



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA Y
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ENTIDADES
QUÍMICAS NO CONVENCIONALES PARA SU USO EN
DERMATOLOGÍA VETERINARIA**

Memoria presentada por la licenciada

María Pérez-Aranda Redondo para

optar al grado de Doctora en Farmacia

María Pérez-Aranda Redondo
Sevilla, marzo 2021



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ENTIDADES
QUÍMICAS NO CONVENCIONALES PARA SU USO EN
DERMATOLOGÍA VETERINARIA**

Vº Bº de las directoras de la Tesis

Fdo. Dra. Ana Alcudia Cruz
Profesora titular del Departamento
de Química Orgánica y Farmacéutica
de la Universidad de Sevilla

Fdo. Dra. Eloísa Pajuelo Domínguez
Profesora titular del Departamento de
Microbiología y Parasitología de la
Universidad de Sevilla

Agradecimientos

A mis directoras, por la oportunidad, el apoyo y la confianza.

A los Departamentos de Química Orgánica y Farmacéutica y Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, por permitirme desarrollar mi trabajo de investigación.

A los profesores Pedro Ginel, Francisco Montilla, Tomás Carballo y Yadir Torres por su colaboración en este proyecto.

A todos los compañeros de laboratorio con los que he podido compartir esta experiencia, en especial a Belén, Manuel, Guillermo, Jennifer, Salvadora, y Noris. Gracias por los buenos momentos.

A Ana, por no sólo ser una referencia en mi labor investigadora, sino por haber sido una persona que me ha inspirado, que me ha apoyado y dado fuerzas en los momentos más arduos. Gracias por ver en mí facetas que ni yo misma conocía. Gracias por permitirme evolucionar y por acompañarme en todos los pasos del camino.

A toda mi familia, por su apoyo, respeto y amor incondicional.

A mis padres, Inmaculada y Eugenio, porque siempre habéis sido los grandes pilares que me sustentan.

A mis hermanos. Alberto, por aportarme siempre positividad, pragmatismo y humor, por estar siempre ahí. Ana, por enseñarme el significado de la palabra resiliencia, por tu amor y tu valentía.

A mis abuelos, Antonio y María. Porque han sido y serán siempre fuente de orgullo, admiración e inspiración.

A Pedro, por demostrarme lo que es ser un compañero de vida.

“Despacito, y buena letra”

Dña. María Camacho Cobos

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN (Pág. 6)
2. SIGLAS Y ABREVIATURAS (Pág. 8)
3. INTRODUCCIÓN GENERAL (Pág. 10)
4. OBJETIVOS GENERALES (Pág. 24)
5. **CAPÍTULO PRIMERO: APLICACIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO PREDICTIVO PARA LA TERAPIA DE INFECCIONES POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MULTIRRESISTENTES** (Pág. 27)
6. **CAPÍTULO SEGUNDO: PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DE LOS COMPUESTOS 1,4-AMINOFENOL Y 4,4'-AZODIFENOL. DISEÑO DE UNA APLICACIÓN TERAPÉUTICA TÓPICA PARA SU USO EN INFECCIONES CUTÁNEAS** (Pág. 77)
7. **CAPÍTULO TERCERO: PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DE COMPLEJOS METAL-CARBENO Y CARBOXILATOS METÁLICOS** (Pág. 140)
8. CONCLUSIONES GENERALES (Pág. 207)
9. **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DEL PERÍODO DE REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL** (Pág. 210)

RESUMEN

El desarrollo de multirresistencias a antibióticos por parte de las bacterias es un problema médico cuya incidencia ha aumentado de manera exponencial, sobre todo en las últimas décadas. Realmente, se trata de un mecanismo adaptativo a modo de respuesta de los microorganismos ante el enfrentamiento reiterado a fármacos antimicrobianos, con objeto de eludir su acción. En consecuencia, este hecho ha generado un gran problema de salud pública que afecta tanto a animales como personas, elevando no sólo el gasto sanitario sino también aumentando la mortalidad en infecciones graves debida a un grupo numeroso de bacterias. Ante esta situación es necesaria la búsqueda de alternativas eficaces y económicamente viables para combatir de microorganismos de una forma eficiente. La presente Tesis Doctoral, compuesta de tres capítulos, comienza mostrando por un lado, el estudio de la prevalencia de las resistencias de un patógeno concreto y la aplicación de un modelo matemático que permite la posibilidad de aplicar un tratamiento empírico con una probabilidad de éxito por encima del 90%. Así, la implementación de este tipo de herramientas, que permiten predecir y prever el comportamiento epidemiológico de estos patógenos y que por ende, permiten establecer medidas eficaces para su prevención, diagnóstico y tratamiento, son claves para establecer un diagnóstico certero. En este caso concreto, la modelización matemática, basada en el uso de programas informáticos en los que se implementa computacionalmente un modelo matemático permite simular el comportamiento de una epidemia, en el sentido en el que permite el seguimiento del estado de poblaciones sanas, infectadas, curadas y que no han superado la enfermedad. Asimismo, este mismo modelo se está aplicando en la actualidad a muchas enfermedades infecciosas de carácter bacteriano o vírico, concretamente el SARS-COVID 19, proporcionando una información predictiva muy valiosa para su control. En el campo de la Medicina Veterinaria Clínica no tenemos constancia de que se haya implementado nunca antes un modelo de estas características, por lo que esta investigación puede abrir un camino que ofrece grandes posibilidades y que tendrían una repercusión directa sobre la salud animal y por ende, la salud pública.

