



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

**Efecto del potencial antimicrobiano de la
promazina, una amina bicíclica, en la
bacteria *Streptococcus mutans***

María Lax Rueda

Tutores: Manuel Sánchez Angulo

María Isabel Navarro Mendoza

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

Curso 2024-2025

Grado en Biotecnología

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a mis profesores y tutores Manuel Sánchez y Maria Isabel Navarro por acompañarme en estos últimos meses de mi carrera, por su orientación y apoyo, que han sido fundamentales para realizar este trabajo.

Gracias a mis padres, por acompañarme en esta etapa como en todas las anteriores y porque mis logros son también los suyos. Gracias a mi hermana por su cariño y consejos y a mis amigas, Paula y Ana, de las que estoy tan orgullosa como ellas lo están de mí. Por último, gracias a Fernando por su paciencia infinita y todo el apoyo durante estos años.



Resumen y palabras clave

Los procesos cariogénicos son la principal enfermedad de la cavidad bucal y afectan a miles de millones de personas en todo el mundo. *Streptococcus mutans* habita de forma natural en la cavidad bucal humana y es la bacteria predominante en las caries. Es capaz de crear un ambiente favorable para el crecimiento de otras especies, junto a las cuales establece un biofilm multiespecie. La formación de este biofilm permite aumentar la persistencia y la viabilidad celular de las bacterias en la placa dental. Debido al aumento de la aparición de resistencias a antibióticos, urge el estudio y uso de alternativas que permitan defendernos frente a los microorganismos patógenos. Una de las alternativas estudiadas en los últimos años son los ésteres de aminas bicíclicas, como es la promazina. En este trabajo, se estudia el potencial antimicrobiano de la promazina y sus efectos en la morfología y viabilidad de *S. mutans*.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, caries, cariogénicos, biofilm, promazina, crecimiento, viables.

Abstract and keywords

Cariogenic processes are the main infectious oral cavity diseases, from which billions of people all over the world suffer. *Streptococcus mutans* naturally inhabits the human oral cavity and it is the predominant bacteria in caries formation. This is due to its ability to create an advantageous environment for other species' growth, with which it establishes a multispecies biofilm. These biofilms enhance the persistence and cell viability of bacteria in the dental plaque. As antibiotic resistance continues to rise, the study and use of alternative compounds to defend against pathogenic microorganisms is imperative. One of the many alternatives is esters of bicyclic amines, such as promazine. In this project, the antimicrobial potential of promazine and its effects on the morphology and viability of *S. mutans* are studied.

Keywords: *Streptococcus mutans*, caries, cariogenic, biofilm, promazine, growth, viable.

Contenido

1.	Introducción	5
1.1.	<i>Streptococcus mutans</i>	5
1.2.	Caries y biofilms	6
1.3.	Promazina	8
2.	Antecedentes y objetivos	9
3.	Materiales y Métodos	10
3.1.	Microorganismo usado	10
3.2.	Medio de cultivo	10
3.3.	Crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i>	10
3.4.	Crecimiento del biofilm	11
3.5.	Tratamiento con promazina	11
3.6.	Curva de crecimiento	11
3.7.	Microscopía	12
3.8.	Recuento de viables	12
4.	Resultados y discusión	13
4.1.	Efecto de la promazina sobre la formación de biofilm de <i>S. mutans</i>	13
4.2.	Efecto de concentraciones decrecientes de promazina sobre <i>S. mutans</i>	14
4.3.	Efecto de la promazina en biofilms a diferentes tiempos de aplicación	16
4.4.	Curva de crecimiento de <i>S. mutans</i> en presencia de promazina	17
4.5.	Recuento de viables	21
4.6.	Microscopía	23
5.	Conclusiones	25
6.	Proyección futura	26
7.	Bibliografía	27

1. Introducción

1.1. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es una bacteria anaerobia facultativa, acidogénica y acidúrica, es decir, es capaz tanto de producir ácido como de tolerarlo (Abranches *et al.*, 2018). Es un coco Gram positivo, no posee flagelo y no es móvil. Es una bacteria ácido-láctica, por lo que su producción de energía se basa exclusivamente en la fermentación de azúcares. Se caracteriza por ser capaz de metabolizar una gran variedad de carbohidratos.

Fue aislada por primera vez por J. Clarke en 1924 a partir de una caries dental. Le otorgó el nombre *mutans* debido a que los estreptococos presentan una forma de coco, pero la forma de estas bacterias era ovalada (Fig. 1) y concluyó que era una cepa mutante del género *Streptococcus*.

Streptococcus mutans se caracteriza por ser un patógeno bucal, siendo uno de los principales causantes de la placa dental. Algunas de sus cepas son capaces de causar otras patologías extraorales como endocarditis infecciosa o bacteriemia (Lemos *et al.*, 2019 y Ojeda-Garcés *et al.*, 2013), debido a su baja antigenicidad que les permite mantenerse en el torrente sanguíneo por más tiempo.

Según la composición de los polisacáridos de ramnosa-glucosa de la superficie, las cepas de *S. mutans* se clasifican en 4 serotipos: *c*, *e*, *f* y *k*; siendo el más abundante (>75%) en la cavidad bucal humana el serotipo *c* y el menos abundante y cariogénico, el serotipo *k*.

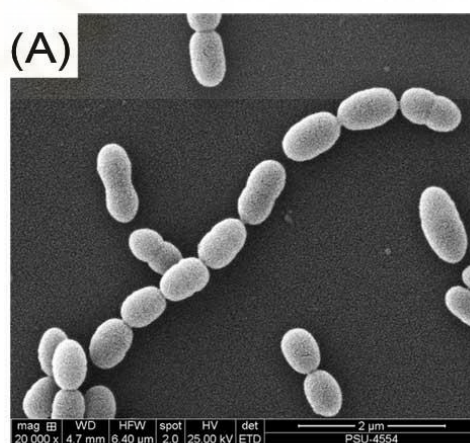


Figura 1. Imagen en microscopio electrónico de barrido de *Streptococcus mutans* (Teanpaisan *et al.*, 2014)

1.2. Caries y biofilms

Las caries son una de las enfermedades bucodentales más comunes e importantes, afectando a prácticamente pacientes de todos los grupos de edad. Se trata de una infección contagiosa causada por la interacción entre los microorganismos orales, la dieta y complejos factores relativos al hospedador (Priya *et al.* 2023).

Los biofilms son comunidades de microorganismos que se desarrollan adheridos a una superficie y se encuentran integrados en una matriz extracelular. La formación de biofilms supone una serie de ventajas frente a la forma planctónica, como protección frente a estrés ambiental, el sistema inmune o antimicrobianos. El desarrollo del biofilm incluye tres procesos: la adhesión de las bacterias a una superficie o entre ellas, la división celular y producción de matriz extracelular y la dispersión del biofilm. El cambio de bacteria planctónica a biofilm sucede en respuesta a situaciones ambientales y a señales químicas entre la comunidad bacteriana, que favorecen la producción de adhesinas y compuestos de la matriz extracelular (Tolker-Nielsen, 2014; Solano *et al.* 2014). Esta comunicación entre bacterias se denomina *quorum sensing* (QS). Consiste en un mecanismo de comunicación intercelular mediante el uso de pequeñas moléculas que se producen en respuesta a la densidad poblacional o ambientes desfavorables. De esta manera, se controla la expresión de ciertos genes, entre los cuales destacan genes relacionados con la tolerancia a ambientes ácidos y con el desarrollo de caries (Bojanich y Orlietti, 2020).

S. mutans habita principalmente en la cavidad bucal humana, formando biofilms en la superficie de los dientes, denominada placa dental. Aunque los biofilms de las caries son multiespecie, *S. mutans* presenta diferentes características que le hacen destacar en estas formaciones y ser el microorganismo predominante.

Algunos de los factores de virulencia más importantes que le otorgan a *S. mutans* su potencial cariogénico son:

- a) Produce glucosiltransferasas que catalizan la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS) a partir de la glucosa. Estos son polisacáridos insolubles que permiten la adhesión a la superficie dental y la acumulación para formar biofilms (Li *et al.*, 2020).
- b) Su acidogenicidad, que implica el transporte y metabolismo de gran variedad de carbohidratos a ácidos orgánicos, permite generar un pH medio-bajo y un ambiente adecuado para el desarrollo de otras especies acidogénicas y acidúricas (Lemos *et al.*, 2019).
- c) Su capacidad para crecer bajo condiciones de estrés ambiental, especialmente a pH bajo.
- d) La adherencia a la superficie de los dientes para la formación del biofilm y la producción de bacteriocinas (Priya *et al.*, 2023).

Cuando *S. mutans* se encuentra formando biofilms bucales y en condiciones anaeróbicas, utiliza carbohidratos como fuente principal de energía y produce ácidos láctico, propiónico, acético y fórmico, causando una acidificación de la zona (Fig 2). Estos ácidos atraviesan la placa dental y se dirigen al esmalte, generando la liberación de iones fosfato y calcio del hidroxiapatito que forma el esmalte, causando el proceso de desmineralización (Ojeda-Garcés *et al.*, 2013).

