



UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

SALES DERIVADAS DEL ÁCIDO BENZOICO COMO  
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA FRENTE A BACTERIAS  
FORMADORAS DE BIOFILM EN INFECCIONES DE PIEL Y  
TEJIDOS BLANDOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

AUTOR: CRISTÓBAL EDUARDO PARRA CID  
PROFESOR GUÍA: T.M. Dr. LUIS.GUZMÁN JOFRÉ  
PROFESOR CO-TUTOR: Dr. OSCAR FORERO DORIA

TALCA – CHILE

2019

## CONSTANCIA

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



Talca, 2019

## **DEDICATORIA**

*A las personas más importantes e influyentes de mi vida, quienes han guiado mis pasos y apoyado bajo toda circunstancia, brindándome su amor y comprensión, mi familia. Principalmente a mi madre, Rosa Cid Matamala, quien, con su ejemplo profesional y humano, ha contribuido enormemente a mi desempeño personal, demostrándome que con trabajo honesto y esfuerzo, todo es posible. Infinitas gracias por brindarme tu apoyo incondicional desde el primer momento en que decidí ingresar a la Universidad de Talca, por tu enorme sacrificio personal y económico para cumplir mis metas, por preocuparte que nunca nos faltara nada y enseñarnos a ser mejores pero humildes siempre, inculcando valores sólidos y a no rendirme en la adversidad. Para ellos, y especialmente mi madre, esta memoria y todos mis logros.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al equipo docente y encargados de la investigación de esta memoria. Primeramente al T.M. Dr. Luis Guzmán por todo el apoyo incondicional, dedicación y confianza brindados durante el año en que desarrollé esta memoria, incentivándome a la investigación, entregándome herramientas, equipamiento y recursos a fin de completar un trabajo de excelencia, además de tenerme siempre en consideración para diferentes trabajos de diversas complejidades, asociados a sus proyectos ajenos a esta memoria. También, al Dr. Oscar Forero por toda su amabilidad en orientarme en el trabajo de esta memoria, en la búsqueda de nuevas alternativas y por su confianza para desarrollar este y otros trabajos. Sin duda alguna, todo el conocimiento, técnicas, experiencias y nuevos desafíos a los que me enfrenté, han sido un enorme aporte tanto en lo personal como en lo profesional y académico.

A mi familia, pilar fundamental en este proceso universitario. A mi padre Miguel Parra Canales., mi hermano Diego Parra Cid y a mi madre Rosa Cid Matamala, quienes han sido un ejemplo a seguir durante todo el desarrollo de este proceso, entregándome valores, apoyo incondicional y comprensión.

Finalmente, a todos los que de alguna manera u otra, aportaron con su cariño, alegría, afecto, compañerismo y apoyo en todo el proceso universitario. A mi novia Loreto Meza Campano y a toda generosa su familia, quienes han sido parte importante de mi vida en este último tiempo. A mis compañeros, amigos y hermanos(as) Felipe González, Marcelo Guerrero, Gabriela Avilés. Jordan Norambuena, Cristian y Felipe Silva, Jordan Sandoval, Orlando Quezada, Juan Contreras, Nicolle Fuenzalida, Patricia Muñoz, Nicolás Valenzuela, Javiera Acuña, Guillermo Cantero y muchos más, tanto de la universidad como del ámbito musical y artístico, además de algunos profesores y personal no académico de la escuela de Tecnología Médica.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	8
<b>2. Introducción</b>	9
<b>3. Revisión bibliográfica</b>	11
3.1. Líquidos iónicos (LIs)	11
3.1.1. Composición	12
3.1.1.1. Cationes	13
3.1.1.2. Aniones	14
3.1.2. Sustituyentes polifenólicos en los LIs	15
3.1.3. Actividad antimicrobiana y antibiofilm de los LIs	17
3.2. Infecciones de la piel y los tejidos blandos (IPTB)	18
3.3. Principales agentes etiológicos de las IPTB	19
3.3.1. <i>Streptococcus pyogenes</i>	19
3.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.3.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	21
3.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.3.5. <i>Escherichia coli</i>	22
3.3.6. <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
3.4. Características de los agentes de IPTB en la formación del biofilm	23
<b>4. Hipótesis</b>	28
<b>5. Objetivos</b>	29
<b>6. Materiales y métodos</b>	30
6.1. Obtención de las sales derivadas del ácido benzoico	30
6.2. Cultivos bacterianos	36
6.3. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en placa de 96 pocillos	36

6.4. Determinación de la actividad antibiofilm	37
6.5. Determinación de la viabilidad celular en células HaCaT frente a LIs	38
6.5.1 Línea celular	38
6.5.2 Cultivo celular	39
6.5.3 Determinación de la viabilidad celular frente a LIs	39
6.6. Análisis estadístico	40
<b>7. Resultados</b>	<b>42</b>
7.1. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en placa de 96 pocillos	42
7.2. Determinación de la actividad antibiofilm	48
7.3. Determinación de la viabilidad celular en células HaCaT frente a LIs	61
<b>8. Discusión</b>	<b>63</b>
<b>9. Conclusión</b>	<b>74</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Cationes comúnmente usados en los LIs	13
<b>Figura 2.</b> Estructura electrónica del catión 1,3-dialquilimidazolio	14
<b>Figura 3.</b> Aniones comúnmente usados en los LIs	15
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la formación de biofilm	25
<b>Figura 5.</b> Esquema de síntesis de LI derivados en ácidos benzoicos	31
<b>Figura 6.</b> Placa de 96 pocillos para la determinación de la CMI	43
<b>Figura 7.</b> Actividad antibiofilm de los LIs frente a <i>S. pyogenes</i>	50
<b>Figura 8.</b> Actividad antibiofilm de los LIs frente a <i>P. aeruginosa</i>	52
<b>Figura 9.</b> Actividad antibiofilm de los LIs frente a <i>S. epidermidis</i>	54
<b>Figura 10.</b> Actividad antibiofilm de los LIs frente a <i>S. aureus</i>	56
<b>Figura 11.</b> Actividad antibiofilm de los LIs frente a <i>E. coli</i>	58
<b>Figura 12.</b> Actividad antibiofilm de los LIs frente a <i>A. baumannii</i>	60
<b>Tabla 1.</b> Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido benzoico	32
<b>Tabla 2.</b> Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido vanílico	33
<b>Tabla 3.</b> Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido protocatecuico	34

<b>Tabla 4.</b> Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido siríntrico	35
<b>Tabla 5.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los LIs derivados del ácido benzoico y ácido vanílico	46
<b>Tabla 6.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los LIs derivados del ácido protocatecuico y ácido siríntrico	47
<b>Tabla 7.</b> Determinación de la viabilidad celular de los LIs frente a células HaCaT expresado en EC <sub>50</sub> .	62



## 1. RESUMEN

Las infecciones a la piel y tejidos blandos (IPTB) son un grupo de infecciones que contribuyen directamente a la morbilidad y mortalidad a nivel nacional e internacional, afectando a personas con diversa consideración clínica. Los patógenos productores de IPTB han adquirido resistencia a la amplia gama de antimicrobianos desarrollados, impidiendo así un tratamiento efectivo y siendo esto un problema a nivel mundial, por lo que es vital poseer nuevas alternativas de tratamiento.

En la presente memoria se utilizaron diferentes líquidos iónicos (LIs) derivados del ácido benzoico, con diferentes tamaños de cadenas de alquilo, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) por medio de la microdilución en caldo para *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *A. baumannii*, obteniendo concentraciones de CMI desde 2 mM hasta  $CMI < 0,01562$  mM, evidenciándose actividad variada de acuerdo a la funcionalización que posee el LI como el largo de la cadena hidrocarbonada. También se evaluó la capacidad de inhibición de la formación de biofilm de dichos patógenos, usando concentraciones de 1 mM, 0,1 mM y 0,01 mM, mostrando mejor actividad antibiofilm los LIs que se componen con ácido vanílico con diferentes largos de cadena hidrocarbonada. Además se determinó la viabilidad celular en células HaCaT, determinando la concentración a la cual el 50% de estas permanecen viables, mostrando concentraciones menores a la CMI de 4 LIs con la mejor actividad. Estos resultados demuestran que los LIs tienen actividad antimicrobiana y antibiofilm prometedoras, junto con no producir toxicidad celular, siendo un tratamiento prometedor frente a las IPTB. Sin embargo, es necesario ampliar los estudios confirmar dicha premisa.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones a la piel y tejidos blandos (IPTB) han sido caracterizadas como un problema para la salud mundial por su amplia capacidad infectiva y virulenta sobre diversos pacientes, desde sanos a pacientes hospitalizados, siendo además un factor de vulnerabilidad y/o predisposición la presencia de enfermedades crónicas. Estos pueden desarrollar cuadros infecciosos graves, pudiendo llegar al extremo de amputación de extremidades o tejidos comprometidos vitales para el paciente por medio de cirugía (1).

Dentro de los microorganismos que son productores de IPTB, destacan como agentes etiológicos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, diversas enterobacterias, *Staphylococcus aureus* (cepas resistentes a meticilina), *Streptococcus pyogenes* y en algunos casos *Staphylococcus* coagulasa negativo como *Staphylococcus epidermidis*. Algunos autores señalan que uno de cada tres IPTB se desarrolla producto de infecciones por cocáceas Gram positivo, siendo el resto producto de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (2). El tratamiento inadecuado prescrito de forma empírica ha contribuido al aumento de mortalidad por infecciones provocadas por estos agentes (3).

El fenómeno creciente de la resistencia a antimicrobianos por parte de estos agentes patógenos ha puesto en alerta a entidades nacionales, como el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) o a la Organización Mundial de la Salud (OMS), pronunciándose esta última en estado de vigilancia sobre sus mecanismos de resistencia, puesto que ponen en peligro la capacidad para tratar

enfermedades. La resistencia a los antimicrobianos está poniendo en riesgo los logros de la medicina moderna. Los trasplantes de órganos, la quimioterapia y las cirugías se vuelven mucho más peligrosas sin antimicrobianos efectivos para la prevención y el tratamiento de infecciones (4). Estos agentes han sido capaces de generar resistencia a diversos antimicrobianos, por medio de producción de enzimas como betalactamasas y carbapenemasas (5), bombas de eflujo o modificación de sitios diana, descritos para Gram negativos (6), mientras que para bacterias Gram positivo se describen a *S. aureus* meticilino resistentes y expresión de fenotipos resistentes a macrólidos en *S. pyogenes*, entre otros mecanismos de resistencia (7).

En base a lo anterior, es de preocupación y urgencia el desarrollar nuevas terapias para el tratamiento frente a estos microorganismos causantes de IPTB. Para la presente memoria se trabajará con líquidos iónicos (LIs), particularmente con derivados del ácido benzoico de diferentes cadenas de alquilo. Estas son sales que a temperatura ambiente se encuentran en estado líquido, se componen básicamente de núcleos catiónicos y aniónicos de gran peso a los que se unen diferentes cadenas hidrocarbonadas o grupos funcionales. Bajo este punto se ha propuesto que la aplicación de LIs como tratamiento puede ser efectivo, a fin de aumentar la capacidad microbicida y disminuir la capacidad de formar biofilm por parte de *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Líquidos iónicos (LIs)

En los últimos años ha imperado en el ámbito científico la producción de solventes verdes, de baja toxicidad, fácil obtención y aplicación en diversos campos, además de evitar la contaminación medioambiental en la producción de estos. Por ello, los LIs han tomado relevancia como alternativa para diferentes investigaciones multidisciplinarias que incluye química, ciencia de materiales y ambiental e ingeniería química (8).

Los LIs son sales de bajo peso molecular, cuyo punto de fusión es menor a 100 °C, siendo a temperatura ambiente líquidos, generalmente incoloros, con viscosidades relativamente altas (9). Exhiben presiones de vapor muy bajas en condiciones ambientales y, por lo tanto, son efectivamente no volátiles. Son buenos disolventes para un amplio espectro de materiales inorgánicos, orgánicos y poliméricos, y son inmiscibles con numerosos disolventes orgánicos. Algunas propiedades, como la estabilidad térmica y la miscibilidad, dependen principalmente del anión, mientras que otras, como la viscosidad, la tensión superficial y la densidad, dependen de la longitud de la cadena de alquilo en el catión y/o la forma o simetría (10). Todas estas propiedades hacen de los LIs, en comparación con otros solventes, compuestos con características únicas.

Las propiedades relacionadas a la biología como viscosidad, hidrofobicidad y densidad pueden ser manejadas al modificar los núcleos y la solubilidad se puede alterar conjugando cadenas hidrofóbicas o grupos funcionales hidrófilos, por lo que estas moléculas pueden ser construidas según la necesidad requerida (11).

Estos compuestos han sido catalogados como “solventes verdes” debido a que poseen algunas propiedades que han sido definidas como las propiedades ideales de un solvente, tales como: baja volatilidad, alta estabilidad física y química, reutilizable y eventualmente fácil de manipular. Además, por medio de diferentes técnicas de síntesis, es posible generar una mínima cantidad de residuos (o nula en algunas) y de emisión de disolventes que podrían ser potencialmente tóxicos para el medioambiente (9).

### 3.1.1 Composición

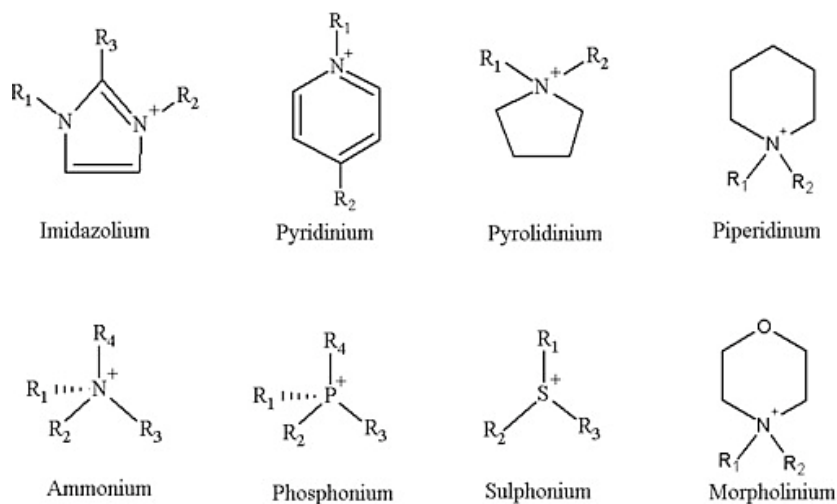
Los diferentes LIs están formados por un catión y un anión. La mayor parte de los cationes tienen naturaleza aromática con átomos de nitrógeno en el anillo, heterociclos nitrogenados, mientras que los aniones suelen estar constituidos por diferentes elementos químicos, tanto orgánicos como inorgánicos (12).

Estos compuestos adquieren su estado líquido puesto que los iones que los componen son muy asimétricos y de gran tamaño, por lo que las fuerzas que actúan frente a la unión catión-anión

son más débiles que las fuerzas que actúan en una sal convencional. En los LIs tienen gran importancia las fuerzas débiles como enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (13). Por ello, al partir de iones de gran diferencia química, no es posible lograr un empaquetamiento molecular que dé paso a una estructura compacta. Solo es necesario un aporte pequeño de energía para separar aniones y cationes que configuran el sólido y transformarlo en un líquido (12).

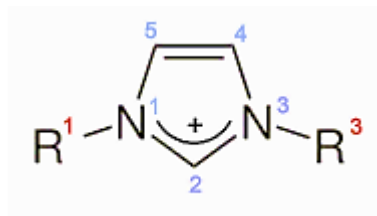
### 3.1.1.1 Cationes

El catión es una estructura de baja simetría, por lo general contiene nitrógeno orgánico voluminoso, como imidazolio, piridinio, pirrolidinio, picolinio, oxazolío, fosfonio o amonio, siendo estos los más representativos y descritos (14) (Figura 1). Se le atribuye al catión de los LIs las propiedades físicas como punto de fusión, viscosidad y densidad (15).



**Figura 1.** Cationes comúnmente usados en los LIs. (Adaptado de Wang et al., 2016) (16).

De los cationes más reportados y estudiados se encuentra el imidazolio, ya que presenta características únicas en su estructura química. (Figura 2).

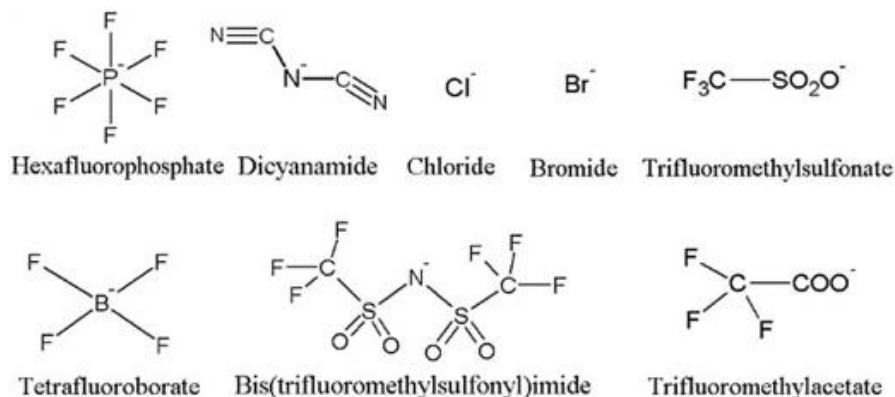


**Figura 2.** Estructura electrónica del catión 1,3-dialquilimidazolio (13).

De acuerdo a Weingärtner (2008) (17), los átomos de hidrógeno en las posiciones 2, 4 y 5 (Figura 2) soportan casi la misma carga, sin embargo el átomo de carbono en la posición 2 está cargado positivamente por el déficit electrónico en el enlace C=N. Los carbonos 4 y 5 son prácticamente neutros. Esto provoca que el átomo de hidrógeno en posición 2 tenga una acidez de Lewis alta (como resultado de la carga positiva deslocalizada). Además, la acidez de este átomo de hidrógeno favorece la formación de enlaces de hidrógeno. Esto permite entender molecularmente las propiedades físicas descritas para este tipo de catión.