Por otro lado, centrándonos en la búsqueda de nuevos potenciales tratamientos farmacológicos alternativos a la antibioterapia convencional para infecciones por microorganismos del tipo Gram positivos *S. pseudintermedius* y *S. aureus* y para Gram negativos, por *E. coli* y *P. aeruginosa*, que son patógenos muy relevantes en infecciones multirresistentes. Con referencia a los patógenos Gram positivos hemos estudiado la acción antimicrobiana y frente a la formación del biofilm, un importante factor de virulencia clave en el desarrollo de resistencias antimicrobianas, de diferentes azocompuestos. Estos compuestos se utilizan ampliamente en la industria como tintes sintéticos y se aplican como colorantes para pinturas, textiles, industria alimentaria o cosmética. También se ha extendido su uso en otros campos, entre los que destacamos la biomedicina, como indicadores en sensores que utilizan materiales funcionales con fluorescencia u optoelectrónica. Asimismo, los compuestos con funciones azo pueden unirse a numerosos metales, formando complejos que muestran propiedades antifúngicas y antibacterianas. A pesar de la abundante literatura acerca de las propiedades antimicrobianas de estos azocompuestos, su efecto sobre la formación del biofilm, un importante factor de virulencia, por parte de las bacterias patógenas así como de los mecanismos de acción exactos de toxicidad no han sido estudiados en

profundidad. En el presente trabajo de investigación hemos podido comprobar que los compuestos con funciones azo ensayados poseen una notoria acción antimicrobiana frente a las cepas de *S. pseudintermedius* y *S. aureus*, permitiéndonos dilucidar su mecanismo de acción, así como su acción frente a la formación del biofilm. Todo ello nos ha permitido diseñar una potencial aplicación terapéutica tópica que consideramos de gran utilidad.

Finalmente, como estudio complementario centrado en las especies Gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa* hemos podido determinar que ciertos carbenos heterocíclicos metálicos de plata, así como compuestos tipo carboxilatos de nueva síntesis de este mismo metal son muy efectivos frente a estos patógenos. Aunque, numerosos estudios muestran que tanto determinados complejos metal-carbeno como los dicarboxilatos poseen propiedades antimicrobianas, sin embargo, sus mecanismos concretos de acción no habían sido previamente estudiados. Al igual que para los azocompuestos, hemos podido determinar su mecanismo de acción y su acción frente al biofilm. Asimismo, hemos podido determinar una relación estructural-funcional muy significativa en el campo de la terapéutica que abre futuras y prometedoras nuevas líneas de investigación.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AAS: ácido acetyl salicílico
ADN: ácido desoxiribonucleico
ARGs: genes de resistencia a los antibióticos
ARN: ácido ribonucleico
BCCM/LMG: Laboratory of Microbiology
BSA: albúmina sérica bovina
CAT: catalasa
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
CITIUS: Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla
CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute
CMI: concentración mínima inhibitoria
CMB: concentración mínima bactericida
DAC: Dermatitis Atópica Canina
DMSO: dimetilsulfóxido
DMF: dimetilformamida
DCM: diclorometano
DSC: calorimetría diferencial de barrido
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
FAD: flavina adenina dinucleótido
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g: gramos
GHS: Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos
GLASS: Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos
GUI: interfaces de usuario
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HOMO: orbital molecular ocupado de más energía (Highest Occupied Molecular Orbital)
MDA: malondialdehído
ml: mililitros
MATLAB: Matrix Laboratory
MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina
MRSP: *S. pseudintermedius* resistente a la meticilina
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT: nitroazul de tetrazolio
NHC: carbenos N-heterocíclicos
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS: Organización Mundial de la Salud
ROS: reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
SEFH: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria
SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SEM: microscopía electrónica de barrido
SIR: susceptibles, infectados, recuperados.
SIRI: susceptibles, infectados, recuperados, reinfectados.

