

Universidad Miguel Hernández

Facultad de Ciencias Experimentales



FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández



Respuesta de *Streptococcus mutans* ante diversas aminas bicíclicas

Marta Díaz Riquelme

Tutor: Manuel Sánchez Ángulo

Cotutora: María Isabel Navarro Mendoza

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología
Área de Microbiología

Curso 2024-2025

Grado en Biotecnología

Resumen y palabras clave

Streptococcus mutans es la principal bacteria causante de los procesos cariogénicos en la cavidad bucal debido a su capacidad de colonizar el esmalte y contribuir a la formación de la placa dental (un biofilm originado por diversas especies bacterianas). La placa dental protege a *S. mutans* del ambiente que lo rodea, por lo que la viabilidad celular se ve aumentada. En este Trabajo de Fin de Grado se ha hecho uso de protocolos de formación *in vitro* de biofilm y tinción de este, de manera que sea posible estudiar la capacidad de diversas aminos bicíclicas para inhibir *in vitro* la formación de biofilms de *S. mutans*. A su vez, se evaluó la combinación de promazina, una bicíclica que afecta a *S. mutans* con el antibiótico estreptomicina para realizar pruebas de sinergia, de manera que posteriormente se puedan realizar pruebas en modelos *in vivo* para poder usar dichas moléculas como agentes de higiene bucodental.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, cariogénicos, biofilms, viabilidad celular, drogas, agentes de higiene bucal.

Abstract and keywords

Streptococcus mutans is the main bacterium that causes cariogenic processes in the oral cavity due to its ability to colonize enamel and contribute to the formation of dental plaque (a biofilm caused by various bacterial species). Dental plaque protects *S. mutans* from its surrounding environment, thereby increasing cell viability. This thesis uses *in vitro* biofilm formation and staining protocols to study the ability of several bicyclic amines to inhibit *S. mutans* biofilms formation *in vitro*. In turn, the combination of promazine, a bicyclic amine that affects *S. mutans* with the antibiotic streptomycin was evaluated to perform synergy test, enabling subsequent testing in *in vivo* models to use those molecules as oral hygiene agents.

Keywords: *Streptococcus mutans*, cariogenic, biofilms, cell viability, drugs, oral hygiene agents.

Agradecimientos

A mi tutor Manuel Sánchez Ángulo, por descubrirme el mundo de la microbiología y enseñarme el camino por el que quiero seguir profesionalmente, al igual que a María Isabel Navarro Mendoza y Rocío Valera Sánchez, por acompañarnos durante todo nuestro trabajo de fin de grado y hacerlo más ameno.

A mi madre, a mi padre, a mi hermana y a mi cuñado, por cuidarme siempre y aconsejarme de la mejor manera que han sabido; y a mi pareja, por acompañarme en todas las sesiones de estudio aun cuando él no tenía nada que hacer.

A mis entrenadoras, Titi y Raquel, por trabajar en mí la disciplina y el compromiso, gracias a esos valores he sabido llevar la carrera a la vez que el trabajo y, aunque me lo haya replanteado más de una vez en estos cuatro años, no me rendí ni abandoné. No me olvido de Érika, gracias por mantenerme en el camino aun cuando todo se me venía encima y acompañarme siempre tanto dentro como fuera de la gimnasia.

Gracias a todo mi grupo “Bioparty” y a mis amigos de toda la vida por hacer más corta y divertida la carrera.

Por último, hacer una mención especial a Andrea Botella Lázaro, mi compañera de TFG y mi mitad en la carrera. Por haber compartido todas y cada una de las sesiones de prácticas durante nuestro paso por el grado, por ayudarme en los trabajos cuando iba con el agua hasta el cuello y por no cansarse cuando lo ponía todo difícil por trabajar a la vez que estudiaba. Qué suerte que la B y la D están tan cerca en el abecedario. No hay palabras suficientes para expresar lo que destacas en mi vida. Muy agradecida de haberte tenido a mi lado en cada paso.

CONTENIDO

1. Introducción	7
1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	7
1.2 Biofilms y caries.....	8
1.3 Aminas bicíclicas y estreptomicina	9
2. Antecedentes y objetivos	12
3. Materiales y métodos	12
3.1 Cepa utilizada.....	12
3.2 Medios de cultivo y reactivos	12
3.3 Mantenimiento de la cepa <i>Streptococcus mutans</i> en colección	13
3.4 Crecimiento de la cepa <i>Streptococcus mutans</i>	13
3.5 Crecimiento de biofilms de <i>Streptococcus mutans</i>	13
3.6 Ensayos con aminas bicíclicas (EABs).....	14
3.7 Ensayo con antibióticos	15
3.7.1 Cálculo de la concentración mínima inhibitoria.....	15
3.7.2 Búsqueda de sinergia	16
3.8 Protocolo para el crecimiento y el tratamiento de biofilms	16
4. Resultados.....	17
4.1 Efecto del proadifen sobre el crecimiento de biofilms de <i>S. mutans</i>	17
4.2 Efecto de la procaína sobre el crecimiento de biofilms de <i>S. mutans</i>	18
4.3 Efecto de la escopolamina sobre el crecimiento de biofilms de <i>S. mutans</i>	19
4.4 Efecto de la benacticina sobre el crecimiento de biofilms de <i>S. mutans</i>	19
4.5 Efecto del butetamato sobre el crecimiento de biofilms de <i>S. mutans</i>	20
4.6 Efecto de la cloroquina sobre el crecimiento de biofilms de <i>S. mutans</i>	21
4.7 Sinergia entre la promazina y la estreptomicina.....	21
4.7.1 Concentración mínima inhibitoria de la estreptomicina sobre <i>S. mutans</i>	22
4.7.2 Sinergia de promazina con estreptomicina.....	23
5. Discusión	24

6. Conclusiones y proyección futura.....	26
7. Bibliografía.....	28



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BHI: brain heart infusion

CMI: concentración mínima inhibitoria

CPBs: carbapenemasas

DO: densidad óptica

EABs: ésteres aromáticos de aminas bicíclicas

MRA: microorganismo resistente a antibióticos

OMS: Organización mundial de la salud

O/N: overnight

Q/S: Quorum sensing

SI: sistema inmune



1. Introducción

1.1 *Streptococcus mutans*

En 1924, James Killian Clarke aisló por primera vez, una cepa bacteriana proveniente de una lesión en la placa dental (caries) de un paciente. El microbiólogo británico atisbó el hecho de que esta bacteria desconocida predominaba en los estadios tempranos de la formación de biofilm dental (Lemos et al., 2019). Además, observó que las zonas donde prevalecía la formación de caries presentaban colonias bacterianas con gran capacidad fermentativa y de producción de ácido láctico, por lo que planteó la hipótesis de que estas características estaban implicadas en el desarrollo de caries. Tras examinar al microscopio la muestra bucodental, determinó que la cepa bacteriana desconocida presentaba una morfología esférica, además de que se organizaba en cadenas cortas, por lo que la descripción presentada indicaba que se trataba de un estreptococo (figura 1). Sin embargo, debido a que la morfología variaba mucho entre colonias, denominó a esta especie de estreptococo “mutans”, dando así el nombre *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Clarke, 1924).

Hoy en día, se sabe que la bacteria *S. mutans* desempeña un papel fundamental en la formación de caries debido a que se trata del primer colonizador del esmalte dental, formando una matriz compuesta por polisacáridos que permite la adherencia de otras especies bacterianas. El conjunto microbiota acaba formando la placa dental. La formación de esta matriz o biofilm proporciona una resistencia a antibióticos y una barrera difícil de atravesar para el sistema inmune (SI) del hospedador (Khan et al., 2023).

S. mutans es un microorganismo Gram positivo que no dispone de flagelo, por lo que se trata de una bacteria no móvil que se dispone en diplococos y en cadenas (figura 1). Se trata de una especie bacteriana anaerobia facultativa, ácido tolerante y acidogénica (Abranches et al., 2018). Una de sus propiedades bioquímicas es la capacidad de producir ácido láctico a partir de azúcares, es por ello que una dieta elevada en carbohidratos combinada con una mala higiene bucodental tiende a derivar en caries dentales. Se han llegado a describir 4 serotipos de *S. mutans* (c, e, f y k), basándose en la composición de un polisacárido de superficie celular (Paladines-Calle et al., 2023).

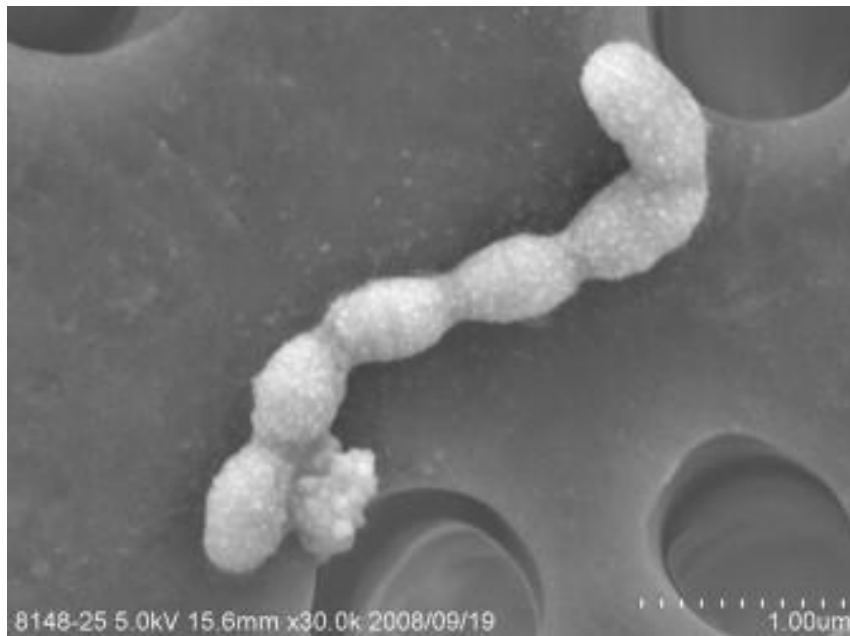


Figura 1. Imagen en microscopio electrónico de barrido de *Streptococcus mutans* (Matsumoto-Nakano, 2014).