### 3.1.1.2 Aniones

Dentro de los aniones más utilizados, se encuentran Hexafluorofosfato ( $\text{PF}_6^-$ ), Tetrafluoroborato ( $\text{BF}_4^-$ ), Trifluoroacetato ( $\text{CF}_3\text{-COO}^-$ ) Trifluorosulfonato o triflato ( $\text{CF}_3\text{-SO}_3^-$ ) y Hexafluoroantimoniato ( $\text{SbF}_6^-$ ). (Figura 3)



**Figura 3.** Aniones comúnmente usados en los LIs. (Adaptado de Wang et al., 2016) (16).

Los aniones tienen un gran efecto sobre las propiedades de los LIs independiente del catión que este tenga. Por ejemplo, según Keskin y colaboradores (2007) (18), el LI con 1-*N*-butil-3-metilimidazolio y el anión  $\text{PF}_6^-$  es inmisible con el agua, mientras que el líquido con el mismo catión pero con el anión  $\text{BF}_4^-$  es soluble en agua. Este ejemplo representa la propiedad de "disolvente diseñador" de los LIs: diferentes pares de iones determinan las propiedades físicas y químicas del líquido. Al cambiar el anión, se puede cambiar la hidrofobicidad, la viscosidad, la densidad y la solvatación, diseñando, por lo tanto, propiedades nuevas de acuerdo al anión presente en la estructura del LI.

### 3.1.2 Sustituyentes polifenólicos en los LIs

De la amplia gama de sustituyentes en los LIs, han tomado protagonismo los sustituyentes derivados de compuestos polifenólicos. Los compuestos polifenólicos se encuentran distribuidos



ampliamente en la naturaleza, son fitoquímicos que se encuentran principalmente en frutas, verduras, té, café, chocolates, legumbres, cereales y bebidas. Destacan dentro de sus beneficios la capacidad de proteger, en enfermedades crónicas, del daño de los radicales libres, actuando como antioxidantes. Estos compuestos se dividen en cuatro categorías: flavonoides, estilbenos, lignanos y ácidos fenólicos (19).

Dentro de los ácidos fenólicos, estos pueden sub clasificarse en aquellos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico. Particularmente para los derivados del ácido benzoico, los representantes de mayor estudio e impacto son el ácido protocatecuico, el ácido vanílico, ácido gálico y el ácido sirínico (20). Además de las propiedades antioxidantes y otras de importancia para la salud mundial por parte de estos derivados, se les ha asociado una actividad frente a diversos patógenos. Según diversos autores, se especula que el sitio y el número de grupos hidroxilo en el grupo fenol están relacionados con la toxicidad relativa frente a los microorganismos, siendo las principales características estructurales que influyen en la capacidad antioxidante de los derivados fenólicos, con evidencia previa de que el aumento de la hidroxilación produce un aumento de la toxicidad. Además, algunos autores han encontrado que los fenoles más altamente oxidados tienen propiedades antimicrobianas más altas con los consecuentes de cambios irreversibles en las propiedades de la membrana (carga, permeabilidad intra y extracelular y propiedades fisicoquímicas) por medio de cambios de hidrofobicidad, disminución de la carga superficial negativa y ocurrencia de ruptura local o formación de poros en las membranas celulares, con la consiguiente fuga intracelular de constituyentes esenciales (21).

### 3.1.3 Actividad antimicrobiana y antibiofilm de los LIs

Una de las características relevantes de los LIs es su lipofilidad, principal factor en la determinación de la actividad antimicrobiana. Esta actividad se ve mejorada al aumentar desde cadenas de 6 átomos de carbono a 14, 16 o 18 átomos de carbono en su grupo alquílico (22). El aumento de la longitud de la cadena, aumenta también la tendencia a la adsorción de los LIs en las superficies de las membranas de los microorganismos (23). Además, los LIs poseen mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivo que las Gram negativo. Esto puede explicarse por diferentes estructuras de membrana celular de los dos tipos de bacterias. La capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativo está compuesta casi totalmente de lipopolisacáridos y proteínas que restringen la entrada de biocidas y compuestos anfipáticos y, por lo tanto, son más resistentes que las bacterias Gram positivo (24).

También, los LIs demuestran efectividad frente a la formación de estructuras como el biofilm bacteriano de diversos patógenos, dependiendo de la cantidad de carbonos que presente el LI como también los sustituyentes químicos que lo compongan. Los LIs de hidroxilamonio son altamente activos contra patógenos humanos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*, mientras que los LIs difosfóricas muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra patógenos oculares (25).

El gran problema actual de los diversos LIs, sintetizados y usados experimentalmente frente a diversos patógenos, es su potencial efecto citotóxico frente a diversas líneas celulares eucariontes, teniendo LIs funcionales pero tóxicos. Repetidamente en la literatura científica se

ha demostrado que el efecto citotóxico de los LIs depende principalmente del aumento de la cadena hidrocarbonada en el catión. Frente a células PC 12 (Feocromocitoma murino), se demostró que al usar LIs de 12 átomos de carbono, la citotoxicidad aumentó 380 veces (reflejado en el EC<sub>50</sub>) comparado con un LI de 4 átomos de carbono de la misma característica química (26). Esto también es extrapolable frente a células NIH 3T3 (fibroblastos murinos) donde, al usar LIs de 18 átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada se produce un aumento de la citotoxicidad en 46 veces (relacionado con EC<sub>50</sub>) comparado con un mismo LI de 8 átomos de carbono (27).

### **3.2 Infecciones de la piel y los tejidos blandos (IPTB)**

La piel es una membrana fibroelástica, considerada la “envoltura viva del cuerpo”; es un órgano que desempeña una gran gama de funciones que incluyen la protección frente a agresiones externas, la termorregulación, la absorción de radiaciones ultravioleta y la producción de vitamina D. Adicionalmente, tiene una importante función de reconocimiento inmunitario, es una eficaz barrera de protección contra microorganismos patógenos, siendo el órgano de mayor extensión (28). La piel se encuentra formada por una barrera física llamada epidermis, que tiene como función resistir a la penetración de microorganismos y toxinas, como glándulas ecrinas que acidifican la piel para evitar la colonización de los microorganismos. Sin embargo, el pH ácido favorece el desarrollo de bacterias como estafilococos coagulasa negativos (*Staphylococcus epidermidis*) o *Corynebacterium spp* (29).

Se define a las IPTB como los cambios inflamatorios en la epidermis, dermis, tejido celular subcutáneo, fascia profunda o músculo, producidos por un agente infeccioso (30). Las IPTB cubren una multitud de presentaciones clínicas que van desde leves, que requieren una intervención mínima, hasta infecciones graves que amenazan la vida y que exigen la administración intravenosa inmediata de antibióticos y la intervención quirúrgica. La evaluación de la gravedad de la infección y la identificación del agente causal más probable promueve resultados mejorados y disminuye el desarrollo de la resistencia (31). Los signos y síntomas considerados para la internación del paciente son fiebre, comorbilidad (hipertensión, diabetes tipo II, la inmunosupresión), la zona afectada (manos y cabeza tienen potencialidad de dejar secuelas) y pacientes con infecciones a nivel muscular con evidente signo de bacteriemia (1).

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) caracteriza primeramente una IPTB como una lesión de la piel mínima de 75 cm<sup>2</sup>. El daño que se presenta está caracterizado por: inflamación bacteriana con invasión de la epidermis, edemas y endurecimiento de la zona. El cuadro es acompañado por fiebre, dolor y presencia de rubor en la zona (32).

### **3.3 Principales agentes etiológicos de IPTB**

#### *3.3.1 Streptococcus pyogenes*

Cocácea Gram positivo agrupada en cadenas, generalmente se cultiva en medios suplementados con sangre, donde se pueden apreciar colonias β-hemolíticas que suele ser de dos

a cuatro veces más grande que el diámetro de la colonia. Pertenece al grupo A de la clasificación de Lancefield y puede identificarse presuntivamente por el test de PYR, dando positivo para este test, pero es el test de sensibilidad a la bacitracina quién resulta clave para su correcta identificación, siendo positivo frente a las demás especies del mismo género (33). Dentro de las patologías que puede producir una infección por esta especie, destacan tres tipos: fascitis necrotizante, miositis y síndrome de shock tóxico estreptocócica (STSS). Las tasas de mortalidad son altas en infecciones invasivas estreptocócicas, desde aproximadamente el 20% para la fascitis necrotizante hasta casi el 100% para la miositis. La terapia consiste principalmente en altas dosis de combinaciones de antibióticos, cirugía agresiva y administración intravenosa de inmunoglobulinas para el STSS (34).

### 3.3.2 *Staphylococcus aureus*

Esta especie es Gram positivo, inmóvil, es positivo para el test de la catalasa y para el test de la oxidasa resulta negativo. Posee un color amarillo u oro en medios como agar sangre. Es característico en esta especie presentar enzimas como la coagulasa (libre y ligada), donde se utiliza esta, por medio del test de la coagulasa, para su identificación confirmatoria, arrojando positivo (35). Pueden generar cápsula, sin embargo en condiciones salvajes no la expresan, además son aerobios facultativos (36). Tiene la capacidad de generar toxinas y producir cuadros infecciosos como el síndrome de piel escaldada, intoxicación alimentaria y síndrome de shock tóxico (37). *S. aureus*, en un principio, era naturalmente susceptible a prácticamente todos los antibióticos que se hayan desarrollado. Sin embargo, ha adquirido gran importancia la adquisición acelerada de mecanismos de resistencia, los cuales a menudo son por transferencia horizontal de genes desde fuentes externas, aunque la mutación cromosómica y la selección de antibióticos también son importantes. Las cepas resistentes a meticilina (SAMR), distribuidas

ampliamente en la clínica, no permiten la acción de vancomicina, tetraciclina, eritromicina y dicloxacilina (38).

### 3.3.3 *Staphylococcus epidermidis*

Cocácea Gram positivo, inmóvil, catalasa positivo y oxidasa negativo. Presenta colonias blancas elevadas y no hemolíticas. A diferencia de *S. aureus*, frente al test de coagulasa resulta negativo, clasificándose, al igual que otras especies de *Staphylococcus*, como *Staphylococcus* coagulasa negativo (CoNS) (39). Es sensible al test de la novobiocina, siendo de utilidad clínica para su identificación frente a otras especies de CoNS (40). Antiguamente se consideraba parte de la microbiota normal de piel y conjuntiva, sin embargo ha adquirido importancia clínica puesto que, a pesar de ser comensal de la piel, puede actuar como patógeno (41). *S. epidermidis* representa la fuente más común de infecciones en dispositivos médicos residentes. Esto probablemente se debe al hecho de que *S. epidermidis* es un colonizador permanente y ubicuo de la piel humana, y por ello tiene alta probabilidad de contaminación del dispositivo durante la inserción. Actualmente, se le ha caracterizado como un patógeno oportunista (42). Ha adquirido relevancia en la clínica porque algunas cepas están adoptando la resistencia a meticilina, al igual que *S. aureus*.

### 3.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilo Gram negativo, el que se caracteriza por ser no fermentador, es aeróbico y posee la capacidad de ser móvil, oxidasa positivo, altamente versátil, incluso capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno, produce un pigmento verde azulado y tiene la capacidad de crecer a 42 °C (35). Es un patógeno oportunista, importante agente de infecciones nosocomiales y que afecta a pacientes críticos como post operados, grandes quemados o que necesitan equipos médicos (como ventilación mecánica) para su tratamiento y sobrevida. Posee resistencia a una amplia gama de antimicrobianos por la producción de betalactamasas de amplia gama y carbapenemasas (43).

### 3.3.5 *Escherichia coli*

Bacilo Gram negativo, catalasa positivo, oxidasa negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo uno de los representantes más característicos. Crece en agar MacConkey, denotando su capacidad de usar la lactosa, clasificándose como lactosa positivo, además de ser móvil, utiliza el indol (indol positivo) y descarboxila la ornitina (44). Este patógeno es descrito para múltiples infecciones, siendo uno de los más aislados en la clínica. Para las IPTB se le han asociado complicaciones como onfalitis neonatal, celulitis localizada en las extremidades inferiores o superiores, fascitis necrotizante, infecciones del sitio quirúrgico e incluso infecciones después de lesiones por quemaduras (45).

### 3.3.6 *Acinetobacter baumannii*

Esta especie morfológicamente es clasificada como un cocobacilo Gram negativo, perteneciente a los bacilos no fermentadores, oxidando la glucosa. Es inmóvil, pleomórfico, catalasa positivo, oxidasa negativo (46). Las especies de *Acinetobacter* se consideran generalmente microorganismos de baja virulencia, salvo en pacientes críticamente enfermos o inmunocomprometidos. Estos microorganismos se asocian más a menudo con infecciones nosocomiales que comunitarias, siendo asociado mayoritariamente *A. baumannii* como especie de infección nosocomial (47). *A. baumannii* tiene una serie de mecanismos de resistencia, que incluyen  $\beta$ -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de flujo de salida, defectos de permeabilidad y modificaciones de los sitios objetivo (48). Estos mecanismos hacen que las infecciones por este agente sean de difícil tratamiento y erradicación del patógeno.

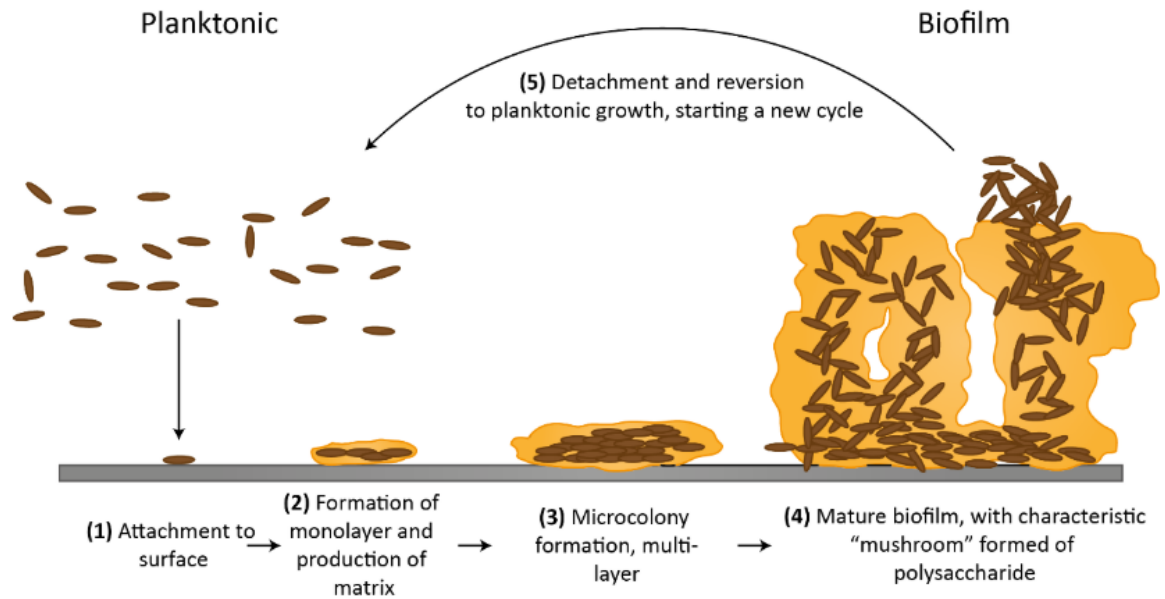
## 3.4 Características de los agentes de IPTB en la formación del biofilm

El biofilm es una asociación bacteriana compleja, donde existe una única población bacteriana con características en común. Es formado por un conjunto complejo de proteínas, polisacáridos y el ADN en una matriz polimérica extracelular de producción propia. Puede encontrarse en varias superficies, incluyendo sistemas naturales acuáticos o de agua potable, tejidos vivos, dispositivos médicos, entre otros. Posee una arquitectura única, donde existen además de los elementos mencionados y agua, agujeros diseñados de forma específica que permite la difusión de nutrientes, gases y agentes antimicrobianos a través del biofilm; sin embargo, el biofilm modula su arquitectura en respuesta a estos cambios en el proceso interno y externo. Debido a la



proximidad de las células, que intercambian sus moléculas de detección de quórum, plásmidos y cromosomas adicionales, mostrando carácter heterogéneo en cada comunidad del biofilm. (49)

El biofilm bacteriano, para su formación consta de cinco etapas (Figura 4): unión reversible inicial (1), unión irreversible (2-3), maduración (4) y dispersión (5). Primeramente, las bacterias planctónicas toman contacto con la superficie a colonizar, siendo el punto de partida y pudiendo además ser reversible. Las bacterias forman una monocapa, produciendo una matriz extracelular para protección, la cual está formada por polisacáridos extracelulares, proteínas estructurales, residuos celulares y ácidos nucleicos. Luego comienzan a formarse microcolonias, que muestran un crecimiento significativo y una comunicación célula-célula como la detección de quórum sensing (QS). El biofilm crece de manera tridimensional y el apego desde esta etapa es irreversible. En la última etapa, algunas células del biofilm maduro comienzan a desprenderse y dispersarse en el medio ambiente como células planctónicas, para comenzar potencialmente un nuevo ciclo de formación de biofilm (50).



**Figura 4.** Representación esquemática de la formación de biofilm. (Adaptado de Hollmann, Perkins y Walsh, 2018) (50).

La formación de biofilm favorece la resistencia a antimicrobianos, de esta forma impiden la aplicación de un tratamiento efectivo para su erradicación. “El aumento de la resistencia a los antibióticos del biofilm se debe a (i) difusión limitada de los agentes antimicrobianos a través de la matriz del biofilm, (ii) la comunicación de los agentes antimicrobianos con la matriz del biofilm (polímero y las células), (iii) resistencia mediada por enzima, (iv) niveles de actividad metabólica dentro del biofilm, (v) la adaptación genética, (vi) (bombas de eflujo) y (vii) la estructura de la membrana externa” (49).

*Streptococcus pyogenes* se caracteriza por producir un biofilm colonizador en diferentes cavidades como en la piel. Este patógeno puede ingresar a través de la cavidad oral y situarse en

el tracto respiratorio superior, producir biofilm y con ello generar un fracaso terapéutico en pacientes con faringitis recurrente (51). También puede situarse en la piel, produciendo colonización y conducir a diferentes infecciones, descritas algunas en el punto 3.1.1.