SOD: superóxido dismutasa
TBA: ácido tiobarbitúico
TBARS: enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido tiobarbitúico
TBME: metil *terc*-butil éter
TCA: ácido tricloroacético
TGA: análisis termogravimétricos
THF: tetrahidrofurano
TSA: agar triptona soja
TSB: caldo triptona soja
UCO: Universidad de Córdoba
UFC: unidades formadoras de colonias
WHO: World Health Organization
XRPD: difracción de rayos X en polvo

INTRODUCCIÓN GENERAL

Mi ejercicio profesional como veterinaria clínica durante los últimos años me ha hecho experimentar en primera persona la realidad de las infecciones por microorganismos multirresistentes, la gran dificultad que presenta su tratamiento y el riesgo que supone tanto para los pacientes (los más frecuentes, perros y gatos), como para las personas con las que conviven e interactúan, puesto que se pueden transmitir entre sí. Esta situación no ocurre sólo en el área de medicina veterinaria, sino también en medicina humana, lo que hace evidente la necesidad, por un lado de un uso responsable de estos fármacos por parte de los profesionales y usuarios, y por otro, la búsqueda urgente de alternativas eficaces y viables para el tratamiento de este tipo de infecciones.

Está ampliamente documentado que en la última década, el desarrollo de resistencias antimicrobianas por parte de microorganismos se ha visto aumentado de manera exponencial. Desde un punto de vista epidemiológico, el concepto de resistencia múltiple o multirresistencia se define como la resistencia a, al menos, un agente antimicrobiano de tres o más familias diferentes (Magiorakos et al., 2012). Es importante destacar que no existe una definición universal de este concepto y que presenta diferencias en función de si el enfoque es epidemiológico, microbiológico o clínico. Por tanto, de manera general, al menos estas dos premisas deben estar presentes: por un lado, que exista resistencia a más de una familia o grupo de antibióticos de uso clínico habitual y por otro, que dicha resistencia posea una relevancia tanto epidemiológica como clínica (López-Pueyo et al. 2011). Esta resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias, tanto en medicina humana como en veterinaria, es un problema de gran relevancia y en continuo auge durante los últimos años en todo el mundo. Datos muy recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), revelan unos niveles alarmantes de resistencia a los antibióticos, tanto en los países de ingresos altos como en los más precarios, como muestra el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la OMS, denominado GLASS (en inglés), que ha revelado la presencia de resistencia generalizada en muestras de 500.000 personas de 22 países. Asimismo, la OMS estima que para el año 2050 habrá más muertes a causa de infecciones por microorganismos multirresistentes que por cáncer. Por tanto, es evidente que se trata de un gravísimo problema de salud pública con consecuencias muy graves como son el incremento de morbilidad y mortalidad, fallos terapéuticos, opciones terapéuticas limitadas y aumento de los costes en salud pública (O'Connor et al. 2018, Dadgostar, 2019). En este contexto debemos resaltar los denominados microorganismos ESKAPE. Este acrónimo incluye seis patógenos tanto de especies Gram positivas como Gram negativas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp.) que destacan tanto por su virulencia como por su capacidad de desarrollo de multirresistencias frente a los antimicrobianos. De hecho, amplios estudios sistemáticos revelan que estos microorganismos están claramente asociados con una mayor tasa de morbilidad y mortalidad, con elevados costes sanitarios y la OMS los ha incluido en la lista de los 12 patógenos que necesitan de manera urgente el desarrollo de nuevos fármacos para combatirlos (Santajit e Indrawattana, 2016, Mulani et al., 2019).

En este sentido, el gran descubrimiento de los antibióticos supuso un antes y un después en la terapéutica de las infecciones. En el año 1907, Paul Ehrlich, ganador del Premio Nobel de Medicina, descubrió un derivado arsenical, arsfenamina (**Figura 1**), con acción frente a *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis. Este producto fue comercializado en 1910 con el nombre de Salvarsan®, considerándose como el nacimiento de la quimioterapia antimicrobiana (Laborda, 2002).

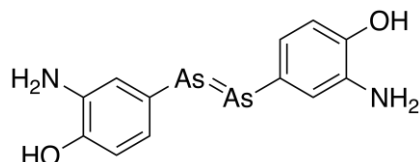


Figura 1: Estructura química de la arsfenamina (Salvarsan®)

Posteriormente, en el año 1932, el también ganador del premio Nobel de Medicina Gerhard Dogmak descubrió que el fármaco precursor de las sulfamidas llamado Prontosil (sulfamidocrisoidina, **Figura 2**) protegía a los ratones de la infección por *Streptococcus pyogenes*. Este hecho consolidó el uso de la quimioterapia antimicrobiana (Laborda, 2002).

