



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

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DE SALES DERIVADAS DE  
N-CINAMILIMIDAZOL CON DIFERENTES LONGITUDES DE CADENA FRENTE A  
DIFERENTES MUESTRAS DE *S. mutans*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN  
TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: VANESA MANRIQUEZ VASQUEZ

PROFESOR GUÍA: TM. Dra. LORENA TOLOZA M.

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

## ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. HIPOTESIS	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 Carie dental	10
4.2 Placa bacteriana	10
4.3 <i>Streptococcus mutans</i> y rol en la formación de biofilm a nivel dental	15
4.4 Actividad antibacteriana de los ácidos cinámicos y sus derivados	19
4.5 Líquidos Iónicos	21
4.6 Estructura de los cationes	22
4.7 Estructura de los aniones	23
4.8 Medios de cultivo	26
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Cepas bacterianas de <i>S. mutans</i>	29
6.2 Medio de cultivo y viabilización de cepas bacterianas de <i>S. mutans</i>	29
6.3 Preparación del medio MSB suplementado	30
6.4 Sales derivadas de N-cinamilimidazolio	31
6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitorio (CMI)	31
6.6 Cuantificación de Biofilm estático en placa de microtitulación	32
6.7 Análisis estadístico	34
7. RESULTADOS	35

6.1 Medio de cultivo y viabilización de cepas bacterianas de <i>S. mutans</i>	35
6.2 Determinación de la CMI	36
6.3 Cuantificación de la actividad antibiofilm	42
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIÓN	53
9. BIBLIOGRAFÍA	55

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Factores de virulencia de <i>Streptococcus mutans</i>	19
<b>Figura 2.</b> Estructura de cationes más comunes de LI	24
<b>Figura 3.</b> Estructura de aniones más comunes de LI	25
<b>Figura 4.</b> Colonia de <i>S.mutans</i> en agar mitis salivarius bacitracina (MSB)	28
<b>Figura 5.</b> Colonia de <i>S.mutans</i> en medio de cultivo MSB suplementado	36
<b>Figura 6.</b> Pruebas bioquímicas para <i>S. mutans</i> (urea y bilis esculina)	36
<b>Figura 7.</b> Microdilución para CMI para muestra N°1	38
<b>Figura 8.</b> Microdilución para CMI para muestra N°2	39
<b>Figura 9.</b> Microdilución para CMI para muestra N°3	39
<b>Figura 10.</b> Microdilución para CMI para muestra N°4	40
<b>Figura 11.</b> Microdilución para CMI para muestra N°5	40
<b>Figura 12.</b> Microdilución para CMI para muestra N°6	41
<b>Figura 13.</b> Microdilución para CMI para muestra N°7	41
<b>Figura 14.</b> Microdilución para CMI para muestra N°8	42
<b>Figura 15.</b> Microdilución para CMI para muestra N°9	42
<b>Figura 16.</b> Microdilución para CMI para muestra N°10	43
<b>Figura 17.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°1	45
<b>Figura 18.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°2	45
<b>Figura 19.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°3	46
<b>Figura 20.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°4	46
<b>Figura 21.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°5	47
<b>Figura 22.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°6	47
<b>Figura 23.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°7	48
<b>Figura 24.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°8	48
<b>Figura 25.</b> Microdilución para biofilm estático para muestra N°9	49

Figura 26. Microdilución para biofilm estático para muestra N°10	49
Figura 27. Gráfico: Media de las concentraciones de las sales derivadas del <i>N</i> -cinamilimidazolio [mM] v/s porcentaje remanente de biofilm.	50
Tabla 1. Derivados de ácidos cinámicos	21
Tabla 2. Determinación de la CMI de las distintas muestras de <i>S. mutans</i>	43

## 1. RESUMEN

En los últimos años se ha visto aumentado el interés científico y con ello, el número de publicaciones relacionadas con los líquidos iónicos (LI), esto debido a sus propiedades como: baja toxicidad, baja presión de vapor, reciclabilidad, alta estabilidad química y térmica, entre otras. 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, donde se ha demostrado su versatilidad. En esta investigación, se profundizará en dos propiedades específicas de los LI derivados del *N*-cinamilimidazolio; la actividad antibacteriana y la actividad antibiofilm. El proceso de síntesis de LI derivados de ácidos cinámicos, se basa a nivel molecular en un núcleo de un grupo imidazol, que inicialmente se sintetiza con la formación de diferentes amidas entre el ácido cinámico con carbonilimidazol hasta obtener el correspondiente *N*-cinamilimidazolio. En seguida, la reacción de cuaternización de los diferentes *N*-cinamilimidazoles se lleva a cabo con haluros de alquilo (metilo, hexilo, octilo y decilo), los LI correspondientes y sus precursores se caracterizaron por diferentes técnicas espectroscópicas y de espectrometría. El propósito de esta investigación es evidenciar empíricamente la actividad bactericida y/o bacteriostática de este grupo de LI mediante, determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), de igual forma se midió la actividad antibiofilm con técnicas de microtitulación y densidad óptica. La actividad antibacteriana y antibiofilm se evaluó en 10 muestras de *Streptococcus mutans* de aislados humanos, proporcionadas por el laboratorio de Cariología de la Universidad de Talca, con el propósito de promover el uso de LI, como un posible agente antibacteriano contra microorganismos potencialmente patógenos presentes en la cavidad oral, iniciadores de caries dental e infecciones graves como bacteriemia y endocarditis. Al término de este estudio se concluye que si existe actividad antibacteriana y antibifilm de los LI contra cepas de *S. mutans* aislados de pacientes y que esta es proporcional al largo de la cadena alquílica de los mismos.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales son las enfermedades crónicas más comunes, constituyendo un importante problema de salud pública por su alta prevalencia, impacto negativo en la salud bucal y sistémica en los individuos y sociedad, y por el alto costo de su tratamiento (1). Se ha comprobado que las bacterias poseen una alta capacidad de adaptarse al medio ambiente, generando estructuras que facilitan su colonización a superficies que pueden ser celulares o no. Esta característica aumenta por el uso indebido de agentes antimicrobianos, considerado como uno de los principales factores que fomentan esta situación y el incremento de la resistencia bacteriana a múltiples alternativas terapéuticas. Las bacterias presentan diferentes estrategias para poder colonizar e invadir las mucosas y tejidos y se asocian principalmente a la adhesión bacteriana, movilidad y quimiotaxis y evasión de la respuesta inmune entre muchas otras. Dichas estrategias se llevan a cabo a través de moléculas denominadas “Factores de Virulencia”. A modo de ejemplo podemos destacar la formación de una matriz formada por exopolisácarido denominado biofilms que permite el desarrollo de múltiples poblaciones bacterianas de forma organizada (2), esta matriz, promueve un rol protector frente al uso de antibióticos en el ser humano, que impide la erradicación del microorganismo e incluso ocasionando cuadros graves para el huésped, que pueden terminar en una falla multisistémica. Esto cobra importancia en salud bucal cuando *Streptococcus mutans* es capaz de colonizar las superficies de dientes y aparatos prostéticos, principalmente por la capacidad de producir biofilm (placa dental). Esta bacteria se describe como una cocócea Gram positivo y como el principal patógeno involucrado en la formación de caries dental por su capacidad de producir ácidos en presencia de carbohidratos como la sacarosa.

En la actualidad, no existen antibacterianos específicos dirigidos a inhibir la comunidad microbiana con características patógenas, con la finalidad de prevenir la formación de caries (3). Es por ello que se vuelve de interés desarrollar medidas clínicas que

favorezcan la prevención de la caries dental por sobre su tratamiento, ya que, aunque acciones como la fluoración del agua potable y de las pastas de dientes han sido implementadas en casi la totalidad de la población, siguen siendo medidas que se centran en fortalecer los tejidos duros del diente, para así hacerlos más resistentes al efecto acidogénico de la placa bacteriana, pero pasan por alto la supervivencia de las bacterias, su adherencia a la superficie del diente y/o a su ambiente ácido (4). Además, la creciente resistencia bacteriana, ha llevado a la búsqueda de nuevas terapias alternativas para erradicar infecciones bacterianas de distinta índole. Entre estas alternativas se encuentra el uso de LI, descritas como sustancias químicas específicamente sales con bajo punto de fusión, que se mantienen en estado líquido a temperatura ambiente, cuya estructura está compuesta por iones con cargas positivas y negativas. Debido a su gran estabilidad térmica y química se pueden emplear en procesos a altas temperaturas hasta de 300 °C. Debido a su naturaleza iónica y a su composición los LI son capaces de disolver compuestos polares, no polares, orgánicos, inorgánicos y materiales poliméricos. Desde hace más de dos décadas, se ha informado la actividad antibacteriana de los LI, 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 presentan, otorgándole una mayor característica lipofílica, que se asocia a su actividad antibacteriana, representadas por cadenas entre 10 y 16 carbonos (5). Esta actividad se evalúa mediante técnicas de dilución en caldo, determinando sus respectivas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Diversos compuestos se han analizados en los últimos años, siendo los derivados del N-cinamilimidazolio los más estudiados por sus propiedades benéficas para la salud, antioxidantes y quelantes, a su vez se han descrito propiedades antibacterianas atribuidas a su grupo éster. Es por lo anterior que se busca estudiar los LI con distintas longitudes de cadena, derivados de las sales ya mencionadas, como potencial terapia alternativa por sus características antibacterianas.

### 3. HIPOTESIS

Las sales derivadas del *N*- cinamilimidazolio con diferentes longitudes de cadena, tienen actividad antibacteriana y antibiofilm sobre *Streptococcus mutans*.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Caries dental**

La caries dental, es una de las enfermedades crónicas a nivel mundial y la principal causa de dolor bucal y pérdida dentaria (1), es una enfermedad infecciosa, transmisible, polimicrobiana y localizada que afecta los tejidos duros del diente, es decir, una enfermedad multifactorial infectocontagiosa que afecta la estructura dentaria a través de un ataque ácido continuo resultante del metabolismo bacteriano, que causa la desmineralización progresiva del diente en el tiempo, llegando así a instalarse una lesión cariosa, provocando una pérdida de la estructura dentaria cuantitativamente variable (6,7). No solo afecta 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 enfermedades emergentes (6). La placa dental o biopelícula (biofilm) formado por bacterias orales en la superficie de los dientes juega un papel importante en la formación de la caries (7).

La capacidad de adaptación al medio ambiente que poseen las bacterias, facilita la colonización de determinadas superficies. Existen determinados elementos que fomentan esta situación, pero el 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. No obstante, la relación entre el uso de antibióticos y la resistencia antimicrobiana es un tema

complejo, y sus metas difíciles de realizar (8). Es por ello que el Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, Director General de la OMS, el año 2018, ha insistido en su propósito de hacer de la resistencia a los antimicrobianos una de las máximas prioridades de la Organización, y para ello ha reunido a expertos en la materia en un nuevo grupo orgánico: “Iniciativas Estratégicas” que se suma al Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la OMS, denominado GLASS por sus siglas en inglés (9). Hay diferentes factores que afectan esta relación que incluyen, entre otros, la exposición al antimicrobiano y la ventana de selección, su farmacodinamia, la naturaleza de la resistencia (natural o adquirida, incluyendo la resistencia mutacional y la asociada a la transferencia de genes de resistencia) y la propia definición de resistencia (9,10).

El principal método de tratamiento es la prevención, de esta forma, se impide la instalación y progresión de la caries, dirigiendo la atención en la eliminación de la placa bacteriana, la cual está compuesta por consorcios bacterianos llamados biofilms.

## **4.2 Placa bacteriana**

Las bacterias con potencialidad de formar biopelículas 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 respuesta inmune celular y humoral, demostrada por la identificación de citosinas liberadas por leucocitos expuestos a estos patógenos (11). 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 debido a la limitación de oxígeno y nutrientes, que pueden conducir a un estado de

lentificación o cese de sus mitosis, así como también la formación de nichos anaeróbicos en zonas profundas de la biopelícula. Por otra parte, la acumulación de productos ácidos puede conducir a diferencias significativas de pH que interfiere con la acción del antibiótico. Además, la aparición de genes específicos y un fenotipo altamente protegido, con una diferenciación similar a esporas garantiza, además, la resistencia de la biopelícula (11). Van Leeuwenhoek, fue el primero en describir en el siglo XVII la presencia de microorganismos adheridos a superficies dentales, a raíz de lo cual se le reconoce como el descubridor del biofilm bacteriano, pero a su vez el Dr. John William (Bill) Costerton estudió biofilms durante más de 40 años, por lo que es considerado pionero en el desarrollo de la teoría de la biopelícula, donde las bacterias crecen encerradas en una matriz biopolimérica protectora que forma una película que se adhiere a las superficies sólidas (un organismo sésil), junto con el Dr. Niels Hoiby de la Universidad de Copenhague, promovió la opinión de que las bacterias en las biopelículas difieren de sus contrapartes planctónicas (de flotación libre) (12,13). En 2002, Donlan efectuó una descripción ampliamente aceptada de un biofilm, estableciendo que es "una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica (14).