Por su parte, *Pseudomonas aeruginosa* forma biofilm para aumentar la resistencia frente a antimicrobianos y persistir la infección, mostrando resistencia a carbapenémicos y betalactámicos impidiendo así un tratamiento. Se ve favorecido la formación de biofilm en pacientes hospitalizados inmunocomprometidos (43).

En infecciones por *Staphylococcus aureus*, es común la formación de biofilm en los catéteres de pacientes con tratamiento de hemodiálisis. Esta codificado por lo genes de virulencia *ica* y *hemB* asociados además a síndromes clínicos como fibrosis quística (52).

*Staphylococcus epidermidis* también desarrolla un biofilm codificado por el gen de virulencia *ica* que permite la formación en dos fases: la bacteria inicialmente se adhiere a la superficie de un implante médico y en un segundo paso, la unión célula-célula y su acumulación en multicapas depende de la habilidad de las células para formar la adhesina intercelular polisacárida (PIA) (41). Este biofilm ha demostrado ser persistente en equipos quirúrgicos, por lo que su presencia pone en riesgo cualquier tratamiento y la rehabilitación del paciente (53).

En *Escherichia coli*, el biofilm juega un papel importante tanto en la colonización para múltiples afecciones (previamente descritas), como también en la resistencia antimicrobiana y el fracaso terapéutico. Estudios señalan que las fimbrias tipo I de *E. coli* desempeñan un papel crucial en su fijación a la superficie y la maduración. También han identificado genes de resistencia al estrés en el proceso de formación de biofilm que ayudan a que este sobreviva en ambientes hostiles. Además, juegan un rol importante los genes que este patógeno posee para la formación del biofilm, puesto que también se han asociado a la sobreproducción de la matriz de la estructura, ayudando a la impermeabilidad para el tratamiento antimicrobiano en pacientes con infecciones crónicas (54).

En *Acinetobacter baumannii* actúan múltiples genes de regulación, tanto de bombas de eflujo u otros mecanismos de resistencia, como genes de codificación de matriz. Estos hacen que el biofilm que produce sea uno de los causantes de la multirresistencia de este patógeno (55). Según He y colaboradores (56), la sobreexpresión de la bomba eflujo AdeFGH tiene un papel potencial en la síntesis y el transporte de moléculas de QS durante la formación de biofilm.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las sales derivadas del ácido benzoico poseen actividad antimicrobiana y antibiofilm sobre bacterias patógenas de la piel y tejidos blandos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de líquidos iónicos (LIs) derivados del ácido benzoico con diferentes largos de cadena en microorganismos productores de infecciones de la piel y tejidos blandos.

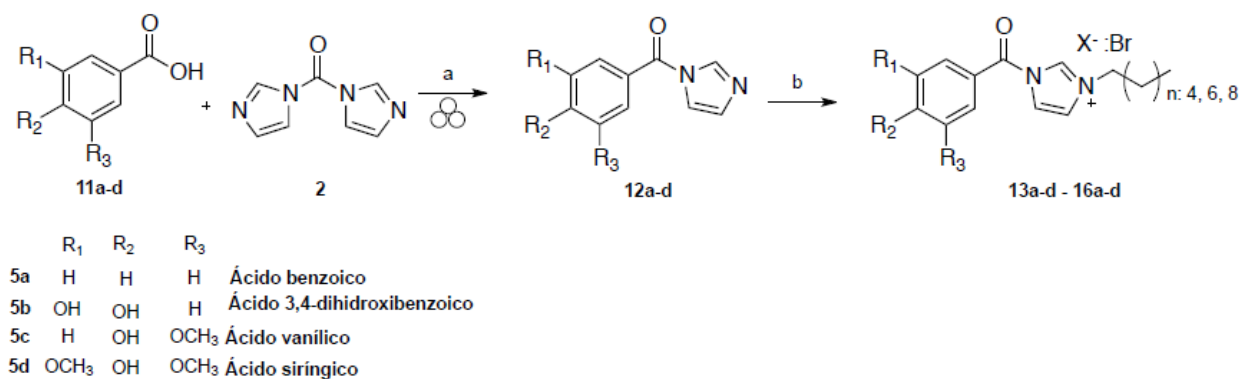
### 5.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los LIs frente a *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*.
- Evaluar la capacidad antibiofilm de los LIs frente a *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de las sales derivadas del ácido benzoico

Los LIs funcionalizados basados en ácidos benzoicos utilizados fueron previamente sintetizados, iniciándose con la formación de los *N*-benzoilimidazoles, haciendo uso de la mecanoquímica de síntesis. Esta se basa en que reactivos sólidos se trituren juntos, sin solvente o con un mínimo de solvente, llevándose a cabo en un mortero de molinillo (FRITSCH: Pulverisette 2) a 70 rpm y 130 mm de diámetro del recipiente de molienda. Los benzoilimidazoles fueron obtenidos como aceites de color amarillo y fueron empleados sin previa purificación en la formación final de los LIs. La reacción de cuaternización se llevó a cabo por reacción de los diferentes *N*-benzoilimidazoles con los diferentes bromuros de alquilo (hexil, octil y decil) en una proporción 1:1,2 eq, obteniendo en un rango de 45-95% de rendimiento de reacción. Luego, los LIs fueron purificados por decantación en tolueno con el fin de eliminar excesos de reactantes y solvente. Finalmente, los LIs fueron lavados con hexano y dietileter y aislados por decantación. Todo lo anterior señalado se resume en la Figura 5. La síntesis de estos LIs se enmarca dentro del Proyecto FONDECYT INICIACIÓN 11150390.

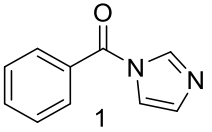
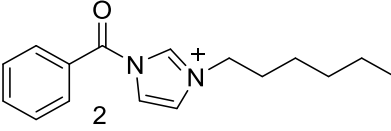
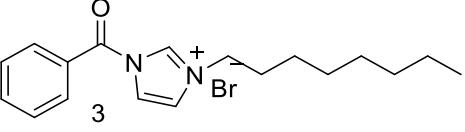
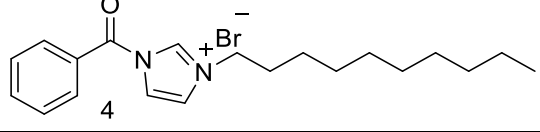


**Figura 5.** Esquema de síntesis de LI derivados en ácidos benzoicos.

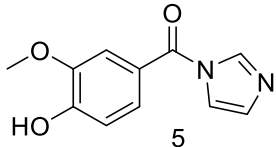
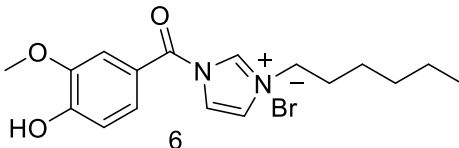
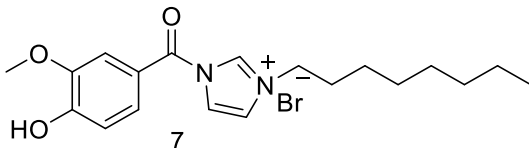
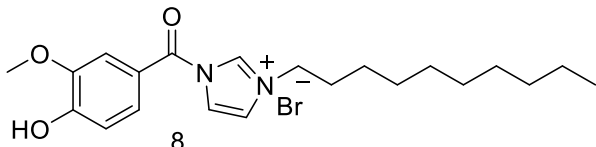
Los LIs utilizados para el presente trabajo derivan de 4 precursores distintos: ácido benzoico, ácido vanílico, ácido siringico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico (comercialmente conocido como ácido protocatecuico). En las tablas 1, 2, 3 y 4 se detalla la estructura, nombre IUPAC, abreviación (principalmente utilizada en este trabajo) y pesos moleculares.



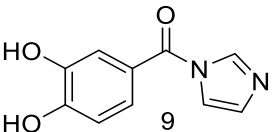
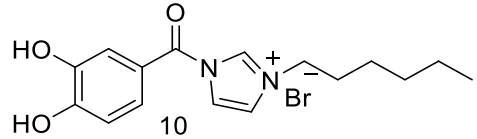
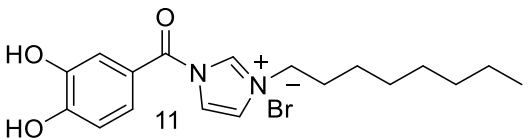
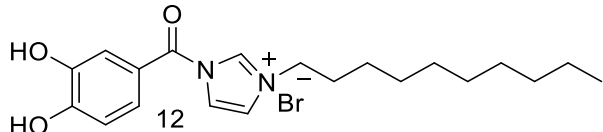
**Tabla 1.** Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido benzoico.

Nombre IUPAC	Estructura química	Peso Molecular	Abreviatura
(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)(fenil) metanona		172,6 g/mol	[BIM]Br
Bromuro de 3-hexil-1-benzoil-1 <i>H</i> -imidazolio		336,08 g/mol	[BHIM]Br
Bromuro de 3-octil-1-benzoil-1 <i>H</i> -imidazolio		364,12 g/mol	[BOIM]Br
Bromuro de 3-decil-1-benzoil-1 <i>H</i> -imidazolio		395,15 g/mol	[BDIM]Br

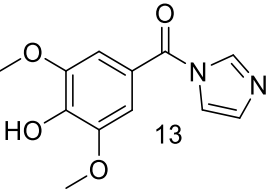
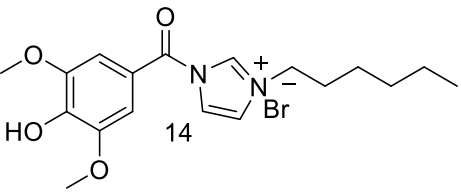
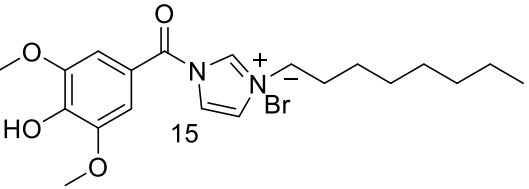
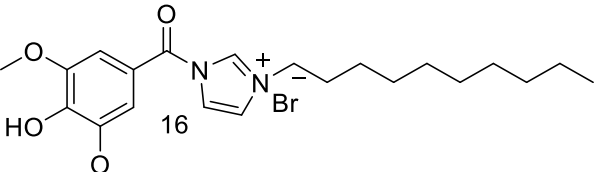
**Tabla 2.** Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido vanílico.

Nombre IUPAC	Estructura química	Peso Molecular	Abreviatura
(4-hidroxi-3-metoxifenil)(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metanona		218,07 g/mol	[VIM]Br
Bromuro de 3-hexil-1-(4-hidroxi-3-metoxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		382,09 g/mol	[VHIM]Br
Bromuro de 3-octil-1-(4-hidroxi-3-metoxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		410,12 g/mol	[VOIM]Br
Bromuro de 3-decil-1-(4-hidroxi-3-metoxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		438,15 g/mol	[VDIM]Br

**Tabla 3.** Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido protocatecuico.

Nombre IUPAC	Estructura química	Peso Molecular	Abreviatura
(3,4-dihidroxifenil)(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metanona		204,05 g/mol	[PIM]Br
Bromuro de 3-hexil-1-(3,4-dihidroxibenzoil) 1 <i>H</i> -imidazolio		368,07 g/mol	[PHIM]Br
Bromuro de 3-octil-1-(3,4-dihidroxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		396,10 g/mol	[POIM]Br
Bromuro de 3-decil-1-(3,4-dihidroxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		424,14 g/mol	[PDIM]Br

**Tabla 4.** Caracterización química y nomenclatura de los LIs derivados del ácido siríngico.

Nombre IUPAC	Estructura química	Peso Molecular	Abreviatura
(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metanona		248,08 g/mol	[SIM]Br
Bromuro de 3-hexil-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		412,10 g/mol	[SHIM]Br
Bromuro de -3-octil-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		440,13 g/mol	[SOIM]Br
Bromuro de 3-decil-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoil)-1 <i>H</i> -imidazolio		468,16 g/mol	[SDIM]Br

## **6.2 Cultivos bacterianos**

Las cepas bacterias utilizadas se mantuvieron congeladas en leche descremada al 20%, conservadas a -20 °C. Las cepas utilizadas fueron: *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606). Antes de comenzar con los ensayos, estas bacterias fueron sembradas en agar BHI e incubadas a 37 °C por 18 horas. Luego, se replicó una colonia en una nueva placa de BHI, incubándose de igual manera que las anteriores. Finalmente, se replicó una colonia de cada bacteria en un caldo BHI, incubándose a 37 °C por 18 horas para la activación metabólica de cada bacteria.

## **6.3 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en placa de 96 pocillos**

La actividad antimicrobiana de los LIs se evaluó mediante el ensayo de microdilución en placa de 96 pocillos, técnica adaptada de la metodología descrita por Eloff y colaboradores. (1998) (57). El inóculo bacteriano fue obtenido a partir de un caldo BHI, ajustado a una concentración final de 0,5 McFarland en caldo Mueller-Hinton. De este estándar se realizó una dilución 1/10, la cual fue utilizada para el ensayo. Los LI fueron solubilizados en suero fisiológico estéril, ajustando sus concentraciones a un volumen final de pocillo de 210 µl. A cada pocillo se le agregó 100 µl de caldo Mueller-Hinton y 100 µl de la solución de LI

correspondiente por duplicado. Las concentraciones de trabajo para los LIs fueron: 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM, 0,03125 mM y 0,01562 mM. A cada pocillo se le agregaron 10  $\mu$ l de la suspensión de 0,5 McFarland diluido 1/10. Además se incluyeron en cada placa controles de crecimiento bacteriano (control positivo) y control de medio de cultivo (control negativo). Las placas fueron incubadas por 18 horas a 37 °C en agitación continua. El crecimiento bacteriano se comprobó por medio de la adición de 20  $\mu$ l del indicador redox cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (5 mg/ml) en cada pocillo, revelando viabilidad bacteriana los pocillos que tomaran una coloración rojiza, mientras los incoloros demostraban una efectiva acción antimicrobiana por parte de los LIs.

#### **6.4 Determinación de la actividad antibiofilm**

La técnica para el ensayo para la determinación de la actividad antibiofilm fue adaptada de Coffey y Anderson (2014) (58) y aplicada previamente en LIs por Yankata y colaboradores (2012) (59). El inóculo bacteriano se obtuvo a partir de un caldo Mueller Hinton previamente ajustado a una concentración final, equivalente a un estándar 0,5 McFarland para cada bacteria. Los LIs fueron solubilizados en suero fisiológico estéril, y sus concentraciones fueron ajustadas a un volumen final de pocillo de 200  $\mu$ L. Las concentraciones usadas de LI fueron 1 mM, 0,1 mM y 0,01 mM. Se agregó a cada pocillo 200  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton de la suspensión de 0,5 McFarland de cada bacteria por duplicado. Se incluyó además controles de crecimiento bacteriano (control positivo). Las placas se incubaron durante 18 horas a 37 °C sin agitación. Luego del tiempo de incubación, se descartaron de los pocillos el inóculo bacteriano y se les agregó 200  $\mu$ l de cada LI, incubándose por 18 horas a 37 °C. Para revelar la formación de biofilm, luego de la incubación, se añadieron 20  $\mu$ l de solución de cristal violeta al 0,1% (pre-filtrada a través de

un filtro de 0,44  $\mu\text{m}$ ) a cada pocillo y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, los pocillos fueron lavados con suero fisiológico tres veces, dejando secar las placas durante 15 minutos, para posteriormente añadir 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 95% a cada pocillo teñido, permitiendo que la tinción se solubilice e incubándolas 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agitó por 10 segundos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, en el lector de placas Multiskan® GO.

## **6.5 Determinación de la viabilidad celular de células HaCaT frente a LIs**

### **6.5.1 Línea celular**

Las células HaCaT provienen de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente, mediante su incubación a una alta temperatura y una baja concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio de cultivo (60). Además, exhiben morfogénesis normal y expresan todos los marcadores de superficie principales y las actividades funcionales un queratinocito humano aislado, manteniendo una adecuada síntesis de queratina (61, 62). Crecen en monocapa y de forma poligonal., incluso después de más de 300 pases (63, 64).

### **6.5.2 Cultivo celular**

Las células HaCaT fueron cultivadas en medio *DMEM – H* (*Dulbecco's modified Eagle's médium - High Glucose*) suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1%, Gibco) y con suero fetal bovino al 10%, en placas de poliestireno de cultivo celular. Para el crecimiento de las células, se incubaron las placas en una estufa de cultivo celular a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, monitorizando periódicamente la confluencia celular. Cada 3 días aproximadamente, o cuando se obtuviera una confluencia entre 80 a 90%, se resembró en una nueva placa estéril, retirando primeramente el medio de la primera placa luego de la incubación, luego se lavó tres veces sucesivas con PBS estéril y, finalmente, después de retirar el PBS, se le agregaron 700 µl de tripsina al 0,25%, incubando esto por 10 minutos a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Posterior a ello, se agregaron 2 ml del medio *DMEM – H* con 10% de suero fetal bovino para inactivar la tripsina, se homogenizó y se traspasó a la nueva placa, completando con 10 ml del mismo medio de cultivo celular, incubando dicha placa a las mismas condiciones previamente señaladas.