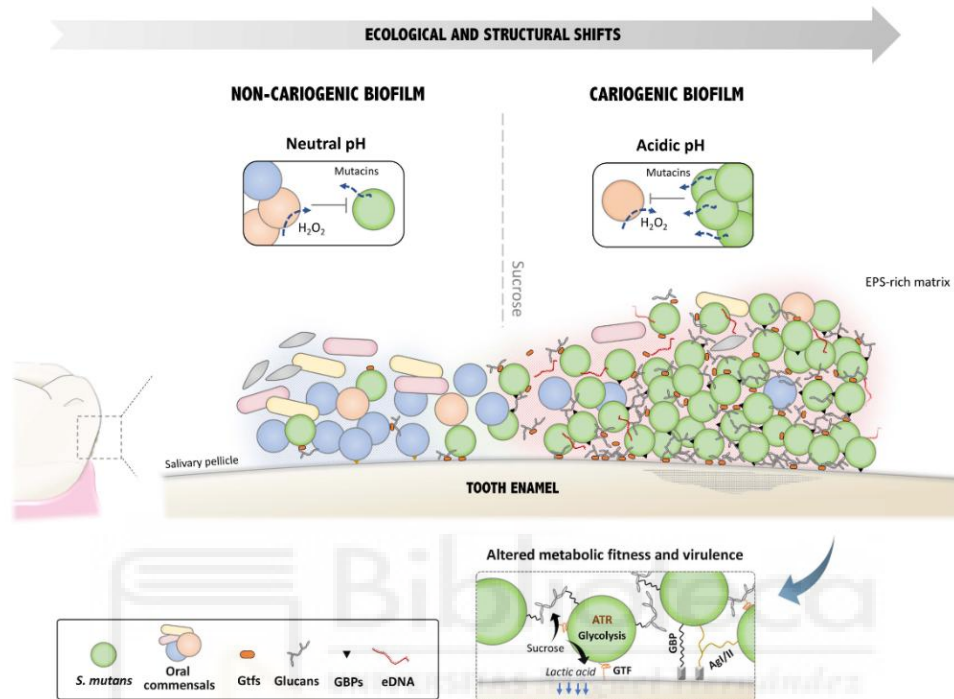


Figura 2. Formación del biofilm e interacciones de *S. mutans* con otras especies (Lemos *et al.*, 2019)

Existen compuestos como el flúor que pueden disminuir la gravedad y la incidencia de la caries. Se trata de un agente cariostático que inhibe la desmineralización y actividades bacterianas como la producción de ácido, la tolerancia a este o la formación de EPS (Li *et al.*, 2020).

El desafío de las caries dentales se afronta principalmente desde la prevención con una buena salud bucodental, utilizando dentífricos fluorados dos veces al día. A pesar de la gran accesibilidad de los productos como los dentífricos, el acceso a una buena salud bucodental no es universal y un gran porcentaje de la población sufre este tipo de afecciones. Según datos de 2021 del *Institute for Health Metrics and Evaluation*, 2240 millones de personas presentan caries en dientes permanentes, mientras que 520 millones las presentan en dientes de leche.

1.3. Promazina

La promazina es un derivado de la fenotiazina. Es un compuesto orgánico con dos anillos de benceno unidos mediante un átomo de azufre y uno de nitrógeno, con una cadena lateral de tres carbonos terminada en un grupo dimetilamina (Fig. 3). Pertenece a la familia de las aminas terciarias aromáticas bicíclicas (PubChem).

La promazina es un medicamento que se utiliza en algunos países como neuroléptico, antipsicótico, como tratamiento complementario para la agitación psicomotriz o como anestésico débil. Por tanto, dado que es un compuesto conocido y que ya ha sido estudiado para otros usos, es interesante su posible aplicación como antimicrobiano.

Diversos estudios han demostrado que los compuestos derivados de la fenotiazina y los ésteres aromáticos de aminas bicíclicas ejercen un efecto antimicrobiano (Pertusa Barberá, 2019; de Gracia Retamosa *et al.*, 2015). Los mecanismos por los que esto sucede son varios. En primer lugar, a bajas concentraciones son capaces de potenciar el efecto de otros antibióticos, incluso cuando la bacteria presenta resistencia a ellos (Kristiansen *et al.*, 2003). En segundo lugar, a concentraciones que aún no inhiben la replicación, alteran la morfología de la bacteria. Por otra parte, también se ha demostrado que perturban la integridad de la membrana, reducen la adherencia y actúan como agentes disruptores del biofilm (Amaral *et al.*, 2004).

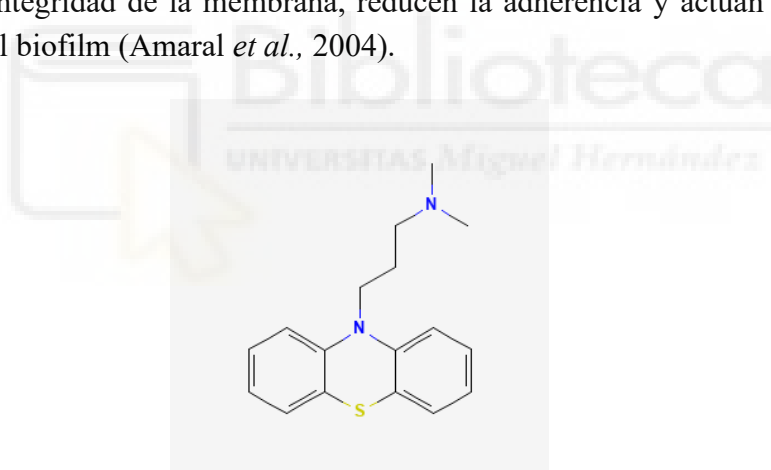


Figura 3. Estructura molecular de la promazina (PubChem)

Por otro lado, en estudios realizados en bacterias del mismo género, *Streptococcus pneumoniae*, se ha demostrado que la promazina y otros ésteres aromáticos de aminas bicíclicas interfieren con la función de las proteínas de unión a colina (CBP, *choline-binding protein*) que presenta en la pared celular (Pertusa Barberá, 2019). Estas presentan una estructura característica de $\beta\beta$ -solenioide, plegamiento que también aparece en proteínas pertenecientes a otras especies bacterianas, en las glicosiltransferasas (GTFs) de *S. mutans*, unas proteínas de gran importancia para el desarrollo de la placa bacteriana. Por ello, se propone que la promazina pudiera ser capaz también de interferir con las proteínas GTF de *S. mutans*.

2. Antecedentes y objetivos

Los estudios sobre *S. mutans* son de gran importancia para comprender el proceso de formación de caries, debido a su posición privilegiada dentro de la placa dental. Además, entender las interacciones que suceden durante la formación de biofilms es clave para el desarrollo de tratamientos mejores y más efectivos para el tratamiento de las caries.

Por otro lado, la creciente preocupación que surge debido al aumento en la resistencia a antibióticos y la aparición de organismos multirresistentes incita la búsqueda de alternativas para tratar este problema. En el caso de *S. mutans* y la salud bucal, se están estudiando compuestos experimentales que tienen como diana diferentes estructuras o mecanismos moleculares de la bacteria e inhiben su crecimiento. También se utilizan otros microorganismos propios de la cavidad bucal humana para inhibir la formación de biofilms mediante competencia.

Otra alternativa que se estudia a raíz de esta problemática es el uso de ésteres aromáticos de aminas bicíclicas (EBAs) como agentes antimicrobianos. Esta es la línea que sigue este Trabajo de Fin de Grado, cuyo objetivo es estudiar el potencial antimicrobiano de la promazina, una amina bicíclica sobre *S. mutans* y los posibles efectos sobre su morfología y viabilidad celular.



3. Materiales y Métodos

3.1. Microorganismo usado

La cepa utilizada en todos los experimentos fue *Streptococcus mutans* CECT 479, de la Colección Española de Cultivos Tipo. Esta presenta un nivel de bioseguridad 1 (BSL1-1). Para su manipulación en el laboratorio, todos los instrumentos y cultivos se encontraban en condiciones asépticas gracias al uso de mechero Bunsen y campana de cultivo, garantizando la esterilidad y evitando contaminaciones.

3.2. Medio de cultivo

El crecimiento de *S. mutans* en medio líquido se realizó utilizando *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid, Ref. CM1135) con 2% de sacarosa para fomentar la producción de polisacárido y estimular la formación del biofilm.

El crecimiento en medio sólido se realizó en placas con BHI con 2% de sacarosa y 1,5% de agar.

Tras su preparación, los medios de cultivo fueron esterilizados en el autoclave a 121°C y 1,2 atm de presión durante 20 minutos.

3.3. Crecimiento de *Streptococcus mutans*

Para la conservación de la cepa, esta se encontraba almacenada a -80°C. Se descongeló y se realizó una siembra en una placa de BHI y se incubó a 37°C. Después de su correcto crecimiento, esta placa se mantuvo en refrigeración a 4°C y se utilizó para inocular el resto de experimentos.

