estructura química de cationes más utilizados en investigaciones con sus posibles aniones coordinantes presentes en los LI (Adaptación desde <http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/Liquidioni/Composition.html>). (24)

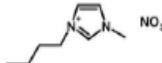
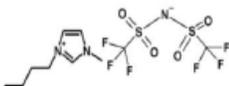
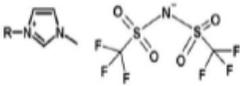
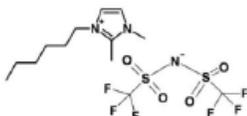
3.9 Aplicaciones de líquidos iónicos

Los líquidos iónicos, presentan diferentes usos reportados, de acuerdo con su composición, por ejemplo son utilizados en mejorar el procesamiento del petróleo y otros crudos (25). Otra aplicación de los líquidos iónicos se ha enfocado a su utilización como componente de dispositivos

electrónicos que permiten tener mayor vida de funcionamiento a un costo más bajo que las baterías a base de iones litio. También se han usado satisfactoriamente en algunas extracciones en la industria farmacéutica, como es el caso de nitrofurantoína, paracetamol e ibuprofeno. En el caso de procesos bioquímicos, se usan con éxito como medios de reacción debido a su gran capacidad para la estabilización enzimática, alta conversión y mejor recuperación y re-uso de las enzimas, lo cual permite su uso en operaciones continuas (26)

Otra característica que presentan los LIs, es que también pueden ser utilizados como catalizadores ácidos en muchas reacciones, por su acidez y como electrolitos, debido a su gran potencial electroquímico y alta conductividad iónica, algunos ejemplos de estos LIs se encuentran en la Tabla 1. Cabe mencionar que los LIs, se pueden utilizar como sensores electroquímicos, tales como los plastificantes en electrodos selectivos de ciertos iones (27).

Tabla 1: LIs utilizados con mayor frecuencia en Investigación (Extraído desde “High pressure phase behavior of carbon dioxide with imidazolium-based ionic liquids”) (28).

| Líquido Iónico | Estructura | Nombre abreviado |
|---|--|-----------------------------|
| 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato. |  | [bmim] [BF ₄] |
| 1-butil-3-metilimidazolio dicianamida. |  | [bmim] [DCA] |
| 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato. |  | [bmim] [PF ₆] |
| 1-butil-3-metilimidazolio nitrato. |  | [bmim] [NO ₃] |
| 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl) imida. |  | [bmim] [Tf ₂ N] |
| 1-octil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl) imida R: C ₈ H ₁₇ . |  | [omim] [Tf ₂ N] |
| 2,3-dimetil-1-hexilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl) imida. |  | [hmmim] [Tf ₂ N] |

En el presente trabajo se busca, encontrar la capacidad de inhibición del *Streptococcus mutans* a nivel bucal, lo que implicaría, que estos podrían utilizarse, como suplemento en pasta de diente o en enjuague bucal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana, *in vitro* de sales derivadas de ácido benzoico con diferentes longitudes de cadena, frente a una cepa de *Streptococcus mutans* auto-extraída

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antibacteriana de 6 sales derivadas de ácido benzoico con diferentes longitudes de cadena, frente a una cepa de *Streptococcus mutans*.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria de 6 sales derivadas de ácido benzoico con diferentes longitudes de cadena, frente a una cepa de *Streptococcus mutans*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de las sales derivadas del ácido benzoico

Los LIs basados en ácidos benzoicos utilizados fueron previamente sintetizados, iniciándose con la formación de los *N*-benzoilimidazoles, haciendo uso de la mecanoquímica de síntesis. Esta se basa en que reactivos sólidos se trituren juntos sin solvente o con un mínimo de solvente, llevándose a cabo en un mortero de molinillo (FRITSCH: Pulverisette 2) a 70 rpm y 130 mm de diámetro del recipiente de molienda. Los benzoilimidazoles fueron obtenidos como aceites de color amarillo y fueron empleados sin previa purificación en la formación final de los LIs. La reacción de cuaternización se llevó a cabo por reacción de los diferentes *N*-benzoilimidazoles con los diferentes bromuros de alquilo (hexil, octil y decil) en una proporción 1:1,2 eq, obteniendo en un rango de 45-95% de rendimiento de reacción. Luego, los LIs fueron purificados por decantación en tolueno con el fin de eliminar excesos de reactivos y solvente. Finalmente, los LIs fueron lavados con hexano y dietileter y aislados por decantación.