### **6.5.3 Determinación de la viabilidad celular frente a LIs**

Los LIs utilizados en este ensayo fueron seleccionados posterior a la determinación de la CMI. Estos se disolvieron en PBS estéril y se conservaron a 4 °C hasta su utilización. Para este ensayo se utilizó el Kit MTT Cell Proliferation Assay (Cayman Chemical), trabajando las células en microplaca estéril de 96 pocillos. Primeramente, luego de que la placa con



células HaCaT tuvieran una confluencia entre 80 a 90%, se comenzó con el ensayo, traspasando  $2 \times 10^5$  células/ml en cada pocillo de la microplaca con medio *DMEM – H* con 10% de suero fetal bovino, por duplicado (adaptado de Zanoni y colaboradores (2019) (65)). Se incluyeron pocillos controles de crecimiento celular y otros sólo con medio de cultivo (blanco), incubándose a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad por 24 horas. Luego, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se cambió por *DMEM – H* con suero fetal bovino al 10%, agregándose los LIs a estudiar (luego de la determinación de la CMI) y se incubó en las mismas condiciones anteriores por 24 horas. Posterior a ello, se descartaron 50 µl de cada pocillo de la microplaca y se agregaron 5 µl de MTT 250 mM, incubándose bajo las mismas condiciones anteriores por 4 horas, para luego añadir 50 µl de solución disolvente de cristales (Cayman Chemical) y se incubaron entre 4 a 18 horas bajo mismas condiciones anteriores. Finalmente, se realizó la lectura a 570 nm, previa agitación de 10 segundos, en el lector de placas Multiskan® GO. Los resultados para este ensayo fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

## 6.6 Análisis estadístico

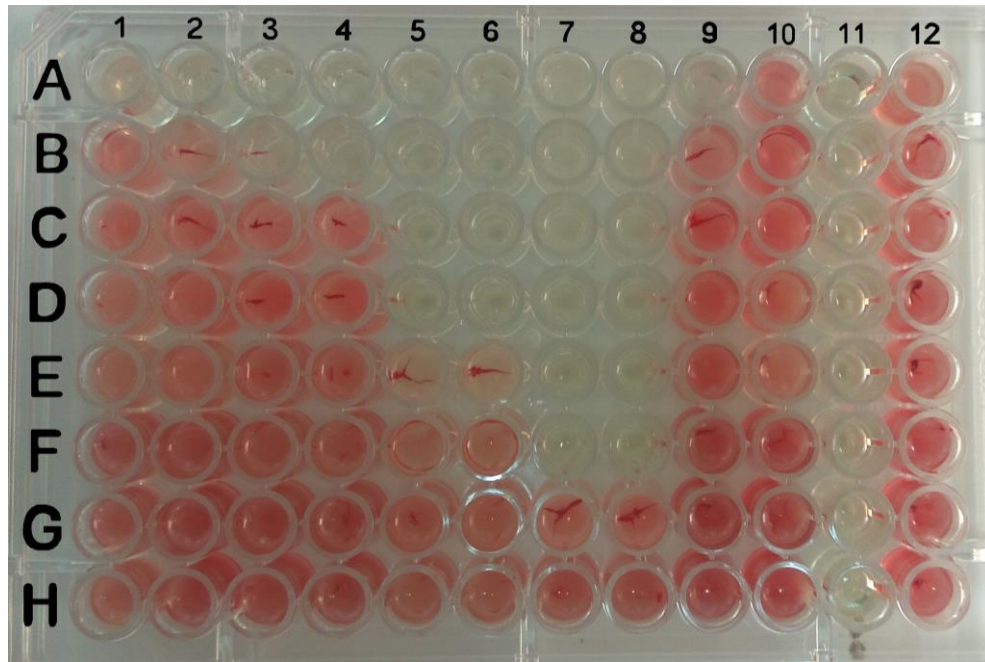
Los datos obtenidos para el análisis de la actividad antibiofilm de los LIs se obtuvieron por duplicado, determinando media aritmética y desviación estándar, además del porcentaje de actividad. Se utilizó el sistema *GraphPad Prism 6.0* y se procedió a graficar. Se utilizó One-Way ANOVA con Post Test Tukey para comparación de variables y, considerando datos estadísticamente significativos con un valor  $p \leq 0,05$ .

Para los datos obtenidos en la determinación de la viabilidad celular en células HaCaT frente a LIs, por duplicado y luego de tres ensayos independientes (N 3), se determinó  $EC_{50}$  a partir de las concentraciones utilizadas y el porcentaje de viabilidad celular, normalizado en base al control de crecimiento celular (control positivo).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en placa de 96 pocillos**

La CMI reportada corresponde a la última dilución que no evidenció viabilidad bacteriana (Tabla 5 y 6). Esto queda en evidencia por medio de la aplicación del indicador redox cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio, observándose una coloración rojiza en los pocillos donde había viabilidad bacteriana y los que no tenían dicha coloración, el crecimiento y la acción bacteriana había sido inhibida. En la Figura 6 se ejemplifica de mejor manera lo antes señalado. Los pocillos fueron cargados de izquierda a derecha con LIs, dejando siempre en cada placa que se utilizara controles negativos y positivos, los cuales están a la derecha de la placa (carril 11 y 12, desde A hasta H).



**Figura 6.** Placa de 96 pocillos para la determinación de la CMI. Se aprecian las barras negras que señalan la última dilución donde no hubo viabilidad bacteriana. Además, se puede observar el control negativo (carril 11, desde A hasta H en vertical) y el control positivo (carril 12, desde A hasta H en vertical).

Frente a los precursores de cada derivado sintetizado, como lo son [BIM]Br, [VIM]Br, [PIM]Br y [SIM]Br, se observó que presentan una muy baja actividad antimicrobiana frente a ninguna de las bacterias estudiadas, resultando CMI en el límite o la mitad de la concentración inicial, en algunos casos más altas que las diluciones empleadas

En *Streptococcus pyogenes* se observó en los derivados de ácido benzoico ([BHIM]Br, [BOIM]Br y [BDIM]Br) que, a medida que la cadena hidrocarbonada aumenta de 6 carbonos

a 8 o 10 carbonos, la CMI disminuye considerablemente, siendo compleja su interpretación, puesto que refleja una CMI menor a la dilución realizada. Este resultado es idéntico en los derivados de ácido protocatecuico ([PHIM]Br, [POIM]Br y [PDIM]Br), siguiendo la tendencia de que el aumento de la cadena hidrocarbonada disminuye la CMI. Sin embargo, en los derivados de ácido vanílico ([VHIM]Br, [VOIM]Br y [VDIM]Br), si bien al aumentar la cadena desde el precursor en 6 y 8 átomos de carbono, la actividad antimicrobiana aumenta considerablemente, disminuyendo la CMI, la molécula con 10 átomos de carbono no responde a este patrón y aumenta de forma considerable el resultado de la CMI, en contraste a las molécula de 6 y 8 carbonos. Lo descrito también ocurre con los derivados del ácido siríngico ([SHIM]Br, [SOIM]Br y [SDIM]Br), cuyos valores de CMI se ven aumentados.

Frente a *Pseudomonas aeruginosa* se observó que [BDIM]Br tiene un mejor efecto antimicrobiano que el resto de LIs de menor cadena hidrocarbonada. Frente a los derivados de ácido vanílico ocurre un efecto contrario al que presenta [BDIM]Br, puesto que [VOIM]Br es el que presenta una mejor actividad antimicrobiana, siendo este compuesto el que presenta mejor acción frente a este patógeno y no así [VDIM]Br, que posee una CMI mucho mayor. En los demás derivados, tanto de ácido, protocatecuico como siríngico no hay una actividad antimicrobiana frente a este patógeno relevante, teniendo CMI altas.

Se pudo observar que *Staphylococcus epidermidis* es susceptible a todos los LIs de diferentes largos de cadenas, teniendo la correlación, en la mayoría de los casos, de una mejor actividad antimicrobiana asociada a un largo de cadena, de forma directamente proporcional. Sin embargo, la variación de grupos funcionales presentes en los LIs permite variar la CMI, haciéndola de valores un poco más altos, ocurriendo con [VDIM]Br y [SDIM]Br.

Frente a *Staphylococcus aureus*, se observó que los derivados de ácido benzoico y siríngico presentan una baja CMI, relacionando esta actividad antimicrobiana elevada con la cantidad de carbonos en la cadena alquílica que presentan en su estructura. Al igual que frente a *Staphylococcus epidermidis*, [VDIM]Br y [SDIM]Br mejoran la actividad antimicrobiana, aumentando la CMI a valores de mejor cuantificación.

Frente a *Escherichia coli* se observó que existe acción antimicrobiana alta, presentando CMI bajas en los derivados que presentan una cadena hidrocarbonada de mayor longitud, siendo creciente dicha actividad a medida que aumentan de 6 a 8 o 10 carbonos en [BIM]Br y [PIM]Br. Tanto en [VHIM]Br, [VOIM]Br, [SHIM]Br y [SOIM]Br la actividad antimicrobiana es muy alta, reflejándose en la CMI, sin embargo, la molécula [VDIM]Br y [SDIM]Br aumenta la CMI a una dilución mucho mayor.

Finalmente, se observó que frente a *Acinetobacter baumannii*, la acción antimicrobiana por parte de algunos de los LIs aumenta conforme a que la cadena hidrocarbonada va aumentando de tamaño, llegando a concentraciones de CMI muy bajas en los LI de 10 átomos de carbono como [BDIM]Br y [PDIM]Br, siendo en este último la CMI de igual valor con [POIM]Br. Por otra parte, [SDIM]Br tiene una menor actividad antimicrobiana que [SOIM]Br, aumentando la CMI, tal como ocurre con [VDIM]Br que aumenta considerablemente la CMI, comparándolo con [VOIM]Br.

**Tabla 5.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los LIs derivados del ácido benzoico y ácido vanílico.

Moléculas	<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>A. baumannii</i> (ATCC 19606)
	mM					
[BIM]Br	2	2	> 2	> 2	> 2	> 2
[BHIM]Br	0,25	2	0,125	0,25	0,5	0,5
[BOIM]Br	<0,01562	0,25	<0,01562	<0,01562	0,03125	0,0625
[BDIM]Br	<0,01562	0,0625	<0,01562	<0,01562	<0,01562	<0,01562
[VIM]Br	2	> 2	>2	> 2	> 2	> 2
[VHIM]Br	<0,01562	0,25	<0,01562	<0,01562	<0,01562	0,0625
[VOIM]Br	<0,01562	0,03125	<0,01562	<0,01562	<0,01562	<0,01562
[VDIM]Br	0,125	1	0,0625	0,25	0,5	1

**Tabla 6.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los LIs derivados del ácido protocatecuico y ácido siríngico.

Moléculas	<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>A. baumannii</i> (ATCC 19606)
	mM					
[PIM]Br	1	2	> 2	> 2	> 2	> 2
[PHIM]Br	0,25	1	0,25	0,5	1	0,5
[POIM]Br	<0,01562	0,5	<0,01562	<0,01562	0,03125	0,0625
[PDIM]Br	<0,01562	0,5	<0,01562	<0,01562	0,03125	0,0625
[SIM]Br	1	1	2	> 2	> 2	2
[SHIM]Br	<0,01562	0,5	<0,01562	<0,01562	0,125	0,125
[SOIM]Br	<0,01562	0,25	<0,01562	<0,01562	<0,01562	0,0625
[SDIM]Br	0,0625	1	0,125	0,25	0,25	0,5



## 7.2 Determinación de la actividad antibiofilm

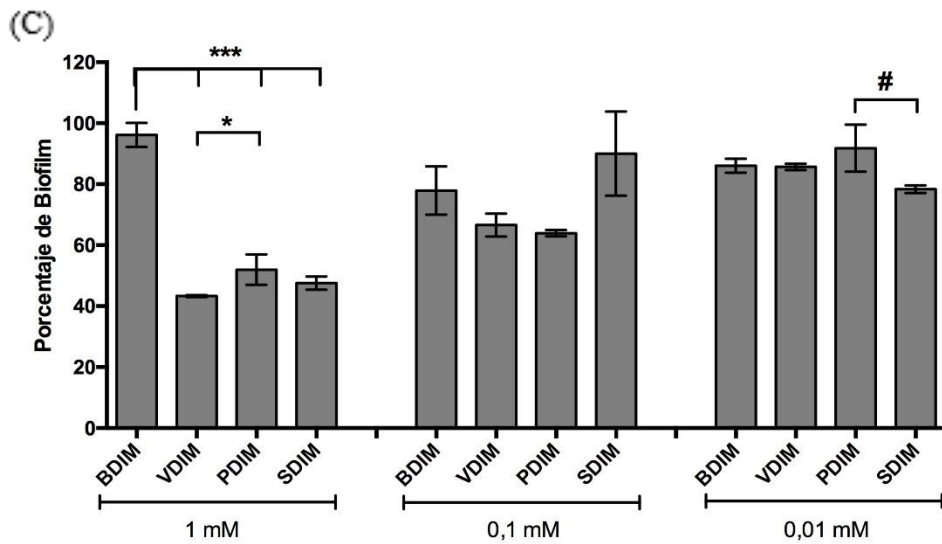
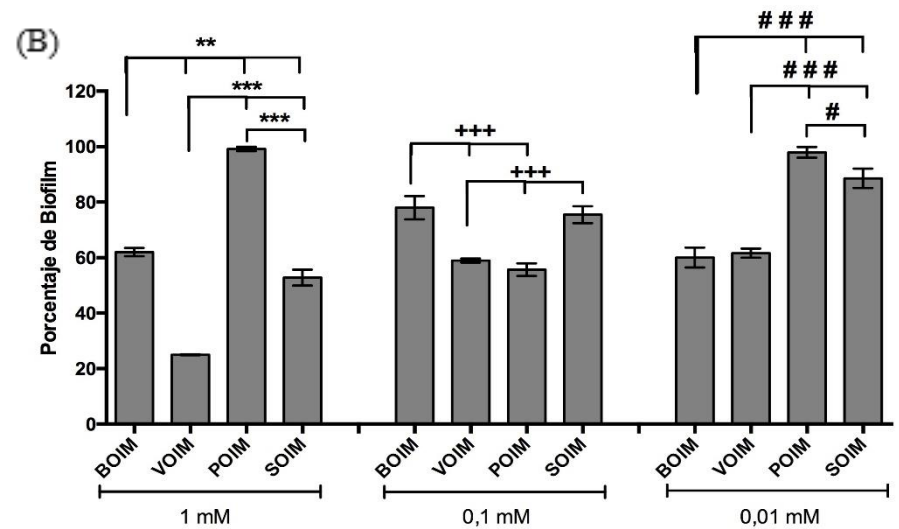
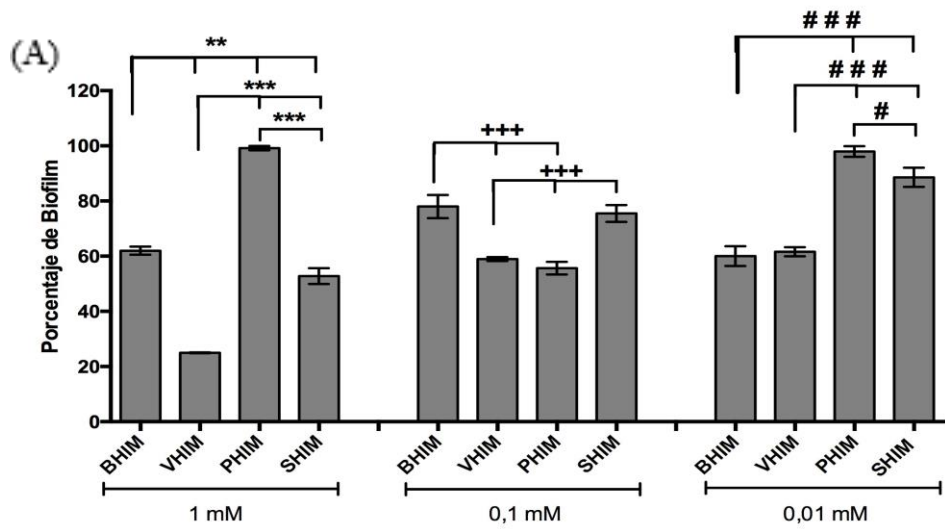
Debido a que los precursores [BIM]Br, [VIM]Br, [PIM]Br y [SIM]Br no presentan una actividad antimicrobiana importante frente a los patógenos estudiados y, dado que existen diferencias entre el largo de la cadena hidrocarbonada y el grupo funcional frente a la actividad antimicrobiana y la consecuente CMI, se utilizaron 12 de los 16 LIs para realizar la evaluación de la actividad antibiofilm, descartando los precursores nombrados con el fin de caracterizar de mejor manera los LIs frente a dicha actividad.

En las siguientes figuras se presenta la actividad antibiofilm de los LIs antes señalados, comparados por el largo de cadena hidrocarbonada de 6, 8 y 10 átomos de carbono, además de comparar la actividad entre las series de LIs de acuerdo al derivado de ácido benzoico.

En la figura 7, para *S. pyogenes*, la actividad antibiofilm de los LIs con 6 átomos de carbono (A), se observa que, a una concentración de 1 mM, [VHIM]Br tiene una mayor diferencia significativa frente a [PHIM]Br y [SHIM]Br ( $p \leq 0,001$ ), y este último frente a [PHIM]Br ( $p \leq 0,001$ ). A una concentración de 0,1 mM de LI, la tendencia se repite, habiendo diferencia significativa [VHIM]Br frente a [SHIM]Br ( $p \leq 0,001$ ). Finalmente, para una concentración de 0,01 mM, la diferencia significativa es más marcada gráficamente entre [VHIM]Br frente a [SHIM]Br y frente a [PHIM]Br, además [BHIM]Br tiene diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) frente a estos últimos dos LIs.

En (B), las mayores diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) se acentúan entre [VOIM]Br y [SOIM]Br frente a [POIM] a una concentración de 1 mM. Para una concentración de 0,1 mM, la actividad antibiofilm disminuyó por parte de [VOIM]Br y [SOIM]Br, habiendo diferencias significativas frente a [POIM]Br ( $p \leq 0,001$ ), aumentando esta la actividad antibiofilm. A 0,01 mM solo se observan diferencias significativas entre [VOIM]Br y [BOIM]Br frente a los demás LIs ( $p \leq 0,001$ ).

En (C), a una concentración de 1 mM, hay diferencias significativas entre los cuatro LI ( $p \leq 0,001$ ), siendo más relevante la diferencia entre [VDIM]Br frente a [PDIM]Br ( $p \leq 0,05$ ) por disminuir el porcentaje de biofilm, teniendo este una menor actividad que el anterior. A una concentración de 0,1 mM no se observan diferencias significativas entre los cuatro LIs y poco relevantes a 0,01 mM.