Los inóculos fueron preparados utilizando tubos estériles SARSTEDT de 5 ml (Ref. 55.475.001) a los que se añadía 4 ml del medio BHI. Los tubos SARSTEDT utilizados presentan un paso óptico de 1 cm, lo cual permitió la toma de medidas de densidad óptica directamente en el tubo de ensayo. Las inoculaciones se hicieron usando el asa de siembra, tomando una muestra de la placa conservada en refrigeración. Como control de contaminación, se prepara otro tubo estéril con 4 ml de BHI, pero sin inóculo. Posteriormente, ambos se colocaron en la estufa a 37°C durante toda la noche (cultivo *overnight*, O/N). Tras un crecimiento de aproximadamente 24 horas, se alcanzó una máxima de densidad óptica a 600 nanómetros (DO₆₀₀) de entre 1,2 y 1,3.

3.4. Crecimiento del biofilm

El establecimiento de los biofilms se realizaba en placas de 96 pocillos SARSTEDT (Ref. 83.3924). Se utilizaba el inóculo preparado el día anterior (O/N) y se diluía hasta alcanzar una concentración de 0,05 DO/ml (Alex Mira, comunicación personal) que se colocaba en las placas de 96.

Se realizaba un tratamiento de fijación (Navarro, 2024) y de tinción con cristal violeta con el objetivo de cuantificar el crecimiento de biofilm. Es protocolo consiste en:

- 1) Recoger el sobrenadante de cada pocillo con cuidado de no perturbar el biofilm establecido en el fondo.
- 2) Lavar con 200 µl de PBS
- 3) Añadir 200 µl de cristal violeta al 0,2% y dejarlo durante 30 minutos.
- 4) Retirar el cristal violeta
- 5) Lavar 2 veces con 200 µl de PBS
- 6) Dejar secar 24 horas a temperatura ambiente o 90 minutos a 37°C
- 7) Añadir 200 µl de isopropanol y leer a 490 nm usando un espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA)

3.5. Tratamiento con promazina

Se realizaron diferentes experimentos para demostrar el efecto de la promazina sobre el biofilm de *S. mutans*. Durante estos, se utilizó un stock de promazina a 100 mM. En todos los experimentos se contaba con un control negativo, un control positivo y las correspondientes muestras.

3.6. Curva de crecimiento

Para realizar la curva de crecimiento, se preparaban dos tubos SARSTEDT: un control negativo conteniendo únicamente medio BHI y un inóculo de *S. mutans*. Ambos se colocaban en el baño con hielo y se establecía un temporizador para que se encendiera a 37° unas 5 horas antes de comenzar el experimento, con el objetivo de que, al momento de empezar, la bacteria se encuentre en crecimiento activo.

Después de las 5 horas de crecimiento, se preparaban dos tubos a partir de la dilución 1:200 del inóculo, utilizado medio BHI precalentado y se devolvían al baño. Se monitorizó el crecimiento de la bacteria midiendo la densidad óptica del cultivo utilizando un espectrofotómetro Zuzi modelo 4201/50. Cuando los cultivos alcanzaban una DO₆₀₀ de 0,1 se añadía promazina a concentración 1 mM en uno de ellos, mientras que el otro contenía solo la bacteria, actuando de control positivo.

A partir de este momento, se realizaban medidas de absorbancia de ambos tubos cada 20 minutos hasta que el cultivo control alcanzaba una DO_{600} de 1,3, utilizando medio de cultivo estéril como blanco.

3.7. Microscopía

Durante la curva de crecimiento, se tomaron muestras cada 20 minutos para microscopía óptica. Para fijar las muestras, se transfirieron 45 μ l del cultivo de *S. mutans* a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadió 5 μ l de formaldehído al 10%. Estas muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su observación.

Para analizar las muestras se utilizó un microscopio óptico de contraste de fases Olympus BX5. Se tomaron 5 μ l de muestra y se colocaron sobre un portaobjetos, que se cubrió con un cubreobjetos.

3.8. Recuento de viables

Para el recuento de viables, se prepararon tres tubos SARSTEDT: un control negativo con únicamente medio BHI y dos tubos con BHI y *S. mutans*, correspondientes al control positivo y a la muestra con promazina. Al alcanzar una densidad óptica de 0,1 a 600 nm, se añadió promazina a una concentración 1 mM a uno de ellos. En este momento se comenzó a contabilizar el tiempo y se tomaron muestras a 0, 20, 60 y 80 minutos. Dado que en estas muestras la concentración de bacterias es muy elevada, se realiza un banco de diluciones, introduciendo 10 μ l de muestra a 90 μ l de medio BHI para la primera dilución, y 10 μ l de esta dilución en 90 μ l de BHI para la siguiente dilución. De esta manera se realizó el banco de diluciones hasta un factor de dilución de 10^{12} .

Se utilizaron placas de medio sólido de BHI con 2% de sacarosa. Se colocaron dos gotas de 5 μ l de cada dilución en las placas, desde 10^4 a 10^{11} con el objetivo de tener duplicados del recuento. Durante el recuento, únicamente se tuvieron en cuenta las gotas que contenían entre 10 y 100 unidades formadoras de colonias, aproximadamente.

4. Resultados y discusión

4.1. Efecto de la promazina sobre la formación de biofilm de *S. mutans*

En primer lugar, se pretendía comprobar si la promazina evitaba el establecimiento de biofilms de *S. mutans*. Para ello, se administró la promazina inmediatamente después de transferir la bacteria a la placa. El experimento incluía un control negativo, únicamente con medio BHI; control positivo, incluyendo medio BHI y *S. mutans*; control del stock de promazina, con medio BHI y 1 µl del stock de promazina a 100 mM para asegurar que este no estaba contaminado y la muestra con BHI, *S. mutans* y promazina a una concentración de 1 mM (Fig. 4).

Esta placa se dejó crecer durante 24 horas a 37°C. Después, se realizó el tratamiento de tinción con cristal violeta para cuantificar la formación de biofilm midiendo su absorbancia a 490 nm. Todos los datos han sido normalizados en relación con el control negativo.

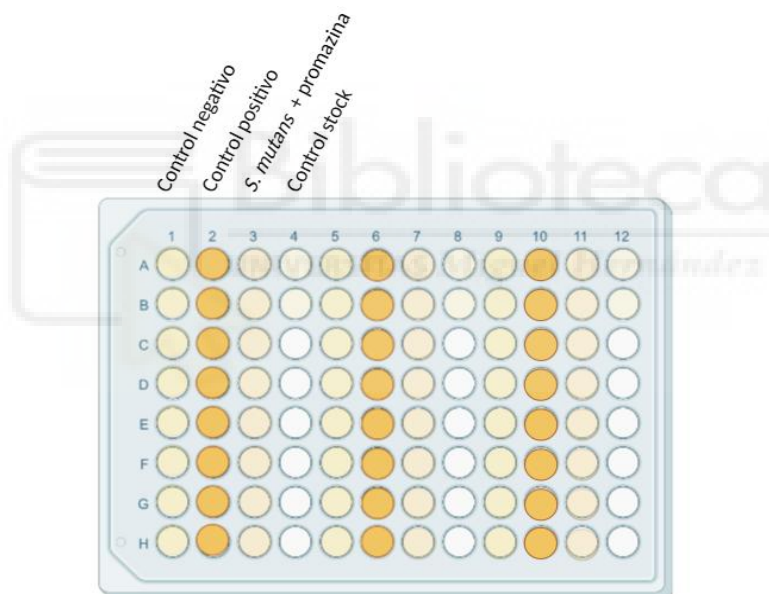


Figura 4. Representación del experimento realizado para analizar el efecto de la promazina sobre *S. mutans*

Hay una disminución de la absorbancia a 490 nm de la muestra en relación con el control positivo, lo que indica una menor formación de biofilm en los pocillos tratados con promazina 1 mM (Fig. 5).

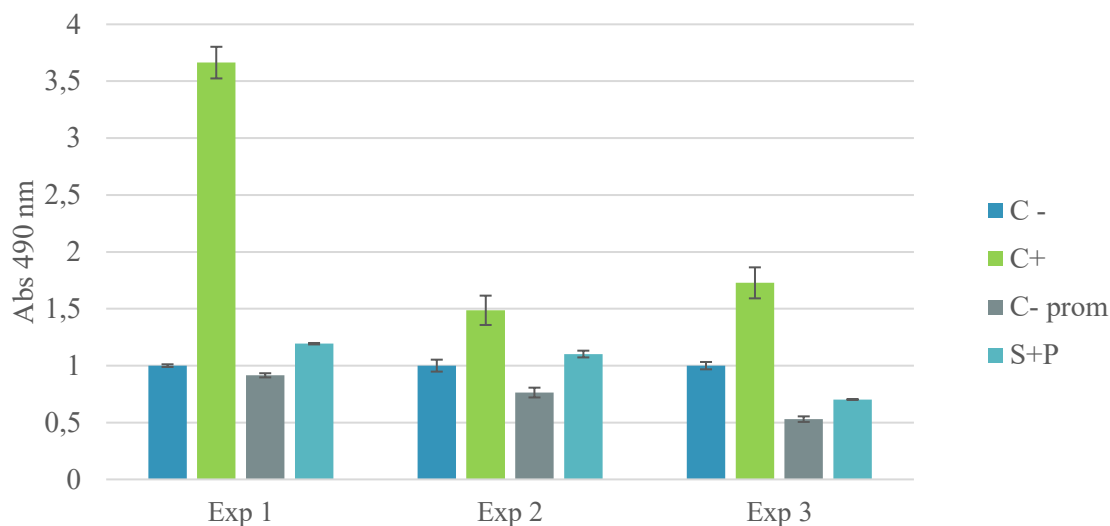


Figura 5. Medida de absorbancia a 490 nm del control negativo (C-), control positivo de *S. mutans* (C+), control del stock de promazina (C-prom) y de la muestra con *S. mutans* y promazina (P)

El experimento se realizó por triplicado. Se observa que la variabilidad intraexperimental es muy baja, pero a pesar de haberse mantenido constantes las condiciones experimentales, incluyendo los inóculos de bacteria, fármaco y el medio de cultivo, se detectó una alta variabilidad interexperimental en el crecimiento de biofilm en los pocillos, especialmente en el control positivo. Se desconocen las causas de esta variabilidad en la formación del biofilm, aunque podría estar relacionada con la posición de los pocillos en la placa multipocillo o con fluctuaciones en las condiciones de humedad dentro del incubador.