Todo lo anterior señalado se resume en la Figura 5. La síntesis de estos LIs se enmarca dentro del Proyecto FONDECYT INICIACIÓN 11150390. Esta síntesis fue desarrollada en un trabajo anterior.

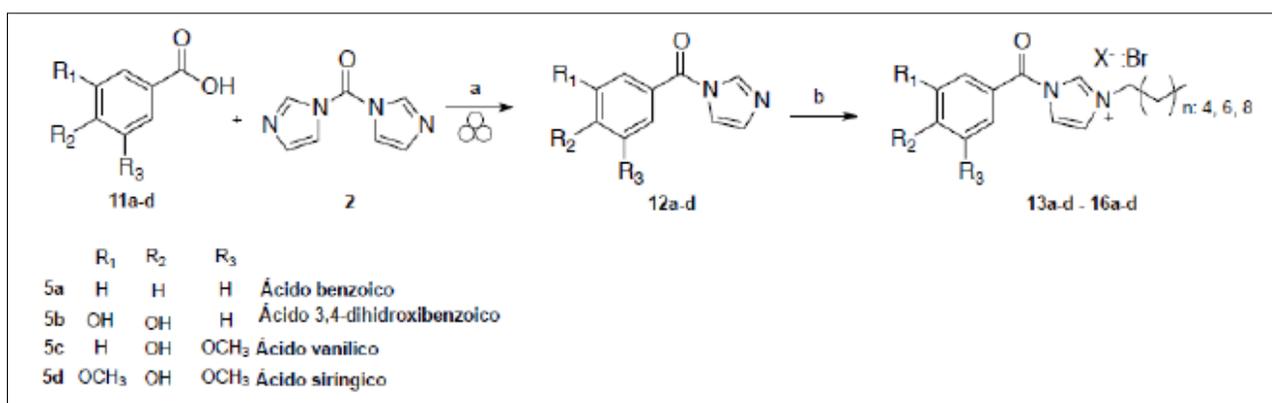
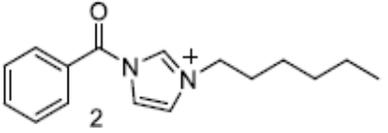
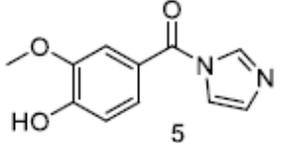
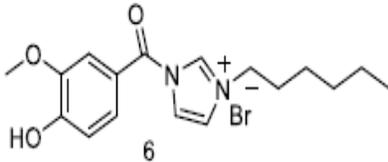
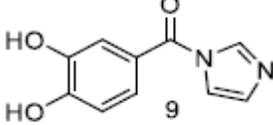
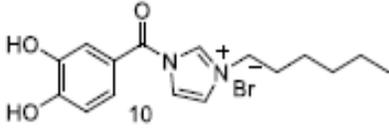
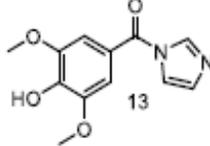


Figura 5: Síntesis de *N*-benzoilimidazoles.

Los LIs utilizados para el presente trabajo derivan de 3 precursores distintos: ácido benzoico, ácido vanílico, ácido sirínico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico (comercialmente conocido como ácido protocatecuico). En la Tabla 2 se detallan los líquidos iónicos sintetizados en un trabajo previo detallando su estructura, nombre IUPAC, abreviación y pesos moleculares. Además de ser los utilizados en este estudio, los cuales fueron entregados de forma liofilizada, para su reconstitución.