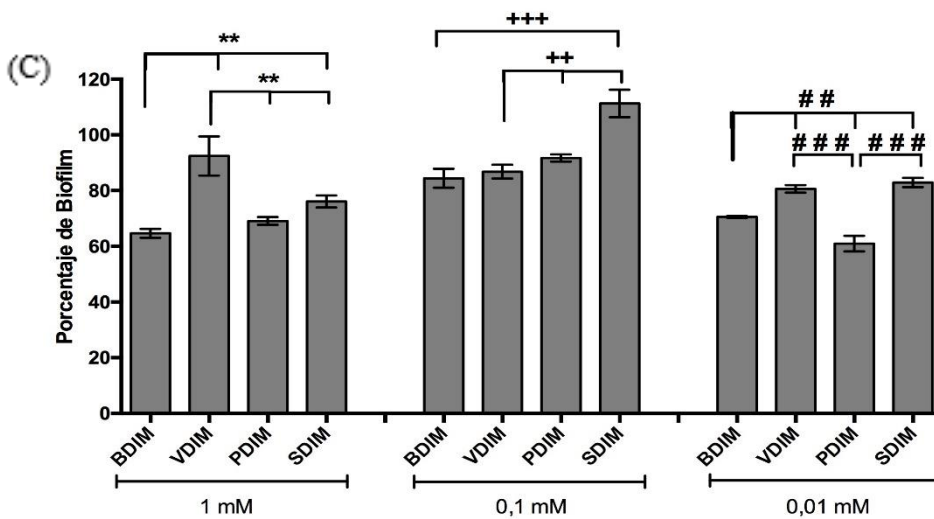
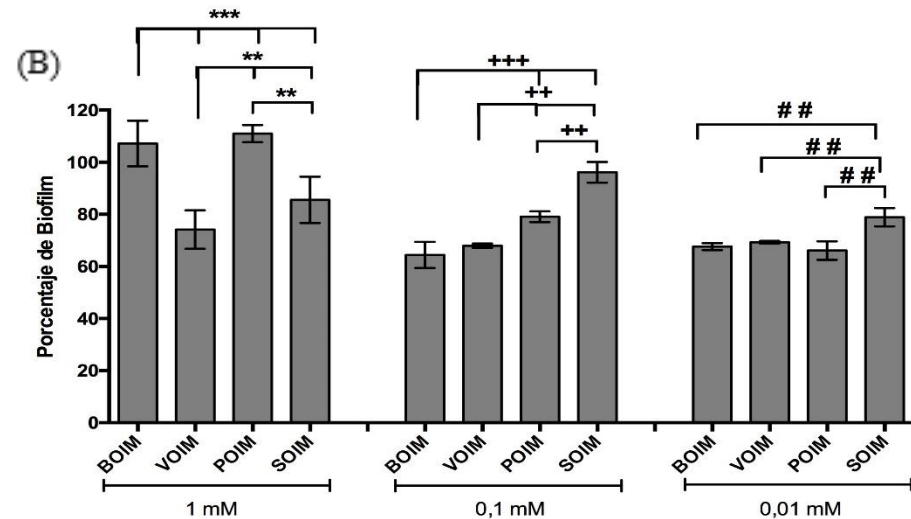
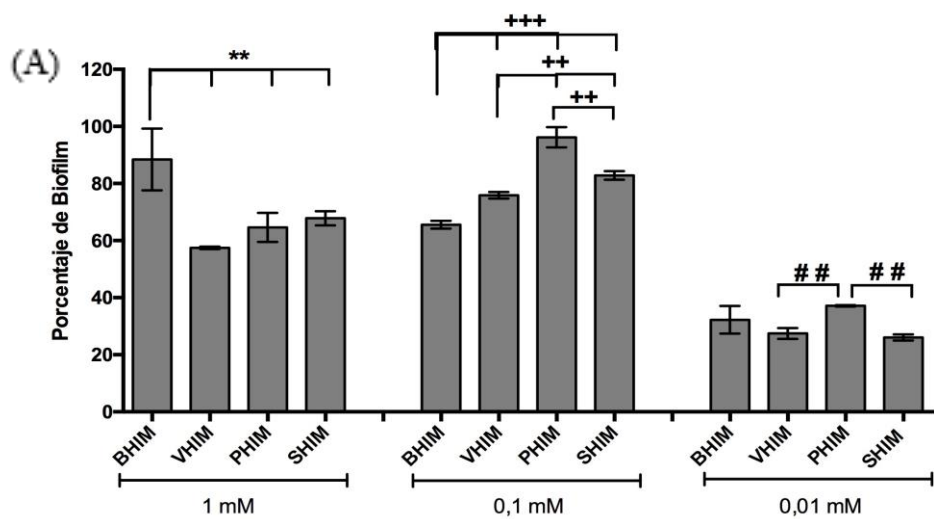


**Figura 7.** Actividad antibiofilm de los LIs frente a *S. pyogenes*. (A) representa a los LIs con cadenas de 6 carbonos, (B) a los LIs con cadenas de 8 carbonos y (C) a los LIs con cadenas de 10 carbonos. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; +  $p \leq 0,05$ ; +  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ . #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$

Para la figura 8, al comparar en (A) a una concentración de 1 mM, existe diferencia significativa de [BHIM]Br frente a los otros LIs ( $p \leq 0,01$ ). A una concentración de 0,1 mM, existe diferencia significativa nuevamente de [BHIM]Br frente a los demás LIs ( $p \leq 0,001$ ), disminuyendo aún más el porcentaje de biofilm. A 0,01 mM, la actividad de los LIs aumenta considerablemente en contraste a las demás concentraciones utilizadas, habiendo diferencia significativa entre [VHIM]Br y [PHIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), como este último frente a [SHIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), demostrando mejor actividad [VHIM]Br y [SHIM]Br a esta concentración frente a las demás series de LIs.

En (B), a 1 mM, se observan diferencias significativas en todos los LIs, teniendo menor actividad [BOIM]Br frente a los demás ( $p \leq 0,001$ ), siendo más destacables la diferencia significativa de [VOIM]Br frente a [POIM]Br y frente a [SOIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), habiendo una mayor actividad antibiofilm con [VOIM]Br. A una concentración de 0,1 mM hay notable diferencia significativa entre [BOIM]Br frente a [POIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,001$ ), aumentando su actividad, además no hay diferencia significativa entre [BOIM]Br y [VOIM]Br. A 0,01 mM, [BOIM]Br, [VOIM]Br y [POIM]Br no exhiben diferencia entre ellos, pero si hay diferencia significativa de cada uno frente a [SOIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), siendo este último el de menor actividad antibiofilm a esta concentración.

Para (C), a 1 mM la diferencia significativa resalta entre [BDIM]Br frente a [VDIM]Br y [SDIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), presentando la mejor actividad. A 0,1 mM, si bien la actividad disminuye, la diferencia significativa resalta en [BDIM]Br frente a [SDIM]Br ( $p \leq 0,01$ ). A una concentración de 0,01 mM, la actividad mejora frente a las concentraciones usadas anteriormente en (C), siendo [PDIM]Br la que posee mejor actividad, teniendo diferencias significativas frente a [VDIM]Br y [SDIM]Br ( $p \leq 0,001$ ).

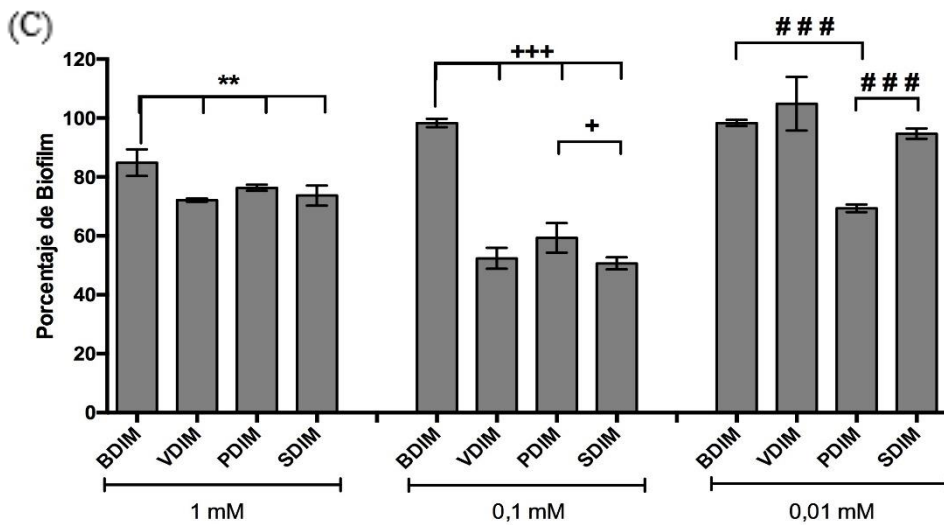
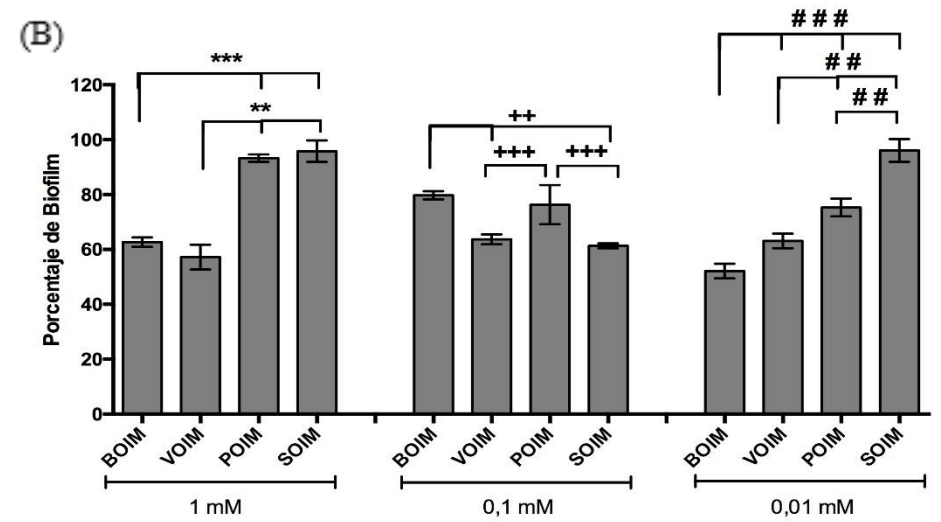
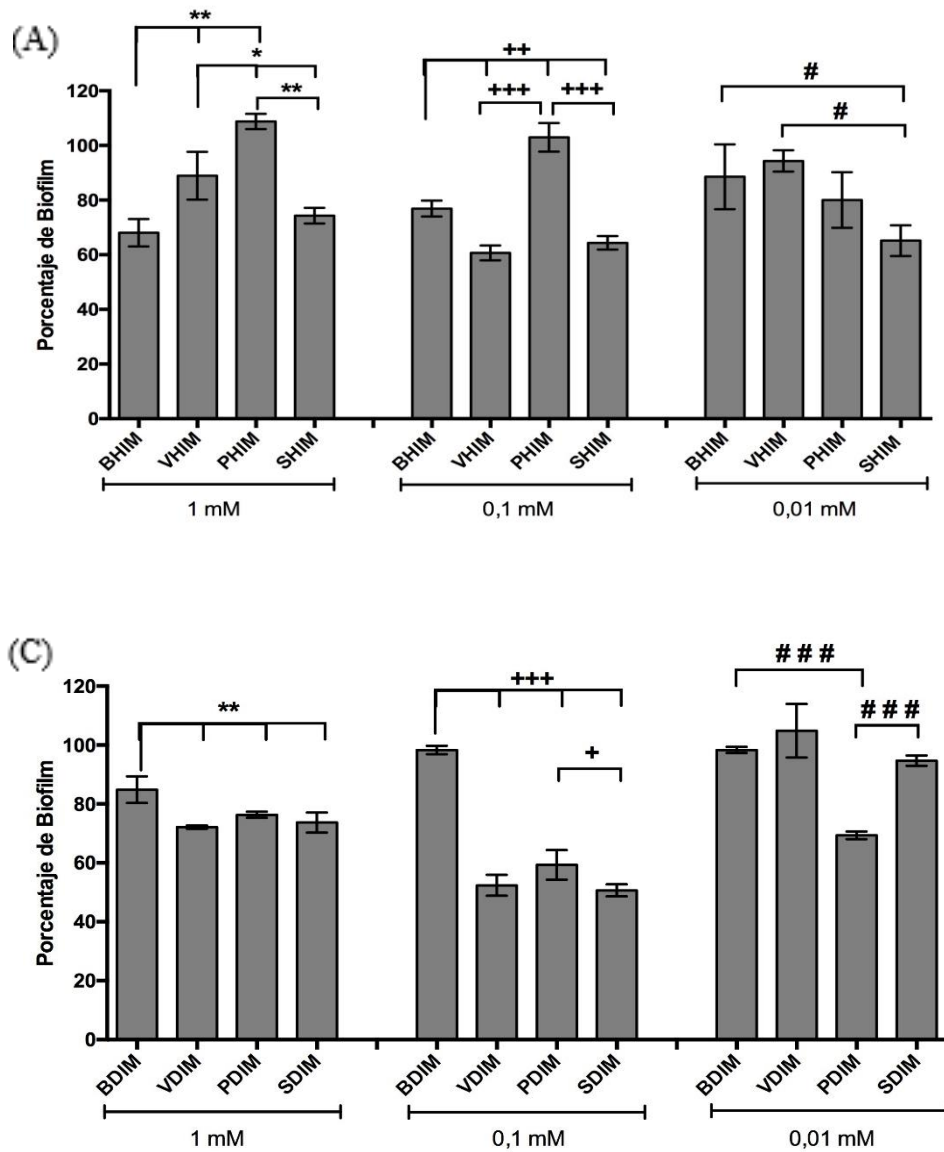


**Figura 8.** Actividad antibiofilm de los LIs frente a *P. aeruginosa*. (A) representa a los LIs con cadenas de 6 carbonos, (B) a los LIs con cadenas de 8 carbonos y (C) a los LIs con cadenas de 10 carbonos. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ . #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$

En la figura 9, la actividad antibiofilm para *S. epidermidis* en (A), se observa que existe mayor actividad en [BHIM]Br frente a [VHIM]Br y [PHIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), como en [SHIM]Br frente a [PHIM]Br ( $p \leq 0,01$ ). A 0,1 mM, si bien [BHIM]Br tiene diferencias significativas frente a los demás LIs ( $p \leq 0,01$ ), es mayormente destacable la actividad de [VHIM]Br y [SHIM]Br frente a [PHIM]Br, siendo significativa dicha diferencia ( $p \leq 0,001$ ). Al usar una concentración de 0,01 mM, este efecto no es similar, puesto que existe diferencias significativas entre [VHIM]Br y [SHIM]Br ( $p \leq 0,05$ ), siendo este último con una mayor actividad.

En (B), con 1 mM existen diferencias significativas de [BOIM]Br frente a [POIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,001$ ), sin embargo, es [VOIM]Br quien exhibe mayor actividad, teniendo diferencias significativas frente a [SOIM]Br y [POIM]Br ( $p \leq 0,01$ ). A 0,1 mM las diferencias significativas resaltan en [POIM]Br frente a [VOIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,001$ ), siendo estos últimos los que poseen menor actividad. Sin embargo, a 0,01 mM, es [BOIM] quien presenta la mayor actividad y también la mayor diferencia significativa frente a los demás LIs utilizados ( $p \leq 0,001$ ).

En (C), a 1 mM, es [BDIM]Br quien presenta diferencias significativas frente a los demás LIs ( $p \leq 0,01$ ), presentando la menor actividad. Esto ocurre de igual forma a 0,1 mM, disminuyendo aún más la actividad, sin embargo, [SDIM]Br presenta diferencia significativa frente a [PDIM] ( $p \leq 0,05$ ). Finalmente, a 0,01 mM, la actividad es dispar, puesto que las actividades de todos los LIs disminuyen en contraste a todos descritos para esta bacteria, teniendo diferencias [BDIM]Br con [PDIM]Br, como este último con [SDIM]Br ( $p \leq 0,001$ ).