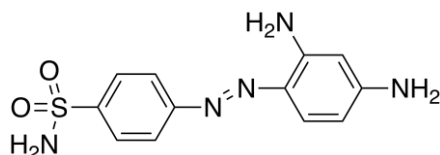


Figura 2: Estructura química de la sulfamidocrisoidina (Prontosil).

Por otro lado, el descubrimiento de la penicilina en el año 1928 por parte de Alexander Fleming supuso un hito en la historia de la Medicina y un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades de origen infeccioso. Este descubrimiento fue casual y serendípico. En ese tiempo, Fleming estudiaba las propiedades de los estafilococos, en concreto *Staphylococcus aureus*. La contaminación de las placas de *S. aureus* con un hongo reveló que dicho hongo había destruido las colonias bacterianas que lo rodeaban. Fleming lo aisló y lo identificó como perteneciente al género *Penicillium* y descubrió así que la sustancia antimicrobiana que producía, la cual llamó penicilina (**Figura 3**), tenía un efecto antimicrobiano importante en microorganismos Gram positivos, pero también en patógenos Gram negativos, causantes de enfermedades tan graves como la meningitis, difteria, neumonía, fiebre tifoidea o gonorrea. Sin embargo, no fue hasta el año 1939 cuando los investigadores Howard Foley y Ernst Chain consiguieron purificar la penicilina. Finalmente en el año 1941 se pudo disponer afortunadamente, de la penicilina a gran escala para su uso militar y civil. Fleming, Foley y Chain recibieron el premio Nobel de Medicina en 1945 (Laborda 2002, Chambers, 2003).

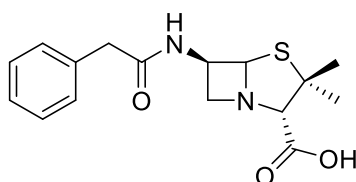


Figura 3: Estructura química de la bencilpenicilina.

A partir de entonces, la industria farmacéutica comenzó a desarrollar la obtención de nuevas moléculas de antibióticos a partir de diferentes microorganismos o derivados semisintéticos o sintéticos de los mismos (Torres y Zarazaga, 2002).

Así, desde un punto de vista farmacológico, podemos clasificar los antibióticos en diferentes familias, que describimos a continuación.

Los antibióticos β -lactámicos tienen su origen en los estudios de Alexander Fleming. Estos fármacos inhiben la biosíntesis de la pared celular bacteriana y se caracterizan estructuralmente por poseer la agrupación de β -lactama o anillo β -lactámico (**Figura 4**). Dentro de los antibióticos β -lactámicos podemos diferenciar distintas subfamilias: cefalosporinas, inhibidores de las β -lactamasas, carbapenemes, monobactamas y penicilinas.

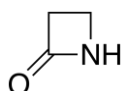


Figura 4: Estructura química de la agrupación β -lactama o anillo β -lactámico

A raíz del descubrimiento de la penicilina se pusieron a punto sistemas industriales y producción a gran escala de estos fármacos. Los métodos fermentativos fueron los primeros optimizados, utilizando los precursores estructurales y extractos de *Penicillium*. Posteriormente se desarrollaron las penicilinas semisintéticas, que se diferencian de la natural o las de origen fermentativo en la cadena lateral, ya que se sintetiza por métodos químicos no enzimáticos. Para la preparación de estas penicilinas semisintéticas se parte del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que resulta de la eliminación de la cadena lateral de la penicilina G (Chambers, 2003) (**Figura 5**).

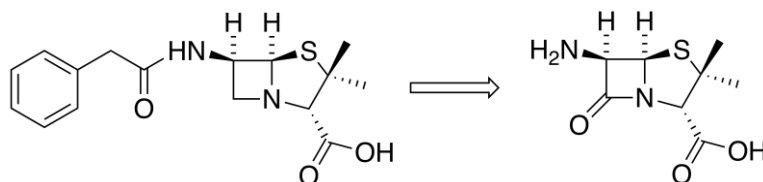


Figura 5: Síntesis del ácido 6-aminopenicilánico a partir de la penicilina G.