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. Esta matriz biopolimérica que se adhiere a las superficies se genera a través de diferentes pasos:

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 ciertas especies bacterianas. Esta película condicionante (película adquirida) se forma inmediatamente después de que el material entra en contacto con el ambiente. Esta formación genera una alteración de la energía superficial y de carga en las superficies, estas 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 esta 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 de 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), se produce la unión, que 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, es la unión entre ambas superficies, se consolida por la producción de exopolisacáridos por parte de la bacteria, que se acopla con los materiales de la superficie, mediante ligandos específicos de receptores localizados en pilis, fimbrias y fibrillas de la bacteria, o la unión de ambos procesos a la vez. Esta unión es irreversible y la bacteria queda firmemente unida 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, una vez que la bacteria se ha unido a la superficie de forma irreversible, comienza el proceso de maduración de biofilm. La densidad y la complejidad del biofilm aumenta cuando las bacterias que lo forman comienzan a dividirse activamente (o morir) y los compuestos extracelulares originados por las bacterias unidas interaccionan con las moléculas orgánicas e inorgánicas del medio formando el glicocálix. El crecimiento de cualquier biofilm está limitado por: disponibilidad de nutrientes, 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: pH, difusión del oxígeno, fuente de carbono y la osmolaridad.

Paso 5: Desprendimiento activo, aquí el 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 y las cuales pueden colonizar nuevas superficies. Esta liberación de bacterias se puede dar por dos mecanismos: 1. Erosión (pérdida de células individuales) y 2. Migración (pérdida de agregados mayores) (15). Vale 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.

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. Los estreptococos conforman el mayor número del total de la población bacteriana del biofilm cariogénico (16). Dentro de ellos, el *Streptococcus mutans* parece tener un rol fundamental. La adherencia de *S. mutans* a superficies dentales ocurre secundariamente en la formación de biopelículas y está mediada por dos mecanismos. El primero, dependiente de sacarosa, está catalizado por proteínas de unión producidas a partir de la enzima glucosiltransferasa (GTF), por consiguiente, entre más sacarosa haya en el medio, más fácil será la adhesión del *S. mutans*. El segundo mecanismo, independiente de la sacarosa, *S. mutans* expresa varias adhesinas de superficie que pueden unirse a películas

salivales formadas en los dientes. Se ha demostrado que la interacción entre la aglutinina salival y la adhesina P1 de *S. mutans*, contribuyen a la agregación bacteriana y median la adherencia a la superficie, independiente de ésta (17), por lo tanto, resulta como protagonista etiológico potente en la inducción de la caries tanto en la superficie como raíz del diente (18).

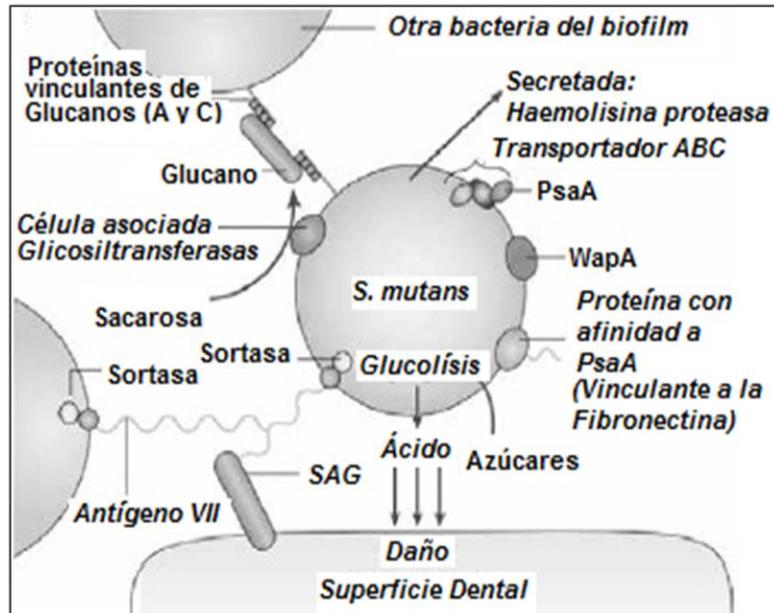
### **4.3 *Streptococcus mutans* y su rol en la formación de biofilm oral.**

*Streptococcus mutans* pertenece a la microbiota oral y constituye la primera causa de caries dental y de infecciones graves por estreptococos del grupo viridans, tales como bacteriemia y endocarditis (16), viridans que deriva del latín *viridis*, significa verde, por la producción, en su mayoría, de colonias pequeñas que en agar sangre se observan rodeadas por un halo estrecho de hemólisis verde, por la destrucción incompleta de los glóbulos rojos (hemólisis alfa), no obstante, también forma parte del grupo de estreptococos que no presentan hemólisis. Posee una morfología de cocócea Gram positivo, asociados en cadena, anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa negativo y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico.

La microbiota oral es un complejo ecosistema que contiene una amplia variedad de especies microbianas. En el ecosistema de la cavidad oral cohabitan principalmente comensales (aproximadamente  $10^{10}$  bacterias, siendo el 60% cultivables) pertenecientes entre 500 y 700 especies, que colonizan las mucosas y dientes donde forman la placa bacteriana o biofilm, entre las cuales están los miembros del género *Streptococcus* (18), pero solo *S. mutans* ha sido implicado como el principal agente causante de la caries dental (19),

y principalmente la forma en que metaboliza la sacarosa asociada al proceso de esta patología. La formación de la biopelícula dental y su sistema de *quorum sensing* son fundamentales en la vida bacteriana de *S. mutans* (20). La superficie dental es un hábitat natural indispensable para *S. mutans* y el tropismo por la biopelícula dental se refleja por su adaptación a sintetizar glucanos, fijar compuestos y adaptarse a ambientes ácidos. La competitividad por este nicho ecológico está en relación con un sistema de regulación de un proceso denominado “Respuesta de Tolerancia al Acido” (RTA) dependiente de la densidad celular. Este proceso de RTA forma parte de los sistemas de señalización de *quorum sensing* desarrollado por algunas bacterias al formar la biopelícula y *S. mutans* ha evolucionado para que su desarrollo, sobrevivencia y persistencia en la cavidad oral dependa de su crecimiento en biopelícula y de la densidad celular que alcance en ella (21), *S. mutans* utiliza dos métodos de unión: independiente y dependiente de sacarosa (22), que son proporcionadas gracias a sus factores de virulencia que se presentan en la **Figura 1**. En ausencia de sacarosa, el organismo 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 expresa varias adhesinas principales, incluyendo el antígeno proteico estreptocócico P (SpaP, conocido como antígeno I/II) (23), que puede unirse a un componente salival específico llamado glucoproteína de aglutinina salivar (SAG), el antígeno I/II está anclado a la superficie celular a través de un motivo LPXTG, y este proceso de anclaje requiere una enzima sortasa (24), por ello los mutantes que carecen de la enzima sortasa no pueden anclar la proteína a la superficie de la célula y muestran una adhesión reducida a la hidroxiapatita (25). En cambio en presencia de sacarosa, las glucosiltransferasas asociadas a la pared celular median la estrecha unión a *S. mutans* a la superficie del diente mediante la síntesis de glucanos (26), los cuales interactúan con proteínas de unión a glucano asociadas a la superficie para promover la agregación celular, facilitando la formación del biofilm (placa dental), es por esto que cualquier alteración de las glucosiltransferasas (mutaciones), puede alterar la estructura de la placa y la cariogénesis (27), las otras adhesinas que son producidas por *S. mutans* incluyen la proteína A asociada a la pared (WapA) (28), las proteínas A y C de unión a glucano (29) y una proteína similar a PavA de unión a fibronectina.

Sin embargo, sacarosa, no es el único carbohidrato que fermenta *S. mutans*, análisis de su genoma en diversos estudios, señalan que es el microorganismo Gram positivo, con mayor capacidad de metabolizar una amplia variedad de hidratos de carbono, secuenciado hasta ahora, ya que posee genes para el metabolismo y transporte de glucosa, fructosa, sacarosa, celobiosa, maltosa, lactosa, galactosa, manosa,  $\beta$ -glucósidos, rafinosa, ribulosa, melobiosa, trehalosa, almidón, isomaltosacaridos y posiblemente la sorbosa, que están presentes en su genoma (30,31). *S. mutans* produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte (19). Debido a que el propio *S. mutans* necesita crecer en este ambiente ácido, es tolerable a éste, por la presencia en una ATPasa intercambiadora de protones ligada a la membrana, que le permite mantener un pH intracelular acorde a sus funciones (32).



**Figura 1.** Resumen de los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* implicados en la formación del biofilm. Fuente: Mitchell T. J. 2003 (20).

Las bacterias que poseen la capacidad de formar biofilm, empeoran o deterioran la salud de las personas a lo largo de sus vidas. Además, si sumamos el abuso de antibióticos, ha proporcionado a la selección de cepas resistentes, en que las opciones terapéuticas son limitadas. Es por esta razón que se ha profundizado en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas con ciertas moléculas, con el fin de producir un efecto bactericida o antibiofilm, que inhiba la proliferación de estos microorganismos en el ser humano. Varios estudios se han enfocado en las propiedades de los flavonoides, compuestos en el cual se han evidenciado efectos benéficos en una diversidad de estados de distintas enfermedades, incluyendo el cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (33).

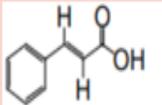
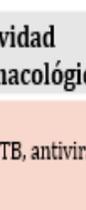
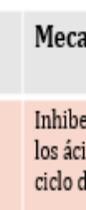
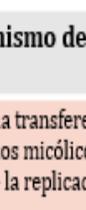
Diferentes estudios han proporcionado las acciones biológicas que poseen los flavonoides, caracterizándolos principalmente en sus propiedades antioxidantes, ya sea por sus capacidades de reducción, no obstante, los mecanismos por los cuales éstos ejercen sus acción beneficiosa o toxica, no están claros (33), estos compuestos pueden ejercer su acción directamente sobre el patógeno, siendo utilizados en combinación con otros antibióticos (sinergia), de igual forma pueden actuar contra los factores de virulencia bacterianos, entre ellas tenemos la posibilidad de unirse a células o toxinas liberadas por el microorganismo infeccioso (32-33). Entre las moléculas que están incluidas en el metabolismo de los flavonoides se encuentran los derivados de ácidos cinámicos, compuestos que al ser sintetizados pueden poseer diferentes longitudes de sus cadenas laterales hidrocarbonadas, y a esto se le asume diversidad en su capacidad antibacteriana (31-34)

#### **4.4 Actividad antibacteriana de los ácidos cinámicos y sus derivados**

Se ha demostrado que la capacidad antibacteriana que poseen los ácidos cinámicos es atribuida principalmente a sus grupos éster; Narasimhan y sus compañeros informaron de la actividad antibacteriana con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, junto a *Bacillus subtilis*, a su vez también se ha informado actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Entre los estudios presentados se expone a cinamato de isobutilo y el cinamato de dibromo por poseen una elevada actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivo y Gram negativo y a su vez, presentan una buena actividad antifúngica; el autor señala que el suplemento de halógenos a la cadena lateral, provocó un considerable aumento de su efecto inhibitor en el crecimiento bacteriano, en tanto, que la adición de grupos hidróxilo al doble enlace de la cadena lateral no producía mejoras en la actividad antibacteriana (5). Además de la efectiva acción antimicrobiana anteriormente descrita, los

derivados de ácidos cinámicos han demostrado distintas actividades farmacológicas de estos compuestos que se detallan a continuación, en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Derivados de ácidos cinámicos, con su estructura, efectos farmacológicos y mecanismos de acción (adaptación desde “*Cinamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities*”) (5).

S No.	Derivados de ácidos cinámicos	Estructura	Actividad farmacológica	Mecanismo de acción
1	Ácido trans-cinámico		Anti-TB, antiviral	Inhibe la transferencia de los ácidos micólicos, y el ciclo de la replicación viral
2	Ácido m-hidroxicinámico		Actividad antidiabético	Mejora consumo de glucosa periférica
3	Ácido p-metoxicinámico		Antidiabético Hepatoprotector Antihiperglicemiante Agente de filtro solar	Actividad agonista de PPAR, propiedad de absorción de UV.
4	Ácido 4-hidroxicinámico		Hepatoprotector	Inhibición de la actividad 5-lipoxygenasa
5	Ácido 4-clorocinámico		Actividad antifúngica	Alteración en la permeabilidad en la membrana fúngica
6	Ácido ferulico		Antioxidante, antidiabético	Inhibe la oxidación de LDL, actividad agonista de PPAR

## 4.5 Líquidos Iónicos

En los últimos años se ha incrementado significativamente el número de publicaciones relacionadas con los líquidos iónicos (LI) (35). 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 LI 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 ya que temperaturas superiores a esta, inducen su descomposición. Los LI 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 (36).