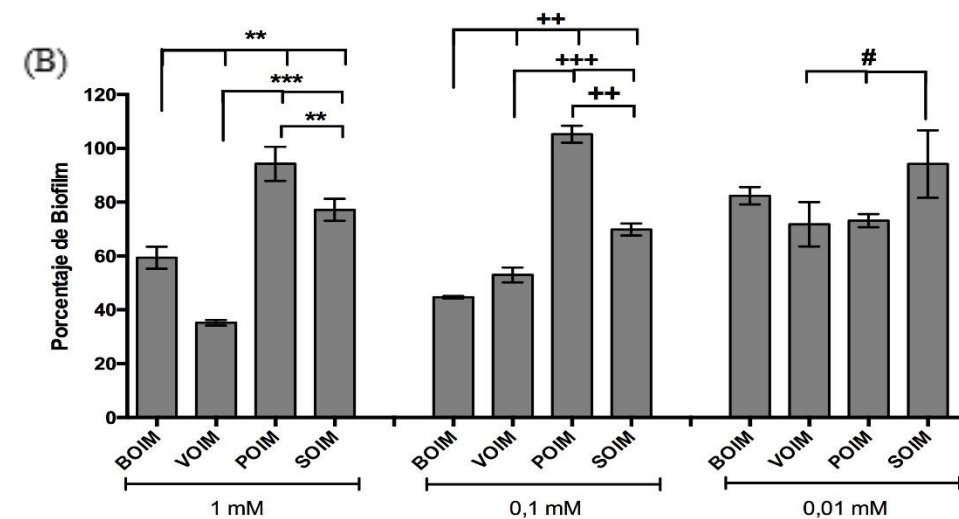
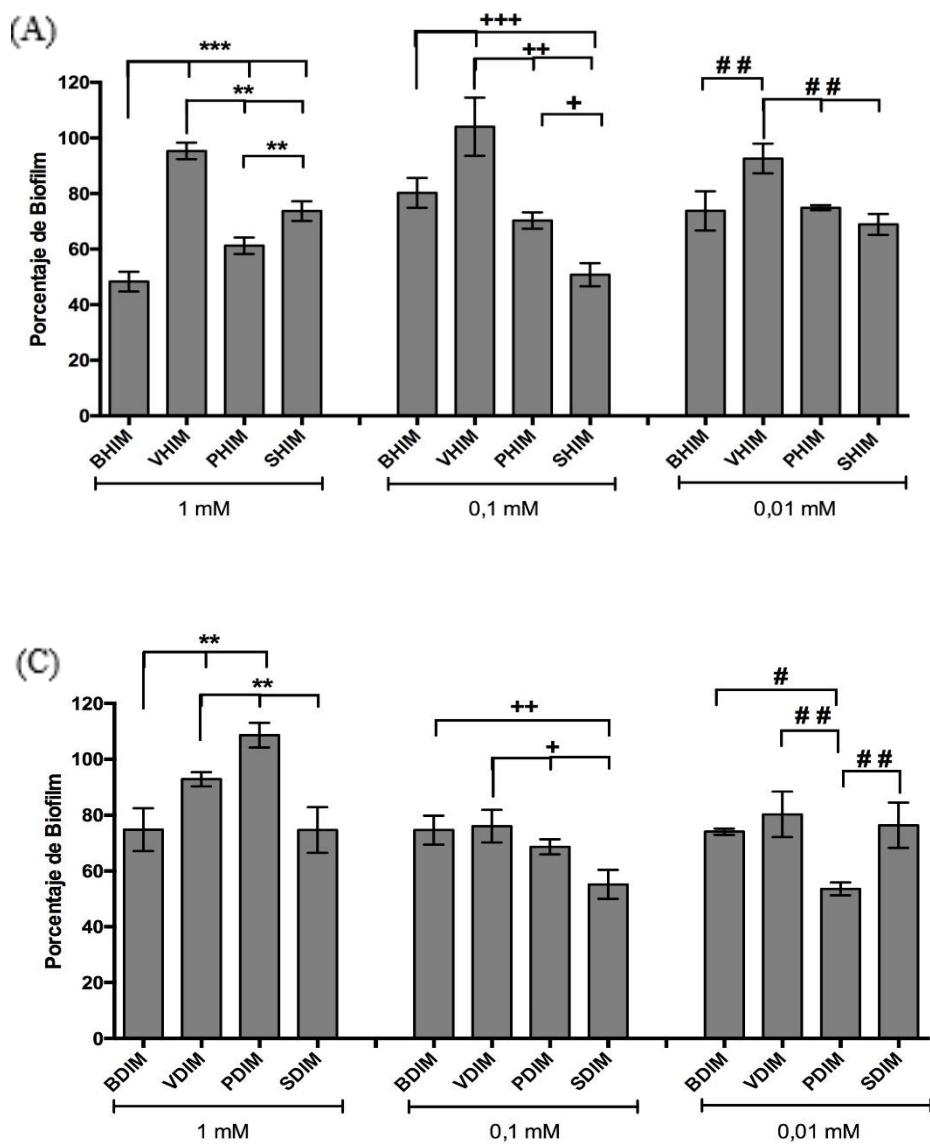
**Figura 9.** Actividad antibiofilm de los LIs frente a *S. epidermidis*. (A) representa a los LIs con cadenas de 6 carbonos, (B) a los LIs con cadenas de 8 carbonos y (C) a los LIs con cadenas de 10 carbonos. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; +  $p \leq 0,05$ ; +  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ . #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$

Frente a *S. aureus* en la figura 10, en (A), a una concentración de 1 mM, el resultado más significativo se observa en [BHIM]Br frente a los demás LIs ( $p \leq 0,001$ ). A 0,1 mM no ocurre lo mismo que lo anterior, puesto que si existe diferencias significativas de [BHIM]Br frente a los demás LIs ( $p \leq 0,001$ ), sin embargo, la menor actividad la presenta [SHIM]Br. A 0,01 mM, [VHIM]Br presenta diferencias significativas frente a [BHIM]Br y [SHIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), pero son estos últimos con mejor actividad.

En (B), a 1 mM, lo más relevante es la actividad que posee [VOIM]Br, la cual es más alta que en los otros LIs independiente de la cantidad de carbonos, mostrando diferencias significativas ante [POIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,001$ ). A 0,1 mM este resultado se ve alterado, puesto que disminuye su actividad pero manteniendo la diferencia significativa frente a los mismos LIs, pero [BOIM]Br presenta aumento de actividad, mostrando diferencias significativas frente a los demás LIs ( $p \leq 0,01$ ). Con 0,01 mM solo hay diferencias significativas de [SOIM]Br frente a [VOIM]Br ( $p \leq 0,05$ ), no siendo relevantes puesto que presentan menor actividad a esta concentración para todos los LIs.

En (C), es [BDIM]Br quien presenta mejor actividad con la consecuente diferencia significativa frente a [VDIM]Br y [PDIM]Br ( $p \leq 0,01$ ). A una concentración de 0,1 mM, [BDIM]Br posee diferencia significativa frente a [SDIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), presentando este último mejor actividad que el primero. En 0,01 mM, la actividad varía, disminuyendo la actividad en [SDIM]Br y aumentando en [PDIM]Br, donde existe diferencia significativa ( $p \leq 0,01$ ).



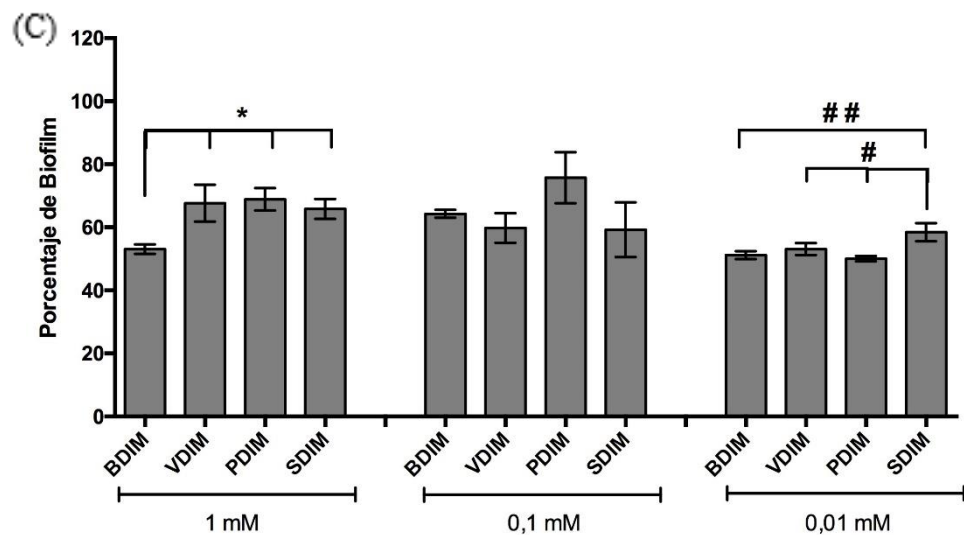
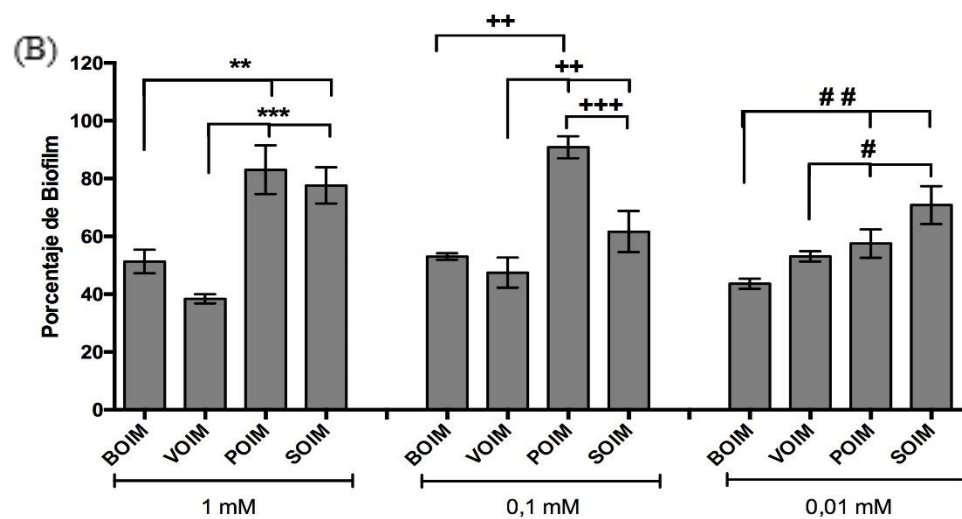
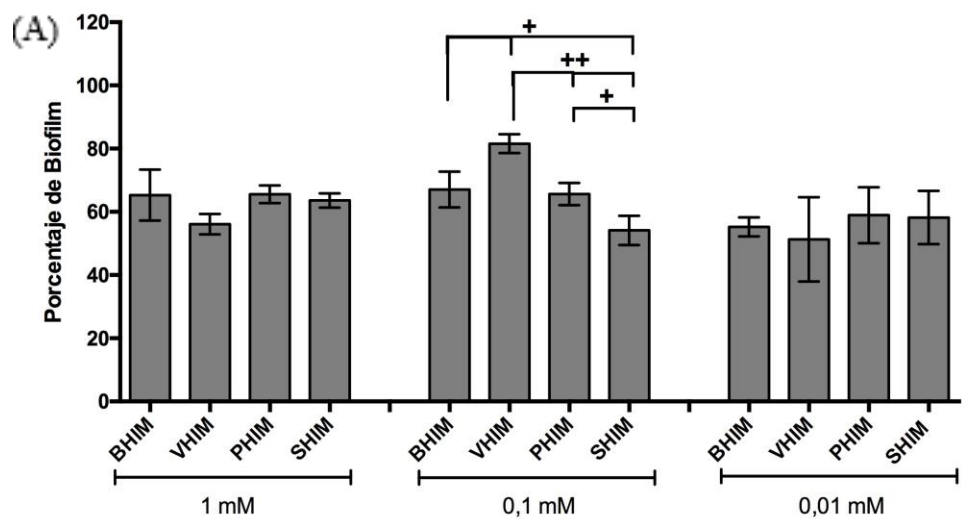


**Figura 10.** Actividad antibiofilm de los LIs frente a para *S. aureus*. (A) representa a los LIs con cadenas de 6 carbonos, (B) a los LIs con cadenas de 8 carbonos y (C) a los LIs con cadenas de 10 carbonos. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ . #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$

En la figura 11, para la actividad de los LIs frente a *E. coli*, en (A), a una concentración de 1 mM, no existen diferencias significativas en las series de LIs. Con 0,1 mM, la diferencia estadística más destacable es [VHIM]Br frente a [SHIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), donde este último presenta mejor actividad. A 0,01 mM no se observa diferencia estadísticamente significativa frente entre los LIs.

En (B) a 1 mM, la diferencia significativa más importante es [VOIM]Br frente a [POIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,001$ ), donde presenta mejora la actividad antibiofilm de mejor forma que el resto de los LIs, independiente de la cantidad de carbonos. A 0,1 mM esta actividad disminuye levemente pero sigue siendo significativa la diferencia frente a [POIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,01$ ). Con 0,01 mM de LI usado, la diferencia de actividad se acorta, disminuyendo aún más para [VOIM]Br frente a [POIM]Br y [SOIM]Br habiendo, sin embargo, diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ). Donde la actividad mejora es en [BOIM]Br frente a [POIM]Br y [SOIM]Br, mostrando significancia estadística ( $p \leq 0,01$ ).

En (C), solo muestra diferencia significativa [BDIM]Br ( $p \leq 0,05$ ) frente a los demás LIs a una concentración de 1 mM. Usando una concentración de 0,1 mM, no existe diferencia significativa entre los LIs. Con 0,01 mM, existe diferencia significativa entre [BDIM]Br y [SDIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), mostrando el primero mejor actividad antibiofilm, a su vez, [SDIM]Br presenta diferencia significativa menor frente a [VDIM]Br ( $p \leq 0,05$ ), teniendo este último una actividad gráficamente similar con [BDIM]Br.

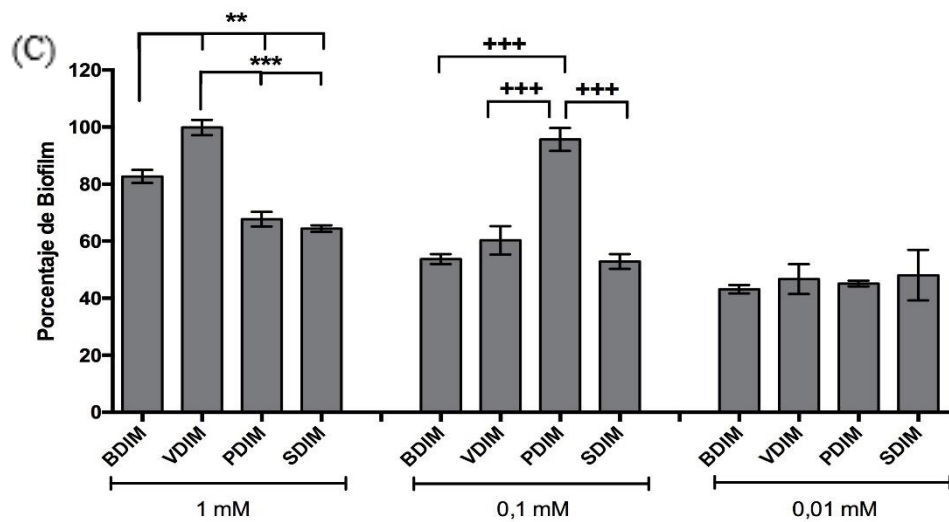
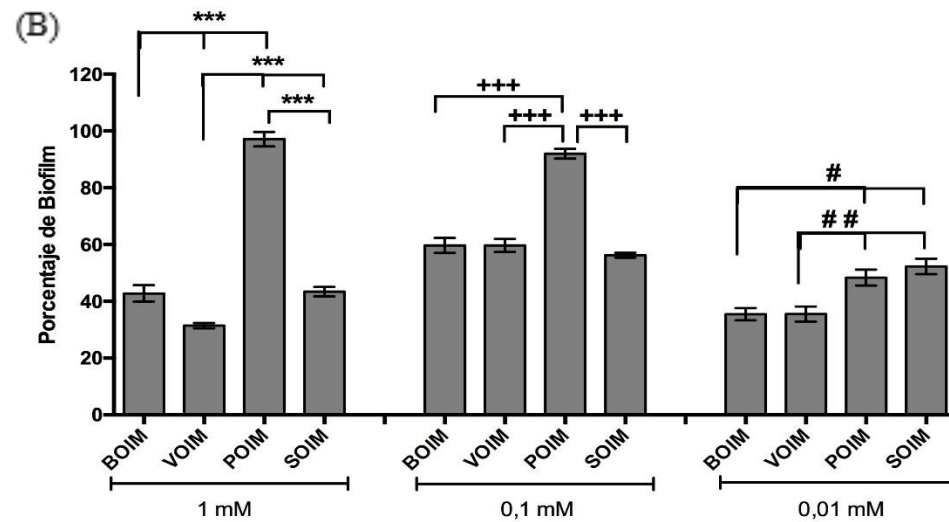
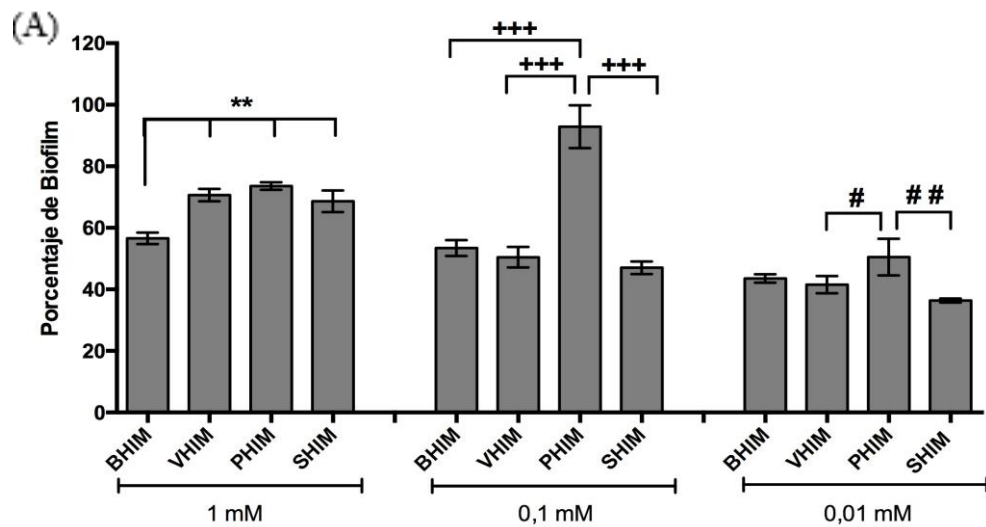


**Figura 11.** Actividad antibiofilm de los LIs frente a *E. coli*. (A) representa a los LIs con cadenas de 6 carbonos, (B) a los LIs con cadenas de 8 carbonos y (C) a los LIs con cadenas de 10 carbonos. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ . #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$

Finalmente, para la figura 12, en (A), usando 1 mM de concentración de LI, existe diferencia estadística por parte de [BHIM]Br frente a los demás LIs ( $p \leq 0,01$ ). Usando como concentración 0,1 mM, [PHIM]Br exhibe diferencia estadísticamente significativa frente a los demás LIs ( $p \leq 0,001$ ), presentando para este caso una menor actividad que los demás. La tendencia anterior se mantiene al usar una concentración de 0,01 mM, puesto que [PHIM]Br presenta diferencia significativa frente a [SHIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), siendo para esta serie particular de 6 carbonos la actividad más alta antibiofilm.

En (B), a 1 mM, [VOIM]Br presenta diferencia significativa frente a [POIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), siendo este resultado el más relevante para la actividad antibiofilm de los LIs frente a *A. baumannii*, puesto que es de mayor actividad independiente de la cantidad de carbonos de la cadena alquílica. Al utilizar 0,1 mM, [POIM]Br posee diferencia significativa frente a los demás ( $p \leq 0,001$ ), presentando mayor actividad que estos. Al disminuir la concentración a 0,01 mM, persiste la diferencia significativa de [VOIM]Br frente a [POIM]Br y [SOIM]Br ( $p \leq 0,01$ ), teniendo mejor actividad antibiofilm, pero no homologándose a la de concentración de 1 mM.

