

Universidad Miguel Hernández
Facultad de Ciencias Experimentales



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Andrea Botella Lázaro

**Efecto del potencial antimicrobiano de aminos
bicíclicas en la bacteria *Streptococcus mutans***

Tutores: Manuel Sánchez Angulo y María Isabel Navarro Mendoza

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

Área de Microbiología

Curso 2024/2025

Grado en Biotecnología

Índice

1. Introducción.....	7
1.1. <i>Streptococcus mutans</i>	7
1.2. Formación de biofilms y su relación con la caries dental.....	8
1.3. Aminas bicíclicas.....	10
2. Antecedentes y objetivos.....	13
3. Materiales y métodos.....	13
3.1. Cepa utilizada.....	14
3.2. Medios de cultivo.....	14
3.3. Mantenimiento de la cepa <i>S. mutans</i> en colección.....	14
3.4. Crecimiento de la cepa <i>S. mutans</i>	14
3.5. Crecimiento de biofilm de <i>S. mutans</i>	15
3.6. Tinción de biofilm de <i>S. mutans</i>	15
3.7. Medida de espectrofotometría.....	15
3.8. Ensayos con aminas bicíclicas.....	16
3.9. Ensayos con antibióticos.....	17
3.9.1. Búsqueda de la concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos.....	17
3.9.2. Búsqueda de la sinergia.....	18
4. Resultados.....	18
4.1. Efecto de la atropina sobre <i>S. mutans</i>	18
4.2. Efecto del clidinio sobre <i>S. mutans</i>	19
4.3. Efecto del ipratropio sobre <i>S. mutans</i>	20
4.4. Efecto de la camylofina sobre <i>S. mutans</i>	21
4.5. Efecto de la trimetilamina sobre <i>S. mutans</i>	21
4.6. Sinergia de la promazina con antibióticos.....	22
4.6.1. Búsqueda de la CMI con ampicilina.....	23
4.6.2. Establecimiento de sinergia entre ampicilina y promazina.....	25
4.7. Efecto del cloranfenicol sobre <i>S. mutans</i>	26
4.7.1. Búsqueda de la CMI con cloranfenicol.....	27
4.7.2. Establecimiento de sinergia entre cloranfenicol y promazina.....	28
5. Discusión.....	30

6. Conclusiones y proyección futura.....	32
7. Bibliografía.....	33



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a mi tutor Manuel Sánchez por haberme brindado la posibilidad de realizar mi Trabajo de Fin de Grado en su laboratorio. Gracias a él he descubierto que lo que de verdad me apasiona en la vida es la microbiología y al darme esta oportunidad he podido descubrir nuevas cosas y estar más en contacto con aquello a lo que me gustaría dedicarme. También me gustaría agradecer el inmenso apoyo y ayuda ofrecida por Maribel y Rocío, ellas siempre han estado ahí cuando las he necesitado, dándonos consejos, aportando nuevas ideas, interesándose por cómo iba nuestro trabajo, etc. Sin ellas, no habría disfrutado tanto este proceso.

Por otro lado, me gustaría agradecer a mi familia, la cual siempre ha estado apoyándome incondicionalmente en cada paso de este proceso. En especial a mi madre por estar ser un pilar fundamental en mi vida y haber confiado más que yo misma en muchas ocasiones.

Además, también me gustaría agradecer a mis amigas, por haber celebrado cada logro que he conseguido como si fuera suyo y por haber estado cuando las cosas no salían como a mí me hubiera gustado.

Por último, pero no por eso menos importante, me gustaría agradecer a mi compañera de laboratorio y amiga Marta. Desde el primer día hemos sido un equipo y siempre hemos estado ahí para apoyarnos y ayudarnos cuando las cosas salían mal, para intercambiar opiniones cuando nos surgía algún problema y sobre todo para celebrar cuando las conseguíamos alguna victoria. Sin ella estos cuatro años de carrera no hubieran sido lo mismo.

¡Muchas gracias a todos vosotros!

Resumen y palabras clave

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positiva y anaerobia facultativa que se encuentra en la cavidad bucal humana, formando parte de la microbiota oral. Esta bacteria es la causante de producir caries, una de las principales enfermedades a nivel bucodental. Esto lo logran gracias a su amplia capacidad de formar biofilms dentales. Por esta razón, son los principales agentes etiológicos en intervenir tanto en el inicio de la formación de la caries como en el desarrollo de estas. En consecuencia, este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se centrará en la búsqueda de compuestos capaces de alterar o incluso detener la formación de dichos biofilms. Para ello, se cuenta con un protocolo para el crecimiento de biofilms “*in vitro*” de *S. mutans* previamente establecido, así como un protocolo de tinción para cuantificar el crecimiento de estos. Finalmente, a estos biofilms se les añadió diferentes compuestos antibacterianos para comprobar su eficacia. De esta forma, si se detectara alguna molécula cuya eficacia quede contrastada, esta podría utilizarse como posible agente en productos de higiene bucal.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, biofilms, caries, compuestos antibacterianos, protocolo, densidad óptica.

Abstract and keywords

Streptococcus mutans is a Gram-positive and facultative anaerobic bacterium that can be found in the oral cavity of humans, forming part of the oral microbiota. This bacterium is responsible for producing one of the main diseases in the oral cavity, namely tooth decay. *S. mutans* achieves this thanks to its capacity to form dental biofilms. For this reason, these bacteria are the main etiological agents involved in both the onset of caries formation and its development. Consequently, this TFG will focus on the search for a compound that can alter or even stop the formation of these biofilms. To do that, we have a previously established protocol for the “*in vitro*” growth of *S. mutans* biofilms, as well as a staining protocol to quantify their growth by measuring the optical density. Finally, different antibacterial compounds were added to these biofilms to test their efficacy. In this way, if we find a molecule whose efficiency is proved, it could be used as an agent in oral hygiene products.

Keywords: *Streptococcus mutans*, biofilms, tooth decay, antibacterial compounds, protocol, optical density.

Índice de abreviaturas

BHI, medio *Brain Heart Infusion* (infusión de cerebro corazón) con un 2% de sacarosa.

CMI, concentración mínima inhibitoria.

DO, densidad óptica.

O/N, *overnight*, tubo de crecimiento de bacteria en la estufa durante toda la noche.

QS, *quorum sensing* (percepción de quorum).

TMA, trimetilamina.



1. Introducción

1.1. *Streptococcus mutans*

Los primeros atisbos de la historia de este microorganismo surgieron en 1924, gracias al aislamiento producido por James Kilian Clarke. Este microbiólogo británico fue el primero en aislar una cepa bacteriana específica de la placa dental de aquellas personas con caries activas. Concretamente, Clark observó que en las zonas donde se producían caries había bacterias que poseían una alta capacidad de fermentar azúcares y producir ácido. Al aislar dichos microorganismos, se percató de que se trataba de unas bacterias que no se conocían hasta aquel momento. Estos microbios se organizaban en forma de cadenas cortas, característica que permitió identificarlos como estreptococos. Además, eran capaces de transformar la sacarosa en ácido láctico, proceso asociado a la desmineralización del esmalte dental. Ahora bien, el nombre de “mutans” lo recibe debido a la gran variabilidad morfológica y bioquímica que presentaban las bacterias aisladas en su muestra. Puesto que, al ver variaciones en el color y forma de las colonias dificultaba clasificarlas de forma precisa con los métodos de identificación de aquel momento (Clarke, 1924).

Streptococcus mutans es anaerobio facultativo altamente acidogénico y acidúrico, puesto que produce ácido y tolera los medios ácidos. Esto hace que tengan un dominio de ambientes con bajo pH, prosperando donde otras bacterias no sobreviven (Abranches *et al.*, 2018). En cuanto a las características morfológicas, nos encontramos con que *S. mutans* es un coco Gram positivo, por lo que posee forma de esfera y su pared celular, al ser más gruesa por la presencia de lipopolisacáridos, retiene el colorante violeta al hacer una tinción Gram. Además, las células de este organismo se presentan en forma de cadenas cortas o pares (Figura 1). *S. mutans* no forma esporas ni posee flagelo, por lo que no es móvil.

También es oportuno mencionar que *S. mutans* posee varios serotipos, que vienen definidos por las diferentes estructuras que poseen los polisacáridos de la cápsula: los serotipos c, e, f y k. Sin embargo, el serotipo c lo encontramos en el 70-80% de los casos, por lo que es el más común entre los humanos. Estos serotipos pueden producir variaciones en cuanto a la capacidad de adhesión, factores de virulencia y producción de ácidos se refiere, aunque todos son potencialmente cariogénicos. Cabe destacar que la forma en la que se distribuyen estas

variantes se puede relacionar con la geografía, la dieta y la genética del hospedador. No fue hasta finales de los años cincuenta que se decidió profundizar acerca del estudio de *S. mutans* y se descubrió que la cavidad bucal era su hábitat natural. Además, se confirmó que esta Gram positiva era la causante principal de la formación de biofilms en el esmalte dental, provocando así las caries. Sin embargo, más allá de su efecto cariogénico, *S. mutans* también se puede comportar como un patógeno oportunista, relacionándose en enfermedades como la endocarditis infecciosa y otras enfermedades sistémicas. Esto ocurre cuando esta bacteria entra en el torrente sanguíneo, pudiendo así desplazarse a otros órganos y colonizarlos, como lo son las válvulas cardiacas en el caso de la endocarditis (Ojeda-Garcés, 2013).

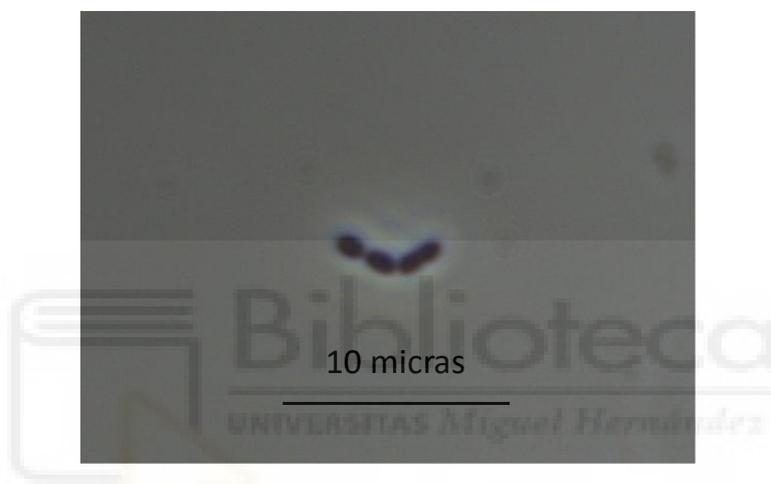


Figura 1. Imagen de microscopio óptico de contraste de fases de *Streptococcus mutans*

1.2. Formación de biofilms y su relación con la caries dental

Uno de los procesos relacionados con la patogénesis de la caries dental más relevantes es la formación de biofilms orales. Estas son comunidades de microorganismos organizadas que se adhieren a una superficie que es embebida en una matriz extracelular producida por ellos mismos. Así mismo, *S. mutans*, aunque no es el único, es uno de los principales agentes etiológicos de la caries dental y una de las bacterias más importantes en los biofilms.