4.2. Efecto de concentraciones decrecientes de promazina sobre *S. mutans*

Una vez demostrado el efecto de la promazina sobre *S. mutans*, el siguiente paso consistió en determinar la concentración mínima inhibitoria, es decir, la concentración más baja a la cuál la promazina inhibe la formación del biofilm de esta bacteria.

El experimento se realizó por triplicado e incluyó: control negativo, únicamente con medio BHI; control positivo, con medio BHI y *S. mutans*; y cuatro muestras con medio BHI, *S. mutans* y concentraciones decrecientes de promazina, desde 1 mM hasta 0,125 mM (Fig. 6).

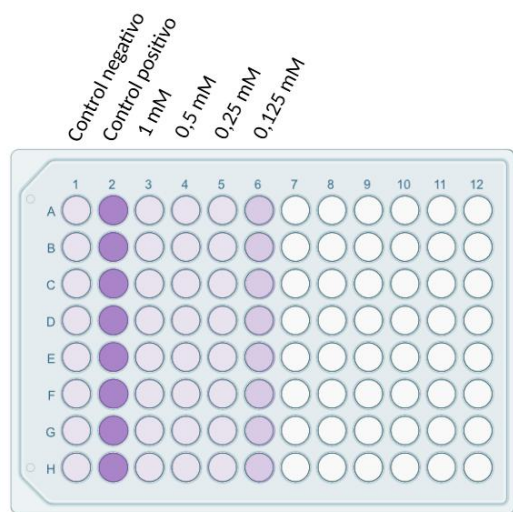


Figura 6. Representación del experimento analizando el efecto de concentraciones decrecientes de promazina sobre *S. mutans*

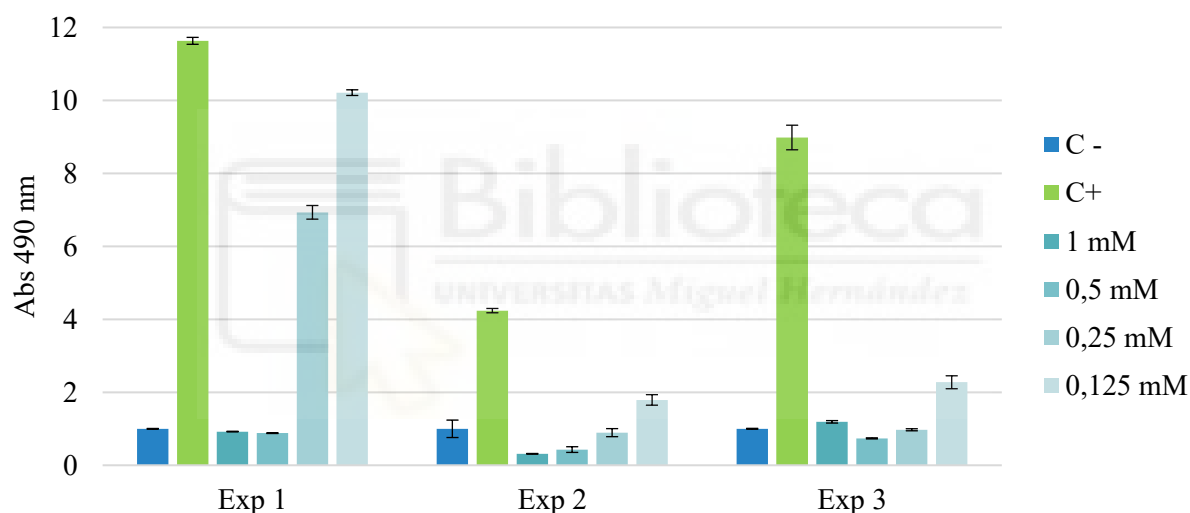


Figura 7. Medida de absorbancia a 490 nm del control negativo (C-), control positivo (C+) y muestras con *S. mutans* y promazina a concentraciones decrecientes (1, 0,5, 0,25 y 0,125 mM).

Se observó un alto grado de inhibición del crecimiento del biofilm a concentraciones de promazina de 1 mM y 0,5 mM respecto al control positivo, como se observa en la gráfica (Fig. 7). Por otro lado, en concentraciones de 0,25 mM y 0,125 mM se observó una disminución del crecimiento respecto al control positivo, pero no tan pronunciada como en las dos primeras concentraciones. Por tanto, la concentración más baja a la que la promazina afecta a *S. mutans* es 0,5 mM.

El experimento se realizó por triplicado. A pesar de haberse mantenido constantes las condiciones experimentales, incluyendo los inóculos de bacteria, fármaco y el medio de cultivo, se detectó una alta variabilidad en el crecimiento de biofilm en los pocillos, especialmente en el control positivo. En este experimento se aprecia, de nuevo, baja variabilidad intraexperimental y alta interexperimental.

4.3. Efecto de la promazina en biofilms a diferentes tiempos de aplicación

Dado que ya se ha demostrado con los experimentos anteriores que la promazina afecta al establecimiento del biofilm, con el siguiente experimento se pretendía descubrir si este compuesto es capaz de interrumpir el crecimiento de *S. mutans* una vez se ha formado el biofilm. Para ello, se incluyó un control negativo, únicamente con medio BHI; un control positivo, con BHI y *S. mutans*; y dos columnas con BHI y *S. mutans* (Fig. 8) a las que se añadiría promazina a diferentes tiempos.

Tras incubar la placa multipocillo a 37°C durante 4 horas, se añadió promazina a una concentración de 1 mM a la primera columna. Después de 20 horas más a 37°C, se añadió promazina a 1 mM a la segunda columna.

Después de 24 horas de crecimiento tras la última adición, se realizó la tinción con cristal violeta para cuantificar la formación de biofilm y se midió la densidad óptica a 490 nm.

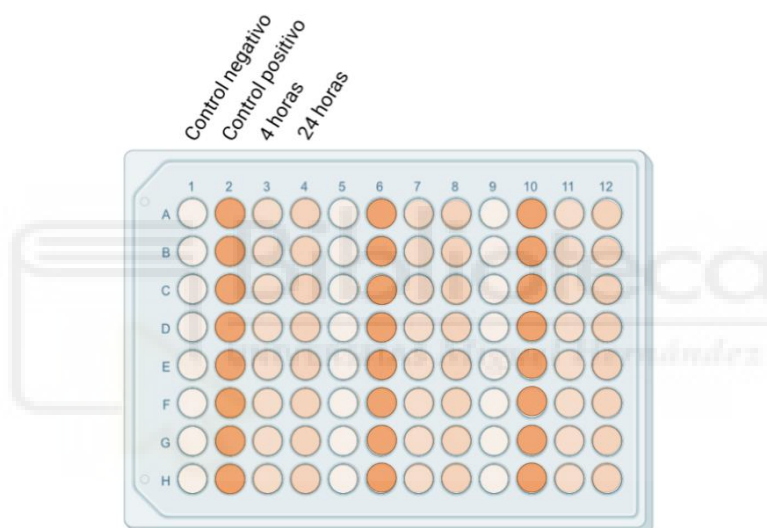


Figura 8. Representación del experimento para analizar el efecto la promazina al aplicarla a diferentes tiempos (4 y 24 horas).