Por último, en (C), utilizando 1 mM, se observa diferencia significativa de [VDIM]Br frente a [PDIM]Br y [SDIM]Br ( $p \leq 0,001$ ), teniendo [VDIM]Br una actividad prácticamente nula (muy cercana al 100% de biofilm). Al utilizar 0,1 mM de concentración, es [PDIM]Br quien exhibe menor actividad antibiofilm, teniendo diferencias significativas frente a los demás LIs ( $p \leq 0,001$ ). Por otra parte, al utilizar 0,01 mM de concentración de LI, las actividades antibiofilm por parte de los compuestos es similar, no observándose diferencia significativa.



**Figura 12.** Actividad antibiofilm de los LIs frente a *A. baumannii*. (A) representa a los LIs con cadenas de 6 carbonos, (B) a los LIs con cadenas de 8 carbonos y (C) a los LIs con cadenas de 10 carbonos. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; +  $p \leq 0,05$ ; +  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ . #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$

### **7.3 Determinación de la viabilidad celular de células HaCaT frente a LIs**

Luego de obtenida la CMI para los LIs (Tablas 5 y 6), se determinó la viabilidad celular en células HaCaT frente a los LIs [BDIM], [VOIM], [PDIM] y [SOIM] a 3 concentraciones distintas: a la CMI del LI, al doble de la CMI y a la mitad de la CMI. Por fines metodológicos, las concentraciones utilizadas para este ensayo fueron ajustadas, de acuerdo a lo detallado en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Determinación de la viabilidad celular de los LIs frente a células HaCaT expresado en EC<sub>50</sub>.

Molécula	Estructura	CMI	EC <sub>50</sub>
[BDIM]	<p>Chemical structure of BDIM (4): A benzimidazolium cation with a decyl chain on the nitrogen and a bromide counterion, attached to a benzoyl group. The number 4 is written below the structure.</p>	0,016 mM	>0,032 mM
[VOIM]	<p>Chemical structure of VOIM (8): A benzimidazolium cation with a decyl chain on the nitrogen and a bromide counterion, attached to a 3-methoxy-4-hydroxybenzoyl group. The number 8 is written below the structure.</p>	0,016 mM	0,0224 mM
[PDIM]	<p>Chemical structure of PDIM (12): A benzimidazolium cation with a decyl chain on the nitrogen and a bromide counterion, attached to a 3,4-dihydroxybenzoyl group. The number 12 is written below the structure.</p>	0,016 mM	>0,032 mM
[SOIM]	<p>Chemical structure of SOIM (15): A benzimidazolium cation with a decyl chain on the nitrogen and a bromide counterion, attached to a 3,4,5-trimethoxybenzoyl group. The number 15 is written below the structure.</p>	0,016 mM	0,0173 mM

## 8. DISCUSIÓN

La alta incidencia de la IPTB, su diagnóstico y tratamiento complejo, hacen que sea necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Si bien, tanto el uso de tratamiento antimicrobiano como el quirúrgico se alzan como los ideales para combatir las IPTB, este último es alto costo y de minucioso cuidado post operatorio; por su parte, el uso de antimicrobianos de amplio espectro y muchas veces sin la correcta posología, contribuyen a la rápida proliferación de mecanismos de resistencia a estas drogas, dejando sin opción a tratamiento para la erradicación de las IPTB. El impacto mundial de la resistencia a los antimicrobianos llega a tal punto que, según el informe O'Neill de 2016 (66), las infecciones bacterianas causarán más muertes por las resistencias a los antimicrobianos que el cáncer en el año 2050, siendo la resistencia antimicrobiana la primera causa de muerte por enfermedad en el mundo.

Además de este aumento importante de la resistencia antimicrobiana por parte de los agentes productores de IPTB, la producción de biofilm tiene una directa relación con los mecanismos de resistencia, principalmente la producción de genes codificadores de dichos mecanismos, puesto que se ha asociado a un aumento en su producción y conducción a un fracaso terapéutico frente a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa* (67) como a *Staphylococcus spp* frente a diversos grupos de antimicrobianos. (68).



Las alternativas para combatir esta problemática se centran en caracterizar un compuesto y evaluar su actividad frente a diversos patógenos, siendo de amplio estudio e importancia compuestos como los LIs, tanto por su eficacia antimicrobiana como las características de su síntesis, ya que disminuyen la utilización de solventes orgánicos y no generan residuos, haciendo procesos más seguros para los operadores, el laboratorio y el medio ambiente (69).

Los LIs que se evaluaron en la presente memoria son de características poco comunes, puesto que derivan del ácido benzoico (caracterizado como un polifenol) cuya naturaleza química lo hace muy diferente a los LIs ya reportados en la literatura. Esta síntesis y aplicación de los LIs derivados del ácido benzoico, frente a bacterias productoras de IPTB, es la pionera en toda la literatura científica, no hay reportes ni trabajos similares en la utilización de estos líquidos particulares.

El estudio de Łuczak y colaboradores (2010) (70) confirman primeramente que, a medida que la cadena hidrocarbonada aumenta en el número de carbonos, la actividad antimicrobiana, reflejada en la CMI, aumenta considerablemente en sales derivadas de imidazolio. Busetti y colaboradores (2010) (71), al analizar tanto bacterias Gram positivo, Gram negativo, así como diversos hongos, describieron que existe una clara dependencia entre el largo de cadena del sustituyente alquilo con la actividad antimicrobiana. Estas conclusiones se repiten ampliamente para diversos LIs. Además ambos autores señalan que la modificación del grupo principal del LI, puede modificar la actividad antimicrobiana.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, estas afirmaciones no se cumplen del todo, puesto que, si bien, a diferentes longitudes de cadena la actividad antimicrobiana tiende a aumentar (como en el caso de los sustituyentes con ácido benzoico y ácido protocatecuico), esta es variable para una misma serie de LI utilizados, comportándose de diferente forma de acuerdo al grupo que está constituyendo al anillo benzoico y no en la gran mayoría por su largo de cadena hidrocarbonada sustituyente. Este primer hallazgo rompe con los paradigmas presentados ampliamente sobre la longitud de la cadena hidrocarbonada y su directa relación con la actividad antimicrobiana, pero a la vez, los resultados obtenidos también orientan a que la variación del constituyente principal del ácido benzoico modifican la actividad antimicrobiana. Esto, según Sánchez-Maldonado y colaboradores (2011) (72), se explica porque al aumentar la cantidad de grupos hidroxilo en el sustituyente principal de los derivados del ácido benzoico, la actividad antimicrobiana disminuye. Al realizar la sustitución del hidroxilo por el metoxilo, la actividad antimicrobiana aumenta considerablemente, puesto que aumenta la lipofilia del ácido y permitiendo una mejor interacción con la bacteria. Por lo tanto, para estos LIs, la longitud de cadena no condiciona completamente la actividad antimicrobiana, sino que la variabilidad del grupo funcional contribuye notablemente a esa actividad, particularmente frente al ácido benzoico (que no presenta grupos hidroxilo, pero si tiene pobre lipofilicidad) y el ácido protocatecuico (que posee doble grupo hidroxilo) en contraste con el ácido vanílico (con un hidroxilo y metoxilo) y el ácido siríntrico (con dos metoxilo), utilizados en esta memoria.

Frente a algunos antioxidantes, como de los que derivan los LIs utilizados en esta memoria, se han descrito actividades antimicrobianas frente a diversos patógenos, como la aplicación del ácido siríntrico frente a *Cronobacter sakazakii* disminuyendo su crecimiento bacteriano y causando disfunción de la membrana celular, lo que se evidenció por la disminución de la concentración de ATP intracelular, entre otros hallazgos (73). Mikłasińska y colaboradores (2015), utilizando éster etílico del ácido protocatecuico demostró que este

compuesto tiene actividad antimicrobiana relativa y variable frente a diversas cepas de *S. aureus*, pero que al combinarse con antibióticos como eritromicina y clindamicina la actividad mejora. Estos antecedentes confirman que, primeramente, los compuestos derivados de polifenoles poseen actividad antimicrobiana a diversa escala. Sin embargo, al modificarlos e incluirlos dentro de un LI, esta actividad mejora, de acuerdo a lo presentado en esta memoria.

En ensayos con derivados de *N*-Cinamil imidazolio por parte de Forero-Doria y colaboradores (2018) (74), presentan CMI para *S. pyogenes*, *S. epidermidis* y *S. aureus* de 0,03125 mM usando moléculas de 10 átomos de carbono en su cadena alquílica, siendo esto superado ampliamente por los LIs utilizados en esta memoria, arrojando una CMI <0,01562 mM en las cuatro series hasta ocho átomos de carbono en la cadena. Sin embargo, son en [VDIM]Br y [SDIM]Br donde la CMI cambia, aumentando y siendo un valor exacto mucho mayor al de las otras series, tanto de la cantidad de carbonos como el grupo funcional. Para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* los valores de CMI difieren, siendo para el primero 0,5 mM, para el segundo >2 mM y para el último 1 mM en cadenas de 10 carbonos en la cadena alquílica. De acuerdo a lo obtenido en esta memoria, para los tres patógenos existen una relación directa con la cantidad de carbonos en la cadena alquílica, presentando CMI mucho más bajas a las reportadas por Forero-Doria y colaboradores (2018), aunque ocurre el mismo fenómeno que con los microorganismos Gram positivos, donde [VDIM]Br y [SDIM]Br aumentan su valor respecto a los de cadena hidrocarbonada menor, esto significa que a pesar de que la relación “largo de cadena hidrocarbonada-actividad antimicrobiana” se cumpla, en los dos LIs recién mencionados no ocurre eso, tendiendo a corregir la CMI, aumentándola y arrojando un valor exacto. Sin embargo, estos LIs derivados de ácido benzoico tienen una notable mejora en la CMI, aumentando considerablemente su actividad antimicrobiana tanto contra Gram negativos como positivos.

La resistencia de *P. aeruginosa* frente LIs derivados del imidazolio, según Santos y colaboradores (2014) (75), demuestran que este microorganismo es tolerante frente a la acción de 9 LIs diferentes, presentando crecimiento al aplicar concentraciones que van desde los 15 mM hasta sobre los 800 mM. Esto se explica por los diversos mecanismos de tolerancia a los disolventes orgánicos que presenta la bacteria, reflejando la difícil erradicación. Frente a esto, los LIs utilizados para esta memoria muestran una mejoría notable frente a este patógeno, arrojando  $CMI < 0,01532$  mM como valor menor y  $CMI > 2$  mM. Ferraz y colaboradores (2014) (76) utilizaron LIs acoplados a antibióticos como la ampicilina, mostrando una mejora importante en la acción antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, siendo *S. aureus* el de mayor mejora, disminuyendo su CMI 100 veces más (llegando a 0,005 mM). Si bien, este resultado no es comparable con lo realizado en esta memoria, demuestra que los LIs son una alternativa sustancial para el tratamiento para este patógeno. Los LIs utilizados en esta memoria, particularmente para *S. aureus*, no presentan el mismo valor de CMI presentado por Ferraz y colaboradores, pero de igual manera poseen una CMI muy baja y variable, no dependiendo de los antibióticos para mejorar la actividad antimicrobiana. Venkata y colaboradores (2012) (59) evaluaron la actividad antimicrobiana de 1-alkyl-3-methylimidazol, siendo más alta frente a la bacteria Gram positivo (*S. aureus*) (CMI 310 mM) comparado con la Gram negativo (*P. aeruginosa*) (CMI  $1,25 \times 10^5$  mM), esto contrasta a la acción de los LIs utilizados en esta memoria, siendo estos de mucha mejor actividad antimicrobiana ante dichos patógenos.

El fenómeno que ocurre con los LIs con 10 átomos de carbono es complejo de dilucidar. Tanto el ácido vanílico como el ácido sirínico tienen alta lipofilia por sus grupos metoxilo en la estructura, además la cadena hidrocarbonada contribuye a esta característica, más aún con una cadena de 10 carbonos. Para este fenómeno se sospecha de que esta lipofilia se puede ver perjudicada por el alto peso molecular de los LIs, una posible variación en la rotación del compuesto al estar presente en el medio, fallando la interacción

que posee el LI con la bacteria y con ello, disminuir cuantitativamente la actividad antimicrobiana. Esto es motivo de controversia, puesto que a una longitud de cadena mayor la actividad antimicrobiana debería ser mucho mayor. Sin embargo, este hallazgo puede ser importante para dilucidar la actividad que pueda poseer estos LIs frente a otros sistemas (como celulares, *in vivo* u otros).

Frente a Gram positivos, los LIs tienen una acción sumamente eficaz, puesto que su pared bacteriana es permeable que, por lo general, no restringe ciertos metabolitos como antimicrobianos (77), favoreciendo la acción de los LIs. En Gram negativos, la actividad antimicrobiana por parte de los LIs disminuye tanto por la impermeabilidad que le otorga una doble pared y morfología distintiva, como también los diversos métodos de resistencia antimicrobiana (78). La actividad antimicrobiana menor en *P. aeruginosa* como en *A. baumannii*, en contraste con *E. coli*, se debe tanto a la producción de mecanismos de expulsión y erradicación de sustancias como la resistencia intrínseca que presentan a diversos antimicrobianos (79).

A pesar de estos resultados notablemente prometedores para combatir estos microorganismos, es necesario dilucidar completamente la CMI para algunos LIs, puesto que los resultados obtenidos en algunas determinaciones arrojan  $CMI < 0,01562$  mM, impidiendo determinar correctamente este parámetro. Por ello, es necesario implementar más diluciones a menores concentraciones de esta CMI para caracterizar de mejor forma la actividad antimicrobiana de los LIs.

En relación a la determinación de la actividad antibiofilm de los LIs, los resultados para esta memoria revelan que las mejores actividades son relacionadas al LI derivado del ácido vanílico. Para *S. pyogenes* mostro mejor actividad [VHIM]Br a 1 mM, una reducción del biofilm entre el 20 al 30%, también aporta una buena actividad [VDIM]Br cercana al 40% (Figura 7). El biofilm de *P. aeruginosa* se observa mejor reducción por medio de [VHIM]Br a 0,01 mM con cerca del 40% de inhibición del biofilm (Figura 8). En *S. epidermidis* la actividad cambia, siendo de mejor acción [BOIM]Br con cifras cercanas al 60% de inhibición al 0,01 mM, sin embargo, muy de cerca siguen a este resultado [VHIM]Br y [SHIM]Br a 0,1 mM (Figura 9). Por otra parte, tanto *S. aureus* (Figura 10), *E. coli* (Figura 11) como *A. baumannii* (Figura 12) mantienen la tendencia frente a la inhibición del biofilm bacteriano, siendo [VOIM]Br a 1 mM quien tiene mejor acción, cercana al 40% de inhibición de biofilm.

En 2012, Venkata y colaboradores (59) evaluaron la capacidad antibiofilm de 1-dodecil-3-metilimidazol en *S. aureus* y *P. aeruginosa*, donde obtuvieron una mejor actividad antibiofilm frente a bacterias Gram positivas que en Gram negativas, mostrando efectividad del LI, concordante a los resultados obtenidos en esta memoria. Buseti y colaboradores (2010) (71), al utilizar bromuro de 1-alkilquinolina como LI frente a bacterias planctónicas y patógenos como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. epidermidis* la actividad antibiofilm mejora a medida que el largo de cadena aumenta en la ramificación hidrocarbonada frente a todos los patógenos, independiente su morfología. Sin embargo, frente a los resultados obtenidos, es el tipo de sustituyente en el LI quien ejerce diferencias en cuanto a la actividad antibiofilm por sobre la cadena hidrocarbonada.

De acuerdo a lo investigado por Sethupathy y colaboradores (2017) (80) con ácido vanílico frente a *Serratia marcescens* y su biofilm, sus resultados revelan que primeramente,

las enzimas lipolíticas que utilizan los patógenos para destruir la bicapa fosfolipídica, y con ello comenzar la colonización bacteriana, son reducidas frente a la acción del ácido vanílico, como también aporta en la reducción del ácido nucleico, proteínas de síntesis, carbohidratos y el contenido de ácidos grasos de la EPS (Sustancia Polimérica Extracelular), siendo este último polímeros naturales de alto peso molecular que secretan los patógenos, estableciendo con ello la integridad funcional y estructural del biofilm, determinando las propiedades fisicoquímicas de este (81). Con estos resultados, los autores sugieren que el ácido vanílico tiene efectos en la producción de biofilm, desestabilizándolo e inhibiendo el QS del biofilm, efectos que son dependientes de la concentración de ácido vanílico que se utilice.

Lo anterior se correlaciona lo obtenido en esta memoria, siendo el ácido vanílico el que posee mejor actividad antibiofilm tanto como en Gram negativos como Gram positivos, también viéndose favorecido por la lipofiliidad que posee este ácido, ya descrito anteriormente. Sin embargo, existen diferencias en la concentración usada frente a cada bacteria, como también el largo de cadena hidrocarbonada en cada ácido, teniendo variaciones importantes que son difíciles de dilucidar por lo poco descrito de la actividad antibiofilm de este tipo de compuestos. Lo que se puede asumir es que, a una concentración de 1 mM de LIs derivados de ácido vanílico, pareciera ser la mejor alternativa para destruir el biofilm bacteriano.

A pesar de la buena efectividad frente al biofilm por parte de los LIs, hay algunos, en su mayoría derivados del ácido protocatecuico que, independiente de la cantidad de carbonos y concentración utilizada, muestran un porcentaje de biofilm sobre o cercano al 100%, pudiendo interpretarse esto como que el LI tiende a estimular la formación en el pocillo utilizado. Esto posiblemente es errado, puesto que debido a la estructura que posee este ácido

tendría la facilidad de interactuar con la matriz del biofilm, que está compuesto en gran medida por agua, pudiendo hacer enlaces tipo puentes de hidrógeno. Esto puede hacer que el LI a diferentes concentraciones no permeabilice el biofilm, quedando retenido por estos enlaces y al realizar la medición espectrofotométrica, esta se altere aumentando el valor de biofilm, equivalente a un porcentaje. Además, juega un rol crucial el tipo de biofilm y que tan permeable para que el LI actué. Sin embargo, Ferrer y colaboradores (2017) (82) demostraron que formándose el biofilm, por medio del análisis en tiempo real de biofilm en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, la eficacia de los antibióticos se reduce drásticamente y las concentraciones sub-inhedorias de algunos antibióticos, como linezolid y claritromicina, estimulan el crecimiento del biofilm. No obstante, frente a los LIs utilizados, no es posible determinar esta hipótesis comprobada por los investigadores, puesto que la caracterización química es diferente, como la cinética de estos y la acción directa en alguna de las estructuras de la bacteria. Por ello, es necesario continuar el análisis a diferentes concentraciones de LI para establecer si realmente pueden estimular la formación del biofilm o es la acción de fuerzas electroquímicas las responsables de este fenómeno.