Esto lo consigue gracias a que es capaz de adherirse a la superficie dental, formando un biofilm que permite establecer un entorno que favorece que se pueda acidificar la zona y que, en consecuencia, se desmineralice el esmalte (Khan *et al.*, 2023). Este biofilm tiene inicio con la adhesión inicial de la bacteria gracias a la acción de adhesinas como el Antígeno I/II. A continuación, se producen una serie de glucanos insolubles mediante enzimas glucosiltransferasas, que serán las responsables de transformar la sacarosa en una matriz

extracelular pegajosa (Bojanich & Orlietti, 2020). Esta matriz será la encargada de mantener la cohesión entre bacterias, además de actuar como una barrera capaz de resistir a la acción de antimicrobianos y factores inmunológicos. Por lo que, al finalizar este proceso, el biofilm ha madurado desde una simple comunidad de microorganismos, a una estructura compleja donde las bacterias tienen una comunicación mediante *quorum sensing* (QS) o percepción de quorum y comparten recursos dentro de la matriz rica en glucanos, proteínas y ADN extracelular (Priya *et al.*, 2023).

Además, *S. mutans* posee una elevada acidogenicidad y aciduricidad, considerados como factores de virulencia. Por lo que, en condiciones anaeróbicas, al fermentar azúcares para poder obtener energía y transformarlos en ácido láctico, reduce el pH del microambiente del biofilm a niveles críticos, menores a 5,5. De esta forma, favorece que el esmalte se desmineralice, liberándose los iones de fosfato que constituyen el hidroxiapatito que forma el esmalte. Además, como también es capaz de resistir ambientes con tan bajo pH, podrá ser una competencia para otras bacterias comensales no cariogénicas (Abranches *et al.*, 2018).

Entre las estrategias que han ido surgiendo estos últimos años para intentar controlar el crecimiento de estos biofilms se incluye la interrupción de la percepción de quorum, el uso de enzimas para degradar la matriz extracelular y el uso de probióticos y compuestos naturales que favorezcan el crecimiento de las bacterias no cariogénicas para que pueda haber una competencia con las que sí lo son. (Li *et al.* 2020)

En cuanto a la importancia de las caries en la salud pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022) las reconoce como la enfermedad bucodental con mayor prevalencia a nivel global, afectando al 60-90% de los niños y a casi todos los adultos. Los biofilms ocasionados principalmente por *S. mutans* se consideran el primer factor microbiano responsable (Figura 2). Del mismo modo, el *Global Burden of Disease* (GBD, 2021a, 2021b) también reporta que las caries, ya sea en dientes definitivos como temporales, representa un gran peso en todas las regiones y grupos étnicos en cuanto a enfermedades se refiere.

En conjunto, la evidencia científica actual respalda que la formación de biofilms por *S. mutans* no solo es central en la etiología de la caries, sino que representa un desafío en términos de tratamiento y prevención, tanto a nivel clínico como en políticas de salud pública.

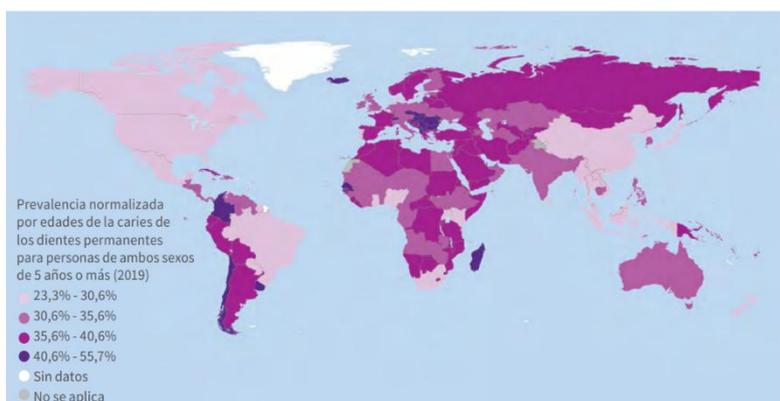


Figura 2. Prevalencia estimada de la caries de los dientes permanentes por país (OMS, 2022).

1.3. Aminas bicíclicas

Un enfoque innovador en el desarrollo de nuevos antimicrobianos consiste en identificar moléculas capaces de interferir en procesos clave del crecimiento, reproducción o supervivencia bacteriana. Un ejemplo de este tipo de compuestos son las aminas bicíclicas. Estas están formadas por al menos dos anillos fusionados y uno o más grupos amina en su estructura. Gracias a su estructura rígida y tridimensional les proporciona afinidad específica por blancos moleculares, convirtiéndolas en moléculas interesantes para el diseño de fármacos.

En cuanto a su función, aunque no todas las aminas bicíclicas tienen efectos antimicrobianos directos, varias de ellas están siendo estudiadas por su capacidad de alterar la permeabilidad de membranas bacterianas, sensibilizar bacterias a otros antibióticos o interferir con la percepción de quorum (Rasko & Sperandio, 2010). Los efectos de estas aminas ya están descritos en farmacología por su acción antipsicótica pero, debido a su potencial de actuación sobre las membranas, se está estudiando su posible comportamiento como antimicrobiano. Además, algunas aminas bicíclicas sintéticas, poseen una actividad antimicrobiana directa *in vitro*, especialmente contra bacterias Gram positivas.

Por otro lado, en cuanto a los posibles usos futuros de estos compuestos, encontramos que pueden ser promotores de nuevos antibióticos frente a bacterias multirresistentes. Además, también podrían utilizarse como sistemas de liberación controlada, puesto que las estructuras bicíclicas pueden usarse como plataformas para transportar y liberar principios activos antimicrobianos. Adicionalmente, también se ha pensado en un uso como terapias

combinadas, actuando como adyuvantes que potencian antibióticos existentes. Finalmente, el potencial uso que más nos interesa para el desarrollo de este trabajo es que pueden ser agentes anti-biofilm, si son capaces de impedir la adhesión bacteriana.

Concretamente, en este trabajo se utilizaron varias aminas bicíclicas (Figura 3). En primer lugar, se probó la atropina como posible agente antimicrobiano. Esta es un alcaloide tropánico natural, derivado de plantas como *Atropa belladonna*, que usa generalmente como antagonista muscarínico. En segundo lugar, se utilizó clidinio, el cual deriva estructuralmente del tropano, como la atropina, y pertenece al grupo de los antimuscarínicos. En cuanto a su función, es un bloqueador competitivo de los receptores muscarínicos del sistema nervioso parasimpático, utilizado particularmente en síndrome de intestino irritable o úlceras. Otro de los compuestos estudiados en este trabajo fueron el ipratropio, el cual es una amina bicíclica cuaternaria derivada del tropano. Su uso principal es como broncodilatador anticolinérgico, y se emplea en el tratamiento del asma y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Además de estos, también se estudió el efecto de la camylofina, cuya composición química incluye un grupo amino terciario y una estructura que permite su acción sobre el músculo liso. Esta amina es un fármaco con actividad anticolinérgica, utilizada para tratar espasmos gastrointestinales, urinarios y uterinos. Finalmente, se analizó el resultado de una amina terciaria alifática, como es la trimetilamina, cuyo uso comercial es de químico industrial.

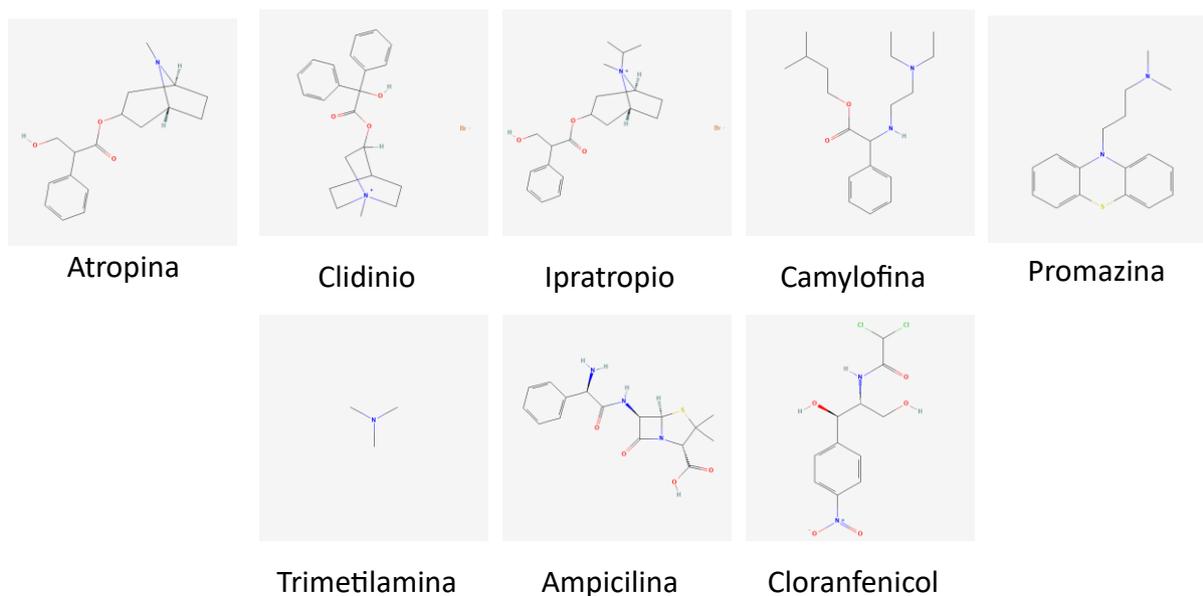


Figura 3. Aminas bicíclicas y antibióticos estudiados en este trabajo. La primera fila de compuestos son las aminas bicíclicas utilizadas y la segunda corresponde a otra amina y a los dos antibióticos a estudio. Estructuras moleculares disponibles en PubChem.

Adicionalmente, también se comprobó el posible efecto sinérgico que poseían ciertos antibióticos combinados con una amina bicíclica, siendo esta la promazina. La promazina es un fármaco antipsicótico típico, perteneciente al grupo de las fenotiazinas, utilizado en trastornos psiquiátricos, además de poseer efectos sedantes y antieméticos. Además, también inhiben las bombas de expulsión de fármacos en bacterias resistentes y potencia la eficacia de otros agentes antimicrobianos frente a bacterias multirresistentes. Adicionalmente, en un trabajo anterior, también se demostró la acción inhibitoria que posee la promazina frente al crecimiento de los biofilms (Navarro, 2024). Por estas razones, se quiso comprobar el efecto que poseía la combinación de esta amina con cada uno de los antibióticos en busca de una posible sinergia. Estos antibacterianos fueron la ampicilina y el cloranfenicol.