Tabla 2: Caracterización química y nomenclatura de los Líquidos Iónicos derivados que se utilizaron en este estudio.

| Nombre IUPAC | Estructura química | Peso Molecular | Abreviatura | Derivado |
|--|--|----------------|-------------|----------------------|
| Bromuro de 3-hexil-1-benzoil-1H-imidazolio |  | 336,08 g/mol | [BHIM]Br | Ácido Benzoico |
| (4-hidroxi-3-metoxifenil)(1H-imidazol-1-il)metanona |  | 218,07 g/mol | [VIM]Br | Ácido Vanílico |
| Bromuro de 3-hexil-1-(4-hidroxi-3-metoxibenzoil)-1H-imidazolio |  | 382,09 g/mol | [VHIM]Br | Ácido Vanílico |
| (3,4-dihidroxiifenil)(1H-imidazol-1-il) metanona |  | 204,05 g/mol | [PIM]Br | Ácido Protocatecuico |

| | | | | |
|--|--|--------------|-----------|----------------------|
| Bromuro de 3-hexil-1-(3,4-dihidroxibenzoil)1H-imidazolio |  | 368,07 g/mol | [PHIM] Br | Ácido Protocatecuico |
| (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)(1H-imidazol-1-il)metanona |  | 248,08 g/mol | [SIM]Br | Ácido Siríngico |

5.2 Aislamiento de microorganismo

El *Streptococcus mutans* requiere de condiciones especiales para su crecimiento. Por lo que necesita medios de cultivo especial, en esta ocasión se utilizó Agar Mitis Salivarius, el cual presenta en su composición dextrosa y sacarosa como fuentes de hidrato de carbono, y cristal violeta y potasiotellurite (de la Solución Tellurite el 1 %) inhibidores de la mayoría de los bacilos Gram negativo y bacterias Gram positivo excepto *Streptococcus spp.* Además, luego de realizar el sembrado, las placas deben ser incubadas 36-48 horas, a 37 °C, en capnofilia. La colonia de *Streptococcus mutans* tiene como característica predominante, la presencia de una capa mucosa.

5.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria

La actividad antibacteriana de los LIs fue evaluada mediante el ensayo de microdilución en placa de 96 pocillos, técnica adaptada de la metodología descrita por Eloff y cols. (1998). (29) El inóculo bacteriano se obtuvo mediante incubación de los microorganismos en caldo de cultivo Muller Hinton suplementado con sacarosa al 1% (100 µl por pocillo), durante 24 horas, ajustándose a una concentración final de $10^4 - 10^5$ UFC/ml. Los LIs fueron solubilizados en suero fisiológico estéril, ajustando sus concentraciones a un volumen final de pocillo correspondiente a 100 µl, el cual se diluyó sucesivamente junto al volumen de caldo Muller Hinton. Las concentraciones finales para cada LI fueron: 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM, 0,03125 mM y 0,015625 mM para cada uno de los 6 líquidos iónicos. Además, fueron incluidos el control de crecimiento bacteriano, con 10 µl de la suspensión de 0,5 Mc Farland diluido 1/10 (control positivo) y un control del medio de cultivo (control negativo). Las placas fueron incubadas durante 18 horas en capnofilia (10% de CO₂) a 37°C. La viabilidad de los microorganismos se determinó a través de la adición de 20 µl de la solución acuosa (5 mg/ml) del indicador redox correspondiente a cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio a cada pocillo y posterior incubación durante 1 hora a 37 °C en capnofilia

(10% de CO₂) a 37° C, revelando la viabilidad bacteriana en los pocillos de coloración rojiza, mientras que los pocillos que mantengan la coloración del medio de cultivo indicarían la inhibición del crecimiento. La cantidad de este producto rojo se relaciona directamente con la viabilidad de la bacteria.