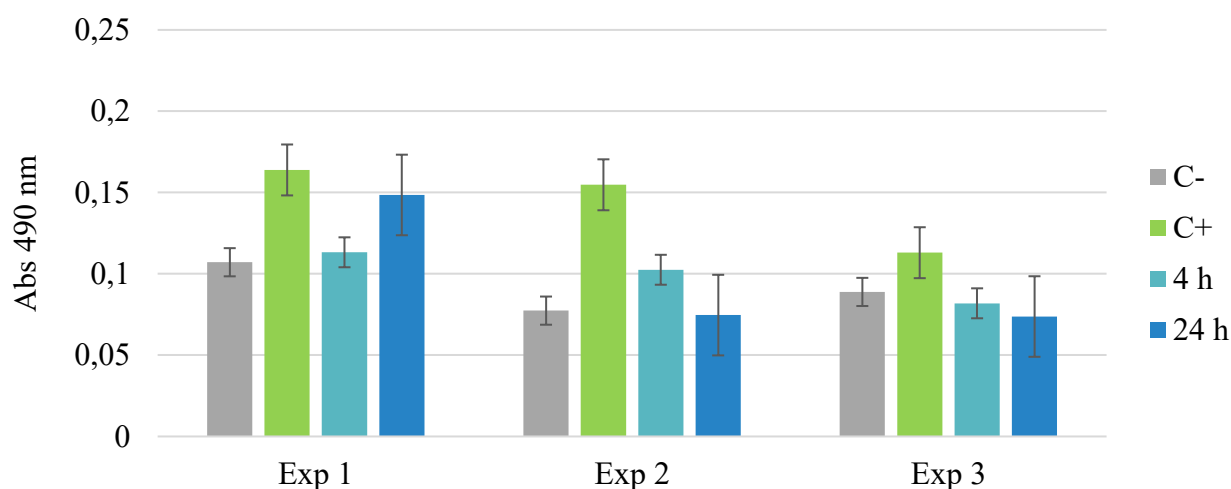


Figura 10. Medida de absorbancia a 490 nm del control negativo (C-), control positivo (C+), aplicando la promazina 4 horas después del inicio de la formación del biofilm (4 h) y 24 horas después (24 h).

Los resultados de cada experimento individual muestran de nuevo que hay una gran variabilidad interexperimental (Fig. 10). Sin embargo, es posible observar que la promazina ejerce un claro efecto inhibidor a las cuatro horas de su aplicación en los tres experimentos. En el caso de su aplicación a las 24 horas parece que dicho efecto inhibidor no es tan evidente, probablemente porque el biofilm ya está en una etapa madura. Esto indica que la promazina tiene un efecto inhibidor cuando la bacteria está en forma planctónica y en las primeras horas de formación del biofilm.

4.4. Curva de crecimiento de *S. mutans* en presencia de promazina

También se estudió el efecto de la promazina en cultivos líquidos de *S. mutans*. Se realizó una curva de crecimiento para analizar el efecto de la promazina 1 mM sobre el desarrollo y crecimiento de *S. mutans* y comparar los resultados con el crecimiento en ausencia de promazina. Se monitorizó el crecimiento de *S. mutans* midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm.

El experimento se realizó por duplicado y los resultados del primero se representan en la gráfica de la Figura 11, mientras que la segunda repetición se representa en la Figura 12, ambos en escala lineal (a) y en escala semilogarítmica (b). En estas gráficas, el tiempo cero representa el momento en el que la densidad óptica del cultivo alcanzó las 0,1 unidades de DO_{600} , punto en el que se incorporó promazina a 1 mM al tubo correspondiente.

En el cultivo control, el crecimiento exponencial puede apreciarse desde el tiempo 0 hasta los 60 minutos, que corresponde con el segmento recto en la gráfica con escala semilogarítmica. A partir de 120 minutos, el cultivo alcanza la fase estacionaria. La absorbancia máxima que se registró en estos experimentos fue de aproximadamente 1,3 unidades de DO_{600} .

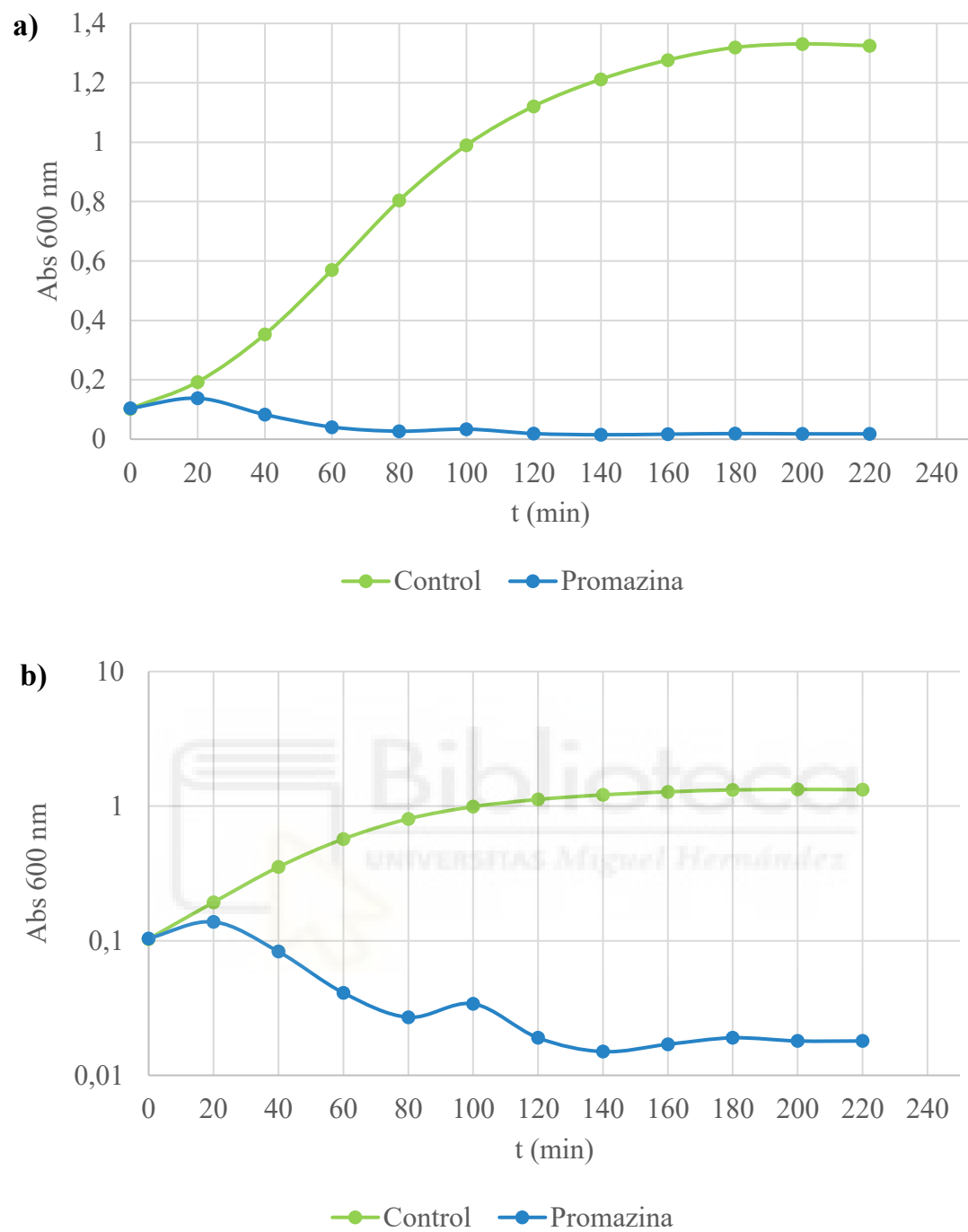


Figura 11. Curva de crecimiento control sin fármaco (verde) y con promazina (azul) en **a)** escala lineal y **b)** semilogarítmica.