En primer lugar, la ampicilina es un antibiótico β -lactámico perteneciente al grupo de las aminopenicilinas, derivadas de la penicilina original. Se caracteriza por tener un espectro de acción ampliado, lo que le permite actuar contra muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Y, en cuanto a su acción antimicrobiana, nos encontramos con que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana, actuando sobre las proteínas de unión a penicilina (PBPs) (Lemos *et al.*, 2019). Estas proteínas son enzimas necesarias para formar enlaces cruzados en el peptidoglicano, un componente esencial de la pared celular de bacterias como *S. mutans*. Por esta razón, al bloquear las PBPs, la pared se debilita y la célula bacteriana sufre lisis por presión osmótica (Bush & Bradford, 2016). Además, también tiene usos como bactericida.

Por otro lado, el cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro, conocido por su actividad bacteriostática, aunque puede ser bactericida en concentraciones elevadas o frente a bacterias muy sensibles. En cuanto a sus efectos sobre bacterias como *S. mutans*, es capaz de inhibir la síntesis de proteínas bacterianas, puesto que se une de forma reversible a la subunidad 50S del ribosoma, bloqueando la formación del enlace peptídico durante la traducción del ARN mensajero. Esto impide que la bacteria produzca proteínas esenciales para su crecimiento y replicación. Además, puede disminuir la producción de ácido láctico al frenar la síntesis de enzimas claves en este proceso. Por último, aunque es principalmente un bacteriostático, también puede emplearse como bactericida a altas concentraciones (Balbi, 2004).

2. Antecedentes y objetivos

S. mutans es el principal colonizador y productor del biofilm en el esmalte dental, provocando la desmineralización de este y el posterior efecto cariogénico. Por eso, conocer el proceso de crecimiento de este biofilm y el mecanismo de acción que sigue *S. mutans* para causar esta afección oral es un paso clave para combatir la producción de placa bacteriana y así poder encontrar algún compuesto antimicrobiano capaz de asegurar una disminución en el número y tamaño de los biofilms producidos.

Actualmente, se están llevando a cabo estudios para controlar el crecimiento de este patógeno en la cavidad oral. Todos ellos se centran en inhibir la propagación de la bacteria dañando alguna de sus enzimas, estructuras, mecanismos o moleculares mediante el uso de varios compuestos en experimentación.

Por esta razón, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la eficacia que poseen varias aminos bicíclicas en la inhibición del crecimiento y producción de biofilms de *S. mutans*. Para esto, llevaremos a cabo una serie de experimentos para lograr los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto de la técnica de crecimiento de cultivos de la cepa de *S. mutans*.
2. Observar el efecto que poseen distintas aminos bicíclicas en los cultivos de *S. mutans* y determinar cuál es el que posee un mayor efecto antimicrobiano.
3. Observar la posible sinergia de las aminos bicíclicas con la acción de antibióticos de amplio espectro.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepa utilizada

La especie bacteriana utilizada a lo largo de todo este trabajo fue *Streptococcus mutans* CECT 479. Esta cepa se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo y se considera una bacteria de nivel de bioseguridad 1 (BSL-1) según la legislación española. Todo el material con el que se manipuló este microorganismo se encontraba en esterilidad y durante su manejo se

mantuvieron condiciones asépticas mediante el uso de un mechero Bunsen, acompañado de una campana de cultivo para intentar evitar posibles contaminaciones.

3.2. Medios de cultivo

Para crecer la cepa de *S. mutans* se utilizó medio BHI (*Brain Heart Infusion*) de la marca Oxoid suplementado con un 2% de sacarosa y fue usado tanto en forma líquida como sólida. El medio fue preparado siguiendo las indicaciones del fabricante. Para preparar el medio sólido se añadió agar a una concentración de 15 g/L.

Ambos medios de cultivo se esterilizaron antes de utilizarse en un autoclave a 1,2 atmósferas de vapor y 121°C durante 20 minutos. Al inicio del trabajo, tras haberse atemperado, almacenábamos los medios en la nevera a 4°C. Sin embargo, debido a problemas de contaminación del medio no detectados a tiempo, ya que a 4°C es una temperatura bacteriostática, los medios se almacenaron a temperatura ambiente y así poder detectar visualmente si alguno de los medios estaba contaminado antes de trabajar con ellos.

3.3. Mantenimiento de la cepa *S. mutans* en colección

En cuanto al mantenimiento de la cepa a estudio, esta se conserva a -80°C. Por lo tanto, se descongeló la cepa almacenada para poder sembrarla en una placa que contenía medio sólido de BHI. Tras la siembra, la placa se incubó en la estufa a 37°C, ya que es la temperatura óptima para el crecimiento de *S. mutans*.

Una vez que ha crecido, se realiza un inóculo con un asa de siembra en 4 mL de medio líquido BHI para poder realizar los experimentos y la placa anteriormente sembrada, se conservó a 4°C.

3.4. Crecimiento de la cepa *S. mutans*

Para hacer crecer a *S. mutans*, se preparó un inóculo en un tubo estéril SARSTEDT de 5 mL (Ref. 55.475.001) y se dejó crecer 24 horas en la estufa a 37°C. Este cultivo, denominado cultivo overnight O/N, puesto que lo dejamos multiplicarse toda la noche, contiene 4 mL de medio líquido BHI y una muestra de *S. mutans* recogida con un asa de siembra de una placa de medio BHI sólido. Adicionalmente, también se preparó un tubo estéril que contenía únicamente los 4 mL de medio BHI sin inocular para poder utilizarlo como control negativo.

Una vez pasadas las 24 horas de crecimiento, se midió la absorbancia de nuestro inóculo a una densidad óptica de 600 nanómetros (DO_{600}), donde la densidad del inóculo solía ser 1,3 aproximadamente.

3.5. Crecimiento de biofilm de *S. mutans*

Para establecer los biofilms de *S. mutans*, se utilizó una placa de 96 pocillos, de la marca SARSTEDT (Ref. 83.3924.005). Para la inoculación de la biopelícula, se realizó un cultivo O/N. Tras 24 horas, se realizó una medida del cultivo a DO_{600} y se realizaba una dilución 1:10 cuando la absorbancia detectada estaba por encima de 1. Posteriormente, tras la dilución, se volvió a medir la DO_{600} y se ajustó la concentración a 0,05 unidades DO_{600} /mL. Una vez el inóculo estaba a la concentración deseada, se inocularon 100 μ L en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó 24 horas en la estufa a 37°C. Tras la incubación, se realizó la tinción con cristal violeta.

3.6. Tinción de biofilm de *S. mutans*

Para teñir las placas con el biofilm de *S. mutans* ya crecido, se siguió el siguiente protocolo:

- Se retiró el sobrenadante de cada uno de los pocillos, evitando romper el biofilm.
- Se realizó un primer lavado de los pocillos con 200 μ L PBS 1x.
- Se añadieron 200 μ L de cristal violeta al 0,02% y se incubó durante 30 minutos.
- Se retiró el cristal violeta.
- Se realizaron dos lavados con 200 μ L de PBS 1x.
- Se dejó secar 24 horas a temperatura ambiente.
- Finalmente, se añadieron 200 μ L de isopropanol inmediatamente antes de realizar la lectura de placas a 490 nm.

3.7. Medida de espectrofotometría

En este trabajo, se utilizó un espectrofotómetro Zuzi modelo 4201/50 para medir la densidad óptica de nuestros cultivos de *S. mutans*. Estas medidas fueron posibles gracias a los tubos SARSTEDT de 5 mL con un paso óptico de 1 cm. Y la absorbancia aparente fue medida a 600 nm. Adicionalmente, las placas de 96 pocillos fueron medidas en el espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA).

3.8. Ensayos con aminas bicíclicas

Durante la primera parte de este trabajo, se emplearon las siguientes aminas bicíclicas como posibles agentes antimicrobianos: atropina, clidinio, ipratropio, camylofina y trimetilamina. Todas ellas fueron anteriormente estudiadas en nuestro laboratorio para comprobar si poseían algún poder antimicrobiano (Pertusa, 2019). Y su adquisición fue en este organismo se presentan en forma Sigma.

En cuanto a los ensayos realizados, lo que hicimos fue inocular la placa de 96 pocillos por filas (Figura 4). En los primeros 8 pocillos de la primera fila, depositamos 100 μ L de medio líquido BHI en cada pocillo para poder contar con un control negativo. Además, en dos pocillos sobrantes de esta fila, decidimos añadir un control negativo de la amina bicíclica correspondiente para comprobar si había algún indicio de contaminación en estos compuestos. Para eso, adicionamos 10 μ L de la amina en 100 μ L de medio BHI. En la segunda fila, agregamos 100 μ L del inóculo de *S. mutans* previamente preparado para que actuara como control positivo del experimento. Finalmente, en la tercera y última fila, añadimos una mezcla de inóculo de *S. mutans* y una de las aminas bicíclicas. Sin embargo, la concentración inicial de las aminas era de 100 mM y, como la cantidad necesaria era de 1 mM, era necesario que se realizara una dilución 1:10. Una vez preparada la dilución, se añadieron 100 μ L de esta en 8 pocillos de la tercera fila de la placa.

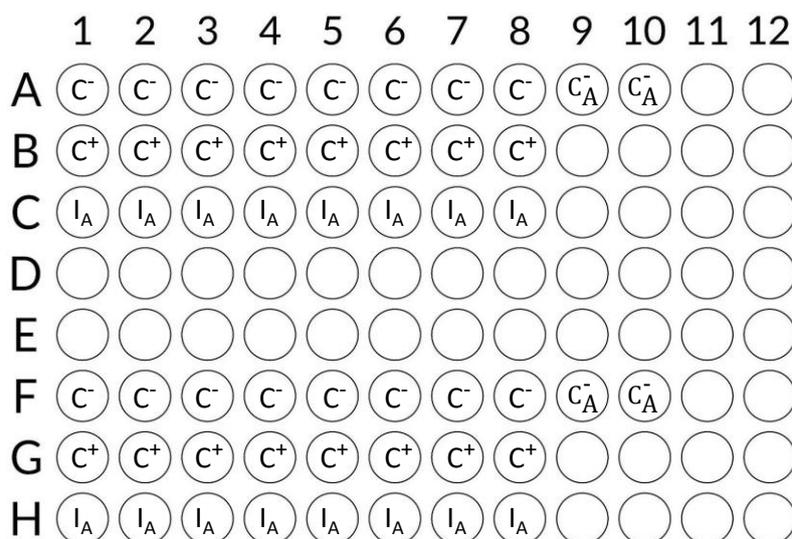


Figura 4. Diseño del experimento con aminas bicíclicas en placa de 96 pocillos. Control negativo (C⁻). Control positivo (C⁺). Control de contaminación de las aminas bicíclicas (C_A⁻). Inóculo de *S. mutans* y la amina bicíclica (I_A).