Algunas de las ventajas de los LI es que son estables. Líquidos a temperaturas por encima de la temperatura ambiente, no reaccionan o 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 LI 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 (37).

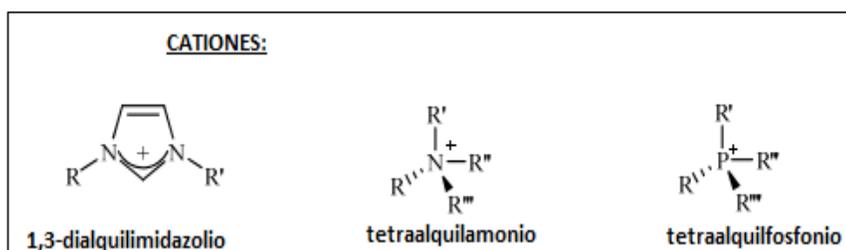
Se les considera disolventes verdes de diseño debido a que sus propiedades se pueden ajustar o modificar variando el catión y/o el anión, además de no generar emisiones contaminantes a la atmósfera.

#### **4.6 Estructura de los cationes**

Los LI más comunes son los derivados de cationes tipo alquilimidazolio, alquilamonio, alquifosfonio, *N*-alquilpiridinio o *N, N*-dialquilpirrolidinio, siendo los LI con cationes de tipo imidazolio los más estudiados ampliamente. Este tipo de cationes tienen una estructura electrónica con propiedades únicas en su anillo aromático, que podría describirse como una configuración de 4 electrones deslocalizados en 3 centros a lo largo del grupo N1-C2-N3, un doble enlace entre los carbonos 4 y 5, en el lado opuesto del anillo, y una deslocalización débil en el centro del anillo. Los átomos de hidrógeno en las posiciones 2, 4 y 5 soportan prácticamente la misma carga, pero el átomo de carbono en la posición 2 está cargado positivamente, debido al déficit electrónico en el enlace C=N, mientras que los

carbonos C-4 y C-5 son prácticamente neutros. Esto provoca que el átomo de hidrógeno en posición 2 tenga una acidez de Lewis alta (como resultado de la carga positiva deslocalizada), que es una de las claves para entender las propiedades de este tipo de LI. Además, la acidez de este átomo de hidrógeno en posición 2 favorece la formación de enlaces de hidrógeno (37-38).

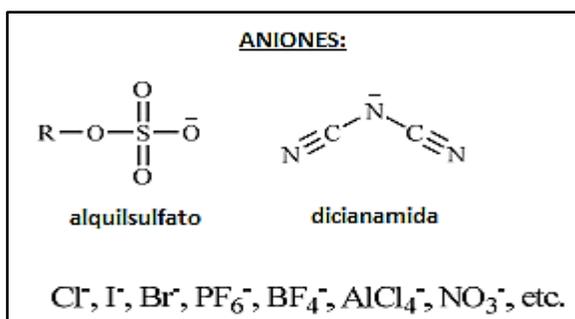
Por lo tanto, mediante el examen de las propiedades de una diversidad de LI basados en cationes imidazolio, se ha determinado que a medida que el tamaño y la asimetría aumentan, el punto de fusión disminuye. Además, un aumento en la ramificación en la cadena de alquilo aumenta el punto de fusión, éste es esencial, ya que representa el límite inferior del estado del líquido y la estabilidad térmica que entrega el intervalo de temperatura, en el cual es posible usarlos como disolventes (37). Algunos ejemplos se observan en la **figura 2**.



**Figura 2.** Estructuras de cationes más comunes en los LI.

## 4.7 Estructura de los aniones

Durante años, los LIs más utilizados y estudiados fueron aquellos basados en los aniones  $[\text{AlCl}_4]^-$ ,  $[\text{PF}_6]^-$  y  $[\text{BF}_4]^-$ . 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 ácido clorhídrico (HCl) o ácido fluorhídrico (HF). Por ejemplo, el hexafluorofosfato de 1-butilmetilimidazolio,  $[\text{C}_4\text{C}_1\text{Im}][\text{PF}_6]$ , se hidroliza completamente tras 8 horas cuando se calienta a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  en presencia de un exceso de agua, formándose HF y ácido fosfórico. También se ha observado la hidrólisis del anión tetrafluoroborato del tetrafluoroborato de 1-butilmetilimidazolio,  $[\text{C}_4\text{C}_1\text{Im}][\text{BF}_4]$ , en las mismas condiciones, aunque en una proporción menor (37). Se describe que 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 (39). Algunos ejemplos se observan en la **figura 3**.



**Figura 3.** Estructuras de los aniones más comunes en los LI.

Frecuentemente los LI pueden presentar un amplio espectro de actividad, afectando a bacterias Gram positivo y Gram negativo, como también a micobacterias y hongos, no obstante, la actividad antimicrobiana se rige por un equilibrio entre factores clave, que está definido por la arquitectura molecular de cada uno de los LI. Todo el mecanismo de acción antimicrobiano de los LI, es aún desconocido, sin embargo, comparten analogías estructurales con biocidas y tencioactivos catiónicos como, por ejemplo, el amonio cuaternario. Se ha visto, a su vez, que la actividad antimicrobiana de los LI, aumenta al aumentar la lipofilicidad, variante que se manipula al extender el sustituyente de la cadena alquílica, la concentración mínima inhibitoria (CMI), menor comúnmente reportada se encuentra en el rango de undecílico (C11) y hexadecílico (C16), en cuanto a las longitudes de cadena, revelando un posible equilibrio entre la lipofilia-hidrofilia, trascendental para la actividad antibacteriana de los LI. Este efecto se observó tanto para la concentración mínima inhibitoria (CMI), como la concentración mínima bactericida (CMB), tanto en bacterias Gram positivo como en Gram negativo (40).

La CMI se define como la concentración más baja de un líquido o agente antimicrobiano que es bacteriostático (evita el crecimiento visible de bacterias). Las CMI se utilizan para evaluar la eficacia antimicrobiana de diversos compuestos al medir el efecto de concentraciones decrecientes de antibiótico / antiséptico durante un período definido en términos de inhibición del crecimiento de la población microbiana. La CMB es la concentración más baja de un agente antibacteriano necesaria para matar una bacteria durante un período fijo, algo prolongado hasta 18 horas o 24 horas, bajo un conjunto específico de condiciones. Se puede determinar a partir de la dilución en caldo de las pruebas de CMI al subcultivar en placas de agar que no contienen el agente de prueba. El CMB se identifica al determinar la concentración más baja de agente antibacteriano que reduce la viabilidad del inóculo bacteriano inicial en una reducción predeterminada, tal como  $\geq 99.9\%$ . La CMB es complementaria a la CMI; mientras que la prueba CMI demuestra el nivel más bajo de agente

antimicrobiano que inhibe en gran medida el crecimiento, el CMB demuestra el nivel más bajo de agente antimicrobiano que resulta en la muerte microbiana (41).

En resumen, las propiedades físicas y químicas de los LI están determinadas por la combinación de los cationes y aniones que los constituyen. Gracias al gran número de aniones y cationes que pueden emplearse para sintetizar LI, y conociendo cómo sus estructuras afectan a sus propiedades, es posible llegar a sintetizar un líquido iónico con las propiedades físicas deseadas, lo que convierte al término “disolventes de diseño” en apto y justificado.

#### **4.8 Medios de cultivo**

En la actualidad, existen 7 medios de cultivo diferentes con el fin de recuperar *S. mutans*. Estos son: Agar Mitis Salivarius (MSA), Agar Mitis Salivarius-Bacitracina (MSB), Agar Mitis Salivarius Kanamicina-Bacitracina (MSKB), Agar Mitis Salivarius Bacitracina-Sulfisoxazol (MS-MUT), Agar Trypticase Soya Extracto de levadura-Sucrosa-Bacitracina (TYS20B) (medios referenciados como selectivos), Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) (medio enriquecido) y Agar Todd Hewitt (TH) (medio selectivo para Streptococcus). (42).

El medio MSB, suplementado con glucosa al 10%, es uno de los medios cuantitativos más frecuentemente utilizado para el recuento de *S. mutans*, por ser altamente selectivo y por

permitir el fácil reconocimiento de las cepas formadoras de glicocálix (43). Cuando se observan macroscópicamente las colonias de *S. mutans* son fácilmente reconocibles al ser sembradas en este agar. Son colonias convexas, de color azul, borde transparente y consistencia dura, que no pueden ser disgregadas cuando se manipulan con un asa de platino. En las colonias productoras de glicocálix, esta estructura se encuentra rodeando a cada colonia, adquiriendo un aspecto característico de mucosidad brillante, semejante a una gota de agua que la rodea (44-45).



**Figura 4.** Colonia de *S. mutans* en agar mitis salivarius con bacitracina (MSB). Fuente: Singla N. 2014. (45)

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana y antibiofilms de sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio con diferentes longitudes de cadena, frente a muestras de *Streptococcus mutans* de pacientes donadas desde del Departamento de Cariología de la Universidad de Talca.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 3 sales derivadas de *N*-cinamilimidazolio sintetizadas con diferentes longitudes de cadena, frente a muestras de *Streptococcus mutans* de pacientes donadas desde del laboratorio de Cariología de la Universidad de Talca.
- Comparar la actividad antibiofilm de 3 sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio sintetizadas con diferentes longitudes de cadena, frente a biofilms producidos por las muestras de *Streptococcus mutans* de pacientes donadas desde del laboratorio de Cariología de la Universidad de Talca.

## **6. MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 Cepas bacterianas de *S. mutans***

Las cepas bacterianas utilizadas fueron proporcionadas por el laboratorio de Cariología de la Universidad de Talca, estaban tipificadas con anterioridad y previamente aisladas en tubos Eppendorf con leche descremada al 20%. Se sembraron 20 muestras y se seleccionó al azar 10 de ellas. Estas cepas, una vez reactivadas y confirmadas según características propias de las colonias, tinción de Gram y pruebas bioquímicas como bilis esculina y ureasa. (46). Las cepas se mantuvieron en tubos Eppendorf con leche descremada al 20%, congeladas a -20°C.

### **6.2 Medio de cultivo y viabilización de cepas bacterianas de *S. mutans***

El medio de cultivo elegido para los ensayos con *S. mutans* fue MSB (Difco) (43). El cual fue modificado en tres de sus componentes: se añadió sacarosa al 10%, bacitracina 200 UI/ml como agente antibiótico selectivo y telurito de potasio al 3,5 %. La bacitracina es un antibiótico que inhibe el crecimiento de los streptococcus orales, excepto *S. mutans* (44). A este medio denominaremos MSB suplementado.

Para el crecimiento bacteriano se tomaron de 2 a 3 asadas de colonias desde los crioviales, para luego ser sembradas en placas de agar de MSB suplementado e incubados a 37°C por 48 horas, las placas fueron depositadas en jarras anaeróbicas (Merk) con un sobre generador de ambiente anaeróbico (AnaeroGen de Oxoid) y un marcador de anaerobiosis (Anaer Indicator bio-Mérieux), con el fin de crear y verificar las condiciones ambientales que mejoran el crecimiento de los *S. mutans*. Los caldos fueron incubados a 37°C en una estufa Pasteur (Memmert 300 GrimbH-Co.KG) por 72 horas; las placas fueron incubadas en las mismas condiciones por un tiempo de 48 horas.

### **6.3 Preparación del medio MSB suplementado**

El medio MSB fue suplementado con sacarosa al 10%, bacitracina 200 UI/ml y telurito de potasio al 3,5 %.

La preparación placas con medio MSB se realizó en una etapa previa al cultivo de las muestras, la fórmula que se utilizó para 1 litro de medio fue la siguiente:

- Se suspendió 90 g del Agar Mitis Salivarius (MS) de Difco, en 900 ml de agua destilada y se autoclavó a 121° durante 15 minutos.
- Se pesó 10 g de sacarosa (marca) y se disolvió en 100 ml de agua destilada, agitando constantemente por aproximadamente 1 minuto. Una vez que el medio tuvo una temperatura adecuada e impedir que se caramelizara la sacarosa, se agregó a los 900 ml del medio previamente autoclavado. Para esto, se utilizó un filtro de membrana de 0,22µm.
- Se adicionó 1 ml de telurito de potasio (marca) 3,5 %, utilizando un filtro de membrana de 0,22 µm.
- Posteriormente se agregó 1 ml de bacitracina (marca) 200 UI/ml.

- Finalmente, se plaqueó rápidamente en condiciones estériles, utilizando aproximadamente 20 ml por placa Petri.

Las placas con medio MSB más suplementos obtenidas, se almacenaron en el laboratorio de microbiología de la universidad de Talca, a una temperatura de 4°C, hasta ser utilizadas.