La concentración bacteriana, permite activar la cadena respiratoria y otros sistemas transportadores de electrones, que al hacer contacto con el reactivo revelador reducen la sal de tetrazolio presente en este, por acción de la enzima succinato deshidrogenasa, formando cristales insolubles en agua. La cantidad de estos cristales puede ser determinada espectrofotométricamente o evidenciada visualmente y además esto sirve como un estimador del número de células viables.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de microorganismo

Para poder realizar una identificación del *Streptococcus mutans* certera, se utilizó un Agar Mitis Salivarius, la cual es selectiva para los géneros de *Streptococcus spp.* en el caso de *Streptococcus mutans* presenta una colonia rígida en el centro, pero con sus extremos mucosos. Para obtener colonias aisladas, se realizaron siembras sucesivas hasta obtener la colonia de *Streptococcus mutans* de forma pura y aislada, tal como se muestra en la Figura 6. Además, se realizó una prueba de identificación con TSI que indicó la fermentación de azúcares y un test de bilis esculina, la cual resultó positiva, demostrado en la Figura 7.



Figura 6: En la imagen se observa una placa de agar mitis salivarius con una cepa de *Streptococcus mutans*.

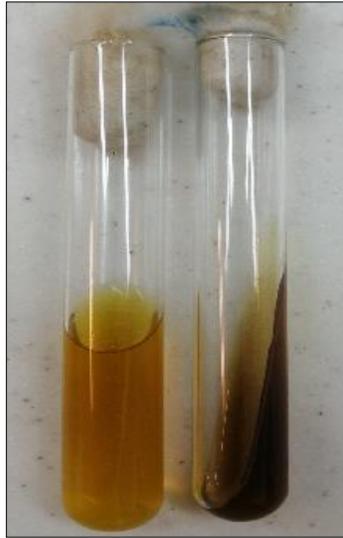


Figura 7: Pruebas de identificación de *Streptococcus mutans* (Medio TSI y bilis esculina.)

6.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria

Para la determinación de la CIM se utilizó la técnica de microdilución en caldo Muller Hinton, suplementado con sacarosa al 1 %, al cual se le agregó 2,3,5-trifeniltetrazolio o simplemente cloruro de tetrazolio, indicador redox, previa incubación por 3 horas a 37°C en capnofilia, para ser revelado posteriormente. En la Figura 8 se observan los líquidos iónicos en el siguiente orden de izquierda a derecha por duplicado: [BHIM]Br (columna 1 y 2), [VIM]Br (columna 3 y 4), [VHIM]Br (columna 5 y 6), [PIM]Br (columna 7 y 8), [PHIM]Br (columna 9 y 10), y [SIM]Br (columna 11 y 12). El control negativo consistió solo en caldo BHI suplementado con sacarosa al 1% (columna 15 y 16) y el control positivo contenía en caldo Muller Hinton suplementado con sacarosa al 1%, más suspensión bacteriana de *S. mutans*. (columna 13 y 14). Además, en la misma figura se puede observar las diferentes concentraciones en las cuales se utilizó el líquido iónico. En cuanto a las CMI, están señaladas con una línea negra.