3.9. Ensayos con antibióticos

Los antibióticos utilizados para continuar con el trabajo fueron la ampicilina y el cloranfenicol. Estos fármacos fueron estudiados con la intención de encontrar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria). Una vez estimada la CMI, se combina el antibiótico con la promazina, una amina bicíclica a la que sí que se le encontró función inhibitoria (Navarro, 2024). Esta combinación de compuestos se realizó para verificar si ambos compuestos generaban una sinergia y así producían un efecto inhibitorio mayor a una concentración menor.

3.9.1. Búsqueda de la concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos

En primer lugar, se procedió a encontrar la CMI de ambos antibióticos. Para ello, se preparó un stock de 1 mg/mL de todos los compuestos para realizar diluciones seriadas al 50% en las placas multipocillo. Sin embargo, el stock inicial de la Ampicilina se encontraba a 50 mg/mL, por lo que tuvimos que realizar una dilución inicial de 50x. Y, el cloranfenicol, se encontraba a una concentración de 25 mg/mL, haciendo necesaria una dilución 25x. Para conseguir las diluciones deseadas realizamos los siguientes cálculos:

Ampicilina

$$\begin{aligned} \text{Stock inicial (50 mg/mL)} &\xrightarrow[20 \mu\text{L Ampicilina} + 980 \mu\text{L BHI}]{50x} \text{Stock A (1 mg/mL)} \xrightarrow[100 \mu\text{L stock A} + 900 \mu\text{L BHI}]{10x} \\ \text{Stock B (100 } \mu\text{L/mL)} &\xrightarrow[100 \mu\text{L stock B} + 900 \mu\text{L BHI}]{10x} \text{Stock C (10 } \mu\text{L/mL)} \xrightarrow[100 \mu\text{L stock C} + 900 \mu\text{L BHI}]{10x} \text{Stock D} \\ &\text{(1 } \mu\text{L/mL)} \end{aligned}$$

Cloranfenicol

$$\begin{aligned} \text{Stock inicial (25 mg/mL)} &\xrightarrow[40 \mu\text{L Ampicilina} + 960 \mu\text{L BHI}]{25x} \text{Stock A (1 mg/mL)} \xrightarrow[100 \mu\text{L stock A} + 900 \mu\text{L BHI}]{10x} \\ \text{Stock B (100 } \mu\text{L/mL)} &\xrightarrow[100 \mu\text{L stock B} + 900 \mu\text{L BHI}]{10x} \text{Stock C (10 } \mu\text{L/mL)} \xrightarrow[100 \mu\text{L stock C} + 900 \mu\text{L BHI}]{10x} \text{Stock D} \\ &\text{(1 } \mu\text{L/mL)} \end{aligned}$$

Utilizando estos stocks, se pudieron inocular placas de 96 pocillos con el objetivo de encontrar la CMI de ambos antibióticos. Concretamente, los stocks A y B se utilizaron para conseguir concentraciones que iban de 500 a 6 $\mu\text{g/mL}$ dividiéndolas a la mitad. Y, los stocks C y D se

emplearon para conseguir una placa más diluida, es decir, con un rango de concentraciones que iba desde 5 µg/mL a 0,06 µg/mL.

3.9.2. Búsqueda de la sinergia

Una vez encontrada la CMI, se estudió si es posible encontrar sinergia entre cada uno de los antibióticos y la promazina. Para esto, se empleó una placa de 96 pocillos, la cual fue inoculada con un control negativo, el cual era únicamente medio BHI líquido; un control positivo, que era inóculo de *S. mutans*; y controles para confirmar que la CMI encontrada era verídica. Además, también se realizaron distintas combinaciones de *S. mutans*, cada uno de los antibióticos a distintas concentraciones y 20 µL de promazina a una concentración de 0,1 mM.

4. Resultados

Durante este trabajo se analizaron un total de seis aminas bicíclicas: atropina, clidinio, ipratropio, camylofina, trimetilamina, y promazina. Además, esta última fue usada en combinación con los antibióticos ampicilina y cloranfenicol para comprobar el efecto sobre el crecimiento y formación de biofilms de *S. mutans*. Previamente al cribado de los diferentes compuestos se puso a punto el protocolo anteriormente establecido en nuestro laboratorio (Navarro, 2024) para la formación de biofilms y el crecimiento y mantenimiento de la cepa bacteriana al igual que se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Para estudiar el efecto de las aminas bicíclicas sobre el crecimiento de *S. mutans*, se incubó el compuesto con un cultivo de este microorganismo, y se analizó si la bacteria era capaz de formar un biofilm en presencia de la amina bicíclica.

4.1. Efecto de la atropina sobre *S. mutans*

La atropina es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos de acetilcolina, encargado de bloquear la acción del sistema nervioso parasimpático. Para comprobar si este compuesto es capaz de impedir el crecimiento de *S. mutans*, se inoculó atropina a una concentración de 1mM junto con *S. mutans* en medio BHI y se incubó de 24 horas en una estufa a 37°C (Figura 4). Para ejecutar el ensayo, se empleó una placa de 96 pocillos, la cual se inoculó tal y como se comenta en el apartado de Materiales y Métodos.

Para comprobar si *S. mutans* forma biofilms tras la incubación O/N, se realizó una tinción con cristal violeta y se midió la densidad óptica de cada pocillo a 490 nm, obteniendo el siguiente resultado (Figura 5).

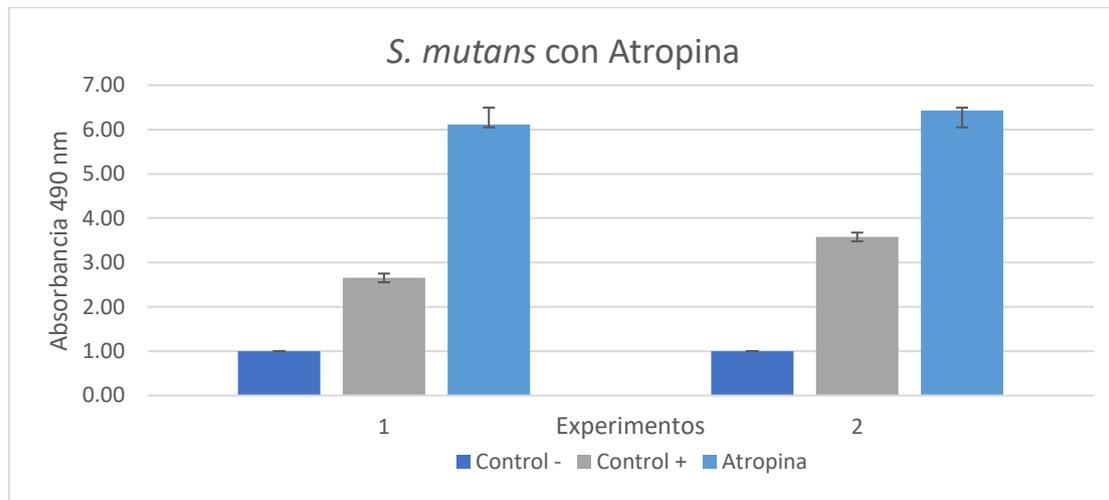


Figura 5. Efecto de la atropina en el crecimiento de *S. mutans*

Al finalizar este experimento, se esperaba que la densidad óptica de la muestra de *S. mutans* con atropina, que indica el efecto que posee la atropina en el crecimiento y desarrollo del biofilm de *S. mutans*, fuera menor que del control positivo, contando únicamente con la bacteria en crecimiento. Sin embargo, los resultados nos muestran que el efecto que se esperaba no se ha logrado, lo que indica que la atropina no posee ningún efecto inhibitorio en el crecimiento de biofilms de *S. mutans* y que incluso podría potenciar el crecimiento del biofilm del microbio.

4.2. Efecto del clidinio sobre *S. mutans*

El clidinio es un fármaco anticolinérgico. Para observar el efecto del clidinio sobre la formación del biofilm de *S. mutans*, el experimento se diseñó igual que el anterior, repitiendo el procedimiento, por lo que se utilizó una combinación de clidinio y *S. mutans*, un control negativo y uno positivo (Figura 4). Una vez procesada y medida la densidad óptica de la placa, se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 6).

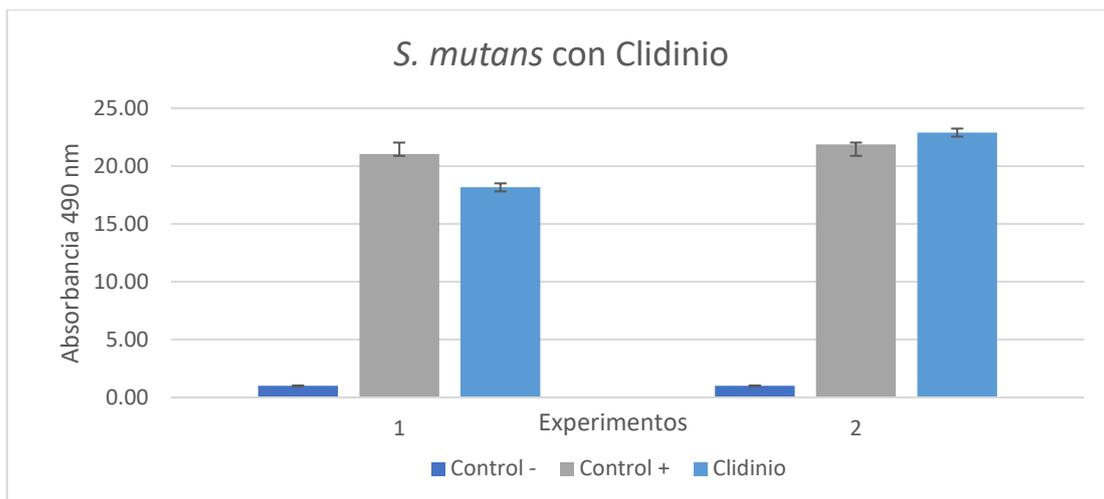


Figura 6. Efecto del clidinio en el crecimiento de *S. mutans*

Al igual que pasaba con el experimento anterior, en este también se esperaba que la combinación del microorganismo y la amina bicíclica resultara en un menor crecimiento del biofilm o que incluso no pudiera formarse. Sin embargo, como se puede apreciar en la gráfica, el clidinio tampoco resultó efectivo a la hora de impedir el desarrollo del biofilm de *S. mutans*.