No fue hasta mitad del siglo XX que *S. mutans* empezó a ganar atención en la comunidad científica y, a mitad de los años sesenta, ya se trataba de un microorganismo de estudio de interés en el ámbito de la investigación clínica.

1.2 Biofilms y caries

S. mutans no es la única bacteria que predomina en el desarrollo de caries dentales, pero sí que posee un papel destacable gracias a sus características bioquímicas exclusivas, como son una gran capacidad de producción de ácido láctico al fermentar los azúcares de la ingesta. La bacteria es muy tolerante frente a los consecuentes cambios bruscos de pH, lo que permite que *S. mutans* sea capaz de colonizar con facilidad la cavidad oral y, por consecuencia, desarrollar caries (figura 2). La adhesión de este microorganismo al esmalte dental se da gracias a la capacidad de síntesis de homopolímeros extracelulares de glucano. Esto permite que *S. mutans* se acumule formando un biofilm y que el descenso de pH debido a la producción del ácido láctico acabe por desmineralizar el esmalte, provocando una lesión dental. La desmineralización viene acompañada de la liberación de iones fosfato de hidroxiapatito que conforman el esmalte. Diversos estudios han demostrado que compuestos químicos como el flúor son capaces de revertir este proceso, ayudando con la remineralización (Priya et al., 2023). A su vez, se da comienzo a la producción de diversas bacteriocinas, las cuales permiten eliminar bacterias competidoras que se encuentren en el biofilm. Tanto la producción de bacteriocinas como el resto de procesos de adaptación se dan gracias a un conocido mecanismo de comunicación intercelular denominado *quorum sensing*

(QS), el cual permite la expresión de genes implicados en la colonización del esmalte dental y la transferencia de diferentes señales químicas que sirven a modo de respuesta al ambiente, por lo que las bacterias son capaces de coordinar su comportamiento dentro del biofilm dependiendo de la densidad poblacional (Zhang et al., 2025).

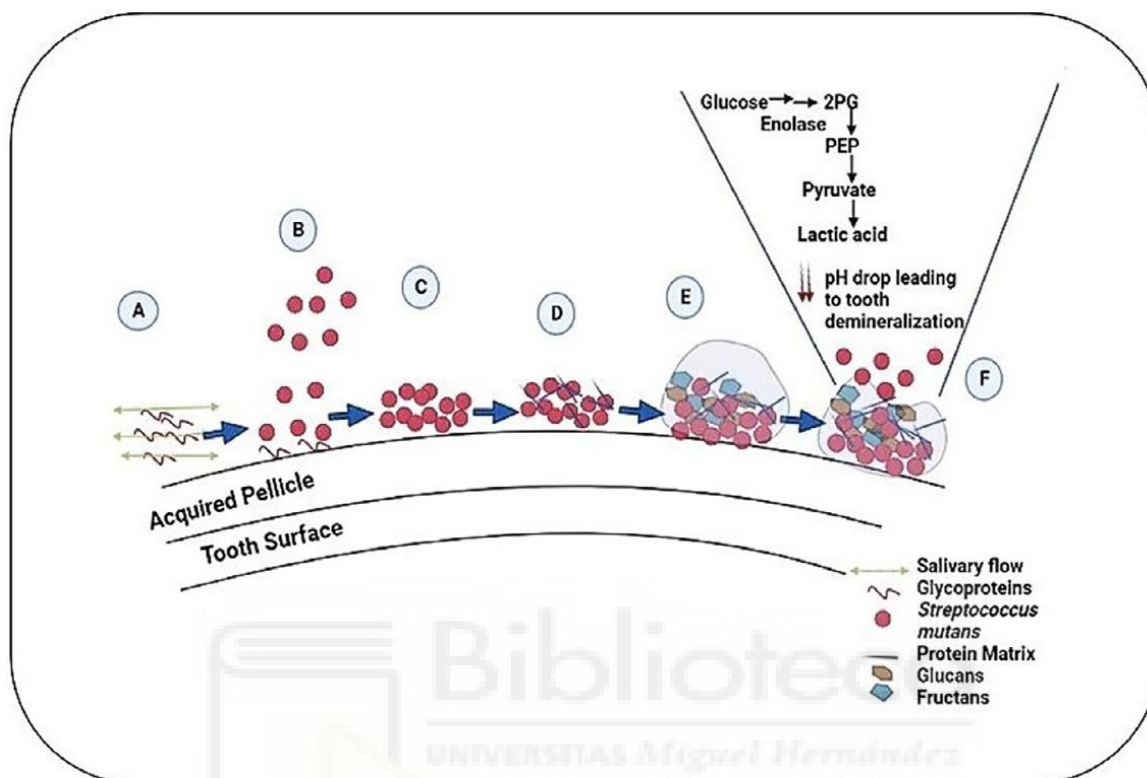


Figura 2. Formación del biofilm de *Streptococcus mutans*. A. Adsorción de una película orgánica, la película, compuesta de glicoproteínas que actúa como ligando receptor en la superficie celular bacteriana. B. Fijación inicial a la película adquirida por las células bacterianas planctónicas que flotan libremente. C. Proceso irreversible de adhesión bacteriana. D. Formación de la matriz proteica. E. Formación de microcolonias dentro de los exopolisacáridos, compuestas por agua, glucanos, fructanos, proteínas, minerales, lípidos, etc. F. Formación de la biopelícula madura. Las bacterias se desprenden de la biopelícula y se dispersan para colonizar nuevos sitios en la cavidad oral. Dentro de la biopelícula madura, la sacarosa se descompone en glucosa y fructosa. PG, fosfoglicerato, PEP, fosfoenol piruvato. (Khan et al., 2023)

1.3 Aminas bicíclicas y estreptomicina

En la actualidad, el número de microorganismos resistentes a antibióticos (MRA) está incrementando a un ritmo alarmante, por lo que cada vez resulta más difícil encontrar compuestos capaces de combatirlos (Roig-Molina et al., 2018). Es por ello por lo que los estudios de investigación enfocados en enfrentarse a estos MRA se están centrando en otros compuestos novedosos como son los ésteres de aminas bicíclicas (EABs). Estas moléculas se conforman a partir de dos anillos puentados, los cuales pueden albergar más de un átomo de nitrógeno, aportando así rigidez al esqueleto del EAB. Además, esta especie química posee un grupo éster, el cual proporciona la capacidad de modificar la actividad bacteriana,

así como aumentar la afinidad por proteínas blanco de las bacterias (De Gracia Retamosa et al., 2015).

El papel de los EABs en el ámbito de la microbiología ya ha sido testado, mostrando efectos antimicrobianos como es la alteración de la membrana o la sensibilidad a otros antibióticos (Rasko & Sperandio, 2010). Se han descrito varias EABs que han mostrado efectos contra *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) al interferir con la función de las proteínas de unión a colina que se localizan en la pared de dicha bacteria (Roig-Molina et al. 2018). No todas las aminas bicíclicas poseen efectos antimicrobianos, pues estos se consiguen o bien a través del grupo éster o añadiendo otros anillos aromáticos a la cadena química de la molécula.

Las aminas bicíclicas testadas en este proyecto (figura 3) abarcan diversos campos de la medicina, pues también tienen uso en el ámbito oncológico y psíquico entre otros, pero presentan gran cantidad de ventajas en el área de la microbiología, pues al tratarse de estructuras nuevas, se reduce la síntesis cruzada con antibióticos clásicos, se consigue la rotura del biofilm bacteriano (Roig-Molina et al., 2018), además de que son fácilmente manipulables en el laboratorio.

Los EABs usados de manera individual en este estudio han sido proadifen, escopolamina, benacticina, butetamato y cloroquina. El proadifen es un inhibidor del citocromo P450 (Grinchii et al., 2018), por lo que las células tratadas con este compuesto derivan en apoptosis celular. Su principal uso es como fármaco antitumoral. La procaína (*Procaine*, 2006) es una molécula sintetizada primeramente para sustituir a la cocaína, pero que, tras diversos ensayos, se descubrió que este EAB es capaz de bloquear los canales de sodio de las células, por lo que hoy en día se utiliza como anestésico local. La escopolamina, un alcaloide tropánico el cual se puede obtener de la planta *Scopolia*. Este EAB bloquea los canales muscarínicos de acetilcolina (anticolinérgico muy potente), por lo que se suele utilizar como antiespasmódico en enfermedades como el párkinson. El cuarto EAB testado fue la benacticina, la cual deriva de la familia de la escopolamina, posee un efecto anticolinérgico muy potente (Vojtěchovský, M., 1986) por lo que su uso se centra en reducir los efectos de trastornos motores y psiquiátricos. Posterior a la benacticina, se probó el butetamato, antitusivo utilizado como principio activo en jarabes y como broncodilatador. Tras las pruebas con butetamato, se pasó a testar la cloroquina, medicamento derivado de la quinina, cuyo uso se basa principalmente en el tratamiento contra parásitos, aunque también se han realizado ensayos para tratar el COVID-19 (Singh, B. 2021) y el glioblastoma.