Las cefalosporinas son la segunda mayor subfamilia de β -lactámicos tras las penicilinas. Estructuralmente difieren de estas últimas en el sistema bicíclico unido al anillo β -lactámico, siendo un derivado de la dihidrotiazina en lugar de tiazolidina. La primera cefalosporina descubierta en 1948 fue la cefalosporina C a partir del hongo *Cephalosporium acemonium*, aunque no fue hasta la década de los 60 cuando se pudo conocer su estructura. Otra de las subfamilias de estos fármacos es la de los inhibidores de las β -lactamasas (**Figura 6**). Son tanto de origen natural como sintético y tienen la capacidad de inhibir las β -lactamasas, enzimas bacterianas que hidrolizan el anillo β -lactámico. Para inhibir estas enzimas se produce una acilación de su centro activo y una alquilación posterior con un grupo amino próximo (Chambers, 2003).

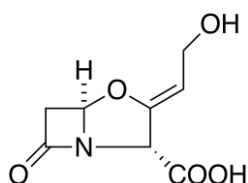


Figura 6: estructura química del ácido clavulánico.

Los monobactámicos constituyen otra de las subfamilia de los antibióticos β -lactámicos. Actualmente el único fármaco disponible en el mercado es el aztreonam, un derivado sintético con acción frente a patógenos Gram negativos. Estructuralmente difiere de otros β -lactámicos en que el segundo anillo de tiazol no está ligado directamente al anillo β -lactámico (Gupta, 2007). Finalmente, la subfamilia de los carbapenémicos derivan de otra modificación química del anillo β -lactámico, donde un átomo de azufre ha sido sustituido por otro de carbono. Su espectro de actividad frente a bacterias es el más amplio de todos los antibióticos β -lactámicos (Breilh et al., 2013).

Otras familias de fármacos antibióticos son aquellos que inhiben la síntesis de proteínas por parte de las bacterias, interactuando con los ribosomas bacterianos. Estas familias son los aminoglucósidos, los macrólidos, las tetraciclinas y los afenicoles.

Los aminoglucósidos se caracterizan estructuralmente por ser derivados de 1,3-diaminoinositoles. Tienen actividad especialmente en contra de bacterias Gram negativas y aerobias y actúan sinérgicamente en contra de organismos Gram positivos. La **figura 7** muestra la estructura química de la gentamicina, uno de los aminoglucósidos más utilizados (Katzung y Bertram, 2007).

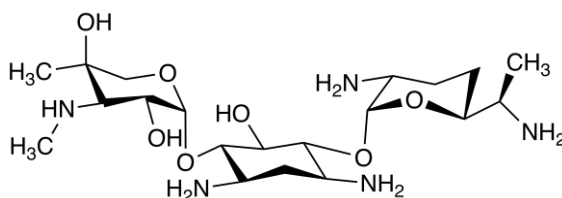


Figura 7: Estructura química de la gentamicina.

Los macrólidos presentan una lactona macrocíclica polifuncionalizada en su estructura química. Entre los grupos funcionales de esta macrolactona se encuentran ciertos azúcares y aminoazúcares que son claves para su actividad farmacológica. La eritromicina fue el primer macrólido, descubierto en 1952 en los productos metabólicos de una cepa del hongo *Streptomyces erytherus*. A partir de este fármaco se han desarrollado derivados sintéticos, mediante modificaciones estructurales, como la azitromicina o la claritromicina. Estos derivados sintéticos poseen una mayor eficacia contra gérmenes Gram negativos (Katzung y Bertram, 2007).

Las tetraciclinas son fármacos antimicrobianos naturales y semisintéticos que proceden de diversas especies de las bacterias *Streptomyces*. Químicamente son derivados de la naftacenocarboxamida policíclica, con un núcleo tetracíclico de donde deriva el nombre del grupo (Katzung y Bertram 2007). Asimismo, los afenicoles ejercen sus efectos mediante la unión irreversible a la subunidad ribosomal 50s. Estructuralmente son derivados del ácido dicloroacético. El cloranfenicol, fármaco más representativo de este grupo, se obtuvo por primera vez en 1947 de *Streptomyces venezuelae*, una bacteria saprofita del suelo, aunque más tarde se obtuvo a partir de otras especies de *Streptomyces* y en la actualidad se produce por síntesis química. El grupo nitro es sustituido por un grupo sulfometil en el tianfenicol y un átomo de fluor en el caso del florfenicol. Son fármacos de amplio espectro, cubriendo microorganismos Gram positivos y negativos (San Román et al. 2002).

Otra familia de antibióticos son las quinolonas, que son de origen sintético. Su mecanismo de acción es el de la interferencia en la síntesis del ARN bacteriano y por tanto, en su reproducción. Las quinolonas de uso clínico (**Figura 8**) tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4. La mayor parte de las quinolonas usadas en la clínica son del grupo de las fluoroquinolonas, caracterizadas por tener un grupo fluoruro en el anillo central, normalmente en posición 6 (Alós, 2003).