4.3. Efecto del ipratropio sobre *S. mutans*

El ipratropio es un derivado sintético de la atropina, por lo que también posee una acción anticolinérgica. Y, aunque no posea un efecto antibiótico directo, se quiso comprobar su papel en la inhibición de formación del biofilm de *S. mutans*. El procedimiento seguido se repitió una vez más (Figura 4), obteniendo el siguiente resultado (Figura 7).

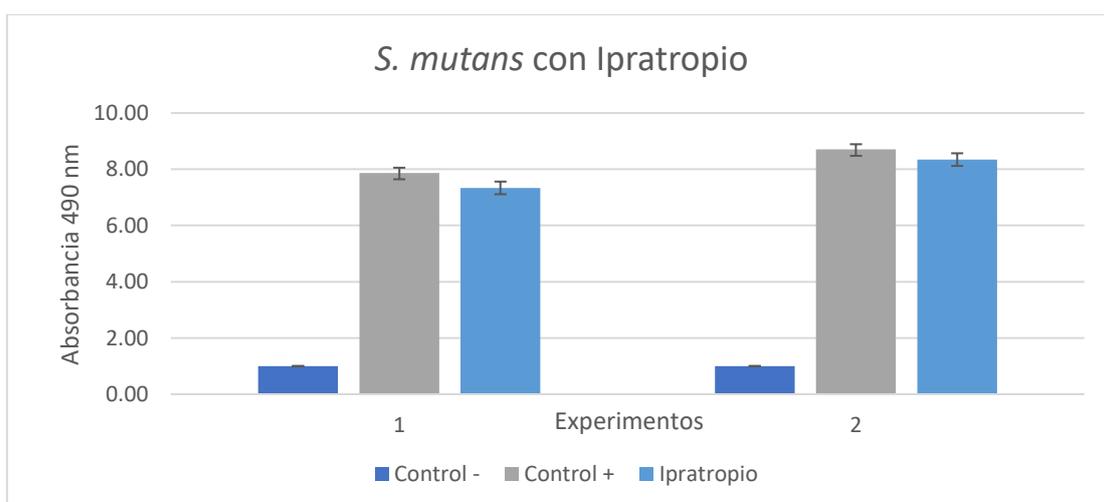


Figura 7. Efecto del ipratropio en el crecimiento del biofilm de *S. mutans*.

Tras estudiar esta amina bicíclica, se esperaba ver un efecto reductor del biofilm en cultivo con ipratropio. Sin embargo, como se puede apreciar en la gráfica, la leve disminución de la densidad óptica en las terceras columnas de ambos experimentos, donde se combina la amina con el microbio, no es significativa. Por lo que los resultados de este experimento indican que el ipratropio no tiene un efecto sobre la formación del biofilm.

4.4. Efecto de la camylofina sobre *S. mutans*

La camylofina es un fármaco espasmolítico, con estructura similar a los anticolinérgicos. Y, a pesar de que no está tan ampliamente documentada como otros antiespasmódicos clásicos, como podría ser el clidinio, en este trabajo se ha estudiado si posee un efecto antimicrobiano o, por el contrario, si no afecta al crecimiento de *S. mutans*. Se siguió el mismo protocolo que para las anteriores aminas bicíclicas, siguiendo el esquema de la placa de 96 pocillos anterior (Figura 4). Tras inocular la placa, teñirla y medir su absorbancia a 490 nm, se obtuvieron los siguientes resultados que aparecen en la gráfica (Figura 8).

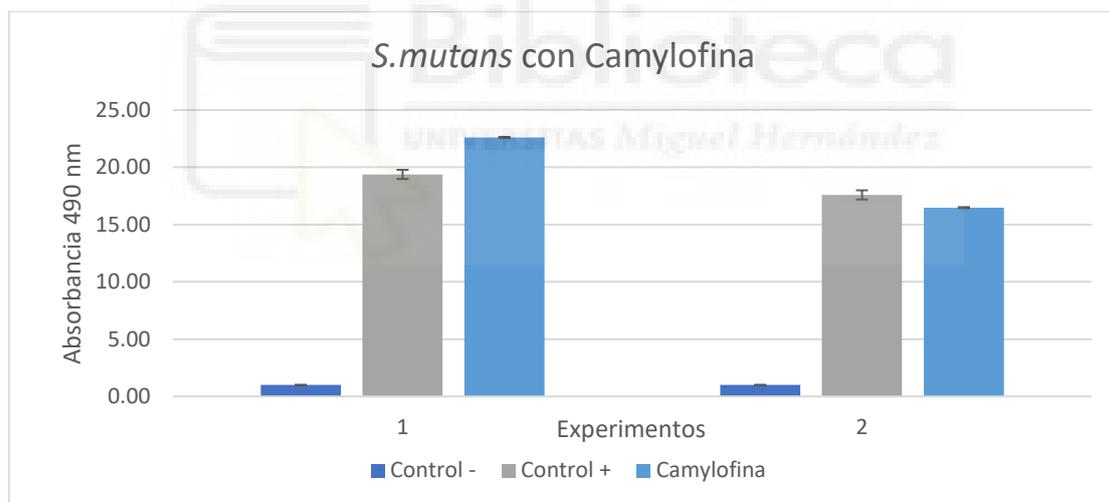


Figura 8. Efecto de la camylofina en el crecimiento del biofilm de *S. mutans*

Como se puede observar en el gráfico anterior, no hay diferencias de absorbancia entre la muestra de *S. mutans* con camylofina y el control positivo. Este hecho indica que la camylofina no es capaz de frenar el crecimiento del biofilm formado por *S. mutans*.

4.5. Efecto de la trimetilamina sobre *S. mutans*

La trimetilamina (TMA) es un compuesto alifático, no bicíclico, pero de gran interés en el metabolismo microbiano y humano. Este compuesto se genera como producto metabólico

bacteriano a partir de sustancias como la colina, la L-carnitina o la betaína. En esta parte del trabajo decidimos probar esta amina puesto que todas las anteriormente estudiadas se asemejaban en su función anticolinérgica, o tenían un precursor común y ninguna resultó eficaz para impedir que se propagara el biofilm bacteriano. Por esta razón, se optó por el uso de la trimetilamina como último recurso de esta primera parte de experimentos para analizar si podía ser una buena candidata frente a la formación de caries. Para realizar este ensayo, se continuó con el protocolo establecido anteriormente por antiguas alumnas en nuestro laboratorio (Navarro, 2024), completando la placa de 96 pocillos como ha sido previamente explicada (Figura 4).

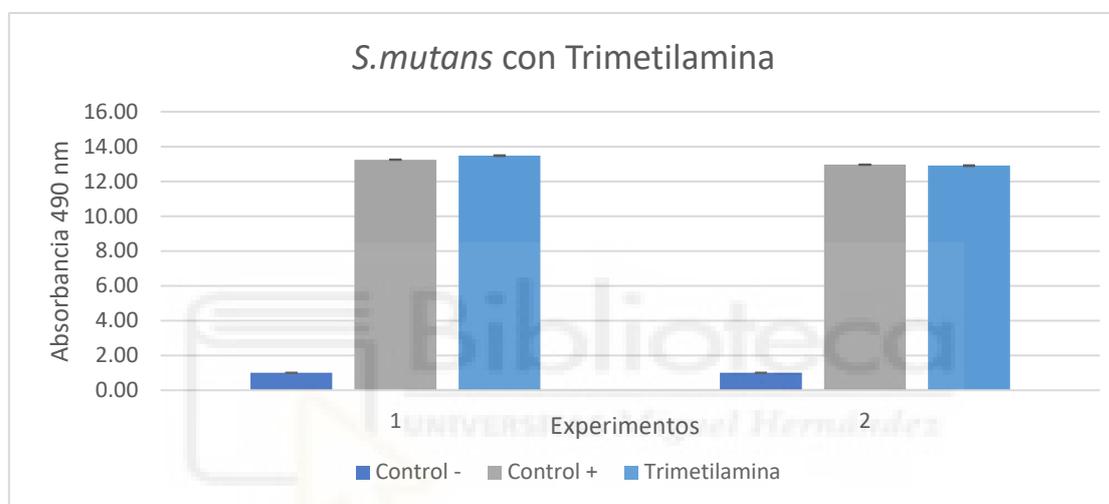


Figura 9. Efecto de la trimetilamina en el crecimiento y desarrollo del biofilm de *S. mutans*.

Como se puede observar (Figura 9), la trimetilamina, al igual que todas las aminas bicíclicas anteriores, no posee ningún efecto significativo en la inhibición del crecimiento del biofilm producido por *S. mutans*.

4.6. Sinergia de la promazina con antibióticos

Como ya se ha visto en los experimentos anteriores donde se han estudiado distintas aminas bicíclicas, ninguna ha resultado efectiva en la inhibición del crecimiento de los biofilms de *S. mutans*. Por esta razón, se decidió realizar estudios de sinergia con antibióticos usando la promazina, una amina bicíclica con actividad anti-biofilm que había sido descrita previamente con la intención de encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y, a partir de esta, poder verificar si estos antibióticos pudiesen establecer una sinergia con la promazina.

La promazina es un fármaco antipsicótico utilizado en psiquiatría. Su estructura está basada en un sistema bicíclico con un grupo amino, convirtiéndola en una amina bicíclica con actividad neuromoduladora. Y, aunque no tiene una actividad microbiana específica, posee efectos antimicrobianos indirectos, como su capacidad para alterar la membrana bacteriana o la inhibición de bombas de eflujo.

4.6.1. Búsqueda de la CMI con ampicilina

El primer paso realizado, fue buscar la mínima concentración a partir de la cual las bacterias no pueden crecer. Para realizar este experimento, se utilizó una placa de 96 pocillos inoculada con una combinación de *S. mutans* y ampicilina a distintas concentraciones, con las cantidades descritas en el apartado de Materiales y Métodos. Para eso, se emplearon distintos stocks de antibióticos con distintas concentraciones, nombrados Stocks A, B, C y D.

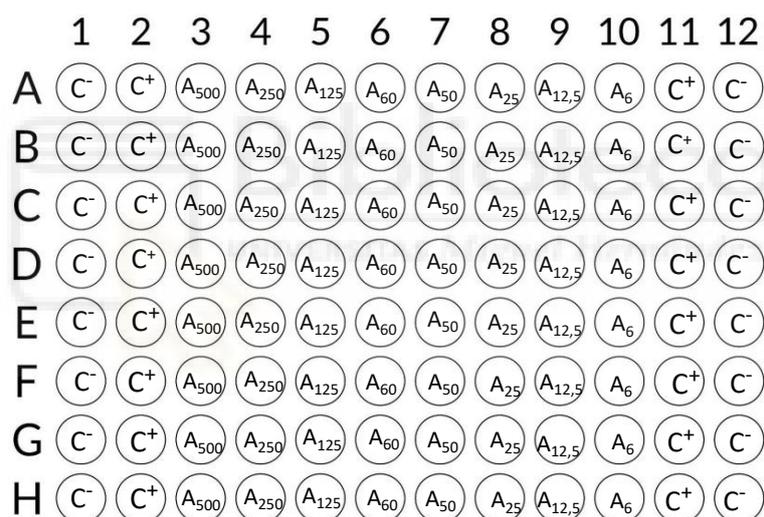


Figura 10. Diseño del experimento con antibióticos en placa de 96 pocillos. Control negativo (C⁻). Control positivo (C⁺). Combinación de inóculo de *S. mutans* y antibiótico a concentraciones de 500 a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A_x).