#### **6.4 Sales derivadas de *N*- cinamilimidazolio**

Los LI fueron sintetizados por el Dr. Luis Guzman Jofre y donados por el Instituto de química de la Universidad de Talca, a partir de las sales de *N*- cinamilimidazolio ([CMIM]Cl) con un peso molecular de 234,09 g/mol, *N*-Cinamil-octilimidazol ([COIM]Cl) con un peso molecular de 332,20 g/mol y *N*-Cinamil-decilimidazol ([CDIM]Cl) con un peso molecular de 360,23 g/mol; fueron identificados por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y reconstituidos a una concentración de 2 mM o 4 mM dependiendo del ensayo.

#### **6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La actividad antibacteriana de los LI fue evaluada mediante el ensayo de microdilución en placa de 96 pocillos, técnica adaptada de la metodología descrita por Eloff y cols. (1998) (46). El inóculo bacteriano se obtuvo mediante incubación de los microorganismos en caldo de cultivo BHI suplementado con sacarosa al 1% (100 µl por pocillo), durante 24 horas, ajustándose a una concentración final de  $10^4$  –  $10^5$  UFC/ml según densidad óptica (D.O). Los LI fueron solubilizados en suero fisiológico estéril, ajustando sus

concentraciones a un volumen final de pocillo correspondiente a 100  $\mu$ l, el cual se diluyó sucesivamente con caldo BHI. Las concentraciones finales ensayadas 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 el ([CMIM]CI), 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM, 0,03125 Mm, 0,015625 mM y 0,0078125 mM para el ([COIM]CI) y las concentraciones utilizadas para ([CDIM]CI) fueron 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM, 0,03125 mM, 0,015625 mM, 0,0078125 mM y 0,003906 mM. Dentro de cada placa fueron incluidos el control de crecimiento bacteriano, 10  $\mu$ l de la suspensión bacteriana de 0,5 McFarland diluido 1/10 (control positivo) y control del medio de cultivo (control negativo). Las placas fueron incubadas durante 18 horas en capnofilia (10% de CO<sub>2</sub>) a 37°C, en agitación constante. La viabilidad de los microorganismos se determinó a través de la adición de 20  $\mu$ l 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 3-4 horas a 37°C en capnofilia , revelando viabilidad bacteriana los pocillos de coloración rojiza, mientras que los pocillos incoloros denotaban una efectiva acción antibacteriana del LI; cabe mencionar que para realizar cálculos posteriores, se efectuaron mediciones de absorbancia a 600 nm, en el lector de placas Tecan Infinite® 200 Pro.

## **6.6 Cuantificación de biofilm estático en placa de microtitulación**

Para la determinación de la actividad inhibitoria de biofilm, por parte de los LI, sobre 10 muestras de *Streptococcus mutans* previamente aisladas, del total de muestras donadas por el laboratorio de Cariología de la Universidad de Talca, se realizó un ensayo en placas de microtitulación para 96 pocillos, donde se vertieron a cada pocillo en estudio 100  $\mu$ l de caldo BHI, suplementado con sacarosa al 10% y a continuación 100  $\mu$ l de LI correspondiente y finalmente 10  $\mu$ l de la suspensión bacteriana 0,5 McFarland, diluida en una relación 1:10

con el medio, esperando un tiempo de incubación de 18 horas a 37°C en capnofilia para la producción de biofilms. Para evaluar formación de biofilms, se añadieron 20 µl de solución de cristal violeta al 0,1% (pre-filtrada a través de un filtro de 0,44 µm) a cada pocillo y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, metodología descrita por Eloff y cols. (1998) (47) y adaptada por Edsont Gutiérrez en su tesis de grado, en el año 2017 (48). Para evaluar el crecimiento planctónico y para eliminar bacterias no adheridas, los pocillos se lavaron con tampón PBS tres veces y se dejó secar las placas durante 15 minutos, para posteriormente añadir 100 µl de etanol al 98% a cada pocillo teñido, permitiendo que la tinción solubilizara el colorante durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se mezcló por un tiempo breve el contenido de cada pocillo pipeteando y se analizó la coloración obtenida.

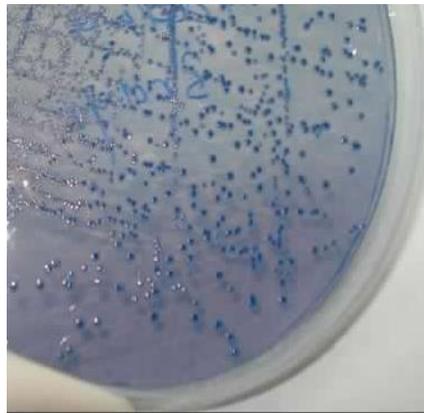
Para los análisis cuantitativos se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero se trabajó solo con cuatro concentraciones: 1 [mM], 0,5[mM], 0,1 [mM] y 0,0625 [mM], midiendo la densidad óptica (DO) de cada una de estas muestras de 100 µl a una longitud de onda de 600 nm, en el lector de placas Tecan Infinite® 200 Pro.

## **6.7 Análisis estadístico**

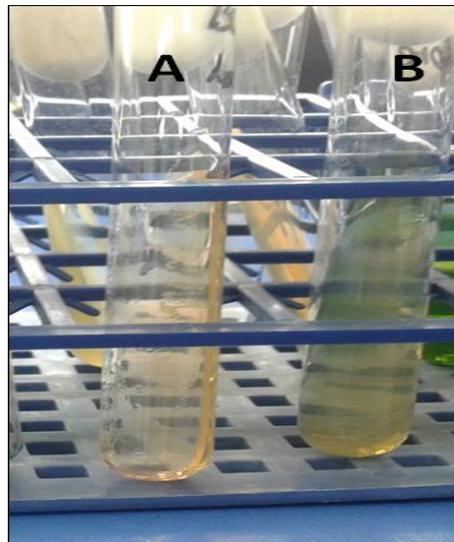
Los datos obtenidos en esta investigación, se recuperaron de experimentos por cuadruplicado. Se utilizó el Programa computacional *GraphPad Prism 6.01* determinado la media aritmética con desviación estándar, aplicando test de ANOVA de una vía, se consideraron resultados estadísticamente significativos aquellos con un valor  $p < 0,05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Medio de cultivo y viabilización de cepas bacterianas de *S. mutans*



**Figura 5.** Colonia de *S. mutans* en medio de cultivo MSB suplementado.



**Figura 6.** Pruebas bioquímicas para *S. mutans* (urea y bilis esculina). **A.** Urea negativa. **B.** Bilis esculina negativa.

## 7.2

### Determinación de la CMI

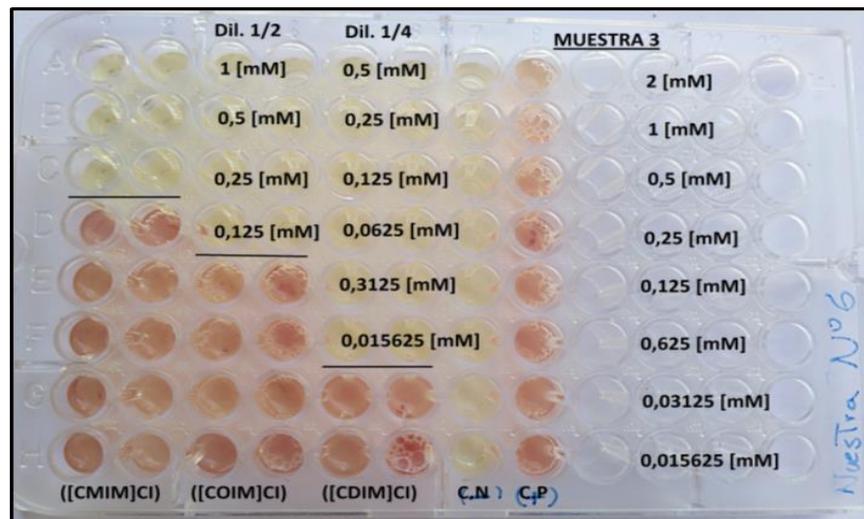
Se puede observar desde la figura 4 a la figura 13, las placas de 96 pocillos que se utilizaron para la cuantificación de la CMI mediante la técnica de microdilución en caldo BHI, suplementado con sacarosa al 10% incubadas durante 18 horas, al cual se le agregó 2,3,5-trifeniltetrazolio o simplemente cloruro de tetrazolio, indicador redox, previa incubación por 3 horas a 37°C en capnofilia, para ser revelada posteriormente. Estas corresponden desde la muestra N°1 a la muestra N°10 respectivamente. La posición de los líquidos iónicos se pueden observar de izquierda a derecha por duplicado en el siguiente orden: *N*-Cinamil-metilimidazol ([CMIM]Cl) (columna 1 y 2), *N*-Cinamil-octilimidazol ([COIM]Cl) (columna 3 y 4) y *N*-Cinamil-decilimidazol ([DCIM]Cl) (columna 5 y 6); además se adicionó la columna 7 como control negativo (C.N) y como control positivo (C.P) la columna 8, el control negativo consistió solo en caldo BHI suplementado con sacarosa al 10% y el control positivo contenía en caldo BHI suplementado con sacarosa al 10%, más suspensión bacteriana de *S. mutans*. Encima de cada pocillo se puede ver las concentraciones de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazol. En cuanto a las CMI, están señaladas con una línea negra, para cada sal derivada del *N*-cinamilimidazol y su duplicado. Se observa en todas las muestras que la mayor CMI corresponde al *N*-Cinamil-metilimidazol ([CMIN]Cl) y la menor CMI corresponde al derivado de cadena alquílica más larga, de 10 carbonos ([DCIM]Cl).

La viabilidad de la cepa de *S. mutans* se evaluó de manera cualitativamente mediante el cambio de color en los pocillos que produjo el indicador redox correspondiente a 2,3,5-trifeniltetrazolio, virando desde el color amarillo correspondiente al medio (sin viabilidad bacteriana), al rojo (viabilidad bacteriana) tal como se muestra desde la **figura 7** hasta la **figura 16**. Los resultados de la CMI de cada sal derivada del *N*-Cinamil-imidazol desde la muestra N°1 hasta la muestra N°13 se presentan en la **tabla 2**. Se observó que a medida

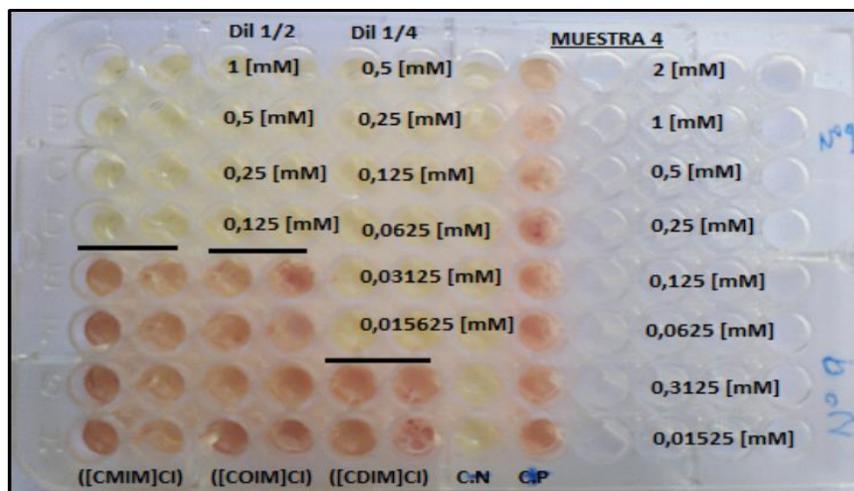




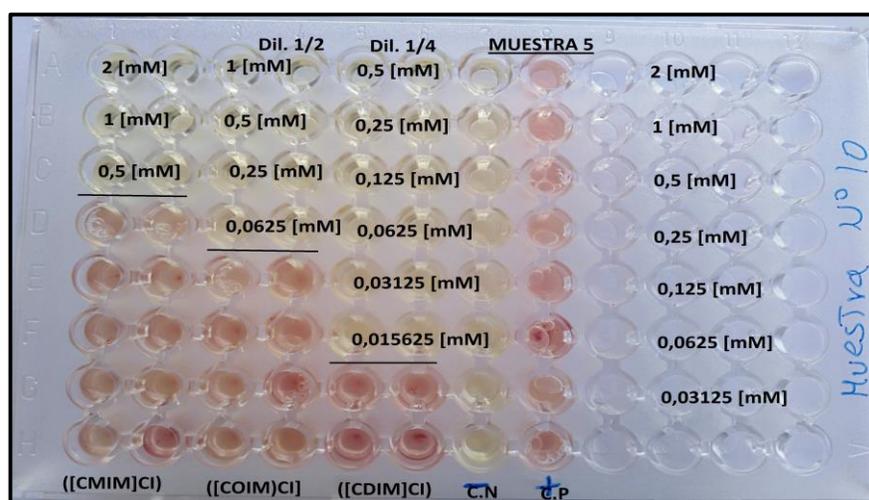
**Figura 8.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°2 de *S. mutans*. ([CMIM]): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]Cl): *N*-Cinamil-octilimidazol ([COIM]Cl) y *N*-Cinamil-decilimidazol ([DCIM]Cl), C.N: control negativo, C.P: control positivo.