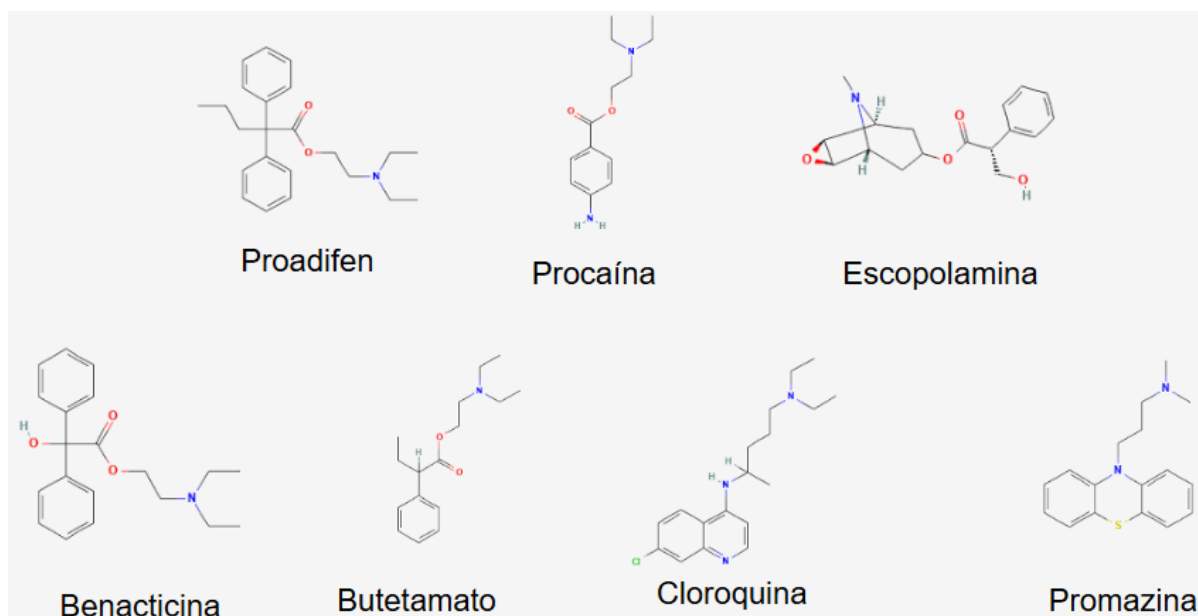


Figura 3. EABs estudiados en este trabajo. Estructuras moleculares disponibles en PubChem.

Tras realizar ensayos para observar los efectos de las aminas anteriormente mencionadas, también se realizó una combinación entre la promazina, un EAB con conocido efecto sobre *S. mutans* (C. Navarro, 2024) y el antibiótico estreptomicina con la finalidad de analizar la posible sinergia de ambos compuestos.

La promazina proviene de las fenotiazinas, un grupo de fármacos de uso antipsicótico con acción sedante. Además, muestra efecto antibacteriano tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Este efecto se ve aumentado si se realizan sinergias con antibióticos aminoglucósidos como la estreptomicina frente a la bacteria *Burkholderia pseudomallei* (Chan et al., 2006b). En el estudio citado, se observó que la unión de ambos compuestos derivaba en la inhibición de las bombas de expulsión que utilizan las bacterias para aumentar su resistencia a antibióticos, por consecuencia, se produce la alteración de las membranas plasmáticas debido a la fuga de K^+ . Por todo lo anterior, se ha considerado realizar el mismo estudio sinérgico frente a *S. mutans*.

Por otro lado, la estreptomicina, como se ha mencionado con anterioridad, es el antibiótico con el que se ha realizado un estudio de la sinergia junto con la promazina. Este antibiótico perteneciente a la familia de los aminoglucósidos se utiliza para tratar casos de tuberculosis, infecciones causadas por enterococos y la peste (Waters & Tadi, 2023). La estreptomicina se une de manera irreversible a la subunidad 30S de los ribosomas presentes en el citoplasma de la bacteria, de manera que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas, pues provoca una lectura errónea de la pauta de lectura del ARNm. Por consecuencia, se producen proteínas defectuosas, derivando así en la muerte celular (Demirci et al., 2013).

2. Antecedentes y objetivos

Debido a su capacidad de colonización de la cavidad oral y formación de biofilm, *S. mutans* compromete la salud bucodental de adultos e infantes a nivel mundial (OMS, 2022), de manera que es necesario hallar un compuesto capaz de inhibir la formación de dicho biofilm y controlar la población bacteriana de este patógeno.

El principal objetivo de este trabajo ha sido explorar otras alternativas a los antibióticos clásicos para inhibir el desarrollo de biofilms de *S. mutans* en el esmalte dental, lo que podría evitar así la aparición de caries. Para ello, se continuó con la línea de investigación de nuestro grupo, en la cual se implantó un modelo *in vitro* de formación de biofilm de la bacteria *S. mutans* (C. Navarro, 2024). Para poder abordar nuestro objetivo principal, desarrollamos una serie de objetivos específicos:

1. Optimización del crecimiento de biofilms de *S. mutans* en laboratorio.
2. Probar el efecto de seis aminas bicíclicas sobre los cultivos de *S. mutans* y analizar si alguna es capaz de bloquear la producción de biofilm.
3. Realizar una sinergia entre una amina bicíclica y un antibiótico clásico como alternativa al uso único de aminas bicíclicas.

3. Materiales y métodos

3.1 Cepa utilizada

La cepa utilizada para realizar este proyecto fue *Streptococcus mutans* CECT 479, obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo. Esta cepa se considera de nivel de seguridad 1 (BSL-1). Toda manipulación de esta cepa se realizó en laboratorio con material estéril y en condiciones asépticas, con mechero Bunsen o mediante una campana de cultivo, para evitar posibles contaminaciones.

3.2 Medios de cultivo y reactivos

Para el crecimiento del microorganismo en medio líquido se preparó medio BHI (Brain Heart Infusion) de la marca Oxoid con 2% de sacarosa, que proveía las condiciones necesarias. Para elaborar el medio sólido se añadió agar a una concentración de 1,5%. Tanto el medio sólido como el líquido se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tanto los medios de cultivo como los materiales utilizados fueron esterilizados en autoclave a 1,2 atmósferas de vapor y 121°C durante 20 minutos. Tras el proceso de esterilización, el medio sólido era repartido en placas Petri que luego se almacenaron en una nevera a 4°C,

mientras que los frascos que contenían medio líquido se almacenaron a temperatura ambiente, pues era una manera más sencilla de detectar contaminaciones en caso de que las hubiera.

3.3 Mantenimiento de la cepa *Streptococcus mutans* en colección

La cepa se encontraba congelada a -80°C para su correcta conservación. Tras su descongelación, se realizó una siembra en una placa de medio BHI sólido y se dejó incubando a 37°C durante 24h. Tras comprobar que creció correctamente, la placa se almacenó en la nevera a 4°C . A esta temperatura, las bacterias que han crecido permanecerán intactas en la placa, pero no se reproducirán, es una temperatura bacteriostática, por lo que se establecen unas condiciones ideales para conservar una población microbiana suficiente y poder dar paso a los experimentos. Para estos, se obtenía una muestra de *S. mutans* directamente de la placa sembrada y se introducía en 4 mL de medio líquido BHI.

3.4 Crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans*

El seguimiento de los cultivos en medio líquido se realizó midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro Zuzi modelo 4201/50. Para los cultivos se utilizaron rutinariamente tubos estériles SARSTEDT de 5 mL (Ref. 55.475.001) que tienen un paso óptico de 1 centímetro y pueden ser usados directamente en el espectrofotómetro.

Para el crecimiento de *S. mutans*, se preparaba el inóculo el día anterior. Para dicho inóculo, se utilizaba un tubo estéril con un volumen de 4 mL de medio BHI. Este tubo se inoculaba con una muestra tomada con asa de siembra de la placa de medio BHI sólido de *S. mutans* conservada en nevera. Adicionalmente se preparaba otro tubo estéril con la misma cantidad de BHI pero sin inocular, para utilizarlo a modo de control de contaminación. Sendos tubos se dejaron incubando en la estufa a 37°C durante toda la noche (cultivo *overnight* O/N). Los cultivos alcanzan un máximo de densidad óptica a 600 nanómetros (DO_{600}) alrededor de 1,4.

3.5 Crecimiento de biofilms de *Streptococcus mutans*

Para los experimentos de establecimiento de biofilm, se hizo uso de placas de 96 pocillos, marca SARSTEDT (Ref. 83.3924.005). El inóculo empleado para los ensayos en estas placas multipocillos fue el O/N. Una vez pasaban las 24h establecidas, se medía el cultivo a DO_{600} , si el valor de la absorbancia era mayor a 1, entonces se realizaba una dilución 1:10 con medio BHI y se realizaba un ajuste para que la concentración de microorganismo a inocular en los pocillos fuese de 0,05 unidades DO/mL .

3.6 Ensayos con aminas bicíclicas

Las aminas bicíclicas empleadas se obtuvieron de la marca Sigma, estas fueron las siguientes: proadifen, procaína, escopolamina, benacticina, butetamato y cloroquina. Además, posteriormente se usó la promazina para realizar una sinergia con el antibiótico estreptomycin, pues se conocía con anterioridad su función inhibitoria contra *S. mutans* (C. Navarro, 2024).

Para los experimentos con las EABs, se siguió la distribución del esquema de la placa representado en la figura 4. A lo largo de los ocho pocillos de la primera fila (A) de la placa, se depositaron 100 µL de medio líquido BHI a modo de control negativo. En los dos pocillos consecutivos, se añadieron igualmente 100 µL de medio líquido BHI y 10 µL de la amina bicíclica empleada para comprobar de igual manera si estas presentaban contaminación o no. En la fila de abajo (fila B), se agregaron 100 µL del inóculo a concentración 0,05 unidades DO/mL de *S. mutans* a modo de control positivo. Por último, en la fila C se realizaba el experimento con la amina bicíclica. Estos compuestos se obtenían con una concentración inicial de 100 mM, pero en nuestro trabajo eran necesarios a una concentración final de 1 mM, por lo que se debía de realizar una solución stock a 10 mM para posteriormente diluirla 1:10 al añadirla al cultivo. En cada pocillo, se añadieron 100 µL del inóculo *S. mutans* junto con 10 µL de la amina bicíclica empleada. Esta dilución final se añadió a cada uno de los primeros ocho pocillos de la fila C de la placa. Una vez se completaba el ensayo, las placas se incubaron a 37° C durante toda la noche (figura 5). Al día siguiente, se procedía a teñir la placa siguiendo el protocolo explicado en el apartado 3.8 de Materiales y métodos.