En primer lugar, el ensayo que se llevó a cabo partió de una concentración de antibiótico de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dividiéndola a la mitad hasta llegar a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para conseguir estas concentraciones se utilizó el Stock A y el B, cuyas concentraciones son de 1 mg/mL y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. La placa fue inoculada siguiendo el esquema anterior (Figura 10) y el experimento se realizó por duplicado. Esta placa fue teñida, y la absorbancia fue medida con un espectrofotómetro, obteniendo los resultados que se muestran en la gráfica (Figura 11).

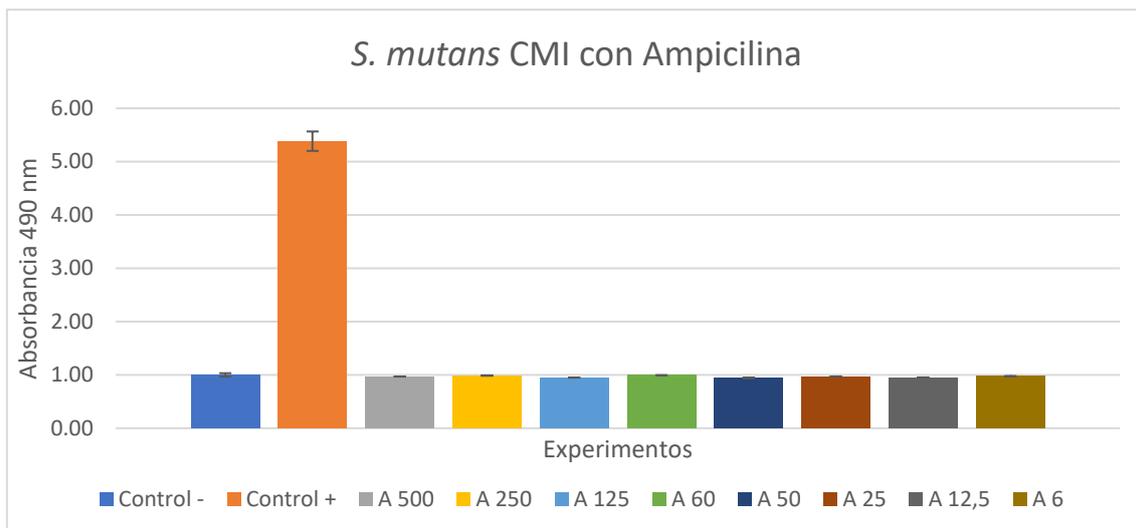


Figura 11. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con ampicilina a concentraciones de 500 $\mu\text{g/mL}$ a 6 $\mu\text{g/mL}$ (A_x).

Como se muestra en esta gráfica todas las concentraciones estudiadas fueron letales para *S. mutans*, impidiendo el desarrollo de su biofilm. Por esta razón, fue necesaria una repetición de este ensayo con un rango de concentraciones menores, siendo estas de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Y, al igual que el caso anterior, las concentraciones se reducirán a la mitad, pero en este caso, el esquema de concentraciones seguidas es el que aparece a continuación (Figura 12). En cuando a los stocks empleados en la realización de este experimento, fueron los Stocks C y D, cuyas concentraciones son de 10 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Finalmente, tras la incubación de la placa y las medidas de absorbancia, y con su duplicado realizado, se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 13).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻
B	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻
C	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻
D	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻
E	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻
F	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻
G	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻
H	C ⁻	C ⁺	A ₅	A _{2,5}	A _{1,25}	A _{0,6}	A _{0,5}	A _{0,25}	A _{0,125}	A _{0,06}	C ⁺	C ⁻

Figura 12. Diseño del experimento con antibióticos en placa de 96 pocillos. Control negativo (C⁻). Control positivo (C⁺). Combinación de inóculo de *S. mutans* y antibiótico a concentraciones de 5 a 0,06 $\mu\text{g/mL}$ (A_x).

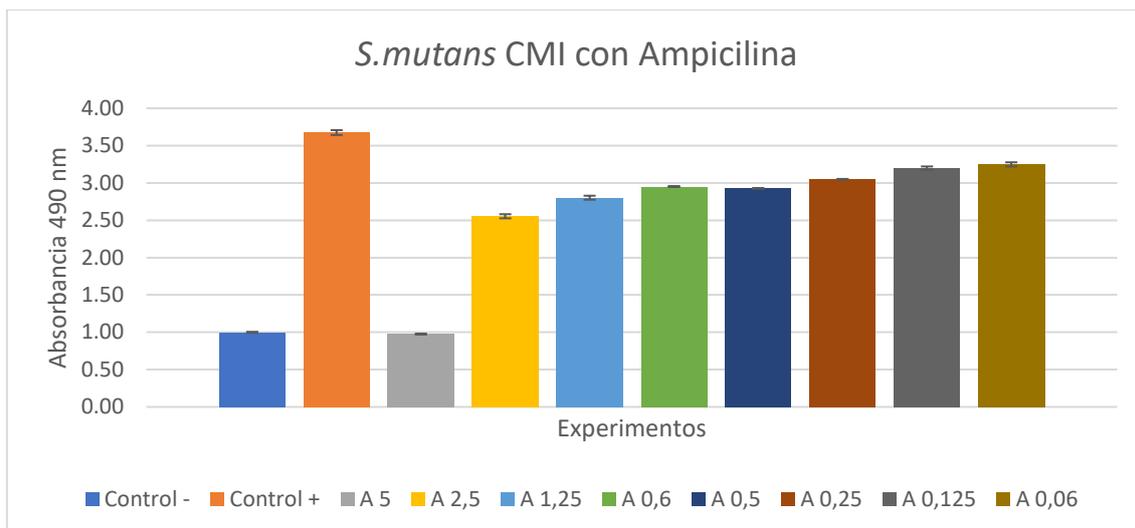


Figura 13. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con ampicilina a concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ax).

Una vez obtenido los resultados de este experimento en forma de gráfico de barras, se puede apreciar claramente la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la ampicilina (Figura 13). A concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el biofilm de *S. mutans* no es capaz de crecer y desarrollarse plenamente, teniendo un valor cercano al control negativo, el cual posee únicamente medio de cultivo BHI líquido. Sin embargo, a partir de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el inóculo del microorganismo empieza a crecer alcanzando valores cercanos o, incluso superiores al control positivo, el cual solo posee inóculo de *S. mutans*. Gracias a esta información, podemos asegurar y confirmar que la CMI del experimento realizado con ampicilina es 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez tenemos este valor, ya se puede realizar el experimento que determinará si la ampicilina establece sinergia con la promazina.

4.6.2. Establecimiento de sinergia entre ampicilina y promazina

Para estudiar la posible sinergia entre la ampicilina y la promazina, se utilizó una placa de 96 pocillos, inoculada con las cantidades descritas en el apartado de Materiales y Métodos. En esta placa, se incubó un inóculo de *S. mutans*, ampicilina a distintas concentraciones (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), medio BHI líquido y en todos los pocillos en los que se estudió la sinergia se dispusieron 20 μL de promazina, cuya concentración final en cada pocillo fue de 0,1 mM. Además de los pocillos empleados para el ensayo de la sinergia, también se añadieron dos pocillos adicionales con *S. mutans* y ampicilina a 5 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para corroborar visualmente que la CMI era correcta. Una vez que la placa estaba completa se visualizaba como

el esquema que aparece a continuación (Figura 14). Y los resultados obtenidos, se pueden ver representados en el gráfico de barras que aparece posteriormente (Figura 15).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻
B	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻
C	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻
D	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻
E	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻
F	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻
G	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻
H	C ⁻	C ⁺	CA ₅	CA _{2,5}	S _{2,5}	S _{2,5}	S _{1,25}	S _{1,25}	S _{0,6}	S _{0,6}	C ⁺	C ⁻

Figura 14. Establecimiento de sinergia en placa de 96 pocillos. Control negativo (C⁻). Control positivo (C⁺). Control con antibiótico a distintas concentraciones (CA_x). Sinergia de promazina y ampicilina a concentraciones de 2,5 a 0,6 µg/mL (S_x).

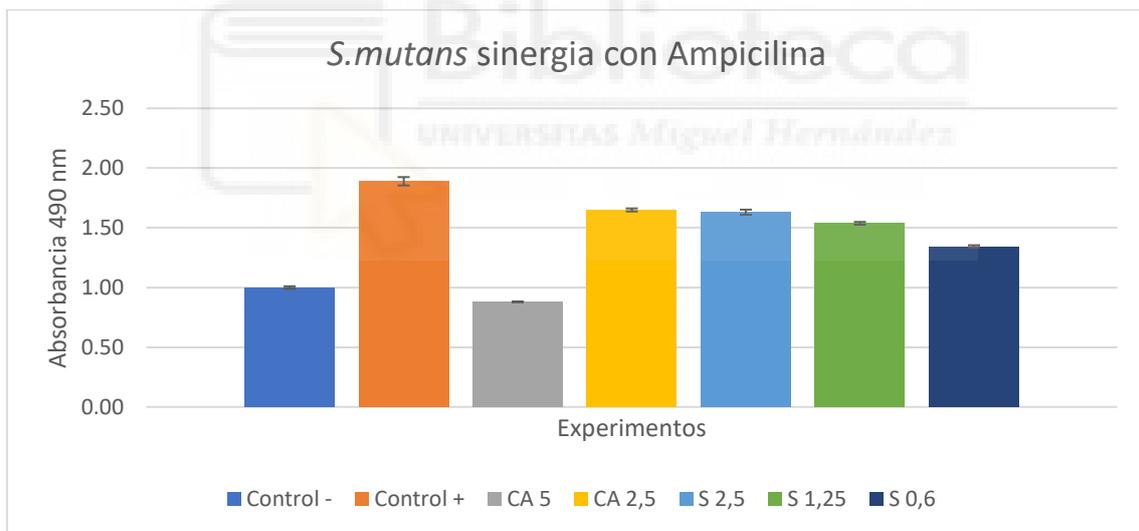


Figura 15. Resultados de sinergia de promazina y ampicilina a concentraciones de 2,5 a 0,6 µg/mL.