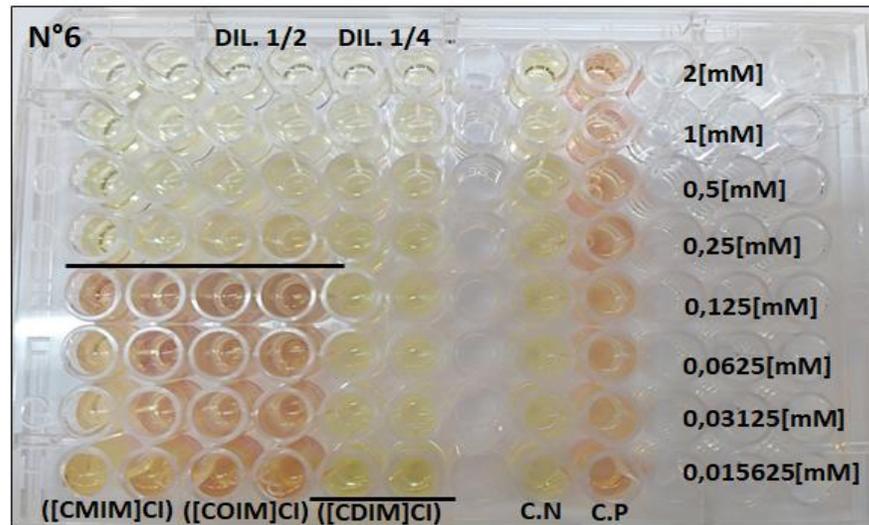
**Figura 9.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°3 de *S. mutans*. ([CMIM]): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]Cl): *N*-Cinamil-octilimidazol ([COIM]Cl) y *N*-Cinamil-decilimidazol ([DCIM]Cl), C.N: control negativo, C.P: control positivo.



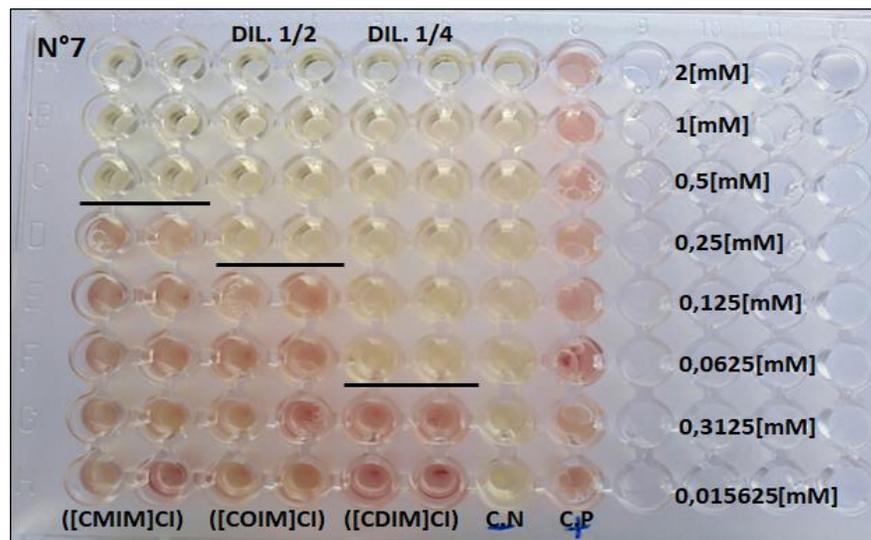
**Figura 10.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°4 de *S. mutans*. [(CMIM)]: *N*-Cinamil-metilimidazol, [(COIM)Cl]: *N*-Cinamil-octilimidazol [(COIM)Cl] y *N*-Cinamil-decilimidazol [(DCIM)Cl], C.N: control negativo, C.P: control positivo.



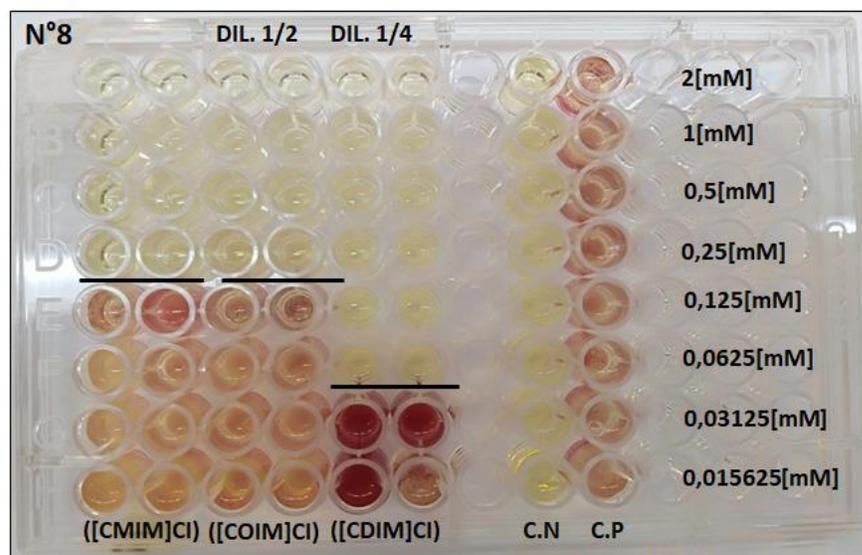
**Figura 11.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°5 de *S. mutans*. [(CMIM)]: *N*-Cinamil-metilimidazol, [(COIM)Cl]: *N*-Cinamil-octilimidazol [(COIM)Cl] y *N*-Cinamil-decilimidazol [(DCIM)Cl], control negativo (C.N), control positivo (C.P).



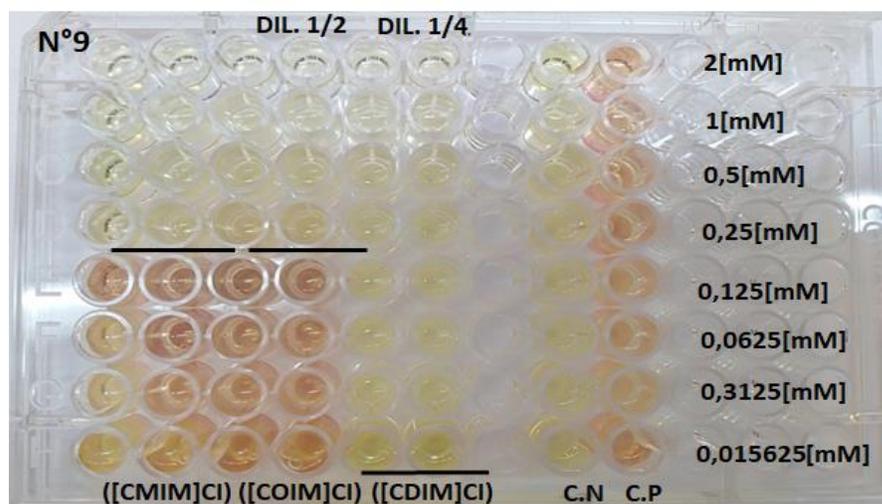
**Figura 12.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°6 de *S. mutans*. [(CMIM)]: *N*-Cinamil-metilimidazol, [(COIM)Cl]: *N*-Cinamil-octilimidazol [(COIM)Cl] y *N*-Cinamil-decilimidazol [(DCIM)Cl], C.N: control negativo, C.P: control positivo.



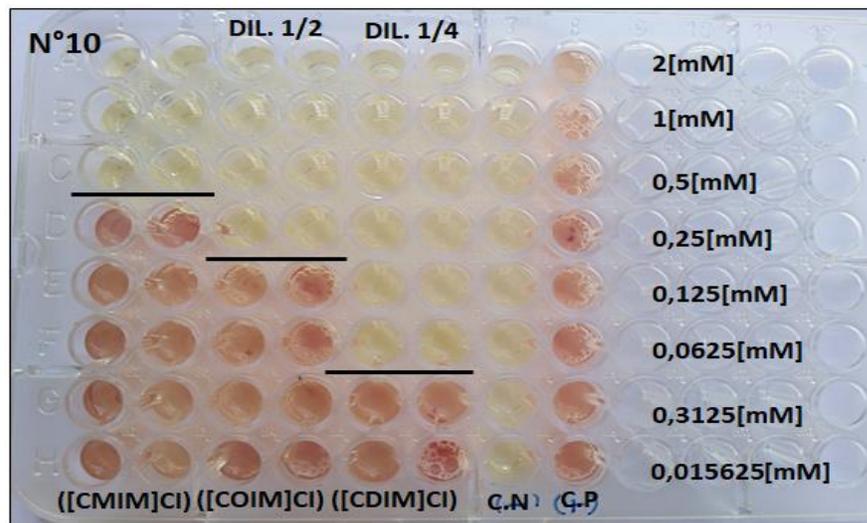
**Figura 13.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°7 de *S. mutans*. [(CMIM)]: *N*-Cinamil-metilimidazol, [(COIM)Cl]: *N*-Cinamil-octilimidazol [(COIM)Cl] y *N*-Cinamil-decilimidazol [(DCIM)Cl], C.N: control negativo, C.P: control positivo.



**Figura 14.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°8 de *S. mutans*. [(CMIM)]: *N*-Cinamil-metilimidazol, [(COIM)Cl]: *N*-Cinamil-octilimidazol [(COIM)Cl] y *N*-Cinamil-decilimidazol [(DCIM)Cl], C.N: control negativo, C.P: control positivo.



**Figura 15.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°9 de *S. mutans*. [(CMIM)]: *N*-Cinamil-metilimidazol, [(COIM)Cl]: *N*-Cinamil-octilimidazol [(COIM)Cl] y *N*-Cinamil-decilimidazol [(DCIM)Cl], C.N: control negativo, C.P: control positivo.



**Figura 16.** Microdilución en caldo utilizada para la determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en la muestra N°10 de *S. mutans*. ([CMIM]): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]CI): *N*-Cinamil-octilimidazol ([COIM]CI) y *N*-Cinamil-decilimidazol ([DCIM]CI), C.N: control negativo, C.P: control positivo.

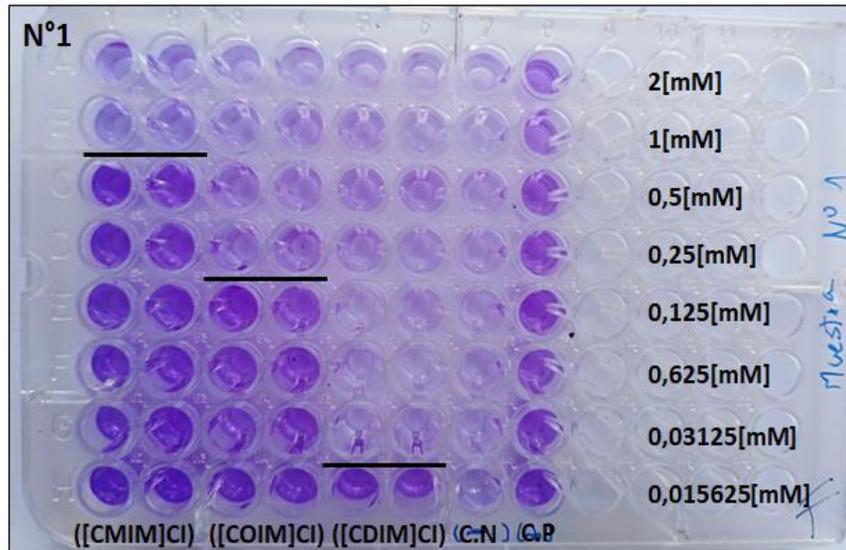
**Tabla 2.** Determinación de la CMI de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio en muestras de *S. mutans*, mediante microdilución en caldo.