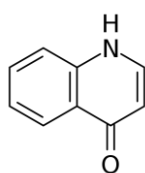


Figura 8: estructura general de las quinolonas.

Finalmente, las sulfamidas interfieren en la producción de las purinas y la síntesis de ácidos nucleicos bacterianos. La fórmula básica de las sulfamidas tiene similitud estructural con el ácido *p*-aminobenzoico. Las propiedades químicas, físicas, farmacológicas y antibacterianas de las diferentes sulfamidas se logran al ligar radicales al grupo amida o al grupo amina del núcleo sulfamida. Como se ha referido al inicio, Gerhard Dogmak descubrió el fármaco precursor de las sulfamidas llamado Prontosil (sulfamidocrisoidina) (Katzung y Bertram 2007).

Durante las décadas siguientes al descubrimiento de la penicilina, el ritmo de desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos fue muy alto, pero en los últimos años se han incorporado muy pocas moléculas al arsenal terapéutico. Uno de los motivos de peso es que estos nuevos fármacos suponen una baja rentabilidad relativa con respecto a otros. Como muestra la **figura 9**, el proceso de comercialización de un nuevo principio activo es muy largo (una media de 12-15 años) y tedioso, y necesita gran cantidad de recursos de investigación, desarrollo, fabricación, etc., con un coste medio de 2500 millones de euros (García, 2012). En los primeros estadios de investigación, se realiza un cribado para escoger aquellos fármacos que potencialmente pudieran ser eficaces, realizando exhaustivos análisis. Tras esto, comienza el proceso de desarrollo del fármaco, evaluando en primera instancia la seguridad y eficacia, comenzando con un número reducido de pacientes (Fase I) para ir incrementando este número hasta llegar a testarlo en gran escala (Fase III). Es importante destacar que en cada una de las etapas existe un riesgo importante de que el fármaco no cumpla con los requisitos necesarios y se deba interrumpir el proceso.



(*) Revisión agencias reguladoras

Figura 9: Proceso de desarrollo de un nuevo fármaco (Fuente: Farmaindustria comunicación).

Por tanto, es más que sabido que los microorganismos poseen la capacidad de desarrollar nuevos mecanismos que les permitan evadir la acción de los antibióticos, por lo que su patogenicidad se incrementa de manera considerable. Conocer dichos mecanismos de adquisición de resistencias por parte de las bacterias es esencial para combatirlos y prevenir su aparición. Se ha demostrado que el origen de los genes de resistencia a los antibióticos que hoy en día poseen los patógenos se remonta a microorganismos ambientales, por lo que el estudio de los mecanismos citados con anterioridad necesitará englobar también a los ecosistemas y al medio ambiente. Es importante recalcar que la resistencia a antimicrobianos en patógenos es una respuesta adaptativa que se ha desarrollado como consecuencia del enfrentamiento de los mismos a la acción de los antibióticos. Podemos definir dos procesos que explican la gran emergencia de las resistencias a los antimicrobianos: uno es la mutación y el otro es la transferencia horizontal de genes (**Figura 10**) (Martínez, 2014).

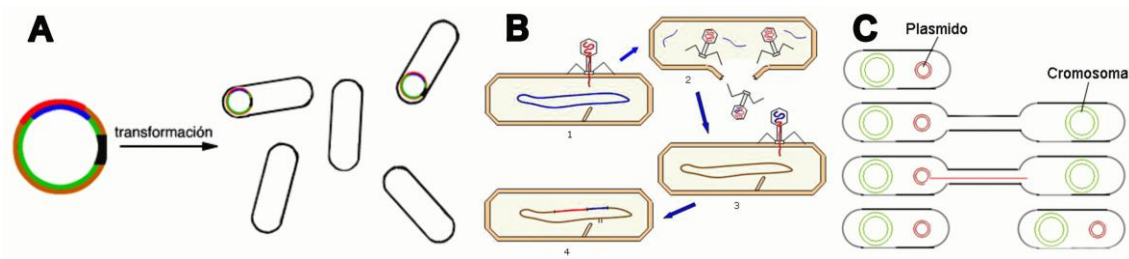


Figura 10: Mecanismos de transferencia horizontal de genes: **A:** transformación, mediante la cual la bacteria capta ADN desnudo del entorno, lo cual permite la transmisión de material genético entre especies muy distantes. **B:** transducción, mecanismo por el cual un virus bacteriófago transfiere fragmentos de ADN de una bacteria a otra. **C:** conjugación, el único proceso que requiere contacto físico entre las dos bacterias que se transfieren así el material genético. Fuente: Herveg y Barcia-Macay (2006).