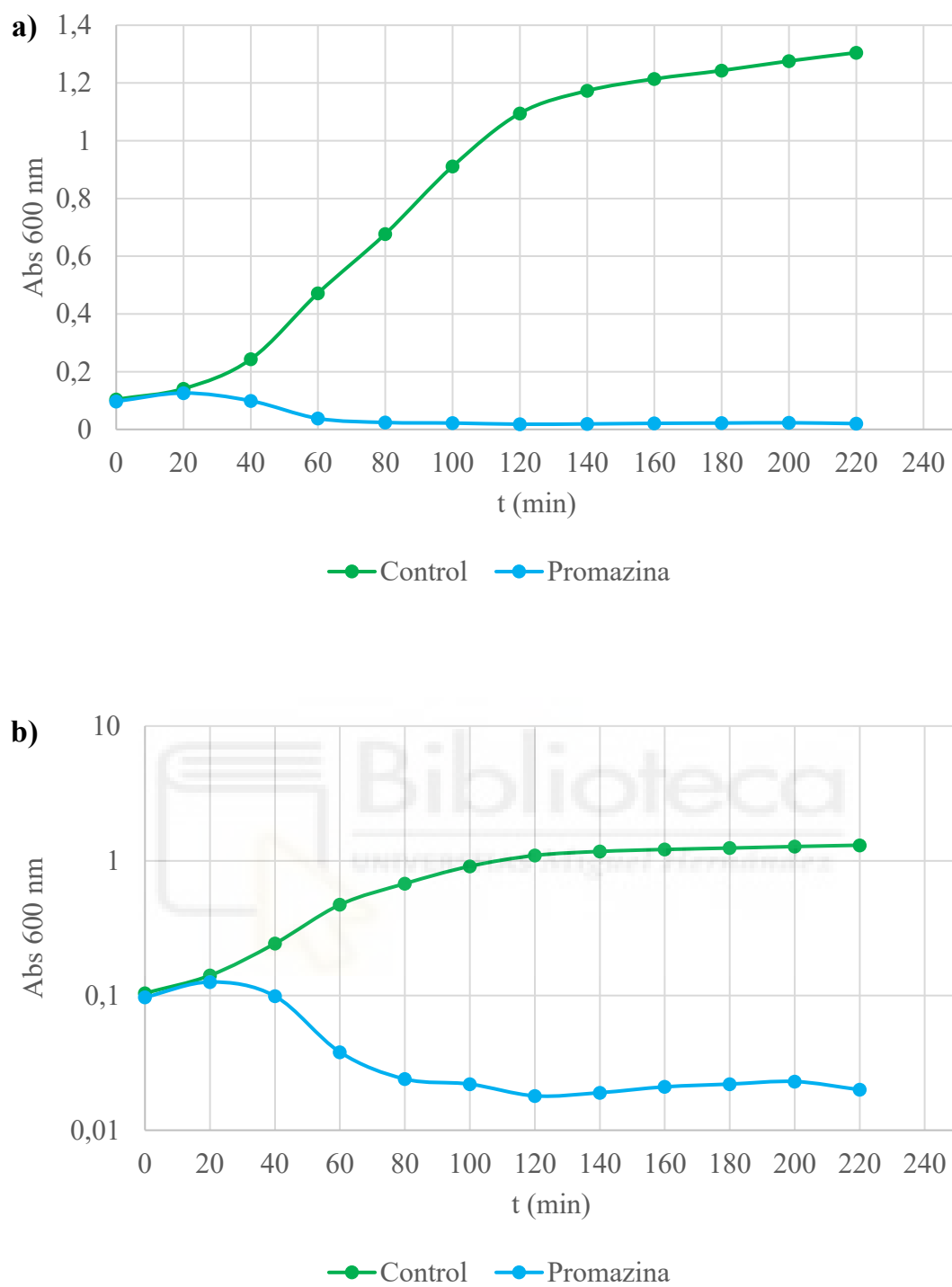


Figura 12. Duplicado de la curva de crecimiento control (verde) y con promazina (azul) en **a)** escala lineal y **b)** semilogarítmica.

Con estos datos, podemos calcular la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación de *S. mutans*, utilizando las siguientes fórmulas.

$$\mu = \frac{\ln(X/X_0)}{t} \qquad \tau = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde μ es la velocidad de crecimiento, obtenida en unidades de min^{-1} ; X_0 es la densidad óptica a tiempo 0; X , la densidad óptica a cierto tiempo; t , el tiempo transcurrido entre estas dos medidas y τ , el tiempo de generación. Se calcula únicamente para la fase exponencial, que es la etapa donde puede estudiarse correctamente el tiempo que tarda una bacteria en dividirse.

Los resultados obtenidos son una velocidad de crecimiento es $0,0233 \text{ min}^{-1}$ y un tiempo de generación es de 32 minutos para *S. mutans* en condiciones normales.

Por otro lado, no se observó crecimiento en la curva de *S. mutans* en presencia de promazina. Se aprecia cierto crecimiento a 20 minutos, llegando a 0,126 unidades de DO_{600} , pero después se mantiene constante a menos de 0,025 unidades durante todo el experimento. Por tanto, este resultado nos indica que la promazina es un compuesto bactericida, es decir, es capaz de matar a *S. mutans* en su forma planctónica.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos en otras investigaciones (Kristiansen and Amaral, 1997; Amaral *et al*, 2004), que han permitido concluir que las fenotiazinas son capaces de inhibir la replicación bacteriana. Por otro lado, estos compuestos potencian la actuación de antibióticos mediante procesos de sinergia. También se conoce que la promazina presenta un leve efecto antipsicótico relacionado con la interferencia de canales iónicos, por lo que es una posibilidad que esté afectando a los canales iónicos de la bacteria (Lara, 2005).

4.5. Recuento de viables

Para estimar la viabilidad de *S. mutans* en presencia de promazina 1 mM, se realizó un recuento de viables en placas de medio sólido BHI con 2% de sacarosa. El objetivo fue comparar el recuento de microorganismos viables en la muestra control y en la muestra con promazina tomando muestras a diferentes tiempos durante la curva de crecimiento (Fig. 13).

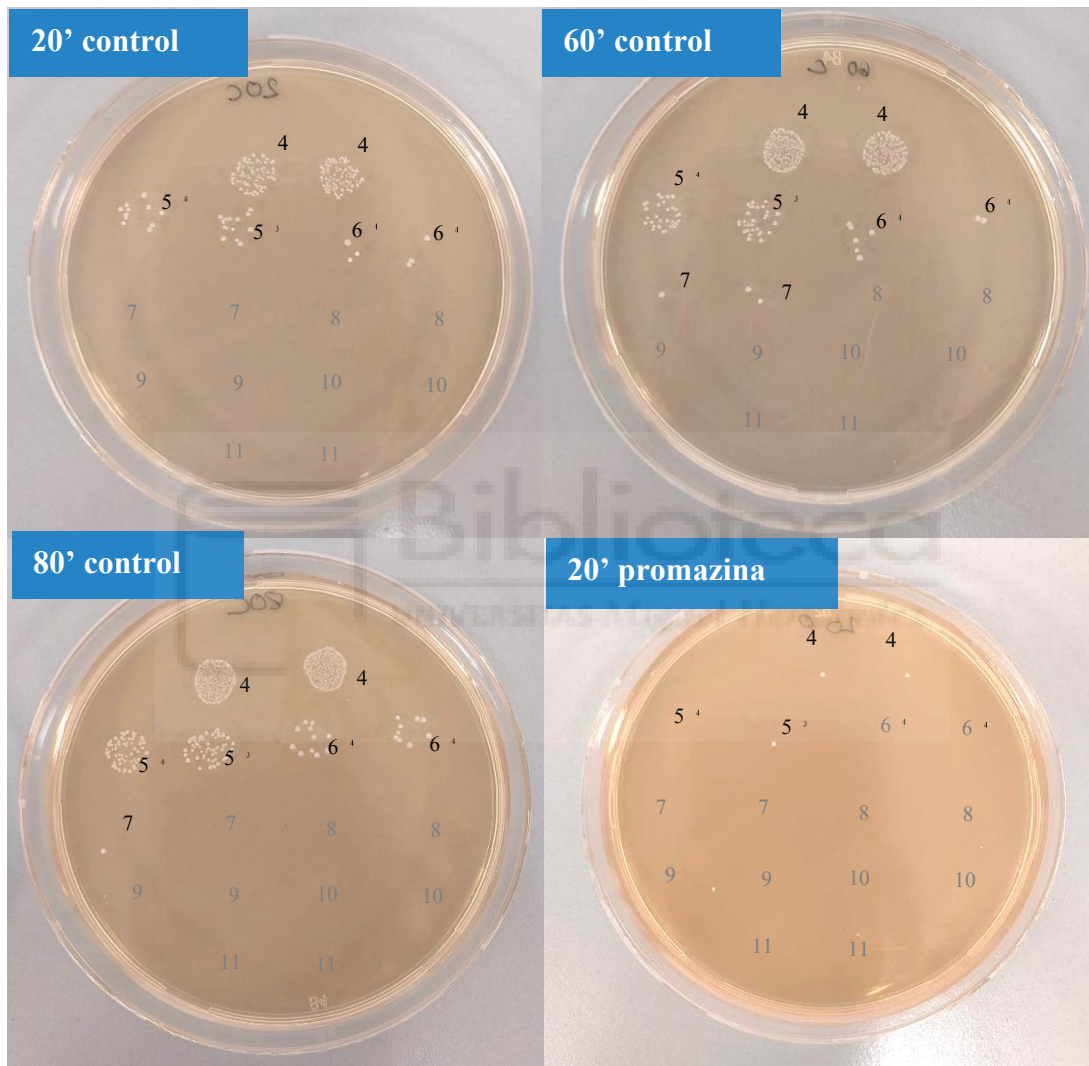


Figura 13. Placas de medio BHI donde los números representan el exponente de la dilución de cada gota para el recuento de viables, a 20, 60 y 80 minutos para el control y a 20 minutos para la promazina.

Se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) obtenidas según la muestra y el tiempo de crecimiento (Tabla 1). Los datos de la Tabla 1 se representan en la Figura 14. Los valores resultantes son una media del conteo de dos gotas de cada concentración.

Tiempo (minutos)	Control (UFC/ml)	Promazina (UFC/ml)
0	$8,3 \cdot 10^4$	$8,3 \cdot 10^4$
20	$2,7 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$
60	$6,3 \cdot 10^5$	0
80	$1,19 \cdot 10^6$	0

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias de *S. mutans* según el tiempo de crecimiento, en presencia y ausencia de promazina 1 mM.