Como se aprecia en este gráfico, no se detecta sinergia entre la ampicilina y la promazina, puesto que todas las concentraciones probadas poseen una absorbancia muy similar a la del control positivo.

4.7. Efecto del cloranfenicol sobre *S. mutans*

Con el experimento anterior se comprobó que compuestos como la ampicilina y la promazina no producen ningún efecto potenciado puesto que no son capaces de formar una sinergia. Sin

embargo, se decidió probar si otros antibióticos pudieran generar un resultado aumentado debido a su cooperación. Para realizar este ensayo, se realizó el mismo procedimiento que el que se siguió para estudiar la ampicilina, es decir, primero se identificó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico para después comprobar si había sinergia con la promazina. En concreto, el antimicrobiano que se estudió fue el cloranfenicol.

4.7.1. Búsqueda de la CMI con cloranfenicol

Al igual que en el caso anterior, el primer paso fue buscar la CMI, es decir, la concentración mínima considerada inhibitoria para *S. mutans*. Para desarrollar este estudio, se necesitó un inculo de la bacteria a estudio y los Stocks de antibiótico A, B, C y D a distintas concentraciones, cuyas cantidades y preparación está ampliamente desarrollada y explicada en el apartado de Materiales y Métodos. Con respecto al experimento realizado, se utilizó una placa de 96 pocillos, a la cual se le atribuyó la misma distribución de pocillos que la placa empleada para estudiar la CMI de la ampicilina (Figura 10).

Para este primera placa, se utilizaron los Stocks de antibióticos A y B, cuyas concentraciones fueron de 1 mg/mL y 100 µg/mL respectivamente. Gracias al uso de estos Stocks se pudo realizar una franja de concentraciones de cloranfenicol que fuera desde 500 µg/mL hasta 6 µg/mL dividiendo las concentraciones siempre a la mitad. Una vez realizado este experimento y su duplicado, se obtuvieron los resultados que aparecen en la siguiente gráfica (Figura 16).

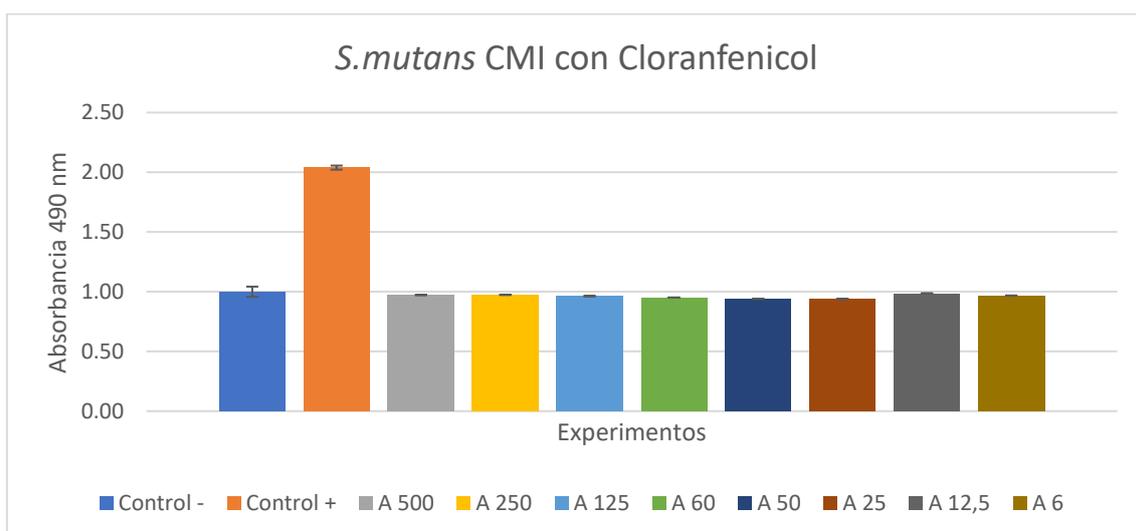


Figura 16. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con cloranfenicol a concentraciones de 500 µg/mL a 6 µg/mL.

Como se puede apreciar en la gráfica, todas las concentraciones estudiadas poseen una absorbancia prácticamente idéntica al control negativo, el cual poseía únicamente medio líquido BHI. Este resultado nos indica que la concentración mínima inhibitoria del cloranfenicol está por debajo de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por esta razón, fue necesario realizar otro experimento con concentraciones reducidas. En este caso, las concentraciones fueron de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, reduciéndose a la mitad, al igual que se hizo con las concentraciones anteriores. Sin embargo, para conseguir este rango, se utilizaron los Stocks de cloranfenicol C y D, los cuales poseen una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Finalmente, una vez que la placa ha sido inoculada y crecida correctamente siguiendo el mismo diseño empleado en la placa con ampicilina (Figura 13), se obtuvo la siguiente gráfica de resultados (Figura 17).

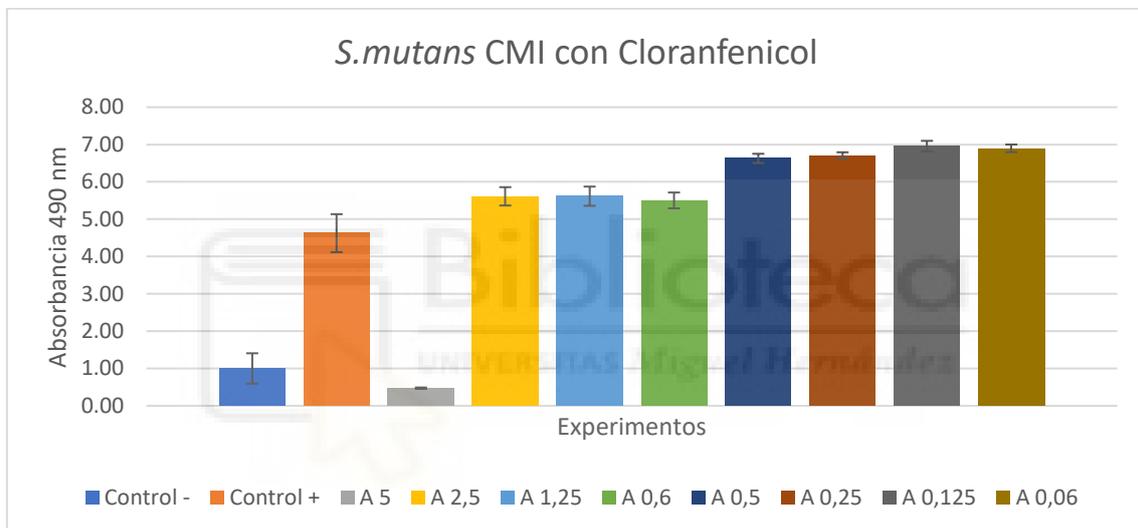


Figura 17. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con cloranfenicol a concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Gracias a esta gráfica, se pudo confirmar que la CMI del cloranfenicol es 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, puesto que fue la única concentración a la que no crecía ningún microorganismo. Una vez corroborada la CMI, se procedió a realizar el experimento que verificaría la presencia o ausencia de sinergia entre el cloranfenicol y la promazina.

4.7.2. Establecimiento de sinergia entre cloranfenicol y promazina

Como ya se ha visto en el apartado anterior, la concentración mínima de cloranfenicol a la cual produce un efecto bactericida frente al biofilm de *S. mutans* fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por esta razón, la placa de 96 pocillos utilizada para realizar el experimento se inoculó en la misma disposición que aparece en el esquema siguiente (Figura 18). En esta placa contamos con un control

negativo (C-), con medio BHI líquido y un control positivo (C+), siendo este únicamente inóculo de *S. mutans*. Adicionalmente, se añadieron dos controles más para asegurarnos que la CMI era correcta: un control que contaba con *S. mutans* y cloranfenicol a concentración 6 µg/mL y otro con el microorganismo y el antibiótico a 5 µg/mL. Por otro lado, las sinergias probadas se establecieron con 20 µL de promazina a 1 mM en cada pocillo y distintas concentraciones de cloranfenicol. Estas concentraciones fueron 6, 5, 2,25 y 1,25 µg/mL respectivamente con sus respectivos duplicados.

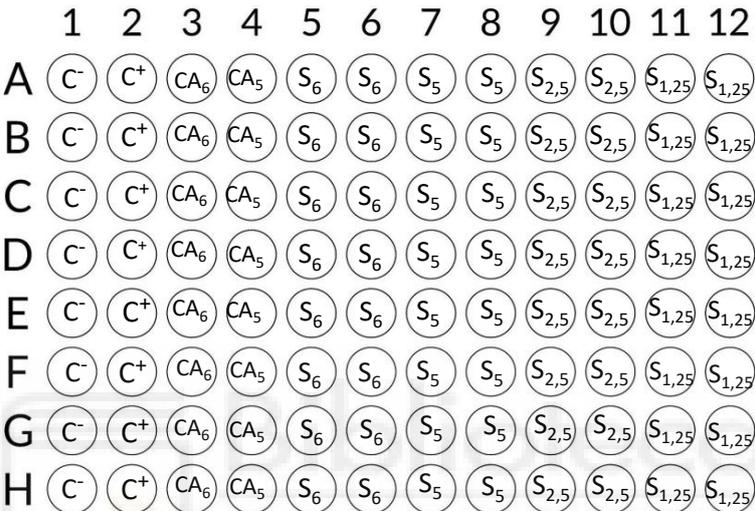


Figura 18. Establecimiento de sinergia en placa de 96 pocillos. Control negativo (C-). Control positivo (C+). Control con antibiótico a distintas concentraciones (CA_x). Sinergia de promazina y cloranfenicol a concentraciones de 6 a 1,25 µg/mL (S_x).

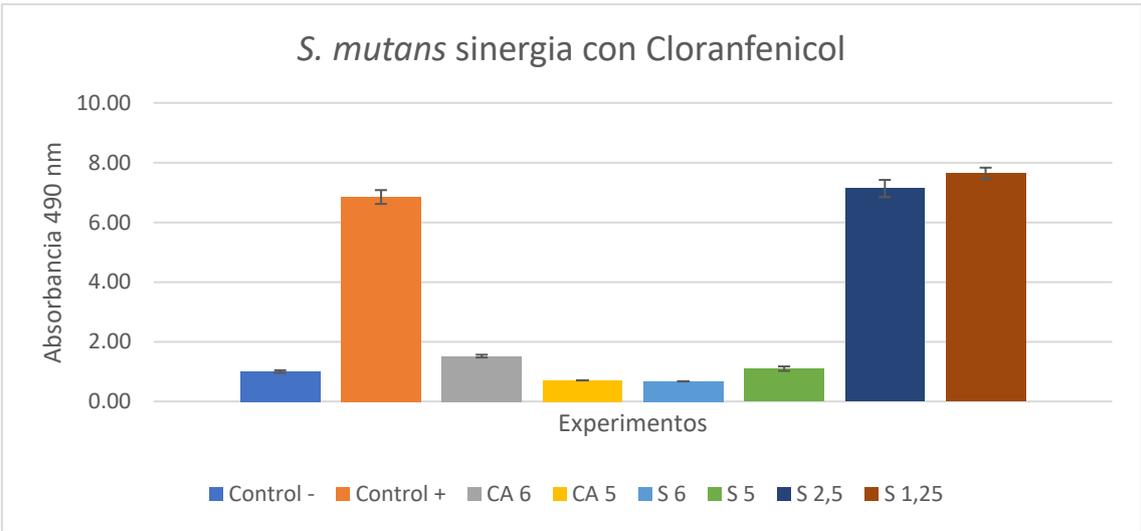


Figura 19. Resultados de sinergia de cloranfenicol y promazina a concentraciones de 6 a 1,25 µg/mL.