Asimismo, las citadas mutaciones ocurren normalmente en tres tipos de genes, aquellos que codifican los objetivos o puntos de acción de los antibióticos, los que codifican sus transportadores y por último los que codifican los reguladores que reprimen la expresión de transportadores o elementos descontaminantes (normalmente enzimas y bombas de flujo). Aunque las mutaciones en estos genes contribuyen a la adquisición de resistencias, no son genes de resistencia *per se*. En el caso de transferencia génica horizontal, los genes implicados pueden provenir tanto de bacterias medioambientales como de comensales, puesto que nunca habían estado presentes en bacterias patógenas hasta el uso de los antibióticos (Martinez, 2014, Christaki et al. 2020).

Por otro lado, el sector de producción animal juega un papel clave en la transferencia global tanto de bacterias multirresistentes como de genes de multirresistencia a través de la cadena alimentaria, contacto directo con animales o a través de la contaminación del medio ambiente. En el sector de la producción para consumo humano, el uso inadecuado de piensos medicados y el uso de antibióticos como medida profiláctica han aumentado mucho la generación de microorganismos multirresistentes y la posibilidad de transmitirlos a los humanos (**Figura 11**) (Boireau et al. 2017).

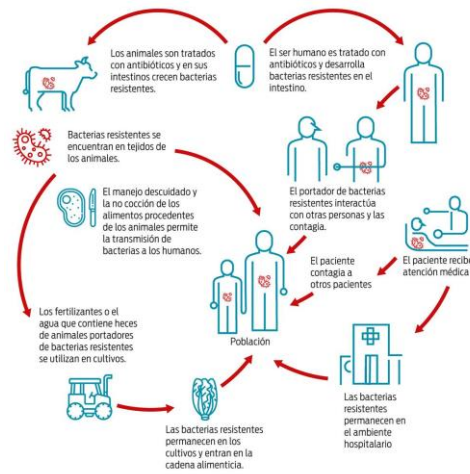


Figura 11. Cadena de transmisión de microorganismos multirresistentes. (Fuente: WHO)

Estudios recientes demuestran que la microbiota fecal es un reservorio extenso de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) que pueden ser adquiridos por microorganismos comensales o patógenos de los seres humanos. Los residuos de los antibióticos, las bacterias resistentes y los ARGs presentes en las excreciones pueden transportarse al medio ambiente por medio del uso del estiércol como abono, fugas o partículas en suspensión en el aire, contribuyendo de manera activa a la extensión de las multirresistencias. La administración de los antibióticos tiene unos efectos muy intensos en los microorganismos fecales propios/comensales, dando lugar a cambios estructurales en la comunidad microbiológica. Se ha demostrado que, estos cambios estructurales juegan un papel crucial en la presencia de ARGs en los suelos, y a su vez, producen un aumento de los hospedadores que portan estos genes (Xiong et al. 2018).

Es importante resaltar que uno de los grandes problemas de salud pública son las infecciones nosocomiales u hospitalarias por este tipo de microorganismos multirresistentes. Dichas infecciones nosocomiales ocasionan una elevada mortalidad, prolongan la estancia hospitalaria y aumentan los costes asistenciales (Pujol y Limón. 2013). *Escherichia coli* es uno de los microorganismos responsables de numerosas de estas infecciones, afectando sobre todo al tracto urinario. Otras bacterias con gran capacidad de generar multirresistencias son el género *Pseudomonas*, en concreto *Pseudomonas aeruginosa*, liderando la lista de patógenos responsables de infecciones nosocomiales y supone un 10% del total de las infecciones contraídas en centros hospitalarios. Se trata de un bacilo Gram negativo que es muy ubicuo en el medio y que es capaz de resistir condiciones ambientales extremas, persistiendo en agua y suelo durante largos periodos de tiempo (Hyun et al., 2018, Paz-Zarza et al., 2019). También son responsables de infecciones del tracto respiratorio o urinario, destacando la afección de pacientes con patologías respiratorias crónicas como la fibrosis quística, ocasionando muchos problemas incluso el fallecimiento de estos pacientes. De hecho, estudios constatan una mortalidad en torno al 40% en neumonías, asociadas o no a respiradores, y bacteriemias adquiridas en hospitales (Puzniak et al., 2019). Otro de los microorganismos responsable de estas infecciones nosocomiales es *Staphylococcus aureus*. Se trata de un coco Gram positivo que forma parte del