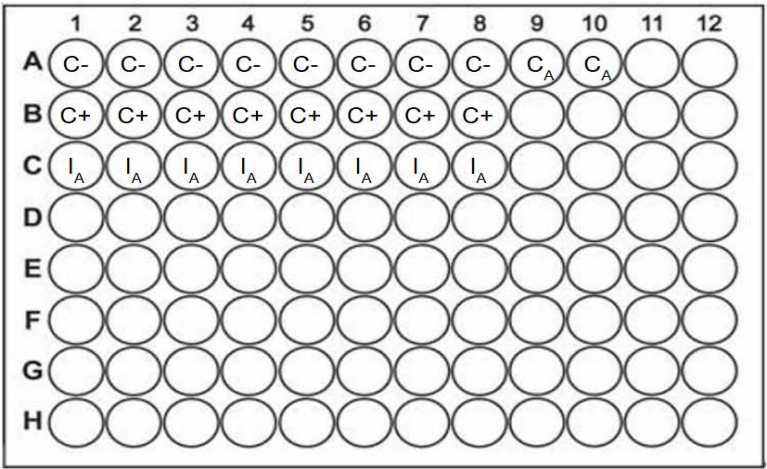


Figura 4. Esquema de la placa de 96 pocillos. Control negativo (C-). Control positivo (C+). Control de contaminación de la amina bicíclica (C_A). Inóculo de *S. mutans* con la amina bicíclica (I_A).

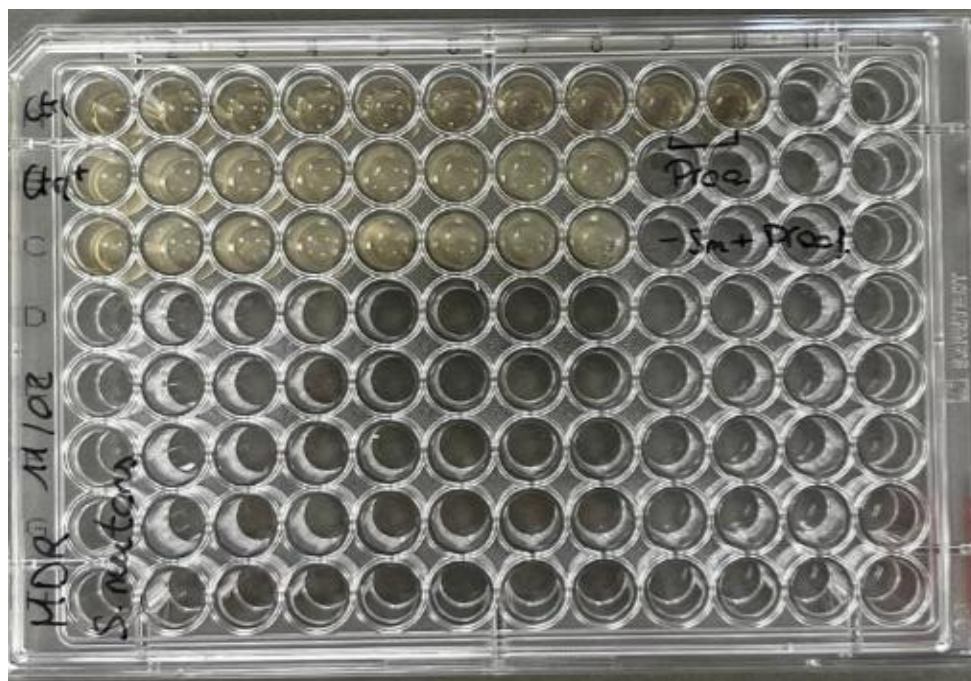


Figura 5. Placa inoculada de *S. mutans* con proadifen. Fila A, pocillos 1-8: control negativo (C-). Fila A, pocillos 9 y 10: control de contaminación del proadifen (C_A). Fila B: Control positivo (C+). Fila C: inóculo de *S. mutans* y proadifen (I_A).

3.7 Ensayo con antibióticos

En este trabajo se empleó la estreptomycinina como antibiótico para comprobar la existencia de sinergia con la promazina. Primeramente, fue necesario hacer un cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que presentaba la bacteria *S. mutans* ante el compuesto.

3.7.1 Cálculo de la concentración mínima inhibitoria

Para poder realizar el cálculo de la CMI, se necesitaba un stock de estreptomycinina de 1 mg/mL y así realizar una serie de diluciones posteriores al 50% en la placa de 96 pocillos. No obstante, el stock de la estreptomycinina poseía una concentración inicial de 50 mg/mL, por lo que se tuvo que realizar una dilución inicial de 50x. Una vez se obtuvo la concentración de antibiótico deseada, se procedieron a realizar dos disoluciones a distintas concentraciones para poder dar paso al experimento de la CMI.

- Disolución A (1 mg/mL): 20 μ L del stock 50x + 980 μ L de medio BHI.
- Disolución B (100 μ g/mL): 100 μ L disolución A + 900 μ L de medio BHI

Al partir con disoluciones de diferentes concentraciones, se obtuvo un rango de entre 500 a 6 μ g/mL de concentración de estreptomycinina, realizando diluciones 1:2 para hallar la CMI mayor facilidad.

3.7.2 Búsqueda de sinergia

Cuando se obtuvieron los datos de la CMI, se pasó a averiguar si la estreptomicina era capaz de realizar una sinergia con la promazina. Se hizo uso de una placa de 96 pocillos (figura 6) inoculada con un control negativo, solo medio BHI; un control positivo, inóculo de *S. mutans* y varias pruebas de sinergias, todas ellas con la misma concentración de promazina (0,1 mM) pero con variaciones en la concentración de la estreptomicina.

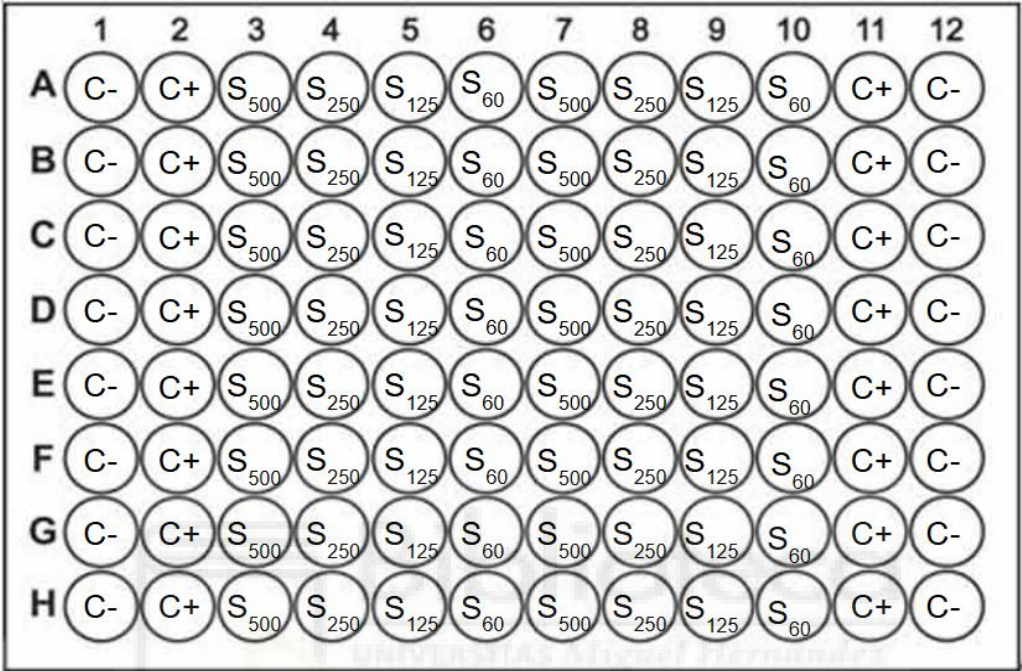


Figura 6. Esquema del estudio de sinergia en placa de 96 pocillos. Control negativo (C-). Control positivo (C+). Sinergia de promazina con estreptomicina a diferentes concentraciones (Sx).

3.8 Protocolo para el crecimiento y el tratamiento de biofilms

En la actualidad existen múltiples protocolos para el crecimiento de biofilms de *S. mutans*. En este trabajo nos acogimos al protocolo desarrollado por Žiemytė et al., 2021 por su sencillez.

El protocolo de fijación y coloración de biofilms se adquirió del laboratorio del Dr. Álex Mira en el FISABIO con gran experiencia en el desarrollo de biofilms orales y fue modificado por C. Navarro (2024). El protocolo con sus variaciones se muestra a continuación:

- 1. Recoger sobrenadante.
- 2. Lavar con 200 µL de PBS.
- 3. Añadir 200 µL de cristal violeta al 0,2% y dejar 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.
- 7. Añadir 200 µL de isopropanol y leer a 490 nanómetros.

4. Resultados

El objetivo final ha sido encontrar un EAB capaz de alterar el crecimiento del biofilm de la bacteria *S. mutans*. Se realizaron una serie de experimentos para comprobar si alguno de estos compuestos era capaz de provocar el efecto esperado. En todos los ensayos realizados en placa de 96 pocillos, el protocolo seguido fue el mismo:

1. Inocular un control negativo (solo medio BHI).
2. Inocular dos pocillos de medio BHI con el EAB.
3. Inocular un control positivo (solo inóculo de *S. mutans*).
4. Inocular *S. mutans* junto con el compuesto a testar.
5. Incubar a 37°C durante 24 horas.
6. Teñir y tratar la placa tal y como se describe en Materiales y Métodos.
7. Medir la absorbancia de la placa y normalizar datos para cuantificar el crecimiento del biofilm.

En todos los casos se realizaron duplicados de cada placa a excepción de los resultados positivos, en los cuales se realizó un triplicado.

4.1 Efecto del proadifen sobre el crecimiento de biofilms de *S. mutans*

El primer EAB probado fue el proadifen. Siguiendo las pautas anteriormente mencionadas, se evaluaron los resultados del experimento realizado siguiendo el esquema de la figura 4. Se observa cómo queda la placa tratada tras 24 horas a 37°C en la figura 5.