Si bien, los LIs presentan una eficaz acción frente a diversos patógenos, es sabido que la acción frente a organismos eucariotas es perjudicial, siendo moléculas funcionales pero tóxicas. Los LIs catiónicos se ven afectados por la atracción electrostática a los lípidos cargados negativamente en la membrana de las células de los mamíferos, se ha descrito que las interacciones de membrana con los LIs pueden ser perjudiciales. Un aumento en la longitud de la cadena lateral catiónica de un LI podría estar directamente relacionado con un aumento en la actividad en la membrana, la presencia y el número de átomos de oxígeno, y la longitud total de las cadenas laterales catiónicas emergen como elementos estructurales y biológicos cruciales que se deben tener en cuenta para el diseño del LI (83).



Lo anterior queda demostrado en los estudios de Li y colaboradores (2012) (26), McLaughlin y colaboradores (2012) (27), entre otros, por lo que es posible con ello estimar que, los LIs con cadenas hidrocarbonadas superiores a 10 átomos de carbono, tienden a aumentar la toxicidad frente a diversas células eucariotas, tendiendo a una mayor bioacumulación en la membrana lipídica debido a la similitud molecular de los LIs con la membrana (84). Este antecedente impediría utilizar LIs como alternativa terapéutica eficaz frente a patógenos de diverso tipo, sin causarle daño a la célula.

Sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos en esta memoria, si bien el largo de cadena influye en la toxicidad celular, el mecanismo que hace citotóxicos a estos LIs funcionalizados con ácido benzoico pareciera ser dicha funcionalización. Esto porque los LIs [BDIM] y [PDIM] son los que poseen una menor toxicidad celular, reflejado en el  $EC_{50}$ , puesto que el primero no posee un grupo funcional en el anillo benzoico y el segundo posee 2 hidroxilaciones, pudiendo contribuir a la disminución (con concentraciones de toxicidad celular  $>0,032$  mM). Por su parte, [VOIM] y [SOIM] aumentan la toxicidad frente a las células, esto por la lipofilia que les confiere la funcionalización con los grupos metoxilo, tal como ocurre frente a las membranas bacterianas. Sin embargo, dicha toxicidad no alcanza a ser igual a la concentración a la cual el LI actúa frente a los patógenos estudiados (0,0224 mM y 0,0173 mM respectivamente; 0,01562 mM CMI), por lo tanto, los LIs estudiados actúan tanto frente a patógenos de la piel y tejidos blandos y no producen acción citotóxica frente a queratinocitos humanos (células HaCaT), siendo LIs funcionales y no tóxicos.

Dobler y colaboradores (2013) (85), en ensayos de citotoxicidad en células HaCaT con LIs [HMIM][Cl] y [BMIM][PF<sub>6</sub>] determinaron una concentración de 5 y 7 mM respectivamente, expresado en  $EC_{50}$ , en donde los LIs no producían toxicidad frente a las

células. Hwang y colaboradores (2018) (86), utilizando células HaCaT, describieron que la citotoxicidad celular es mayor cuando se utilizan LIs como [EMIM][TSFI] o [BMPY][TSFI] que con [EMIM][PF<sub>6</sub>], demostrando así que el catión puede no ser el causante de la toxicidad celular, sino que el anión conjugado en la molécula, aplicando una concentración de 10 mM para todas las comparaciones entre moléculas.

Por lo tanto, los LIs funcionalizados con ácido benzoico presentados en esta memoria, a diferencia de los ya estudiados en la literatura científica, poseen concentraciones bajas de toxicidad celular, además de no dañar células como queratinocitos, en donde una infección bacteriana pudiera propagarse y, junto con ello, actuar como inhibidor del crecimiento bacteriano a concentraciones menores que las citotóxicas para las células, de acuerdo a los datos ya mencionados. Esta premisa puede fortalecer la hipótesis de que estos LIs funcionalizados con ácido benzoico, y únicos en la literatura científica con dicha funcionalización, logren ser una alternativa terapéutica seria frente a los patógenos de la piel y tejidos blandos.

## 9. CONCLUSIÓN

Los LIs son una fuente nueva investigación de las más diversas temáticas, las aplicaciones que pueden obtenerse de ellos es objeto de estudio exhaustivo, sobre todo para el beneficio transversal en la población, bajo el concepto de “química verde”. Actualmente tienen un foco de atención particular en base a las nuevas terapias para enfrentar patógenos de infecciones comunes, como herramienta terapéutica prometedora, de fácil acceso y de buena acción.

Por el gran auge que ha tenido a nivel mundial la aparición de bacterias multirresistentes, se hace urgente recurrir a nuevas terapias como las que prometen los LIs. En la presente memoria, mediante la evaluación de la CMI y la actividad antibiofilm, los LIs derivados de ácido benzoico demuestran ser una terapia eficaz y prometedora frente a agentes productores de IPTB, además de no producir toxicidad celular en queratinocitos *in vitro*. Estos LIs únicos en la literatura, dado su origen polifenólico, poseen una actividad antimicrobiana considerablemente mejor frente a estudios ya reportados con otros sustituyentes no polifenólicos, mejorando también la actividad frente a la erradicación del biofilm bacteriano. Sin embargo, requieren un estudio exhaustivo con el fin de dilucidar completamente la CMI para algunos compuestos, análisis SEM frente al biofilm bacteriano, simulación dinámica molecular (MDs): para evaluación de interacción molécula – membrana y ensayos bioinformáticos para propiedades ADME.

## 10. BIBIOGRAFÍA

1. Esposito S, Bassetti M, Bonnet E, Bouza E, Chan M, De Simone G, et al. Hot topics in the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*.48(1):19-26.
2. Robineau O, Nguyen S, Senneville E. Optimising the quality and outcomes of treatments for diabetic foot infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(9):817-27.
3. Macía-Rodríguez C, Alende-Castro V, Vazquez-Ledo L, Novo-Veleiro I, González-Quintela A. Skin and soft-tissue infections: Factors associated with mortality and re-admissions. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed)*. 2017;35(2):76-81.
4. Organization WH. Antimicrobial resistance 2018 [Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>].
5. Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010;28(10):726-36.
6. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control*. 2017;12:Doc05.
7. Lozano C, Torres C. [Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35 Suppl 1:2-8.

8. Lei Z, Chen B, Koo YM, MacFarlane DR. Introduction: Ionic Liquids. *Chem Rev.* 2017;117(10):6633-5.
9. Díaz. J. M, R, Barrero, R. Líquidos iónicos: propiedades fisicoquímicas y aplicación potencial en el mejoramiento de crudos pesados. Bucaramanga: Scielo; 2012.
10. Han D, Row KH. Recent applications of ionic liquids in separation technology. *Molecules.* 2010;15(4):2405-26.
11. Sivapragasam M, Moniruzzaman M, Goto M. Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications. *Biotechnology Journal.* 2016;11(8):1000-13.
12. Romero A. Líquidos iónicos a temperatura ambiente: un nuevo medio para las reacciones químicas. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* ed. España: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.; 2008. p. 79-90.
13. Rodríguez I. Líquidos Iónicos: propiedades, síntesis y aplicaciones. In: Santa María D, editor. Madrid, España: Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Máster Universitario de Ciencia y Tecnología Química; 2017. p. 58.
14. Kissoudi M, Samanidou V. Recent Advances in Applications of Ionic Liquids in Miniaturized Microextraction Techniques. *Molecules.* 2018;23(6).
15. Plechkova NV, Seddon KR. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem Soc Rev.* 2008;37(1):123-50.
16. Wang J, Luo J, Feng S, Li H, Wan Y, Zhang X. Recent development of ionic liquid membranes. *Green Energy & Environment.* 2016;1(1):43-61.

17. Weingärtner H. Understanding ionic liquids at the molecular level: facts, problems, and controversies. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(4):654-70.
18. Keskin S, Kayrak-Talay D, Akman U, Hortaçsu Ö. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *The Journal of Supercritical Fluids.* 2007;43(1):150-80.
19. Ganesan K, Xu B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients.* 2017;9(5).
20. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-46.
21. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist.* 2013;19(4):256-65.
22. Tawfik SM. Simple one step synthesis of gemini cationic surfactant-based ionic liquids: Physicochemical, surface properties and biological activity. *Journal of Molecular Liquids.* 2015;209:320-6.
23. Aiad IA, Tawfik SM, Shaban SM, Abd-Elaal AA, El-Shafie M. Enhancing of Corrosion Inhibition and the Biocidal Effect of Phosphonium Surfactant Compounds for Oil Field Equipment. *Journal of Surfactants and Detergents.* 2014;17(3):391-401.
24. Negm NA, Elkholy YM, Ghuiba FM, Zahran MK, Mahmoud SA, Tawfik SM, et al. Benzothiazol-3-ium Cationic Schiff Base Surfactants: Synthesis, Surface Activity and Antimicrobial Applications against Pathogenic and Sulfur Reducing Bacteria in Oil Fields. *Journal of Dispersion Science and Technology.* 2011;32:512-8.

25. Egorova KS, Gordeev EG, Ananikov VP. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chemical Reviews*. 2017;117(10):7132-89.
26. Li X-Y, Jing C-Q, Lei W-L, Li J, Wang J-J. Apoptosis caused by imidazolium-based ionic liquids in PC12 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;83:102-7.
27. McLaughlin M, Earle MJ, Gílea MA, Gilmore BF, Gorman SP, Seddon KR. Cytotoxicity of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids in murine fibroblast NIH 3T3 cells. *Green Chemistry*. 2011;13(10):2794-800.
28. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. 2005;31(6):674-86; discussion 86.
29. Becerra Manrique Ana M. PMP, Riaño G. Daniela, Sierra G. Jennifer V. Microbiota of the identity skin of each individual. *Biociencias*. 2017;2.
30. Lozano J S SMS, González F., Hernández-Sampelayo T GMLN. Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos.: Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: Infectología pediátrica; 2011.
31. McMenemy K. *Skin and Soft Tissue Infections*. Brooklyn, New York: Department of Medicine, NYU-Lutheran Medical Center, 150-55th Street, Brooklyn, NY 11220, USA; 2017.
32. Services. USDoHaH, Administration FaD, (CDER) CfDEaR. *Guidance for Industry Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections: Developing Drugs for Treatment*. 2013.
33. Spellerberg B. BC. Laboratory Diagnosis of *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci). *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. 2016.

34. Weiss KA, Laverdière M. Group A *Streptococcus* invasive infections: a review. *Can J Surg.* 1997;40(1):18-25.
35. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. *Sherris medical microbiology.* New York: McGraw Hill Medical; 2010.
36. Eckmann C, Nathwani D, Lawson W, Corman S, Solem C, Stephens J, et al. Comparison of vancomycin and linezolid in patients with peripheral vascular disease and/or diabetes in an observational European study of complicated skin and soft-tissue infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21 Suppl 2:S33-9.
37. Zendejas Manzo G, Avalos Flores H, Soto Padilla M. *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación.* Mexico: Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México; 2014. Contract No.: 25:129-143.
38. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(9):629-41.
39. Wilson BA, Salyers AA. *Bacterial pathogenesis : a molecular approach.* Washington, DC: ASM Press; 2011.
40. França A, Pérez-Cabezas B, Correia A, Pier GB, Cerca N, Vilanova M. *Staphylococcus epidermidis* Biofilm-Released Cells Induce a Prompt and More Marked In vivo Inflammatory-Type Response than Planktonic or Biofilm Cells. *Front Microbiol.* 2016;7:1530.
41. Moreno González ME, Ruiz Galindo E. *Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en blefaroconjuntivitis. *Revista Medica Hospital General Mexico.* 2007;70:24-9.



42. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555-67.
43. Ochoa S, López Martínez B, Jiménez Tapia Y, Giono S, Eslava C, Hernández Castro R, et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Mediagraphic.* 2013;70:138-50.
44. York MK, Baron EJ, Clarridge JE, Thomson RB, Weinstein MP. Multilaboratory validation of rapid spot tests for identification of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3394-8.
45. Petkovsek Z, Elersic K, Gubina M, Zgur-Bertok D, Starcic Erjavec M. Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1811-7.
46. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 2012;3(3):243-50.
47. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(2):148-65.
48. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:55.
49. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J.* 2017;11:53-62.
50. Hollmann B, Perkins, M., Walsh, D. *Biofilms and their role in pathogenesis.* London, England: British Society for Immunology; 2018.

51. Fiedler T, Köller T, Kreikemeyer B. *Streptococcus pyogenes* biofilms-formation, biology, and clinical relevance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:15.
52. Cervantes García E, García González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio.* 2014;61:28-40.
53. Edmiston CE, McBain AJ, Kiernan M, Leaper DJ. A narrative review of microbial biofilm in postoperative surgical site infections: clinical presentation and treatment. *J Wound Care.* 2016;25(12):693-702.
54. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol.* 2016;121(2):309-19.
55. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* 2009;4(3):273-8.
56. He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J, et al. Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4817-25.
57. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 1998;64(8):711-3.
58. Coffey BM, Anderson GG. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods Mol Biol.* 2014;1149:631-41.
59. Venkata Nancharaiah Y, Reddy GK, Lalithamanasa P, Venugopalan VP. The ionic liquid 1-alkyl-3-methylimidazolium demonstrates comparable antimicrobial and antibiofilm behavior to a cationic surfactant. *Biofouling.* 2012;28(10):1141-9.

60. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-71.
61. Schürer N, Köhne A, Schliep V, Barlag K, Goerz G. Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol.* 1993;2(4):179-85.
62. Micallef L, Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, Charveron M, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2009;18(2):143-51.
63. Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hülsen A, Fasching C, Cremer T, et al. Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;19(4):201-14.
64. Fusenig NE, Boukamp P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog.* 1998;23(3):144-58.
65. Zaroni BV, Brasil Romão G, Andrade RS, Barretto Cicarelli RM, Trovatti E, Chiari-Andrèo BG, et al. Cytotoxic effect of protic ionic liquids in HepG2 and HaCat human cells: *Toxicol Res (Camb).* 2019;8(3):447-58.
66. J. ON. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations. London, England 2016.

67. Cho HH, Kwon KC, Kim S, Park Y, Koo SH. Association between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Carbapenem-Resistant. *Ann Clin Lab Sci.* 2018;48(3):363-8.
68. Agarwal A, Jain A. Association between drug resistance & production of biofilm in staphylococci. *Indian J Med Res.* 2012;135(4):562-4.
69. T.Srinivas T. Ionic Liquids – A New Era in Green Chemistry. *International Journal of Engineering and Computer Science* ., 2017;6(1).
70. Łuczak J, Jungnickel C, Izabela A, Acka Ł, Stolte S, Jan H. Antimicrobial and surface activity of 1-alkyl-3-methylimidazolium derivatives 2010. 593-601 p.
71. Busetti A, Crawford DE, Earle MJ, Gilea MA, Gilmore BF, Gorman SP, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids. *Green Chemistry.* 2010;12(3):420-5.
72. Sánchez-Maldonado AF, Schieber A, Gänzle MG. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol.* 2011;111(5):1176-84.
73. Shi C, Sun Y, Zheng Z, Zhang X, Song K, Jia Z, et al. Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane. *Food Chem.* 2016;197(Pt A):100-6.
74. Forero Doria O, Castro R, Gutierrez M, Gonzalez Valenzuela D, Santos L, Ramirez D, et al. Novel Alkylimidazolium Ionic Liquids as an Antibacterial Alternative to Pathogens of the Skin and Soft Tissue Infections. *Molecules.* 2018;23(9).
75. Santos AG, Ribeiro BD, Alviano DS, Coelho MAZ. Toxicity of ionic liquids toward microorganisms interesting to the food industry. *RSC Advances.* 2014;4(70):37157-63.

76. Ferraz R, Teixeira V, Rodrigues D, Fernandes R, Prudêncio C, Noronha JP, et al. Antibacterial activity of Ionic Liquids based on ampicillin against resistant bacteria. *RSC Advances*. 2014;4(9):4301-7.
77. Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol*. 2002;92 Suppl:46S-54S.
78. Zgurskaya HI, López CA, Gnanakaran S. Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis*. 2015;1(11):512-22.
79. CLSI. Performances Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, PA.: Clinical and Laboratory Standard Institute.; 2018.
80. Sethupathy S, Ananthi S, Selvaraj A, Shanmuganathan B, Vigneshwari L, Balamurugan K, et al. Vanillic acid from *Actinidia deliciosa* impedes virulence in *Serratia marcescens* by affecting S-layer, flagellin and fatty acid biosynthesis proteins. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16328.
81. Evans LV. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers; 2005.
82. Ferrer MD, Rodriguez JC, Álvarez L, Artacho A, Royo G, Mira A. Effect of antibiotics on biofilm inhibition and induction measured by real-time cell analysis. *J Appl Microbiol*. 2017;122(3):640-50.
83. Gal N, Malferarri D, Kolusheva S, Galletti P, Tagliavini E, Jelinek R. Membrane interactions of ionic liquids: Possible determinants for biological activity and toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012;1818(12):2967-74.
84. Zhao D, Liao Y, Zhang Z. Toxicity of Ionic Liquids. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2007;35(1):42-8.

85. Dobler D, Schmidts T, Klingenhöfer I, Runkel F. Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems. *Int J Pharm.* 2013;441(1-2):620-7.
86. Hwang J-h, Park H, Choi DW, Nam KT, Lim K-M. Investigation of dermal toxicity of ionic liquids in monolayer-cultured skin cells and 3D reconstructed human skin models. *Toxicology in Vitro.* 2018;46:194-202.