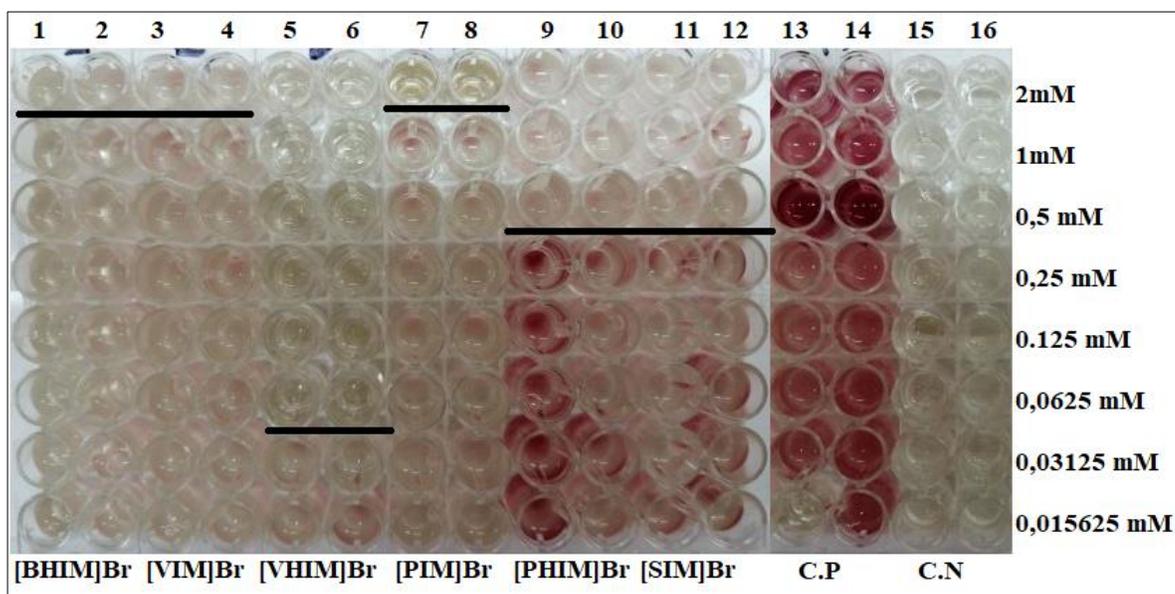


Figura 8: Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria

En la Tabla 3, se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias que se obtuvieron de la microdilución en caldo, con cada uno de los líquidos iónicos, tanto en [BHIM]Br como con [VIM]Br, la concentración fue de 2mM, con [VHIM]Br, fue de 0,0625mM, con [PIM]Br fue de 2mM y una concentración mínima inhibitoria de 0,5 mM para [PHIM]Br y [SIM]Br.

Tabla 3: Determinación de concentración mínima inhibitoria de los líquidos iónicos frente a una cepa de *S. mutans*, mediante microdilución en caldo.

| | [BHIM]Br | [VIM]Br | [VHIM]Br | [PIM]Br | [PHIM]Br | [SIM]Br |
|-----|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| CMI | 2mM | 2mM | 0,0625mM | 2 mM | 0,5mM | 0,5mM |

7. DISCUSIÓN

En los últimos años se está en la búsqueda de un tratamiento efectivo contra el *Streptococcus mutans*, el cual está presentando resistencia. Por lo general el *S. mutans* es sensible a antibióticos como betalactámicos y resistente a aminoglucósidos. Según Brescó (2006) (30) existe una actividad sinérgica entre estas dos familias de antibióticos, también que la resistencia varía según el lugar geográfico donde se encuentren las diferentes cepas del grupo viridans, mostrando resistencia variable según la especie, y el origen del aislamiento. Es importante conocer un tratamiento efectivo para las infecciones que se desarrollan en la cavidad oral, entre las que están las causadas por el *S. mutans*, que ocasionan caries y en las que un tratamiento oportuno permitirá evitar complicaciones más graves a la salud, tales como bacteriemia y endocarditis.

Según lo analizado en este estudio, con respecto a la actividad antibacteriana que expresan las sales derivadas del *N*-benzoilimidazolio frente a la cepa de *S. mutans*, los LIs presentaron acción antimicrobiana, debido a que inhiben su crecimiento, pero la mayoría de los evaluados en este trabajo lo hicieron con la mayor concentración, esto podría ser un problema al ser utilizados en humanos, por lo que es necesario realizar ensayos de citotoxicidad celular. Los LIs que presentaron la CMI más alta, correspondiente a 2 mM, son [BHIM]Br, [VIM]Br y [PIM]Br, de los cuales [BHIM]Br, presenta 4 carbonos y los otros dos son líquidos precursores. En contraste a lo anterior, el [SIM]Br que también es un precursor por lo que tiene menores cadenas alquílicas, inhibió el crecimiento de *S. mutans* con una concentración más baja, correspondiente a 0,5mM. Además, se observó que los líquidos que presentan 4 cadenas alquílicas, presentan una CMI menor que los que provenían del mismo derivado pero que contaban con menos cadenas de alquilo, como, por ejemplo, [VIM]Br y [VHIM]Br, las que presentan un CMI de 2 mM y 0,0625 mM respectivamente. El otro caso es ácido protocatecuico, en el que sus derivados [PIM]Br y [PHIM]Br, presentan una CMI de 2 mM y 0,5mM. Este estudio indicó que todos los líquidos iónicos, presentan actividad antimicrobiana, sin embargo, tienen diferentes concentraciones mínimas inhibitorias.