A primera vista no se apreciaron diferencias de crecimiento entre los pocillos control positivo y los pocillos con proadifen, por lo que se midió la absorbancia para cuantificar el estado del biofilm en cada condición (figura 7). Las medidas de absorbancia fueron muy parecidas entre los pocillos de control positivo y los pocillos con cultivo y compuesto. Esto indicaría que no hay diferencias en el estado del biofilm entre las condiciones examinadas, por lo que, al no apreciarse diferencias, se concluyó que el proadifen no influye en el crecimiento de biofilms de *S. mutans*.

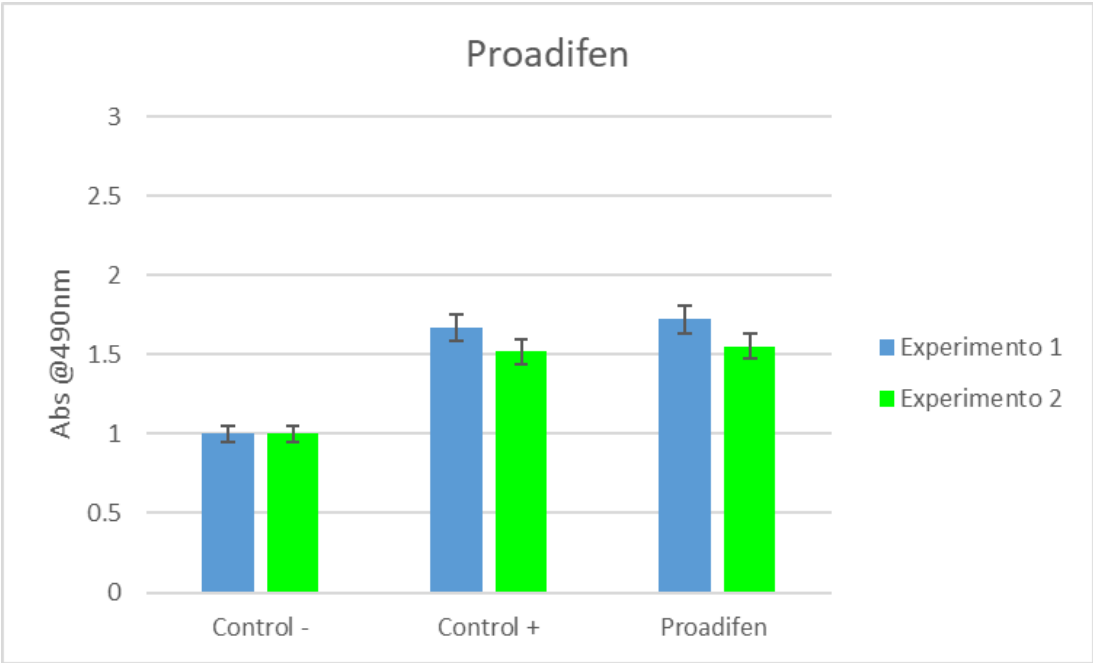


Figura 7. Efecto del proadifen sobre cultivos de *S. mutans*. En color azul se muestra el resultado del primer experimento y en verde del segundo.

4.2 Efecto de la procaína sobre el crecimiento de biofilms de *S. mutans*

Se repitió el protocolo empleado en el experimento anterior, pero esta vez haciendo uso de otro EAB, la procaína (figura 8). La distribución de datos de la gráfica se realizó con el mismo orden que en la anterior.

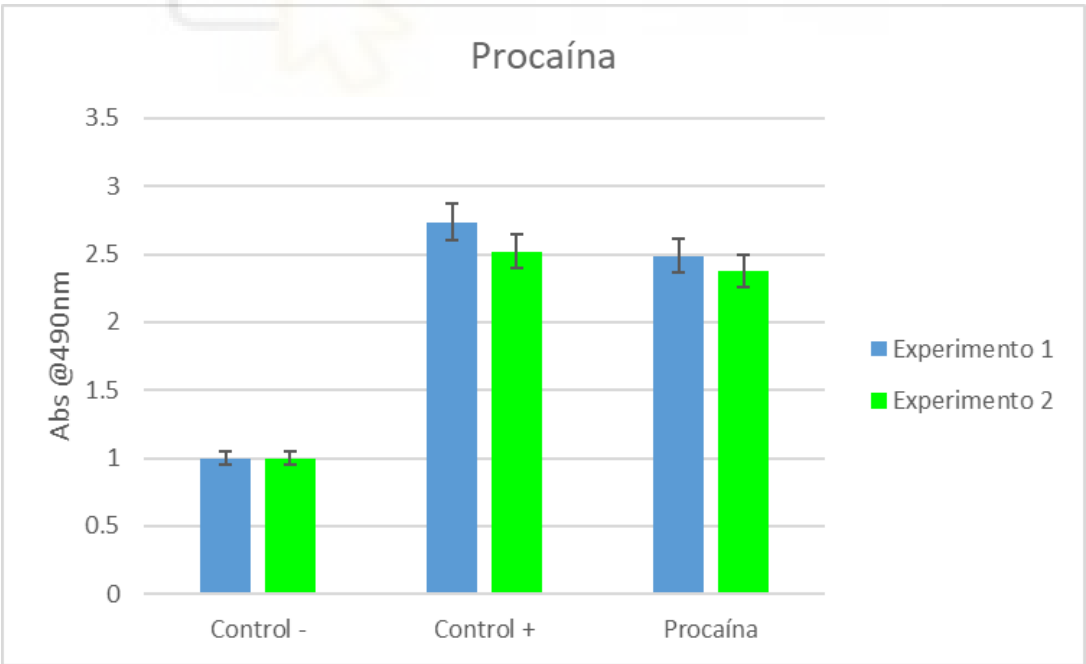


Figura 8. Efecto de la procaína sobre cultivos de *S. mutans*. En color azul se muestra el resultado del primer experimento y en verde del segundo.

Al igual que con el proadifen, no se encontraron diferencias significativas entre las medidas del control positivo y el inóculo con la procaína, por lo que la formación de biofilms no se vio alterada. La procaína tampoco altera a la bacteria.

4.3 Efecto de la escopolamina sobre el crecimiento de biofilms de *S. mutans*

Para poder observar el efecto de la escopolamina sobre la producción de biofilm, se repitió el mismo procedimiento y cuantificó la densidad óptica de las placas control y se comparó con el de *S. mutans* y el EAB (figura 9).

Como ocurrió en los casos anteriores, no se observaron diferencias significativas entre las medidas de las muestras del control positivo y el cultivo de *S. mutans* junto con el compuesto, por lo que este EAB tampoco afecta a la formación de biofilm de *S. mutans*.

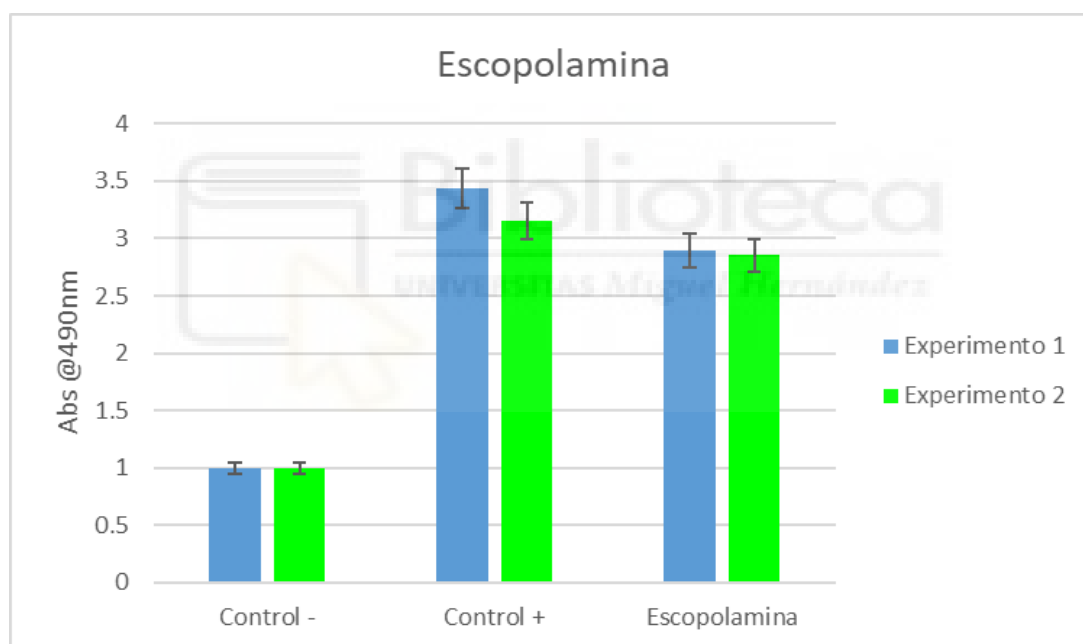


Figura 9. Efecto de la escopolamina sobre cultivos de *S. mutans*. En color azul se muestra el resultado del primer experimento y en verde del segundo.

4.4 Efecto de la benacticina sobre el crecimiento de biofilms de *S. mutans*

Se realizó el mismo procedimiento haciendo uso de la benacticina. Posteriormente, se analizaron los resultados tras las medidas de absorbancia (figura 10).