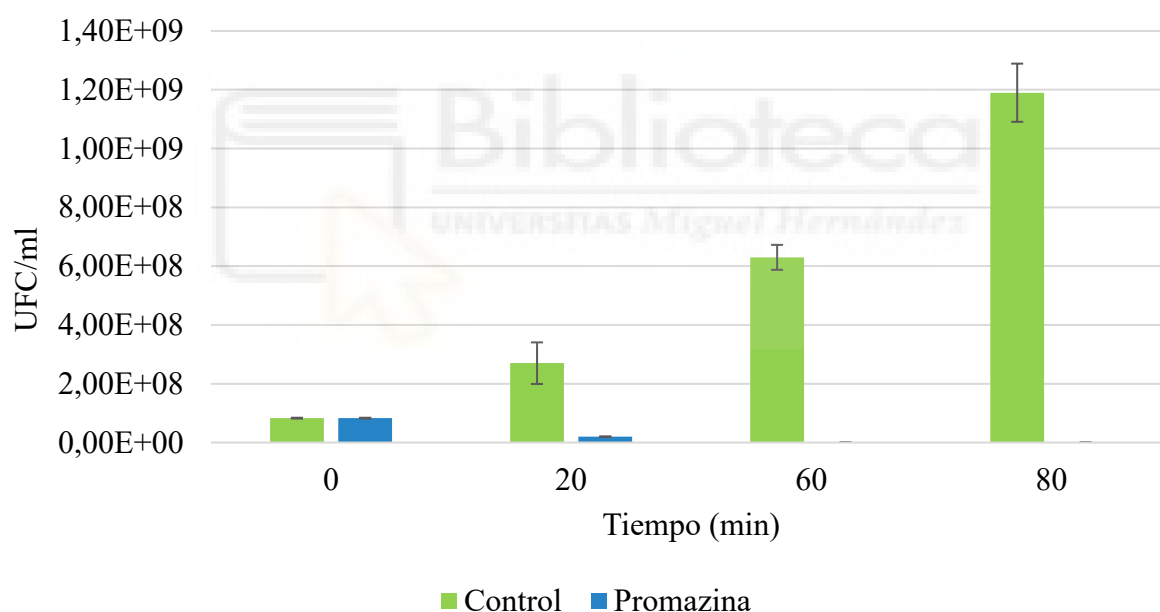


Figura 14. Unidades formadoras de colonias en un mililitro de cultivo en función del tiempo, para la muestra control (azul) y con promazina (naranja).

Se observa un descenso radical en el número de UFC por mililitro en el caso del cultivo con promazina, lo cual es consistente con los resultados obtenidos durante la curva de crecimiento, en los cuales también sucede un descenso considerable en la absorbancia a 600 nm a los 20 minutos de añadir la promazina (Fig. 14). Además, a 80 minutos, el cultivo control no ha alcanzado todavía la fase estacionaria, que también confirma los resultados de la curva de crecimiento.

4.6. Microscopía

Durante la curva de crecimiento se cogieron muestras para observar el crecimiento de *S. mutans* utilizando un microscopio óptico de contraste de fases.

Los datos obtenidos mediante la absorbancia nos indican que el crecimiento en presencia de promazina es muy escaso. Mediante la microscopía, se pretende analizar la morfología normal de *S. mutans* en las muestras correspondientes al control positivo y si existen cambios morfológicos significativos en *S. mutans* en presencia de promazina.

En la Figura 15 se observa la morfología normal de *S. mutans* en las muestras en ausencia de promazina. Se aprecia que las células presentan una morfología esférica correspondiente a la definición de coco. Estos son de tamaño pequeño y se disponen formando cadenas cortas o diplococos.

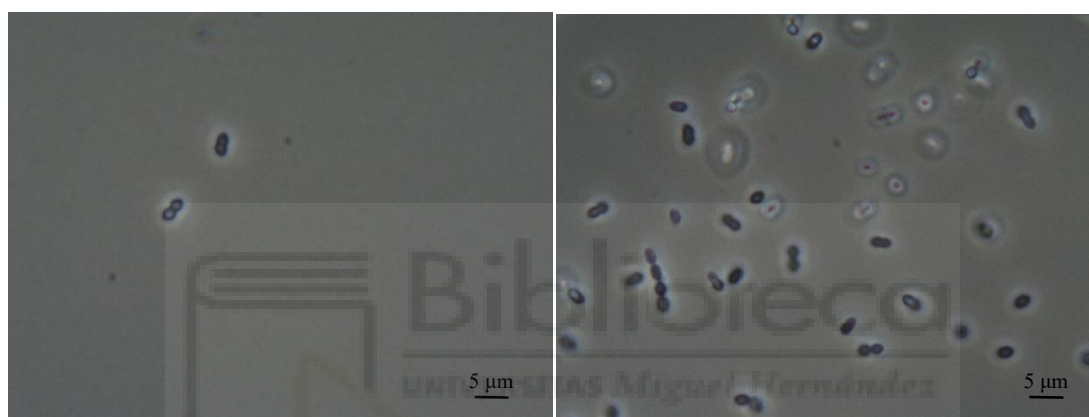


Figura 15. Imágenes al microscopio de contraste de fases de *S. mutans* en ausencia de promazina, tomadas a 20 minutos (izquierda) y 220 minutos (derecha) durante la curva de crecimiento.

En el caso de las muestras de *S. mutans* en presencia de promazina (Fig. 16), solo se estudiaron a los 20 minutos, ya que a 220 minutos la concentración era demasiado baja para poder ser observadas. A pesar de que aparece cierta cantidad de bacterias con una morfología normal, en su mayoría se observan cambios morfológicos significativos. Pueden apreciarse la formación de agregados celulares irregulares y estructuras filamentosas, además de células con morfologías distorsionadas. La típica disposición de *S. mutans* en cadenas cortas está alterada, apareciendo agrupaciones dispersas y desiguales.

Estas alteraciones morfológicas han sido observadas también en otras investigaciones utilizando ésteres aromáticos de aminas bicíclicas contra *Streptococcus pneumoniae* (de Gracia Retamosa *et al*, 2015; Pertusa Barberá, 2019).

Estas alteraciones morfológicas pueden ser la causa del efecto inhibitorio de la promazina sobre el crecimiento y la formación de biofilms de *S. mutans*. Estas pueden ser originadas por diversas razones. Una de ellas es la hipótesis planteada en la introducción: la interferencia de la promazina sobre las glucosiltransferasas de *S. mutans*, al presentar el

plegamiento $\beta\beta$ -solenioide que aparece en las proteínas CBP de *S. pneumoniae* que se ha demostrado son afectadas por este tipo de compuestos (de Gracia Retamosa *et al*, 2015; Pertusa Barberá, 2019). Sin embargo, también puede deberse a otras razones. Su estructura química podría permitirle intercalarse entre los fosfolípidos de la membrana celular y alterar su fluidez y permeabilidad.

Por otro lado, se conoce que la promazina presenta un leve efecto antipsicótico relacionado con el bloqueo de diversos receptores, por lo que posible que pueda afectar a proteínas transportadoras y canales iónicos implicados en mantener el equilibrio osmótico en la bacteria, lo cual conllevaría a deformaciones morfológicas, como las que podemos observar.