N° muestras	Derivado de N-cinamilimidazolio		
	([CMIM]CI)	([COIM]CI)	([CDIM]CI)
1	0,5[mM]	0,25[mM]	0,03125[mM]
2	0,5[mM]	0,0625[mM]	0,01562[mM]
3	0,5[mM]	0,125[mM]	0,01562[mM]
4	0,25[mM]	0,125[mM]	0,01562[mM]
5	0,5[mM]	0,0625[mM]	0,01562[mM]
6	0,25[mM]	0,125[mM]	<0,01562[mM]
7	0,5[mM]	0,125[mM]	0,01562[mM]
8	0,25[mM]	0,125[mM]	0,01562[mM]
9	0,25[mM]	0,125[mM]	<0,01562[mM]
10	0,25[mM]	0,125[mM]	0,01562[mM]

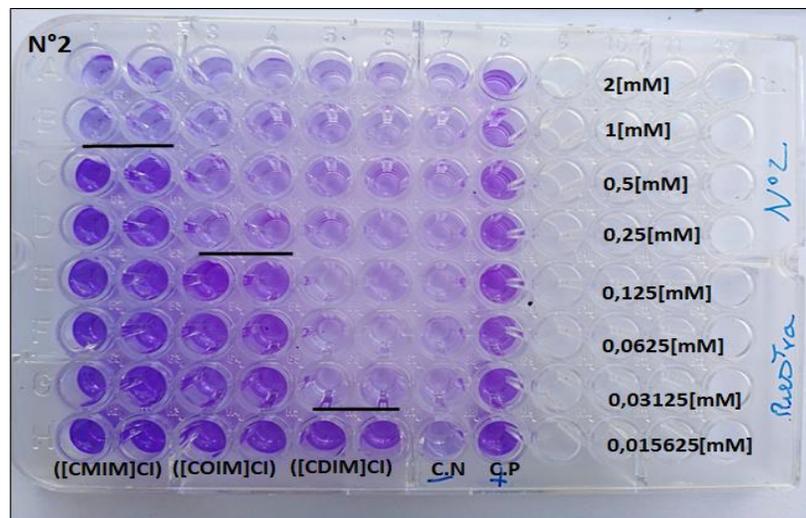
## 7.2

### Cuantificación de la actividad antibiofilm

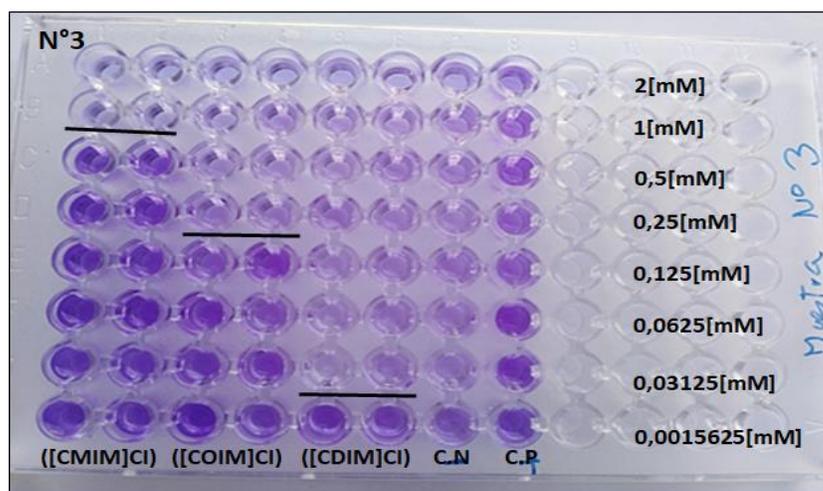
La cuantificación de la actividad antibiofilm se evidenció desde la **figura 17** hasta la **figura 26**, donde se muestran las placas de 96 pocillos en las cuales se realizó la microdilución en caldo BHI, suplementado con sacarosa al 10% y posteriormente fue revelada la formación de biofilm con tinción de cristal violeta al 0,1%. Las placas se cargaron por duplicado de izquierda a derecha con los derivados de *N*-cinamilimidazol, en el siguiente orden: *N*-Cinamil-metilimidazol ([CHIM]CI) (columna 1 y 2), *N*-Cinamil-octilimidazol ([COIM]CI) (columna 3 y 4) y *N*-Cinamil-decilimidazol ([DCIM]CI) (columna 5 y 6); además se adicionó la columna 7 como control negativo (C.N), el cual solo tenía caldo BHI suplementado con sacarosa al 10% y como control positivo (C.P) se utilizó la columna 8, que corresponde al caldo BHI más sacarosa al 10% y una suspensión bacteriana de *S. mutans*; en la porción derecha se puede observar las concentraciones de los derivados del *N*-Cinamilimidazol de arriba hacia abajo en forma decreciente, además se señala mediante una línea de color negro, el punto de corte que determina donde aumenta y disminuye la formación de biofilm,. Observándose de manera proporcional que a medida que aumenta el largo de la cadena alquílica en las sales, aumenta la inhibición en la formación de biofilm que produce *S. mutans*. Podemos observar de manera cualitativa mediante un aumento en la coloración con cristal violeta, de esta forma en el caso del ([CMIN]CI) se aprecia un aumento en la concentración de 0,5 mM; para el (COIM)CI se observa en la concentración de 0,125 mM y finalmente en el caso de la sal ([CDIM]CI) se evidenció el aumento en 0,015625 mM. No se observó una diferencia significativa entre las 10 muestras estudiadas (Figura 17-26).



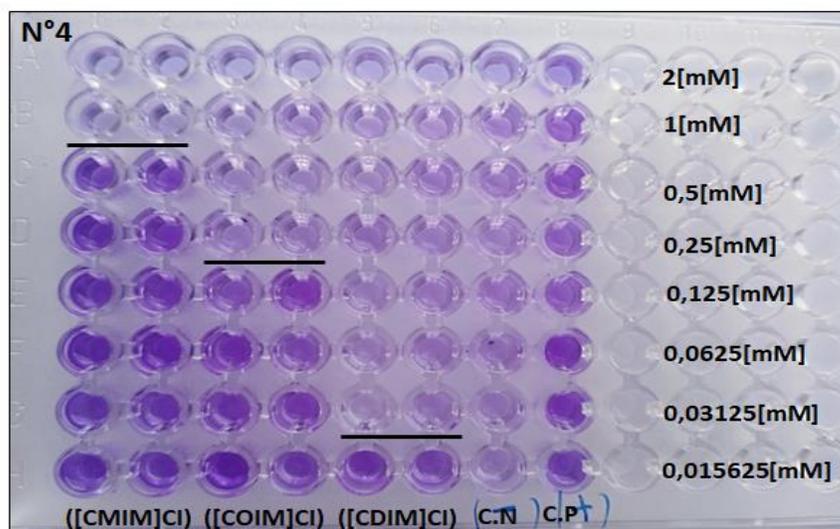
**Figura 17.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 1 de *S. mutans*. (([CHIM]CI): *N*-Cinamil-metilimidazol, (([COIM]CI): *N*-Cinamil-octilimidazol, (([CDIM]CI): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



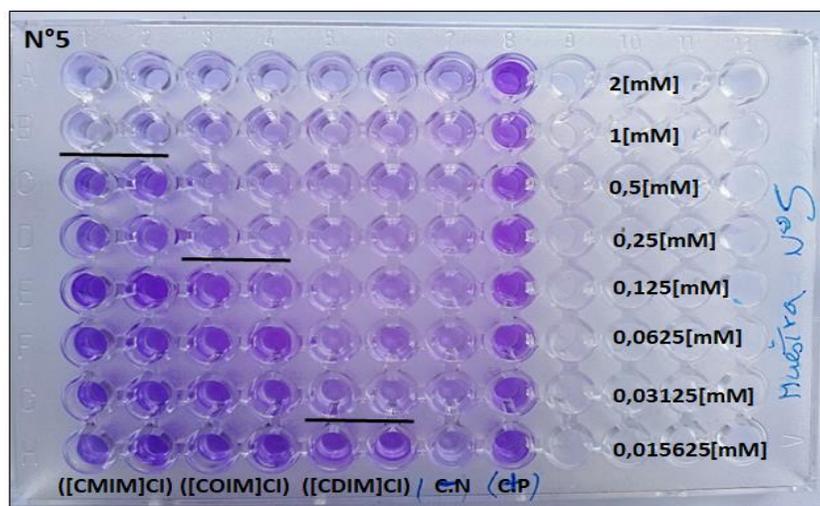
**Figura 18.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 2 de *S. mutans*. (([CHIM]CI): *N*-Cinamil-metilimidazol, (([COIM]CI): *N*-Cinamil-octilimidazol, (([CDIM]CI): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



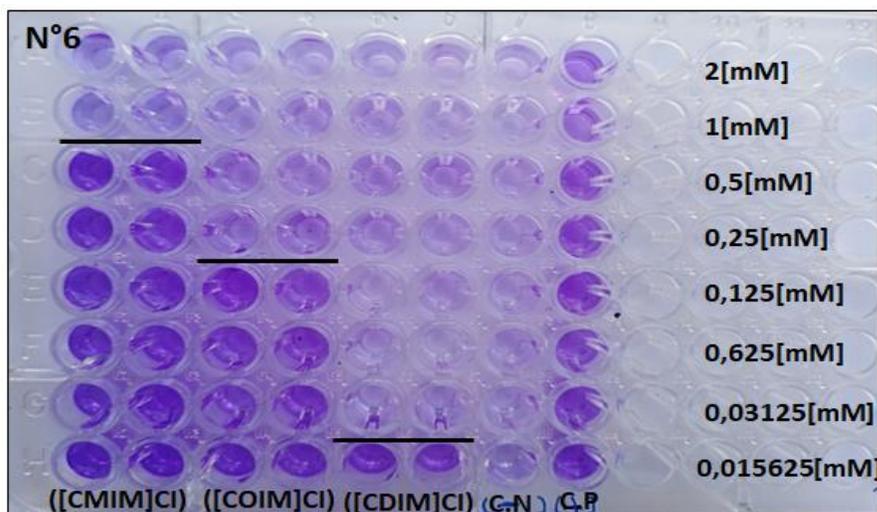
**Figura 19.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 3 de *S. mutans*. ([CMIM]Cl): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]Cl): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]Cl): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



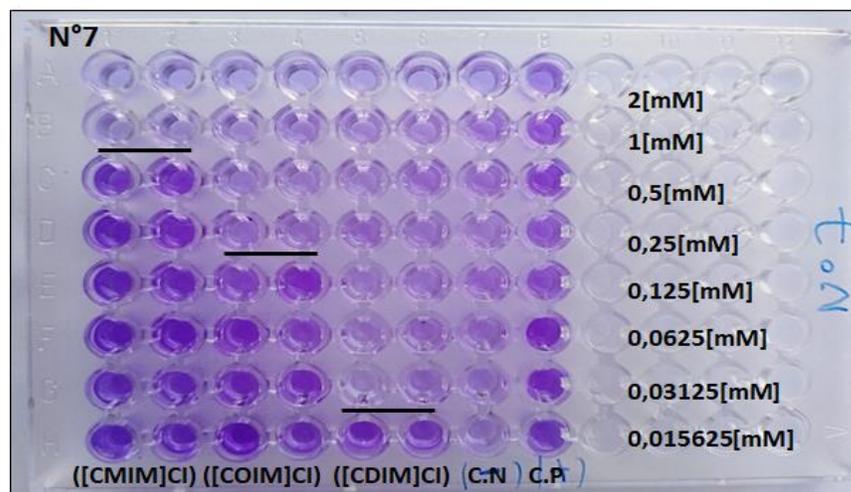
**Figura 20.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 4 de *S. mutans*. ([CMIM]Cl): *N*-Cinamil-metilimidazol), ([COIM]Cl): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]Cl): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



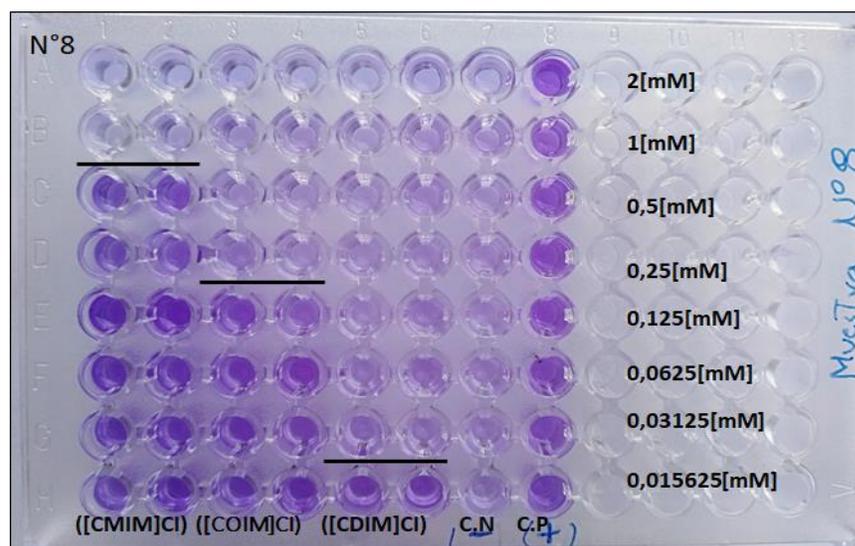
**Figura 21.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 5 de *S. mutans*. ([CMIM]Cl): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]Cl): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]Cl): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