Una vez procesada y teñida la placa, se obtuvieron los resultados que aparecen en el gráfico anterior (Figura 19). Como se puede apreciar, tanto en los controles con antibiótico a concentración 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$, como en sus respectivas mezclas, no creció ninguna bacteria, obteniendo una absorbancia similar a la del control negativo. Sin embargo, la combinación a concentración 2,5 y 1,25 $\mu\text{g/mL}$ los microorganismos crecieron sin problema. Por lo que, con este resultado se llegó a la conclusión de que el cloranfenicol y la promazina no generan ningún efecto bactericida potenciado que indique que entre ambos compuestos hay una sinergia.

5. Discusión

A lo largo de este trabajo se evaluó la capacidad de diversas aminas bicíclicas y antibióticos para inhibir el crecimiento en biofilm *Streptococcus mutans*. Los resultados obtenidos indican que ninguna de las aminas bicíclicas ensayadas fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento del biofilm de *S. mutans*, e incluso, en algunos casos, como la atropina, se observó un efecto estimulador en el desarrollo del biofilm. Estos resultados pueden indicar que las aminas bicíclicas no tienen una interacción directa con la bacteria *S. mutans* y que no interfieren en el inicio de la formación del biofilm en las condiciones que se han probado en los experimentos *in vitro*. No se descarta que estos compuestos puedan tener un efecto antimicrobiano en otras etapas de la formación del biofilm, o en otras condiciones experimentales que simulen la formación de placa dental *in vivo* y que se podrían estudiar en el futuro. Se ha descrito en la literatura algunas limitaciones que tiene el uso de las aminas bicíclicas como antimicrobianos en productos de higiene bucal. Por ejemplo, se ha descrito que la atropina es capaz de reducir la secreción salival en adultos sanos (Murrin, 1973).

Esto puede alterar el equilibrio del microbioma oral en pacientes que estén tomando dicho medicamento, favoreciendo el crecimiento de bacterias cariogénicas como *S. mutans*, que prosperan en ambientes con menos flujo salival y menor capacidad de aclaramiento. Además, la saliva tiene un papel protector porque neutraliza ácidos y arrastra bacterias y, al disminuirla con la atropina, se podría favorecer la formación de biofilms cariogénicas si no hay una buena higiene bucal (Marsh, 2003).

Por otro lado, esta ausencia en el efecto antimicrobiano, también lo sufre el resto de las aminas bicíclicas estudiadas en este trabajo. Adicionalmente, en pacientes con uso prolongado, puede

producir sequedad bucal leve, lo cual podría reducir el flujo salival y, de forma indirecta, favorecer un ambiente más favorable para *S. mutans* si no se mantiene buena higiene bucodental (Pedersen & Belstrøm, 2019). Por último, en cuanto al resultado de efecto negativo de la trimetilamina, podría deberse a que el TMA únicamente es un producto metabólico bacteriano, producido por bacterias intestinales, pero, hasta la fecha, no se ha documentado ningún posible efecto antimicrobiano directo para ningún tipo de bacteria. Sin embargo, la trimetilamina, aunque está poco caracterizada, podría realizar una función de señalización frente a otras bacterias.

Finalmente, la promazina se consideró como una buena opción para intentar generar una sinergia con los antibióticos, puesto que ya se había descrito previamente que afectaba a los biofilms (Navarro, 2024). Sin embargo, al realizar los experimentos se comprobó que no había posibilidad de generar sinergia entre la promazina y la ampicilina o el cloranfenicol. Este hallazgo es relevante, puesto que, en otras bacterias, como las Gram negativas, las fenotiazinas han mostrado capacidad para potenciar la actividad de ciertos antibióticos. Sin embargo, en *S. mutans*, esta interacción no se produjo, probablemente por su falta de la membrana externa y por la escasa relevancia de las bombas de eflujo para la resistencia antibiótica en esta especie.

Es posible que este hecho se deba a que, los mecanismos de acción de los antibióticos y la amina bicíclica son distintos, produciendo que, en lugar de cooperar y funcionar conjuntamente potenciando su efecto, se contrarreste evitando que se produzca ningún efecto bactericida. Además, también se debe tener en cuenta que los efectos que producen tanto la ampicilina o el cloranfenicol como la promazina en bacterias como *S. mutans* se ven reducidos por la formación de un biofilm denso, produciendo que la sinergia de ambos compuestos no rompa la matriz ni cambie la tolerancia del biofilm significativamente.

Adicionalmente, el cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma y, la promazina, aumenta la permeabilidad de la membrana externa. Sin embargo, como *S. mutans* es un Gram positiva, no posee una membrana externa que esta amina pueda superar, por lo que la promazina no añade una ventaja farmacodinámica. Por otro lado, el efecto de ambos compuestos se ve sobre todo en bacterias de vida libre, no obstante, en presencia de biofilm poseen una eficacia limitada y no se potencian entre sí.

6. Conclusión y proyección futura

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen en manifiesto la complejidad de la actividad antimicrobiana frente a bacterias formadoras de biofilms, como lo es *S. mutans*, siendo este el principal agente etiológico de las caries dentales.

En primer lugar, se testaron los efectos de distintas aminas bicíclicas (atropina, clidinio, ipratropio, camylofina y trimetilamina) sobre la formación del biofilm de *S. mutans*. Sin embargo, ninguna de las aminas estudiadas mostró efecto antimicrobiano directo frente a este microorganismo. Incluso, en algunos casos estimularon la formación del biofilm.

En segundo lugar, se quiso estudiar una posible sinergia entre los antibióticos clásicos ampicilina y cloranfenicol y con la promazina, la cual fue seleccionada para este experimento puesto que en estudios anteriores ya se había demostrado su acción antimicrobiana frente al biofilm de *S. mutans*. Para llevar a cabo este experimento, el primer paso a realizar fue el establecimiento de la CMI para la ampicilina y cloranfenicol en *S. mutans*. Y, una vez se obtuvo el valor buscado, se pasó a realizar ensayos para comprobar si existía la sinergia entre estos compuestos con la promazina. No obstante, aunque tanto los dos antibióticos como la amina fueron efectivos para impedir el crecimiento de esta especie bacteriana, no se observó ninguna sinergia que potenciara el efecto producido entre ellos.

En cuanto a las proyecciones futuras, este trabajo abre distintas líneas potenciales de investigación:

- Explorar nuevas combinaciones de antibióticos con agentes dispersantes de biofilms, como pueden ser enzimas que degraden la matriz extracelular o compuestos que interfieran en la adhesión inicial.
- Investigar compuestos dirigidos específicamente contra factores de virulencia de *S. mutans*, como las glucosiltransferasas o el sistema de *quorum sensing*, lo que permitiría reducir su capacidad patogénica sin recurrir exclusivamente a antibióticos clásicos.
- Analizar otras fenotiazinas o derivados modificados con mejor perfil de interacción en bacterias Gram positivas y evaluar su posible rol como coadyuvantes en el tratamiento de caries o endocarditis.

- Desarrollar modelos experimentales que simulen condiciones clínicas más realistas a la placa dental, incluyendo pH bajo, presencia de saliva artificial o co-cultivo con otras especies de la microbiota oral.

En definitiva, aunque los resultados no muestran eficacia clara entre los compuestos evaluados, aportan conocimiento valioso sobre limitaciones de algunas estrategias terapéuticas actuales frente a microorganismos como *S. mutans*. Esta información es esencial para orientar futuras investigaciones en el diseño de nuevos tratamientos más específicos sostenibles y menos propensos a inducir resistencia.

7. Bibliografía

- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T., Richards, V. P., Brady, L. J., & Lemos, J. A. (2018).** Biology of oral streptococci. *Microbiology Spectrum*, 6(5), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>
- Balbi, H. J. (2004).** Chloramphenicol: a review. *Pediatrics In Review*, 25(8), 284-288. <https://doi.org/10.1542/pir.25-8-284>
- Bojanich, M. A., & Orlietti, M. D. (2020).** Virulence factors of *Streptococcus mutans* related to dental caries. In S. Kirmusaoğlu (Ed.), *Staphylococcus and Streptococcus*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85807>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).** β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Clarke, J. K. (1924).** On the Bacterial Factor in the Etiology of Dental Caries. *British Journal of Experimental Pathology*, 5(3), 141-147. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2047899/>
- GBD (2021a).** Caries of permanent teeth – Level 4 cause. *IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation)*. <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. *IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation)*. <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-caries-deciduous-teeth-level-4-disease>
- Khan, R., Adil, M., & Khan, A. U. (2023).** Molecular basis of cariogenic biofilm and infections. En *Elsevier eBooks* (pp. 427–443). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99977-9.00033-8>
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019).** The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology spectrum*, 7(1), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. <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), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01761-3>
- Marsh, P. D. (2003).** Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(2), 279–294. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0>
- Murrin, K. (1973).** A STUDY OF ORAL ATROPINE IN HEALTHY ADULT SUBJECTS. *British Journal Of Anaesthesia*, 45(5), 475-480. <https://doi.org/10.1093/bja/45.5.475>
- 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* y caries dental. *CES odontologia*, 26(1), 44-56
- OMS (2022).** Informe sobre la situación mundial de la salud bucodental. Hacia la cobertura sanitaria universal para la salud bucodental de aquí a 2030. Resumen ejecutivo. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364907/9789240061880-spa.pdf?sequence=1>
- Pedersen, A. M. L., & Belstrøm, D. (2019).** The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal Of Dentistry*, 80, S3-S12. <https://doi.org/10.1016/j.ident.2018.08.010>

Pertusa, M.A. (2019). Estudio del potencial antimicrobiano de los análogos de colina frente a la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.

Priya, A., Nagaiah, H. P., Malligarjunan, N., & Pandian, S. K. (2023). Oral biofilms: Architecture and control. En S. K. Pandian (Ed.), *Understanding Microbial Biofilms* (pp. 485–507). Academic Press.

Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(2), 117–128. <https://doi.org/10.1038/nrd3013>