Es importante mencionar a su vez, que los resultados obtenidos indican que las sales derivadas *N*-benzoilimidazolio frente a la cepa de *S. mutans*, lograron un aumento de su actividad, conforme aumentaba el largo de la cadena, esto quedó manifestado en el ensayo de microtitulación con caldo, en la cuantificación de la CMI, en derivados de ácido vanílico y ácido protocatecuico, debido a que al comparar sales derivadas de un mismo ácido, pero con cadenas alquílicas más largas, se presentaba una inhibición del crecimiento del *S. mutans* con una menor concentración del líquido. En el caso de las sales derivadas del ácido vanílico se evidenció una actividad antibacteriana 32 veces mayor en el derivado [VHIM]Br que en [VIM]Br, el cual presenta menos carbonos en su cadena. En cambio, en el caso del ácido protocatecuico el [PIM]Br fue 4 veces mayor que él [PHIM]Br.

Existen diversas investigaciones en los últimos años, específicamente en 3 estudios se ha tratado de determinar la actividad antibacteriana de distintos LIs frente a diferentes bacterias ya sean Gram positivo o Gram negativo, y como conclusión se ha obtenido que estos son más efectivos frente a bacterias Gram positivo. Estos estudios son Brunel y cols (2016) (31), el cual utilizó LIs sintetizados con el catión fosfonio derivado de la fenilalanina. Sandhu y cols (2017) (32) donde se usó el catión inidazolio, variando en la cantidad de los cationes y el largo de la cadena alquílica. El otro estudio fue el de Carson y cols. (2009) (33), donde se sintetizaron líquidos con diferentes largos de cadena alquílica, pero unidas al catión imidazolio.

Según un estudio realizado por Sandhu y cols.(2017) (32), los LIs que son dicatiónicos, es decir poseen dos cationes de imidazolio añadidos a su estructura, disminuían el efecto de toxicidad que existe sobre distintas células, además esta estructura permite que la cadena alquílica quede entre los cationes, lo que hace que haya una menor interacción con las membranas celulares, demostrándose en el estudio que existía una potente actividad antimicrobiana (32).

Además en el estudio de Sandhu y cols. (2017) (32), existe una mayor actividad antibacteriana mientras mayor sea el largo de cadena alquílica de LIs en presencia de un solo catión imidazolio, lo cual coincide con los resultados de esta investigación. En el estudio de Carson y cols. (2009) (33), se analizaron LIs con el catión imidazolio que poseían cadenas alquílicas de 6, 8, 10, 12 y 14 carbonos con el anión cloruro, para la determinación de la CMI, de un grupo de bacterias entre las que estaban *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, las que son Gram positivo al igual que *Streptococcus mutans* que se usó para esta determinación, lo que los hace comparables. En el estudio de Carson y cols. (2009) (33) se concluyó que las CMI eran más altas cuando aumentaba la cadena alquílica de 6, 8 y 10 carbonos, esto en las especies de *Staphylococcus spp.* que ellos analizaron. A diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación donde al aumentar la cadena alquílica disminuía la CMI en la cepa de *S. mutans*. Aunque los estudios no son totalmente comparables, ya que en esta investigación no se evaluaron las mismas longitudes de cadena y tampoco se emplearon los mismos líquidos iónicos.