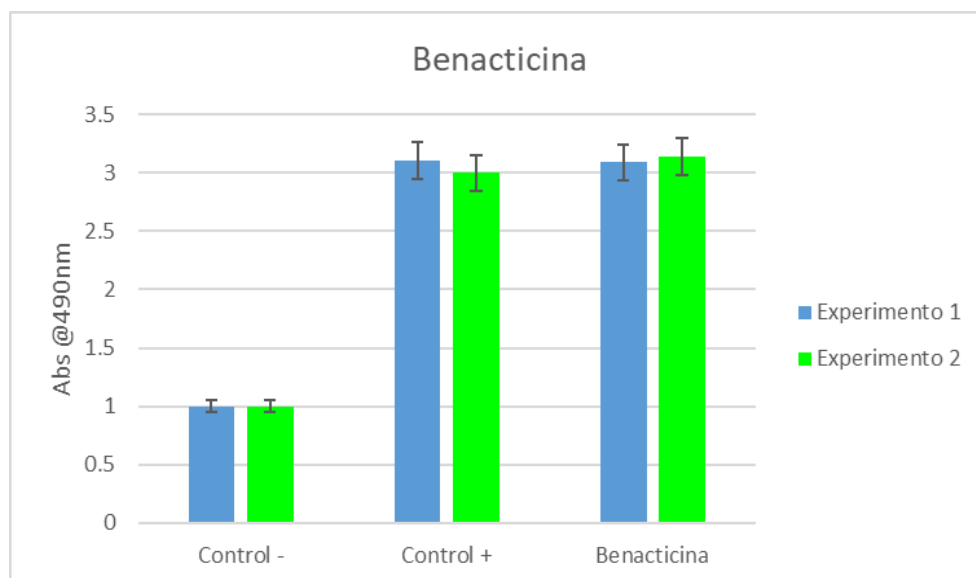


Figura 10. Efecto de la benacticina sobre cultivos de *S. mutans*. En color azul se muestra el resultado del primer experimento y en verde del segundo.

Realizando las mismas comparaciones que en los casos anteriores, se examinó si había diferencias entre las medidas del control positivo y el experimento con benacticina. No se observaron diferencias en el crecimiento entre los controles y el ensayo con el EAB, por lo que se concluyó que la benacticina no causa efecto alguno sobre la bacteria.

4.5 Efecto del butetamato sobre el crecimiento de biofilms de *S. mutans*

Se reprodujo el mismo protocolo que en los experimentos anteriores, pero haciendo uso del butetamato. Los resultados observados fueron los mostrados en la siguiente gráfica (figura 11).

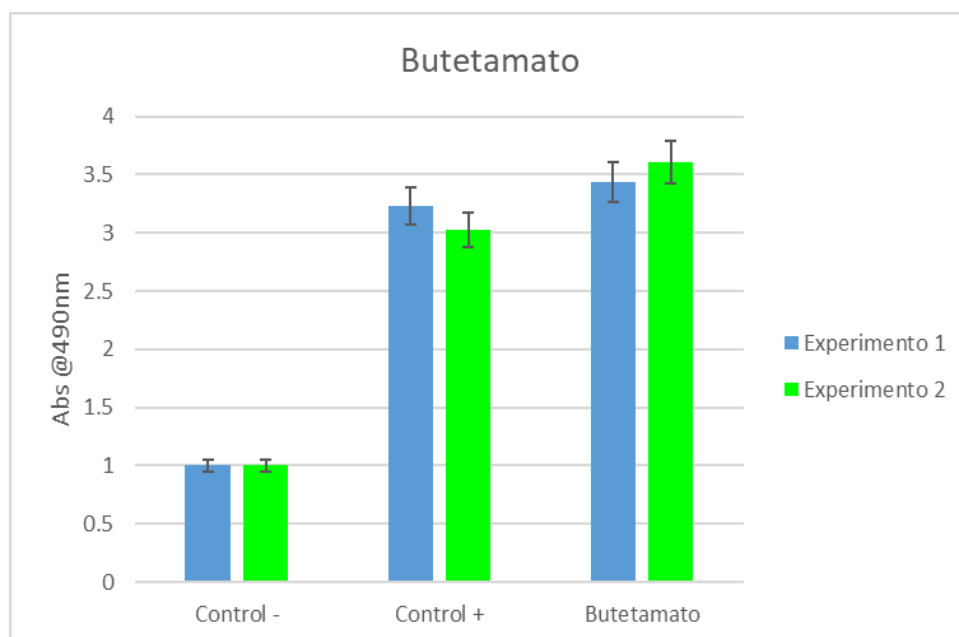


Figura 11. Efecto del butetamato sobre cultivos de *S. mutans*. En color azul se muestra el resultado del primer experimento y en verde del segundo.

Como se observa en la figura 11, y habiendo tenido en cuenta los resultados anteriores, al no haber observado diferencias significativas entre los datos del control positivo y el cultivo de butetamato, se dedujo que este EAB no tenía efecto sobre el crecimiento de *S. mutans*.

4.6 Efecto de la cloroquina sobre el crecimiento de biofilms de *S. mutans*

El último EAB probado con *S. mutans* fue la cloroquina. El protocolo realizado fue el mismo que en los cinco experimentos anteriores (figura 12).

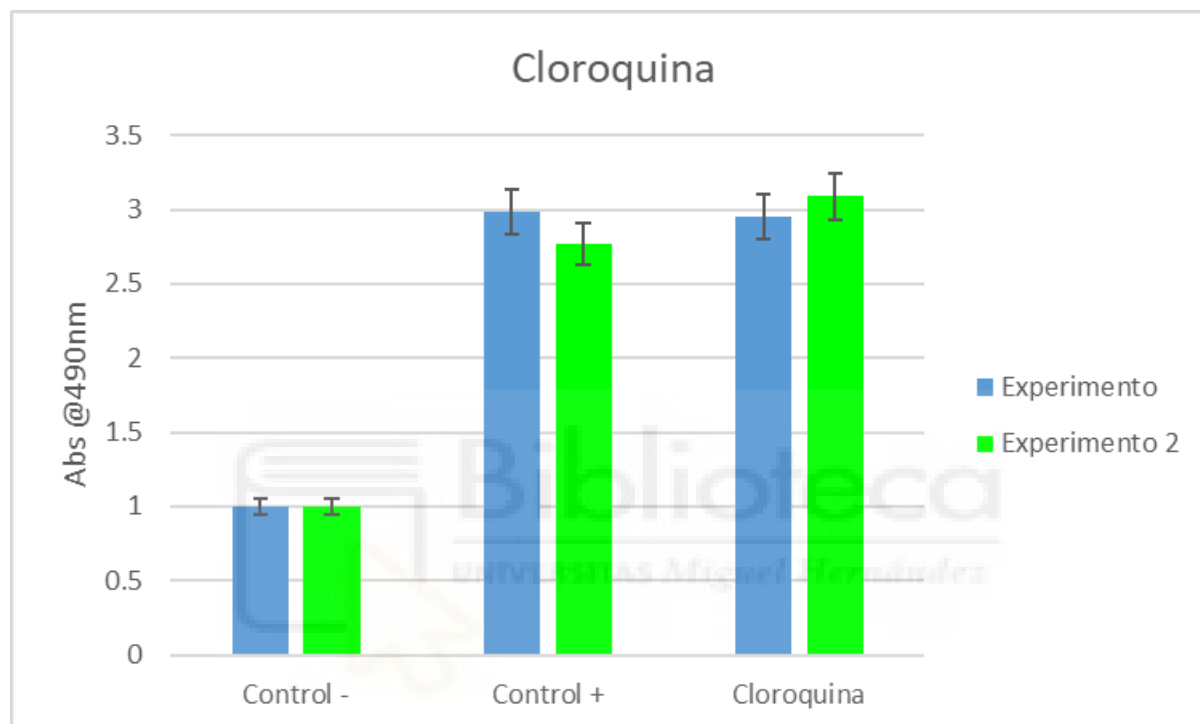


Figura 12. Efecto de la cloroquina sobre cultivos de *S. mutans*. En color azul se muestra el resultado del primer experimento y en verde del segundo.

Los datos de la absorbancia de los cultivos que se representan en la gráfica se analizaron y no se observaron diferencias significativas entre el control positivo y el cultivo con cloroquina, por lo que se determinó que no produjo efecto alguno en el microorganismo.

4.7 Sinergia entre la promazina y la estreptomicina.

Como ningún EAB proporcionó el resultado esperado, se realizó una combinación entre el EAB promazina y el antibiótico estreptomicina para observar si había sinergia entre ambos compuestos. Tanto la promazina (C. Navarro, 2024) como la estreptomicina (De la Higuera, 1997) han sido estudiados por separado en *S. mutans* con anterioridad, demostrando eficacia a la hora de impedir el crecimiento de la bacteria, así como su producción de biofilm, por lo que se decidió combinar los efectos de ambos compuestos para observar si había posibilidad de encontrar sinergia.

4.7.1 Concentración mínima inhibitoria de la estreptomicina sobre *S. mutans*

Primeramente, se calculó la CMI (concentración mínima inhibitoria) de la estreptomicina con *S. mutans* para hallar la concentración óptima para realizar la sinergia con promazina. Se realizó en una placa de 96 pocillos siguiendo el esquema representado en la figura 13, haciendo uso de diluciones seriadas 1:2 en cada paso para poder averiguar a qué concentración la estreptomicina impedía el crecimiento de la bacteria.

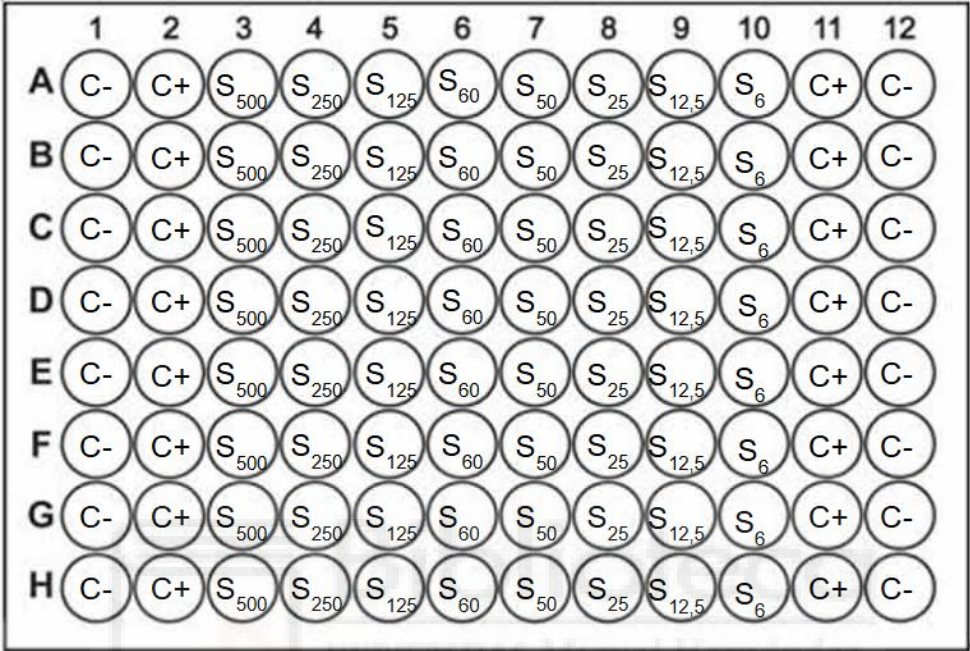


Figura 13. Esquema de placa de 96 pocillos para el cálculo de la CMI. Control negativo (C-). Control positivo (C+). Combinación de inóculo de *S. mutans* con estreptomicina a concentración descendiente de 500 a 6 µg/ml (Sx).