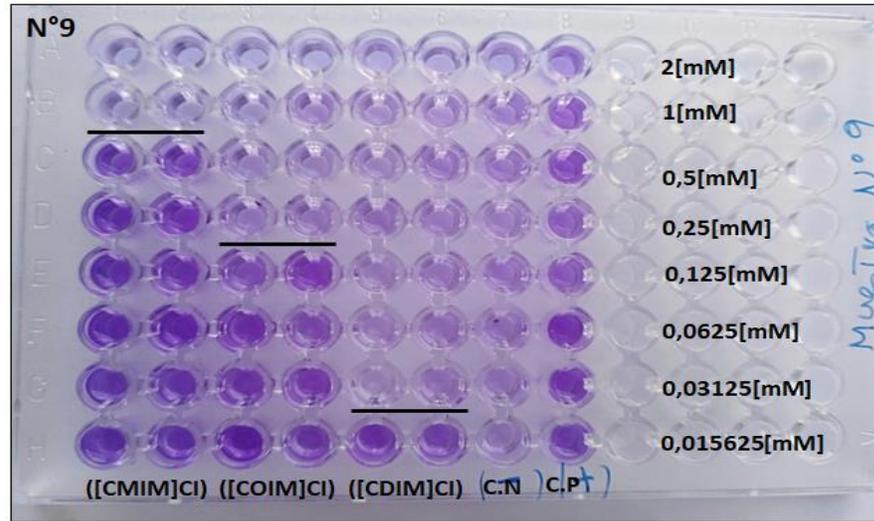
**Figura 22.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 6 de *S. mutans*. ([CMIM]Cl): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]Cl): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]Cl): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



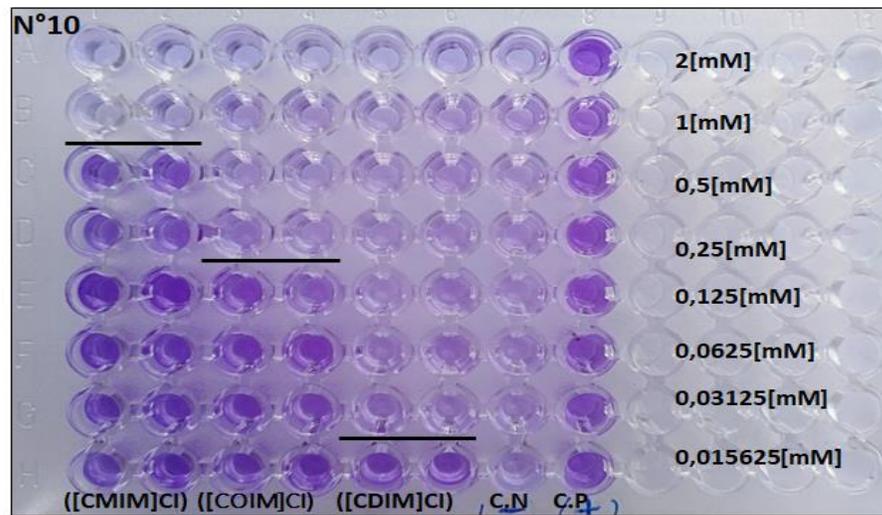
**Figura 23.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 7 de *S. mutans*. ([CMIM]CI): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]CI): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]CI): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



**Figura 24.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 8 de *S. mutans*. ([CMIM]CI): *N*-Cinamil-metilimidazol, ([COIM]CI): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]CI): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.

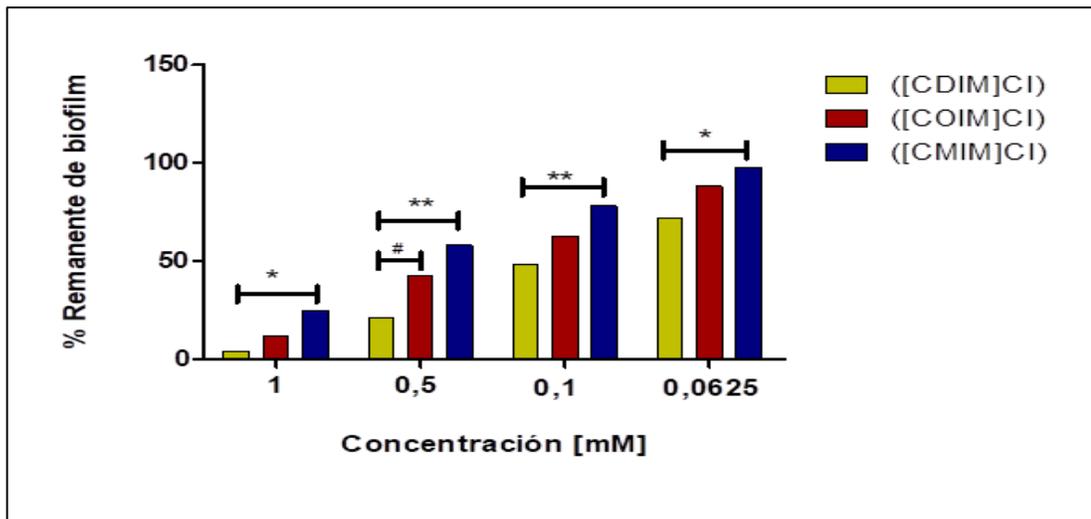


**Figura 25.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 9 de *S. mutans*. ([CMIM]CI): *N*-Cinamil-metilimidazol), ([COIM]CI): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]CI): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.



**Figura 26.** Microdilución en caldo utilizada para la cuantificación del biofilm estático de la muestra N° 10 de *S. mutans*. ([CMIM]CI): *N*-Cinamil-metilimidazol), ([COIM]CI): *N*-Cinamil-octilimidazol, ([CDIM]CI): *N*-Cinamil-decilimidazol, C.N: control negativo, C.P: control positivo.

En la **Figura 27**, se observan los resultados de la cuantificación del biofilm estático sintetizado por *S. mutans*. expresado como porcentajes de absorbancia a 600 nm, equivalente al porcentaje remanente de biofilm, con respecto a los controles positivos, antes tratados con tinción de cristal violeta al 0.1%, posteriormente lavados con suero fisiológico al 0,9% y finalmente la solubilización del colorante con etanol al 98%. Tras los resultados, se puede determinar que a medida la concentración de las sales derivadas del *N*-Cinamilimidazolio disminuye, la concentración del biofilm sintetizado por *S. mutans* aumenta, expresado como absorbancia relativa. Los resultados de la aplicación del Test de ANOVA demostró que, en las distintas concentraciones, de las sales derivadas del *N*-Cinamilimidazolio existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas en cuanto a la actividad antibiofilm, principalmente entre ([CMIM]CI) y ([CDIM]CI). La mayor actividad antibiofilm se evidencia claramente en la concentración mayor (1 mM) estudiada (**Figura 27**).



**Figura 27.** Gráfico: Media de las concentraciones de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio [mM] v/s porcentaje remanente de biofilm, representativo de la actividad antibiofilm que poseen las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio sobre 10 muestras de *S. mutans*. \*  $p < 0,05$  ([CDIM]CI) vs ([CMIM]CI) a 1 [mM]; #  $P < 0,01$  ([CDIM]CI) vs ([COIM]CI) y \*\* $P < 0,01$  ([CDIM]CI) vs ([CMIM]CI) ambas a 0,5 [mM]; \*\* $p < 0,01$  ([CDIM]CI) vs ([CMIM]CI) a 0,1 [mM] y \* $p < 0,05$  ([CDIM]CI) vs ([CMIM]CI) a 0,0625 [mM].

## 7. DISCUSIÓN

La caries dental es una de las patologías crónicas más prevalentes a nivel mundial. Según estimaciones publicadas en el estudio sobre la carga mundial de morbilidad 2016, las enfermedades bucodentales afectan a la mitad de la población mundial (3580 millones de personas), y la caries dental en dientes permanentes es el trastorno más prevalente. Se estima que la periodontopatía grave, que pueden ocasionar pérdidas de dientes, es la undécima enfermedad más prevalente en el mundo (56). La caries dental se presenta desde los primeros años de vida y presenta un importante incremento con la edad. Según estudios nacionales disponibles, a los 2 años la prevalencia de caries es de un 17,5%, de 49,6% a los 4 años y de 70,4% a los 6 años. La prevalencia de caries a los 12 años es de 62,5%, aumentando con la edad hasta llegar a un 99,4% en adultos de 65 a 74 años (57).

Su aparición se debe a la interacción de cuatro factores: huésped, microorganismos, dieta y tiempo. El desarrollo de problemas dentales ocasionados por el incremento de la colonización bucal por parte de *Streptococcus mutans*, origina un riesgo de desarrollar complicaciones tras un procedimiento odontológico invasivo, entre ellas y una de las más grave, endocarditis. Esto debido a la capacidad de esta bacteria de producir biofilm y sumado a la adquisición de resistencia frente a determinados agentes antibacterianos, que puede obtener con el paso de los años. Es esta la principal razón que a través del uso LI, se pretende incorporar nuevas alternativas antibióticas, a las ya existentes.

Existen diversas investigaciones que señalan como protagonista a *S. mutans* en el desarrollo de la caries dental. Uno de los principales mecanismos en la formación del biofilm que tiene esta bacteria y responsable del proceso cariogénico es el glicocálix. Esta estructura se encuentra dispuesta como una capa extracelular que promueve la adhesión bacteriana a la superficie de la pieza dental (17).

Por años ha surgido la necesidad de contrarrestar esta situación en la población a nivel mundial, utilizando diferentes mecanismos antibacterianos que faciliten el tratamiento de las infecciones de la cavidad oral, evitando afecciones comunes como la caries dental y otras más complejas como bacteriemia y endocarditis, asociadas al grupo *viridans* el cual pertenece *S. mutans*. Pero a su vez evitar o reducir la resistencia antimicrobiana, es por esta razón que se ha profundizado en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas con ciertas moléculas, con el fin de producir un efecto bactericida o antibiofilm, que inhiba la proliferación de estos microorganismos en el ser humano. Diversos estudios se han enfocado en las propiedades de los flavonoides, compuestos en el cual se han evidenciado efectos benéficos en distintas enfermedades, entre ellas las cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (33). Entre las moléculas que están incluidas en el metabolismo de los flavonoides se encuentran los derivados de ácidos cinámicos, compuestos que al ser sintetizados pueden poseer diferentes longitudes de sus cadenas laterales hidrocarbonadas, y a esto se le asume diversidad en su capacidad antibacteriana (5).

En el presente trabajo se evaluó en condiciones anaerobias la actividad antibacteriana y antibiofilm de las sales derivadas del *N*-cinamilimidazolio, frente a muestras de pacientes donde se aisló *Streptococcus mutans*, éstas fueron donadas por del laboratorio de Cariología de la Universidad de Talca, de acuerdo a los resultados obtenidos, se logró determinar un aumento de ambas actividades, conforme aumentaba el largo de la cadena alquímica.

En el ensayo de microdilución en caldo, la cuantificación de la CMI evidenció una correlación directa entre el largo de la cadena y la actividad antibacteriana; se observó que el ([CDIM]CI) es el derivado con la cadena alquímica más larga, formado con una cadena de 10 carbonos, presentó una actividad antibacteriana de 32 veces mayor que el derivado

(CMIM]CI) que posee la cadena alquílica más corta y si se compara la actividad de ([COIM]CI) que tiene una cadena formada con 8 carbonos, su actividad fue 8 veces mayor que la de ([CMIM]CI). Publicaciones de diferentes investigadores, como Carson y cols. (2009) que analizaron el largo en la cadena alquílica unida al catión imidazolio y su variabilidad en la actividad antibacteriana; también Gindri y cols (2014) que estudiaron al catión imidazolio variando la cantidad de cationes y el largo de la cadena alquílica y dentro de las investigaciones más reciente, Brunel y cols (2016) sintetizaron nuevos líquidos iónicos (LI) con el catión de fosfonio derivados de la trifenilamina; todos con la finalidad de determinar la actividad antibacteriana de los LI frente a bacterias Gram positivo y bacterias Gram negativo, llegando todos a la determinación que las bacterias Gram positivo presentan una mayor susceptibilidad frente a estos líquidos (49-51). Una conclusión de suma importancia que realizaron Gindri y cols. (2014) fue que los LI que presentaban una cadena alquílica más larga y en presencia de un solo catión imidazolio, presentaban una mayor actividad antibacteriana (49), concordando con los resultados entregados en esta investigación.

Si nos referimos al ensayo de biofilm estático, se apreció un efecto similar a la actividad antibacteriana, sin embargo, se observó que fue menos eficaz la actividad antibiofilm que presentaron las sales derivadas del N-Cinamilimidazolio en estudio, ya que, a diferencia del estudio destinado a la CMI, se evidencio una mayor efectividad inhibitoria del biofilm estático, debido que la concentración del LI fue mayor en una dilución menos.