Es importante revalidar los resultados obtenidos, realizando otros estudios importantes tal como la actividad antibiofilm de los LIs estudiados ya que esta permitirá comprobar si existe la misma acción en el biofilm, eliminándolo tal como se demostró en el estudio de Busetti y cols. (2010) (34) en el cual se evaluaron valores de concentración mínima de erradicación de biofilm, para los LIs derivados de bromuros de 1-alkilquinolinio los cuales dependen de la longitud de la cadena alquílica; concluyéndose que los LI derivados del bromuro de 1-alkilquinolinio con una cadena alquílica con más de 8 carbonos poseen actividad antimicrobiana contra biofilm con una actividad antimicrobiana y antibiofilm máxima cuando el número de carbonos en la cadena alquílica es de 14. Además estos resultados son comparables a los LIs más potentes derivados del cloruro de 1-tetradecil-3- metilimidazolio (34). Estos resultados son comparables con la actividad antibacteriana evidenciada en el ensayo de microdilución en caldo, en la cual la concentración mínima inhibitoria dependía de la longitud de la cadena alquílica y que cuando mayor cantidad de estos haya mayor será la acción antibacteriana. Sin embargo, se requiere de un estudio de la actividad de antibiofilm.

8. CONCLUSIÓN

El desarrollo de caries dental, es un problema de salud pública que va en aumento, como se ha comentado durante todo este trabajo, una causa de este incremento es la colonización bucal por parte de *Streptococcus mutans* en la población, la que crea un alto riesgo de tener complicaciones durante o posterior a un procedimiento odontológico invasivo; dentro de estas complicaciones la más grave corresponde a la endocarditis, cuadro clínico que suele ocurrir en pacientes con enfermedad cardiaca de base, otra cosa importante es la presencia de los factores de virulencia que presenta el de *S. mutans*, los cuales potencian estos cuadros haciéndolos más graves, además entre esto se destaca la capacidad de producir biofilm, y la capacidad de adquirir resistencia a antibióticos. Es por esto que en este estudio se evaluó la propiedad antimicrobiana de algunos LIs.

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de sales derivadas de N-benzoimidazoles con distintas longitudes de cadena, derivados de ácido benzoico y otro de ácido siríngico ambos con una cadena de 4 carbonos, además de 2 sales derivadas de ácido vanílico y ácido protocatecuico con una cadena de 4 y 6 carbonos respectivamente, con frente a una cepa de *S. mutans*, en donde con los derivados del ácido vanílico y el ácido protocatecuico se manifestó una disminución de la CMI, conforme aumentaba el largo de la cadena de carbonos.

Como conclusión acerca de las sales de N-benzoilimidazolio, estas pueden tener una actividad antimicrobiana, lo que indicaría su utilidad como una nueva alternativa terapéutica para el futuro, para lo cual se deben realizar estudios posteriores para poder evaluar si los líquidos iónicos presentan toxicidad celular, además de evaluar si logran traspasar el biofilm bacteriano impidiendo así la resistencia bacteriana, otro aspecto importante es evaluar la acción de estos líquidos derivados de N-benzoimidazoles en los genes que permiten la formación del biofilm bacteriano del *Streptococcus mutans*.

Además de estudiar diversos parámetros farmacodinámicos, como los efectos secundarios en los seres humanos; así como también proyectar nuevos usos a nivel medioambiental de esta alternativa antimicrobiana.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017;96(4):380–7.
2. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2005;83(9):661–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211157> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2626328>
3. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2007 Jan 6 [cited 2019 Jun 13];369(9555):51–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208642>
4. Cantón R, Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. Inappropriate use of antibiotics in hospitals: The complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2019 Jun 13];31:3–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X13701265?via%3DiHub>
5. Lasa P, Pozo D, De R. Biofilms bacterianos e infeccion. 2015;28:1–2. Available from: https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=2&SID=N1mNs7HbrsDIEGNgzjF&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no
6. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady J, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun*. 2008;76(9):4259–68.
7. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *S. mutans*. *Rev CES Odont*. 2013;26(1):44–56.