Figura 14. Placa de la CMI. Columna 1: control negativo (C-). Columna 2: control positivo (C+). Columna 3 a 10: concentraciones de estreptomicina (S₅₀₀, S₂₅₀, S₁₂₅, S₆₀, S₅₀, S₂₅, S_{12,5}, S₆). Columna 11: control positivo (C+). Columna 12: control negativo (C-).

El experimento (figura 14) y su respectiva tinción de la placa se realizó por triplicado para verificar los resultados y obtener los datos de la CMI (figura 15). Las medidas de absorbancia de los experimentos a concentración 500 µg/mL y 250 µg/mL respectivamente, son parejas a la medida del control negativo, lo cual nos indica que no ha habido crecimiento de biofilm bacteriano. A partir de una concentración de estreptomicina de 125 µg/mL, las medidas de las absorbancias aumentan gradualmente. Aunque haya una menor cantidad de biofilm con respecto al control positivo, hay producción de este, por lo que a concentraciones ≤ 125 µg/mL no hay inhibición de la formación del biofilm. Por todo lo anterior considerado, se determinó que la CMI del antibiótico frente a *S. mutans* se da a una concentración de 250 µg/mL.

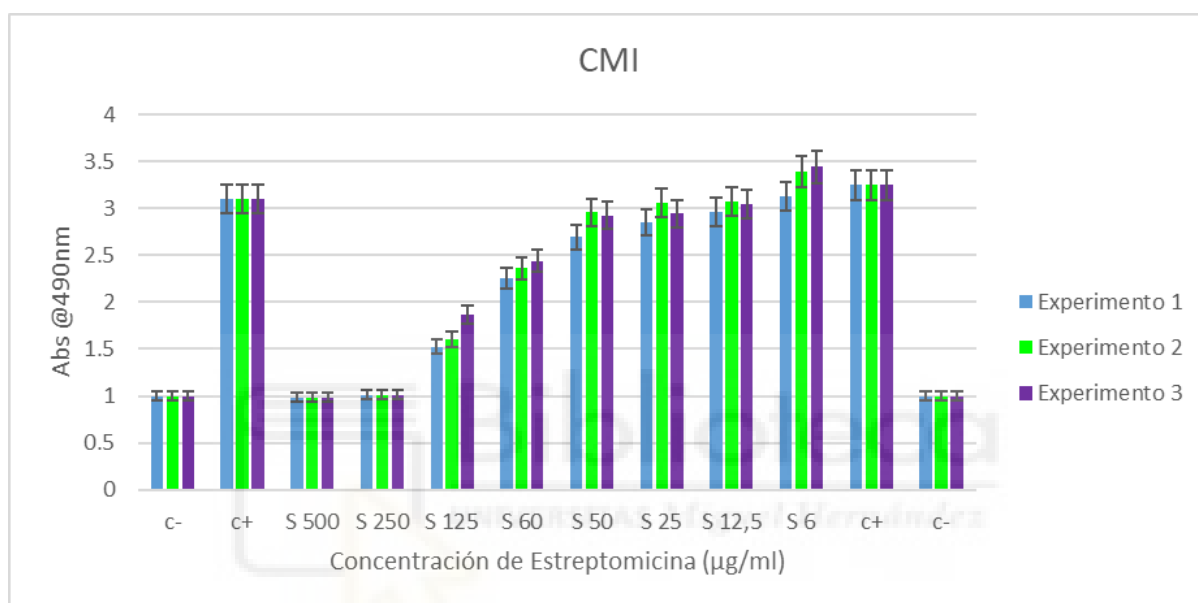


Figura 15. CMI de estreptomicina para *S. mutans*. Control negativo (C-). Control positivo (C+). Concentraciones de estreptomicina (Sx).

4.7.2 Sinergia de promazina con estreptomicina

Experimentalmente, se concluyó por separado que, tanto la promazina a una concentración de 0,5 mM (M. Lax, 2025) como la estreptomicina a una concentración de 250 µg/mL impedían el crecimiento de *S. mutans*, por lo que el siguiente paso fue realizar una sinergia entre ambos compuestos en una placa de 96 pocillos, siguiendo el esquema de la figura 6. La concentración final de promazina en todos los pocillos fue 0,1 mM, mientras que la concentración de estreptomicina descendía a la mitad tras cada fila inoculada (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL y 60 µg/mL). Los resultados obtenidos, así como el duplicado y el triplicado se observaron en la figura 16.

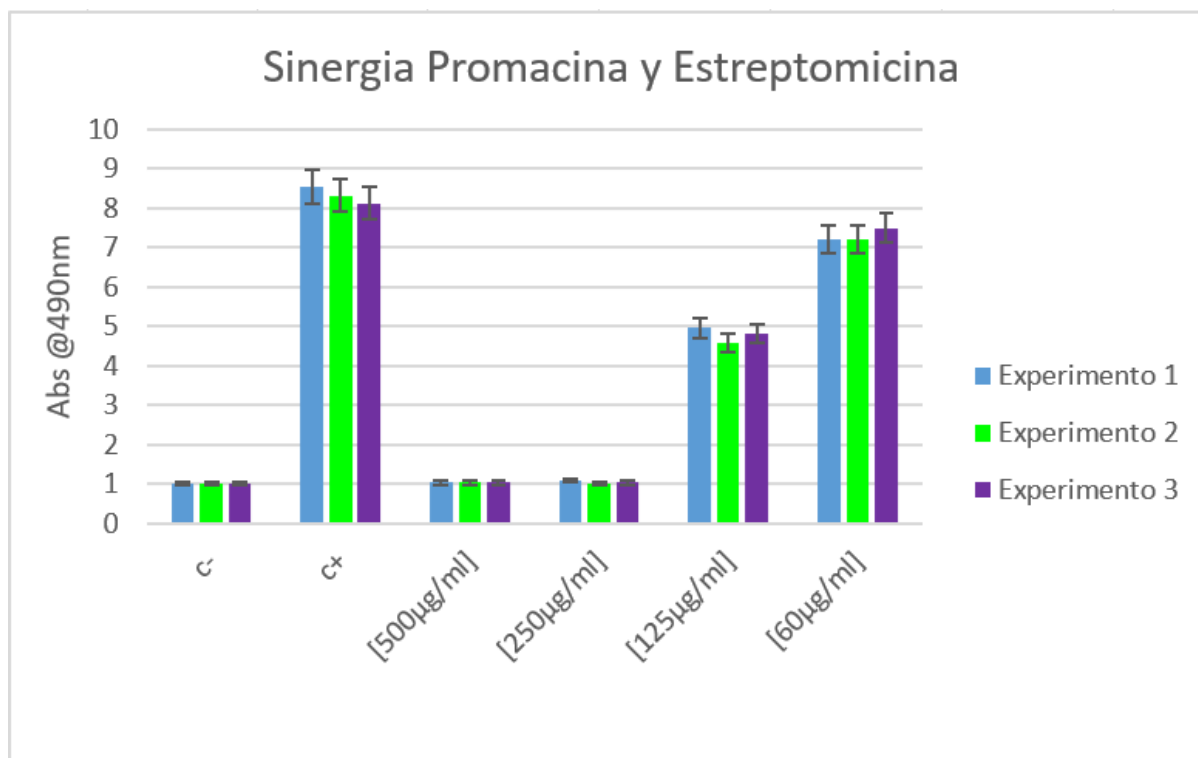


Figura 16. Sinergia de promazina con estreptomicina. Control negativo (C-). Control positivo (C+). Sinergias entre estreptomicina y promazina: S1[500 µg/mL], S2[250 µg/mL], S3[125 µg/mL], S4[60 µg/mL]. Experimento 1: azul. Experimento 2: verde. Experimento 3: morado.

Tras obtener el resultado de las absorbancias de los tres experimentos realizados, se observó que a una concentración de estreptomicina 250 µg/mL no se aprecia producción de biofilm bacteriano. A concentraciones menores de antibiótico, pese a la presencia de promazina a 0,1 mM, sí se aprecia crecimiento de biofilm de *S. mutans*.

En caso de haber conseguido una sinergia, no se debería de haber obtenido valores superiores a los del control negativo a concentraciones menores de 250µg/mL, pues ya se conocía a partir del experimento de la CMI (apartado 4.7.1) que a esa concentración de estreptomicina no había crecimiento bacteriano apreciable. Al observar la figura 16, se aprecian valores elevados para concentraciones de estreptomicina de 125µg/mL y 60µg/mL, lo cual significa que la sinergia no ha tenido éxito, pues no debería de haber producción de biofilm de *S. mutans* si esta hubiese tenido lugar.

5. Discusión

Este trabajo de fin de grado se ha basado en comprobar si existen aminas bicíclicas capaces de inhibir el crecimiento y la producción de biofilm de la bacteria *S. mutans*. Centrándonos primeramente en los EABs, ninguno de los probados ha sido capaz de detener la formación de biofilm bacteriano, mucho menos de alterar el estado de la bacteria, pues en todos los

experimentos realizados, los biofilms de *S. mutans* se desarrollaron con normalidad en comparación con los controles positivos. Además, en nuestro grupo también se han realizado ensayos probando otras aminas bicíclicas como lo son la atropina, el clidinio, el ipratropio, la camylofina y la trimetilamina (A. Botella, 2025), pero los resultados obtenidos han sido similares a los de este proyecto.