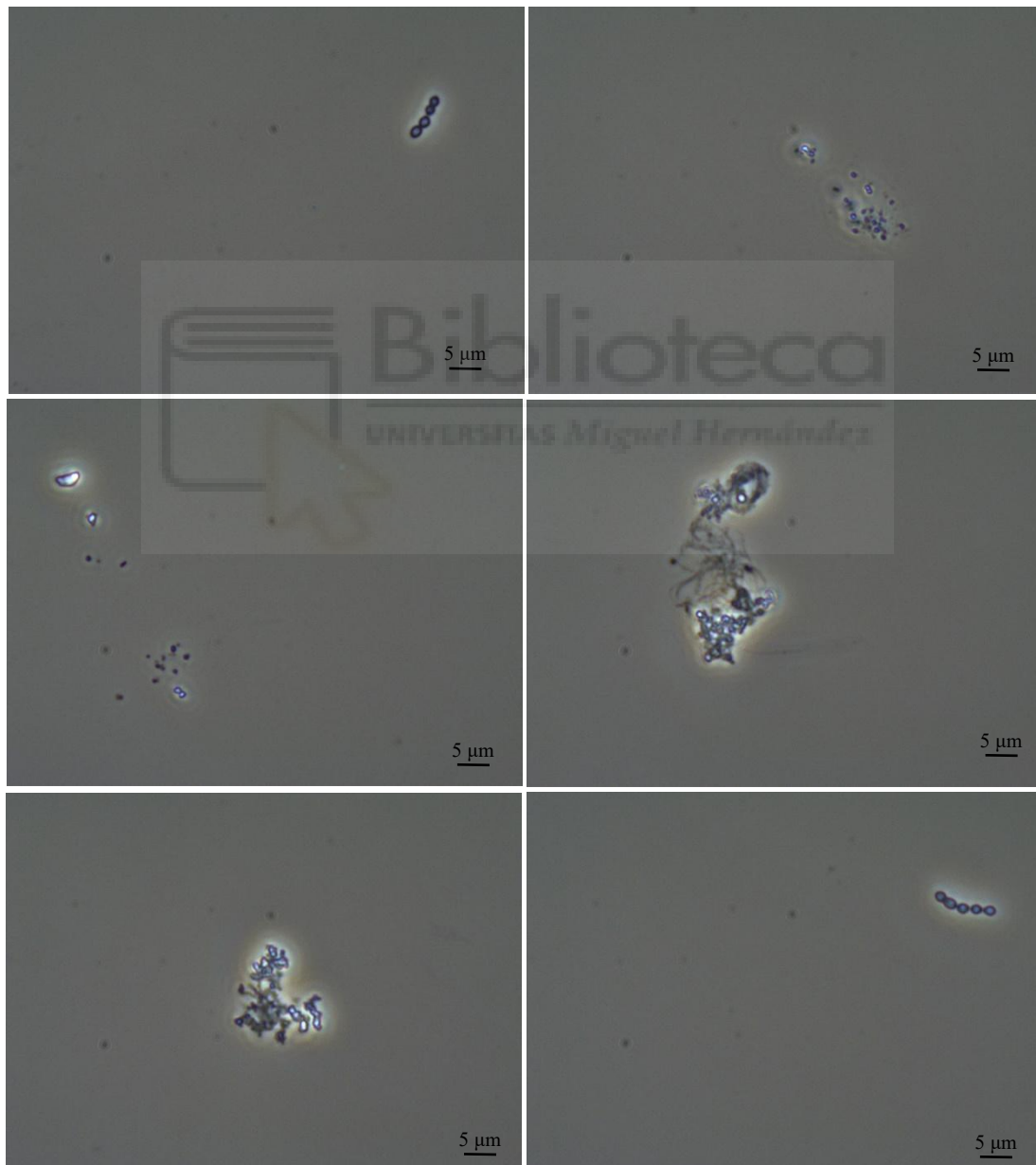


Figura 16. Imágenes al microscopio de contraste de fases de *S. mutans* en presencia de promazina, tomadas a 20 minutos durante la curva de crecimiento.

5. Conclusiones

El objetivo de este trabajo era evaluar el potencial antimicrobiano de la promazina. Los resultados han confirmado que la promazina ejerce un efecto inhibitor sobre el crecimiento y la formación de biofilms de la bacteria *Streptococcus mutans*. Se ha comprobado que hasta una concentración de 0,5 mM de promazina ejerce un fuerte efecto inhibitorio, reduciéndose en concentraciones descendientes. La promazina no solo es capaz de evitar la formación del biofilm, sino que también mantiene su efecto inhibitorio al ser aplicada incluso hasta 24 horas después del comienzo del establecimiento del biofilm, aunque dicho efecto parece disminuir cuanto más tiempo transcurre.

Los experimentos realizados con cultivos líquidos tenían como objetivo comprender el desarrollo y crecimiento de *S. mutans* en presencia de promazina. Los resultados, tanto en la curva de crecimiento como en el recuento de viables y las observaciones microscópicas, indican que la acción que la promazina ejerce sobre *S. mutans* sucede rápidamente, afectando a su viabilidad, pudiendo observar sus consecuencias a los 20 minutos de su aplicación.

Estos resultados sugieren que la promazina, al igual que otros compuestos fenotiazínicos, tiene la capacidad de alterar significativamente las propiedades de la membrana. Dado que los cambios morfológicos se presentan rápidamente tras la exposición al compuesto, concuerda con la hipótesis de alteración de la membrana, ya que este tipo de perturbaciones se producen más rápido que la inhibición de otros procesos celulares.

6. Proyección futura

En cuanto a líneas de investigación futuras, sería interesante dilucidar el mecanismo de acción por el cual la promazina provoca estos efectos en *S. mutans*, entre los cuales se propone la interferencia con las proteínas GTF de esta bacteria, basándose en el efecto demostrado sobre las CBP de *S. pneumoniae* (Pertusa Barberá, 2019; de Gracia Retamosa *et al*, 2015). Esto sería vital para continuar investigando el potencial de este compuesto en la aplicación de la salud bucodental.

Además, al demostrarse el efecto inhibidor de la formación de biofilms de la promazina sobre *S. mutans*, podría ser provechoso el estudio de compuestos del mismo tipo, derivados de la fenotiazina y ésteres de aminas bicíclicas, ya que podrían presentar un efecto similar o más potente sobre esta especie o ser más adecuados para la aplicación en productos de higiene bucodental, ya que, debido al efecto antipsicótico de la promazina, su aplicación en estos productos no es la más adecuada.

Otra posible línea de investigación sería estudiar el potencial antimicrobiano de la promazina sobre otras especies bacterianas del género *Streptococcus* o de otros géneros similares, lo cual sería de especial interés debido al aumento de la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos convencionales.

Por otro lado, en diversos estudios se ha observado que las fenotiazinas potencian el efecto de antibióticos a los que la bacteria es sensible, incluso cuando presenta resistencia. Son capaces de producir un efecto sinérgico, aumentando la acción individual del antibiótico (Amaral *et al*, 2004). Sería de gran utilidad continuar con estas investigaciones y analizar antibióticos para los cuales están apareciendo resistencias y evaluar la posibilidad de utilizar este tipo de compuestos para potenciar su efecto.

7. Bibliografía

- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T., ... Lemos, J. A. (2018). Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum*, 6(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018>
- Amaral L, Viveiros M, Molnar J. Antimicrobial activity of phenothiazines. *In Vivo*. 2004 Nov-Dec;18(6):725-31. PMID: 15646813.
- Bacela, J., Łabowska, M. B., Detyna, J., Ziety, A., Michalak, I. (2020). Functional coatings for orthodontic archwires-A review. *Materials*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma13153257>
- Bojanich, M.A., & Orlietti, M.D. (2020). Virulence Factors of Streptococcus mutans Related to Dental Caries. In *Staphylococcus and Streptococcus*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85807>
- Choi, A., Dong, K., Williams, E., Pia, L., Batagower, J., Bending, P., ... Kaspar, J. R. (2024). Human saliva modifies growth, biofilm architecture, and competitive behaviors of oral streptococci. *MSphere*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/msphere.00771-23>
- Cuadrado, S (2024). Estudio del crecimiento y la autólisis de *Streptococcus pneumoniae* a pH básico. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- De Gracia Retamosa, M., Díez-Martínez, R., Maestro, B., García-Fernández, E., De Waal, B., Meijer, E. W., ... Sanz, J. M. (2015). Aromatic Esters of Bicyclic Amines as Antimicrobials against Streptococcus pneumoniae. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(46), 13673–13677. <https://doi.org/10.1002/anie.201505700>
- GBD (2021a). Caries of permanent teeth - Level 4 cause. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-caries-permanent-teeth-level-4-disease>
- GBD (2021b). Caries of deciduous teeth - Level 4 cause. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-caries-deciduous-teeth-level-4-disease>
- Global oral health status report. Towards universal health coverage for oral health by 2030. Resumen ejecutivo. [9789240061880-spa.pdf](https://www.who.int/publications-detail/global-oral-health-status-report-towards-universal-health-coverage-for-oral-health-by-2030)
- Khan, R., Adil, M., & Khan, A. U. (2022). Molecular basis of cariogenic biofilm and infections. In *Understanding Microbial Biofilms: Fundamentals to*

Applications (pp. 427–443). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99977-9.00033-8>

- Kristiansen, M. M., Leandro, C., Ordway, D., Martins, M., Viveiros, M., Pacheco, T., ... Amaral, L. (2003). Phenothiazines alter resistance of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) to oxacillin in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(3), 250–253. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00200-0)
- Körtvélyessy, G., Tarjányi, T., Baráth, Z. L., Minarovits, J., Tóth, Z. (2021, August 1). Bioactive coatings for dental implants: A review of alternative strategies to prevent peri-implantitis induced by anaerobic bacteria. *Anaerobe*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102404>
- Lara, F.J. (2005). Determinación de fenotiazinas en preparados farmacéuticos y muestras biológicas mediante electroforesis capilar zonal con detección quimioluminiscente basada en la reacción del luminol con ferricianuro potásico. (pp. 27-34). Memoria del periodo de investigación tutelada. Universidad de Granada.
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., ... Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>
- Li, J., Wu, T., Peng, W., & Zhu, Y. (2020). Effects of resveratrol on cariogenic virulence properties of *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01761-3> (2022).
- Mira, A., Buetas, E., Rosier, B., Mazurel, D., Villanueva-Castellote, Á., Llena, C., & Ferrer, M. D. (2019). Development of an in vitro system to study oral biofilms in real time through impedance technology: validation and potential applications. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1609838>
- Navarro, C. (2024). Establecimiento de modelos de biofilm con la bacteria *Streptococcus mutans*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Ojeda-Garcés, J.C., Oviedo-García, E., & Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* and dental caries *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES Odont* (Vol. 26, pp. 44–56).
- Pertusa, M.A. (2019). Estudio del potencial antimicrobiano de los análogos de colina frente a la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.

- Priya, A., Nagaiah, H.P., Malligarjunan, N., Pandian, S.K. (2023). Oral biofilms: Architecture and control. In *Understanding Microbial Biofilms* (pp. 485-507), Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99977-9.00025-9>
- Tolker-Nielsen T. (2015) Biofilm Development. *Microbiol Spectrum*, Apr;3(2):MB-0001-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014> PMID: 26104692.
- Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>
- Yao, S., Hao, L., Zhou, R., Jin, Y., Huang, J., Wu, C. (2022, July 1). Multispecies biofilms in fermentation: Biofilm formation, microbial interactions, and communication. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12991>