8. Porte L, Braun S, Dabanch J. Carta al Editor Streptococcus mutans : Una bacteria que hace honor a su nombre Streptococcus mutans : A bacteria that honours its name Referencias Fe de Erratas. Rev Chile Infect. 2009;26(6):2009.
9. Lozano CP, Jens D, Giacaman RA. Streptococcus mutans y Streptococcus sanguinis Expresión de genes relacionados con la competencia , Bajo sacarosa. 2019;000:194–203.
10. Zambrano M, Suarez L. Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. Univ Odontológica. 2006;25(57):19–25.
11. Mitchell T. The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. Nat Rev Microbiol. 2004;1:219–30.
12. Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. Mol Microbiol. 1997;23(2):183–90.
13. Lee SF, Boran TL. Roles of sortase in surface expression of the major protein adhesin P1, saliva-induced aggregation and adherence, and cariogenicity of Streptococcus mutans. Infect Immun. 2003;71(2):676–81.
14. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(4):499–515.
15. Carinci F, Martinelli M, Contaldo M, Santoro R, Pezzetti F, Lauritano D, et al. Focus on periodontal disease and development of endocarditis. J Biol Regul Homeost Agents. 2018;32:143–7.
16. De Y, Riesgo C, Marino D, Montané C, Rodríguez C, Crespo MI. Medisan 2010,14(1): 1. Medisan. 2010;14(1):1–5.
17. Neumüller OA. Römpps Chemie-Lexikon; Franckh'sche Verlagshandlung W. Keller Co, Stuttgart. 1988;
18. acidosedaccion. No Title [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 3]. Available from: <https://www.acidobenzoico.com/formula/>
19. Sharma P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological

- activities. *J Chem Pharm Res.* 2011;3:403–23.
20. Díaz Alvarez JCMRRBAR. Líquidos iónicos: propiedades fisicoquímicas y aplicación potencial en el mejoramiento de crudos pesados Ionic liquids: physicochemical properties and potential application in upgrading of heavy crude oils. *Rev ION.* 2012;25(1):61–87.
 21. Chiappe C, Pieraccini D. Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *J Phys Org Chem [Internet].* 2005 Apr 1;18(4):275–97. Available from: <https://doi.org/10.1002/poc.863>
 22. Sigma-Aldrich. No Title [Internet]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16255914>
 23. Brennecke JF, Maginn EJ. Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing. *AICHE J.* 2001;47(11):2384–9.
 24. Di Chio Donata, Fusco Marida HM. Ionic Liquids: Composition [Internet]. 2004 [cited 2019 Jun 27]. Available from: <http://lem.ch.unito.it/didattica/infocimica/LiquidiIonici/Composition.html>
 25. Castillo Borja F. Líquidos Iónicos: Métodos de Síntesis y Aplicaciones. *Cienc Tecnológica [Internet].* 2015;(49):52–6. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/944/94438997007.pdf>
 26. Bauer 196. 2004;1–4. Available from: <papers://1534bf8c-273e-4fe2-b9af-fcb670e73bd9/Paper/p674>
 27. Wells AS, Coombe VT. On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids. *Org Process Res Dev [Internet].* 2006 Jul 1;10(4):794–8. Available from: <https://doi.org/10.1021/op060048i>
 28. Shin E, Lee B. High-Pressure Phase Behavior of Carbon Dioxide with Ionic Liquids: *J Chem Eng Data.* 2008;53(12):2728–34.
 29. Eloff JN. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Med.* 1998;64(08):711–

- 3.
30. Brescó Salinas M, Costa Riu N, Berini Aytés L, Gay Escoda C. Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(1):51–6.
 31. Brunel F, Lautard C, Garzino F, Giorgio S, Raimundo J-M, Bolla J-M, et al. Antibacterial activities of fluorescent nano assembled triphenylamine phosphonium ionic liquids. Vol. 26, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016.
 32. Sandhu P, Gindri I, Siddiqui D, Rodrigues D. Dicationic Imidazolium-Based Ionic Liquid Coatings on Zirconia Surfaces: Physico-Chemical and Biological Characterization. *J Funct Biomater*. 2017;8(4):50.
 33. Carson L, K. W. Chau P, Earle M, Gilea M, Gilmore B, Gorman S, et al. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. Vol. 11, *Green Chemistry*. 2009. 492–497 p.
 34. Busetti A, Crawford DE, Earle MJ, Gilea MA, Gilmore BF, Gorman SP, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids. *Green Chem* [Internet]. 2010 Jul 1;12(3):420–5. Available from: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1004294696>