Asimismo, a parte de los resultados obtenidos, se conocen una serie de limitaciones que pueden conllevar el uso de estas aminas en el tratamiento de las caries en humanos. Gran parte de las aminas estudiadas poseen un grupo éster en su estructura (proadifen, procaína, benacticina y butetamato). La presencia de este grupo químico supone una rápida hidrólisis por parte de las esterasas presentes en la saliva, por lo que la vida media de estas aminas bicíclicas en el organismo es muy corta (Brunton, 1985). Pese a que hubieran mostrado inhibición de la producción de biofilm a lo largo de los experimentos, habría que solventar el problema de la farmacocinética. Por otra parte, al escopolamina, al igual que la atropina, reduce la secreción salival, por lo que la microbiota oral puede verse alterada y, por consecuencia, se podría favorecer el establecimiento de biofilms de *S. mutans* (A. Botella, 2025).

Las EABs probadas no producían el efecto inhibitorio esperado sobre el biofilm, por lo que se usó alternativamente una amina bicíclica cuya capacidad de inhibición estaba probada, la promazina. Se consideró un EAB de interés para realizar los ensayos de sinergia, pues se ha mostrado previamente que este compuesto es capaz de afectar a los biofilms de la bacteria, debido a su capacidad de afectar al funcionamiento de las proteínas de unión a colina (CBPs) localizadas en la pared de la bacteria de otra especie de estreptococo, *S. pneumoniae* (M.A. Pertusa, 2019). Se plantea la hipótesis de que dicho compuesto esté interfiriendo de manera similar con alguna de las proteínas de la pared celular involucradas en el establecimiento del biofilm por parte de la bacteria *S. mutans*.

Pese a conocer el efecto inhibitorio tanto de la promazina como de la estreptomicina por separado, no se observó ninguna sinergia entre ambos compuestos. La promazina pertenece a la familia de las fenotiazinas, las cuales ven potenciado su efecto al cooperar con otros antibióticos, alterando la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias. Posiblemente, al trabajar con una bacteria Gram positiva, este efecto no puede verse potenciado debido a la presencia de una pared de peptidoglicano. Además, hay que tener en cuenta que cada componente de la sinergia posee un mecanismo de acción diferente; mientras que la promazina afecta a la permeabilidad de la membrana, la estreptomicina inhibe la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas.

La estreptomicina no ha sido el único antibiótico probado para realizar sinergia con la promazina. Anteriormente, se realizaron ensayos con la ampicilina, capaz de inhibir la síntesis de la pared celular de bacterias Gram positivas, y el cloranfenicol, inhibidor de la síntesis de proteínas por su capacidad de unión a la subunidad 50S de los ribosomas. Estos antibióticos tampoco mostraron capacidad alguna de realizar sinergia con la promazina (A. Botella, 2025).

6. Conclusiones y proyección futura

El objetivo principal de este trabajo era encontrar un compuesto capaz de influir negativamente en la formación de biofilm de *S. mutans*, pues es el microorganismo con mayor peso microbiológico en cuanto al desarrollo de las caries dentales.

Primeramente, se realizaron varios ensayos con seis aminas bicíclicas distintas: proadifen, procaína, cloroquina, butetamato, escopolamina y benacticina. Tras evaluar los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión de que ninguna de estas aminas testadas era capaz de detener la producción de biofilm, mucho menos de alterar el ciclo de vida de *S. mutans*.

Al no obtener el resultado esperado con las aminas, se pasó a estudiar el posible efecto sinérgico que podrían mostrar la promazina, seleccionada a conciencia por su ya conocida actividad antibacteriana ante *S. mutans*, y la estreptomicina, un antibiótico clásico. Para poder realizar la sinergia, en primer lugar, se realizó el cálculo de la CMI para la estreptomicina en *S. mutans* para, posteriormente, realizar los experimentos para comprobar si existía sinergia entre ambos compuestos. Pese a que por separado ambas moléculas químicas son capaces de interrumpir la formación de biofilm, no mostraron un efecto potenciado en esta cepa de estreptococo, por lo que no se dio sinergia entre la promazina y la estreptomicina.

En base a los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, se pueden observar diversas líneas de investigación en un futuro:

- Modificar la estructura de la promazina para potenciar su poder antimicrobiano, así como su uso con otros antibióticos para poder observar una posible sinergia.
- Abordar el estudio de otros factores de virulencia presentes en la bacteria, como su pared de peptidoglicano para, facilitar la entrada de otros compuestos, de manera que se aumente el espectro de fármacos capaces de interferir con la colonización de *S. mutans* en la cavidad oral. Otro factor de virulencia con potencial en investigación puede ser el sistema de comunicación o *quorum sensing*.

- Buscar moléculas que puedan inhibir la glucosiltransferasa, la enzima encargada de transformar la glucosa en glucano extracelular y que permite el establecimiento del biofilm bacteriano.
- Realizar estudios con bacterias competitivas de *S. mutans* que se encuentran en la saliva humana para reducir el uso de antibióticos.



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). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018>
- Botella, A. (2025).** Efecto del potencial antimicrobiano de aminos bicíclicas en la bacteria *Streptococcus mutans*
- Brunton, L. L. (1985).** *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA26583848>
- Chan, Y. Y., Ong, Y. M., & Chua, K. L. (2006b).** Synergistic Interaction between Phenothiazines and Antimicrobial Agents against *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 51(2), 623-630. <https://doi.org/10.1128/aac.01033-06>
- Clarke, J. K. (1924, 1 junio).** *On the Bacterial Factor in the Aetiology of Dental Caries*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2047899/>
- De Gracia Retamosa, M., Díez-Martínez, R., Maestro, B., García-Fernández, E., De Waal, B., Meijer, E. W., García, P., & Sanz, J. M. (2015).** Aromatic Esters of Bicyclic Amines as Antimicrobials against *Streptococcus pneumoniae*. *Angewandte Chemie*, 127(46), 13877-13881. <https://doi.org/10.1002/ange.201505700>
- De la Higuera, A. (1997).** In-vitro susceptibility, tolerance and glycocalyx production in *Streptococcus mutans*. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(3), 359-363. <https://doi.org/10.1093/jac/40.3.359>
- Demirci, H., Murphy, F., Murphy, E., Gregory, S. T., Dahlberg, A. E., & Jögl, G. (2013).** A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms2346>
- Grinchii, D., Paliokha, R., & Dremencov, V. T. E. (2018).** Inhibition of cytochrome P450 by proadifen diminishes the excitability of brain serotonin neurons in rats. *General Physiology And Biophysics*, 37(06), 711-713. https://doi.org/10.4149/gpb_2018040
- 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>
- Lax, M. (2025).** Efecto del potencial antimicrobiano de la promazina, una amina bicíclica, en la bacteria *Streptococcus mutans*
- Lemos, J., Palmer, S., Zeng, L., Wen, Z., Kajfasz, J., Freires, I., Abranches, J., & Brady, L. (2019).** The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>
- Matsumoto-Nakano, M.,** Dental Caries, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2014, ISBN 9780128012383, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00001-5>
- Navarro, C. (2024).** Establecimiento de modelos de biofilm con la bacteria *Streptococcus mutans*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.

- Paladines-Calle, S., Villavicencio-Corral, B., Motoche-Carrión, M., & Sarmiento-Ordóñez, J. (2023, 29 agosto).** *Serotipos prevalentes de Streptococcus mutans en América Latina*. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=112311>
- Priya, A., Nagaiah, H. P., Malligarjunan, N., & Pandian, S. K. (2023).** Oral biofilms: Architecture and control. En *Elsevier eBooks* (pp. 485-507). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-99977-9.00025-9>
- 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.
- Procaine. (2006).** PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000669/>
- 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>
- Roig-Molina, E., Domenech, M., De Gracia Retamosa, M., Nácher-Vázquez, M., Rivas, L., Maestro, B., García, P., García, E., & Sanz, J. M. (2018).** Widening the antimicrobial spectrum of esters of bicyclic amines: In vitro effect on gram-positive *Streptococcus pneumoniae* and gram-negative non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(1), 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.10.001>
- Singh, B., Ryan, H., Kredo, T., Chaplin, M., & Fletcher, T. (2021).** Chloroquine or hydroxychloroquine for prevention and treatment of COVID-19. *Cochrane Library*, 2021(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd013587.pub2>
- Vojtěchovský, M., Krus, D., Grof, S., Vitek, V., Ryšánek, K., Kunz, K., & Skála, J. (1968).** Experimental Psychoses Induced by Benactyzine in Alcoholics. *Progress In Brain Research*, 86-105. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)64545-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)64545-8)
- Waters, M., & Tadi, P. (2023, 4 julio).** *Streptomycin*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555886/>
- World Health Organization: WHO. (2022, 18 noviembre).** La OMS destaca que el descuido de la salud bucodental afecta a casi la mitad de la población mundial. *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/es/news/item/18-11-2022-who-highlights-oral-health-neglect-affecting-nearly-half-of-the-world-s-population>
- Zhang, H., Wang, X., Zhen, L., Chang, Q., Cui, L., & Xue, Z. (2025).** Composition and metabolite patterns of caproic acid-producing bacteria during pH-mediated pit mud-Huangshui co-fermentation based on multi-database annotation. *Food Chemistry*, 143096. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143096>
- Zhang, Y., Niu, X., Xiao, Z., Wang, M., & Zheng, H. (2024).** Scopolamine for patients with motion sickness: a systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis. *Acta Oto-Laryngologica*, 144(7-8), 429-438. <https://doi.org/10.1080/00016489.2024.2397556>

Žiemytė, M., Carda-Diéguez, M., Rodríguez-Díaz, J. C., Ventero, M. P., Mira, A., & Ferrer, M. D. (2021). Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth dynamics and persister cells' eradication. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 2062–2075. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1994355>