Estudios realizados recientemente, en el cual se verifica la actividad antibiofilm que poseen los LI, mostraron resultados semejantes a los obtenidos en esta investigación, pese a no utilizar los mismos LI, ni tampoco la misma cepa bacteriana, no obstante, se utilizan las mismas condiciones en cuanto a interacción molecular y la estructura de las membranas bacterianas, vale decir, de bacterias Gram positivo. En el ensayo realizado por Venkata y cols. (2012) referente a la actividad antibiofilm, sintetizaron LI en base a 1-dodecil-3-

metilimidazolio con el anión yoduro, obtuvieron una actividad inhibitoria completa del biofilm producido, por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, a una concentración mínima de 0,31  $\mu\text{M}$  y 125  $\mu\text{M}$ , respectivamente (52). En la presente tesis, el derivado de la sal de N-cinamilimidazolio con cadena alquílica de 10 carbonos ([CDIM]CI), presento la mayor actividad antibiofilm, sin embargo, la concentración mínima donde la actividad inhibitoria fue completa correspondió a 31,25  $\mu\text{M}$  sobre el biofilm de *S. mutans*; podríamos señalar que la diferencia presentada se asume al tipo de bacteria utilizada para la investigación tal vez debido a la presencia de su matriz glicoproteica y además al largo de la cadena alquílica de la sal, teniendo una mayor actividad antibiofilm el 1-dodecil-3-metilimidazolio, ya que presenta 12 carbonos, en comparación al ([CDIM]CI) que tiene una cadena alquílica de 10 carbonos, podemos mencionar a su vez, que en la investigación realizada por Venkata y cols. (2012) se mostró una diferencia significativa de la actividad antibiofilm entre bacterias Gram positivo y bacterias Gram negativo, teniendo el último grupo mencionado, una menor actividad (52). Otros estudios, como es el caso de Busetti y cols (2010) demostraron que los valores de la concentración mínima de erradicación de biofilm (CMEB) para los LI derivados del bromuro de 1-alkilquinolinio dependen de la longitud de la cadena alquílica, y con ello confirman mediante sus resultados que con una cadena alquílica con más de 8 carbonos la actividad antibiofilm y bacterias planctónicas es mayor (53).

Los microorganismos presentes en el biofilm se vuelven más resistentes frente a antibacterianos. Lo anterior, coincide con lo expresado por diversos estudios que afirman que el glicocálix aumenta significativamente la resistencia a diversos antimicrobianos, en comparación con las células planctónicas, proporcionando refugio a las bacterias y bloqueando agentes nocivos fuera de la biopelícula (12).

Es importante mencionar que, si el biofilm dental es multiespecie y la estructura de la biopelícula es más compleja, la resistencia a los antibióticos es mayor (13). Se ha demostrado que los genes de resistencia a antibióticos se pueden transferir entre células bacterianas dentro del biofilm, cambiando sus características fenotípicas, lo que resulta en una resistencia de todo el biofilm al agente antibacteriano (54). Reflejándose en un problema si se considera que pocos modelos de sistemas son capaces de desarrollar biofilms de especies múltiples en condiciones paralelas al ambiente real, siendo difícil la evaluación de efectividad de los antimicrobianos en el laboratorio (55).

En resumen, los resultados presentados en esta investigación, confirman un aumento de ambas actividades, mediante aumenta el largo de la cadena alquílica. Con esta propuesta antimicrobiana, ya estudiada en cepas ATCC de *S. mutans* (UA 159), pero en esta investigación aplicada a muestras de pacientes, y reflejándose al comportamiento más real de esta bacteria en la población, se intenta incorporar una alternativa terapéutica para el futuro y con ello contribuir a la reducción de la resistencia bacteriana, inhibir la comunidad bacteriana, fomentando la prevención de la caries dental. Ya que, las acciones actuales como el uso de pastas y fluoración de agua, son medidas que su principal objetivo es fortalecer los tejidos duros del diente, aumentando su resistencia al efecto acidogénico de la placa bacteriana, dejando de lado la supervivencia de las bacterias. Por lo tanto, en esta investigación se buscó medidas clínicas que favorecen la detención de la caries dental por sobre su tratamiento.

## 8. CONCLUSIÓN

En esta tesis se estudió la actividad antibacteriana y antibiofilm de tres sales derivadas de *N*-Cinamilimidazol con distintas longitudes de cadena alquílica: 1, 8 y 10 carbonos, frente a 10 cepas de *S. mutans* obtenidas de pacientes las que fueron donadas por el Departamento de Cariología de la Universidad de Talca, Según los resultados obtenidos, y considerando las limitaciones que tiene este tipo de estudio realizado en condiciones in vitro, se concluye lo siguiente:

- Se establece que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *N*-Cinamil-metilimidazol ([CHIM]CI) es de 0.5 [mM], para *N*-Cinamil-octilimidazol ([COIM]CI) es de 0.0625 [mM] y finalmente para *N*-Cinamil-decilimidazol ([CDIM]CI) es de 0.015625 [mM].
- A mayor largo de la cadena alquílica en las sales, mayor es la inhibición del biofilm que produce *S. mutans*, donde ([CDIM]CI) con una cadena alquílica con 10 carbonos, presento la mayor actividad.
- Una concentración alta (1[mM]) de las sales, ejerce una mayor disminución del remanente de biofilm estudiado.
- Es importante continuar lo ensayos biológicos para evaluar la potencial utilización de los LIs, determinando la toxicidad a nivel de mucosa oral y el efecto que ejerce sobre microbiota oral de la boca. Contar con un modelo polimicrobiano demostraría con mayor certeza el efecto de los mismos en un biofilms mixto.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Kandelman D, Petersen PE, Ueda H. Oral health, general health, and quality of life in older people. *Spec Care Dentist*, 2008;28:224-36.
2. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabe 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.
3. Mittrakul K, Loo CY, Hughes CV, Ganeshkumar N. Role of a *Streptococcus gordonii* copper-transport operon, copYAZ, in biofilm detachment. *Oral Microbiology and Immunology*. 2004; 20:65-65.
4. Vieira AR, Gibson CW, Deeley K, Xue H, Li Y. Weaker dental enamel explains dental decay. *PLOS ONE*. 2015;10(4): e0124236.10
5. Sharma P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2011;3(2):403-23
6. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007; 369(9555): 51–59
7. 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*. 2005;83(9):661-9
8. Canton R, Horcajadad JP, Oliverb A, Garbajosaa PR, Vilab J. Inappropriate use of antibiotics in hostitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2013;31 Suppl 4:3-11.
9. Lindmeier C. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. WHO [Internet]. Jan 29, 2018. [citado 2018 Nov 03] <http://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>

10. Sarduy Bermúdez Lázaro, González Díaz María Elena. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. Medicentro Electrónica [Internet]. 2016 Sep [citado 2018 Nov 01]
11. Lasa I., Pozo J. L. del, Penadés J. R., Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. Anales Sis San Navarra . 2005; 28( 2 ): 163-175
12. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbials biofilms. Annual Review of Microbiology 1995 49:1, 711-745
13. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22
14. Donlan RM, 2002, Biofilms: microbial life on surfaces: Emerg Infect Dis. 2002 v. 8, p.881-90
15. Zambrano M, Londoño L. Biofilms: implications in health and disease. Univ Odontol. 2006; 25(57):19-25
16. Hung, W. C., J. C. Tsai, P. R. Hsueh, J. S. Chia, and L. J. Teng, 2005, Species identification of *mutans streptococci* by groESL gene sequence, J Med Microbiol, v. 54: England, p. 857-62.
17. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. Infect Immun. 2008;76(9):4259-68
18. Porte L Lorena, Braun J Stephanie, Dabanch P Jeannette, Egaña Alicia, Andrighetti Daniela. *Streptococcus mutans*: Una bacteria que hace honor a su nombre. Rev. chil. infectol. 2009 Dic; 26( 6 ): 571-571
19. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological reviews. 1980 Jun;44(2):331-84.
20. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiological Reviews 1986;2(3):315-28.
21. Ojeda JC, Oviedo E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. CES odontol. 2013;26( 1 ): 44-56.
22. Mitchell T. The pathogenesis of *Streptococcal* infections: from tooth decay to meningitis. Nature Reviews Microbiology. 2003;1:219-30

23. Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of *streptococcal* antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol.* 1997;23(2):183-90
24. 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
25. Kuramitsu H. Virulence factors of *mutans streptococci*: role of molecular genetic. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):159-76.
26. Munro C, Michalek SM, Macrina FL. Cariogenicity of *Streptococcus mutans*V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. *Infect Immun.* 1991;59(7):2316-23.
27. Russell MW, Harrington DJ, Russell RRB. Identity of *Streptococcus mutans* surface protein antigen III and wall-associated protein antigen A. *Infect Immun.* 1995;63(2):733-5.
28. Haas W, Banas JA. Ligand-binding properties of the carboxyl-terminal repeat domain of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein A. *J Bacteriology.* 2000;182(3):728-33.
29. Holmes AR, McNab R, Millsap KW, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley JL, et al. The pav A gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol.* 2001;41(6):1395-408.
30. Moye ZD, Zeng L, Burne RA. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. *J Oral Microbiol.* 2014;6(10):24878
31. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *PNAS.* 2002;99(22):14434-9.
32. Quivey R, Kuhnert W, Hahn K. Genetics of acid adaptation in oral *streptococci*. *Rev Medical oral biology.* 2001;12(4):301-14
33. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free radicalbiology & medicine.* 2004;36(7):838-49.

34. Bahrin LG, Apostu MO, Birsa LM, Stefan M, The antibacterial properties of sulfur containing flavonoids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2004;24(10):2315-8.
35. Castillo F. Líquidos Iónicos: Métodos de Síntesis y Aplicaciones. *Conciencia Tecnológica* [Internet]. 2015;(49):52-56. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=94438997007>
36. Welton T. Room temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis. *Chem Rev*. 1999;99(8):2071-84.
37. Dupont J, *Accounts of Chemical Research*. 2011;44(11):1223.
38. Chiappe C, Pieraccini D. Review commentary; ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *J Phys Org Chem*. 2004;18(4):275-97.
39. Brennecke JF, Maggin EJ. Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing. *AIChE Journal*. 2001;47(11):2384-9
40. Garcia MT, Gathergood N, Scammells PJ. Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem*. 2005;7(1):9-14. 1.
41. Goins , M. Minimum inhibitory (mic) and minimum bactericidal concentration (mbc) evaluations as rd tools. [Online]. Available from: <https://www.qlaboratories.com/minimum-inhibitory-mic-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc-evaluations-as-rd-tools/> [Accessed 20 July 2019].
42. Medina R, Moreno C, Velasco M, Gutierrez S. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans ATCC 25175* “in vitro”. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*. 2005;3(3):25-30
43. Gutiérrez S, Ruíz RE, Benito IL. Mitis salivarius-bacitracin 10% saccharose agar for oral streptococci and *Streptococcus mutans* counts. *Acta Odontol Latinoam*. 1997; 10(1): 47–53.
44. Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, da Silva LA, da Silva RA, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. *Microbiol Res*. 2011;166(1):63-7.

45. Singla N, Acharya S, Martena S, Singla R. Effect of oil gum massage therapy on common pathogenic oral microorganisms - A randomized controlled trial. *J Indian Soc Periodontol* 2014;18:441-6.
46. Gamboa F. Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of *Streptococcus mutans*: Research Experiences. *Univ Odontol.* 2014; 33(71): 65-73
47. Eloff JN. A sensitive and quick method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 1988;64:711-4
48. Gutiérrez E. Actividad antibacteriana y antibiofilm de sales derivadas de N-cinamilimidazol con diferentes longitudes de cadena frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis de grado]. Talca: Universidad de Talca; 2017.
49. Gindri I, Siddiqui D, Bhardwaj P, Rodriguez L, Palmer K, Frizzo C, et al. Dicationic imidazolium-based ionic liquids: a new strategy for non-toxic and antimicrobials materials. *RSC Adv.* 2014;4:62594-602.
50. Brunel F, Lautard C, Garzino F, Giorgio S, Raimundo JM, Bolla JM, et al. Antibacterial activities of fluorescent nano assembled triphenylamine phosphonium ionic liquids. *Elsevier.* 2016;26(15):3770-3.
51. Carson L, Chau P, Earle M, Gilea M, Gilmore B, Gorman S, et al. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *RSC.* 2009;11(4):492-7.
52. Ventaka Y, Kiran G, Lalithamanasa P, Venugopalan V. The ionic liquid 1-alkyl-3-methylimidazolium demonstrates comparable antimicrobial and antibiofilm behavior to a cationic surfactant. *Biofouling.* 2012;28(10):1141-9.
53. Buseti A, Crawford D, Earle M, Gilmore B, Gorman S, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-420 bromide ionic liquids. *RSC.* 2010;12:420-5.
54. Erickson PR, Herzberg MC. Emergence of antibiotic resistant *Streptococcus sanguis* in dental plaque of children after frequent antibiotic therapy. *Pediatr Dent.* 1999; 21(3): 181-185.
55. Nance WC, Dowd SE, Samarian D, et al. A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(11):2550-60.

56. Salud bucodental. WHO [Internet]. Publicado Sept 24, 2018. [citado 2019 Julio 22] .  
[www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health)
57. Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030. Odontopediatria [Internet]. [citado 2019 julio 21] <http://www.odontopediatria-v.cl/site/wp-content/uploads/2018/03/PLAN-NACIONAL-DE-SALUD-BUCAL-2018-2030.pdf>