microbioma cutáneo y respiratorio. En la última década, ha habido un aumento exorbitante de infecciones cutáneas, respiratorias y de tejidos blandos causadas por *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA). De hecho, estudios demuestran que aproximadamente un 30 % de humanos sanos son portadores de este MRSA en sus fosas nasales, siendo posibles transmisores del mismo (Cain, 2013). La resistencia a la meticilina es el mecanismo de resistencia más importante de este género bacteriano. El gen *mecA*, que codifica una proteína defectuosa de fijación a la penicilina (PBP2a) es el responsable de dicha resistencia. En el ámbito clínico veterinario se ha desarrollado el mismo escenario ocurrido en Medicina Humana. El mal y excesivo uso de las terapias antibióticas, unido a su vez a un aumento de patologías inmunomediadas, en animales de raza, que son individuos que presentan anomalías congénitas que los predisponen a estos procesos, hacen que las resistencias a los antibióticos estén a la orden del día. Se ha demostrado que el mayor de los factores de riesgo en el desarrollo de las resistencias es la exposición repetitiva a los antibióticos (Hensel et al. 2016). *Staphylococcus pseudintermedius* es el agente causal más frecuente en piodermas del perro y del gato y normalmente coloniza también de manera normal la piel y las mucosas de estas especies. La resistencia principal creada es la metilino resistencia, al igual que en el caso de *S. aureus*. La producción de esta proteína alterada se traduce en una resistencia generalizada a todos los derivados betalactámicos, incluidas las penicilinas, penicilinas potenciadas, cefalosporinas y carbapenemes (Cain, 2013). Las infecciones por *S. pseudintermedius* y *S. aureus* metilino resistentes (MRSP y MRSA) en medicina veterinaria han aumentado sustancialmente en la última década. En los años 80 y 90 su aislamiento era más bien de carácter anecdótico, pero ya en los 2000 comienzan a aparecer de manera habitual en la literatura científica. Estudios retrospectivos muestran que de los estafilococos aislados de piodermas al inicio, entre un 15 y 17 % eran MRSP, mientras que en la actualidad alcanzan porcentajes del 66,7 %. Es importante destacar que los MRSP también son aislados de piel y mucosas (mucosa nasal, oral y rectal) de perros y gatos sanos, que actúan como portadores de estos microorganismos en hasta un 30% de la población (Cain 2013). Debido a estos datos, el riesgo de transmisión de MRSP o MRSA a otras mascotas en contacto y a los humanos, así como al entorno y medio es un tema de preocupación y estudio. Aunque la metilino resistencia juega un papel esencial en estos microorganismos, no son las únicas resistencias que pueden adquirir. Son capaces de adquirir resistencias a otros grupos de antibióticos, como a las lincosamidas, macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas (Cain, 2013).

Por otro lado, es importante resaltar que, al igual que en humanos, *P. aeruginosa* es responsable de numerosas infecciones en la especie canina y felina. Asimismo, hemos de destacar que, aunque las infecciones cruzadas entre mascotas y personas sanas no son frecuentes, sí que pueden ocurrir, sobre todo en caso de que exista una inmunodepresión en el humano. En la actualidad, el contacto íntimo de los propietarios con sus mascotas hace muy importante el evitar a aparición de multirresistencias en este tipo de bacterias.

La situación global actual hace patente la urgencia de la necesidad de, por un lado, una buena gestión y control del uso de fármacos antimicrobianos y por otro lado, la utilización de otros productos, a los cuales las bacterias no sean capaces de generar

resistencias, para combatir las infecciones causadas por microorganismos multirresistentes y evitar la generación de nuevas resistencias.

En el presente trabajo de investigación se muestran potenciales alternativas. Por un lado, se presenta un modelo matemático predictivo para la elección de tratamientos empíricos en infecciones por microorganismos multirresistentes. La implementación de este tipo de herramientas, que permiten predecir y prever el comportamiento epidemiológico de estos patógenos y que por ende, permiten establecer medidas eficaces para su prevención, diagnóstico y tratamiento, son claves. En este caso concreto, la modelización matemática, la cual se basa principalmente en el uso de programas informáticos en los que se implementa computacionalmente un modelo matemático permitiendo simular el comportamiento de una epidemia (Fresnadillo et al., 2013). De manera muy reciente, debido a la crisis sanitaria por la pandemia causada por el Coronavirus (SARS-Cov-2), este tipo de modelos están siendo una herramienta clave para su gestión en numerosos países de todo el mundo y para la toma de decisiones de acciones futuras. El valor añadido por este tipo de modelos a la investigación y toma de decisiones en relación a las patologías infecciosas es muy alto, ya que por un lado, contribuye a que no se sigan desarrollando más resistencias a antimicrobianos por parte de estos patógenos puesto que proporciona tratamientos empíricos eficaces y por otro lado ayudaría a reducir costes añadidos en sanidad debidos a este tipo de infecciones. Asimismo, este modelo podría aplicarse a otras muchas enfermedades infecciosas de carácter bacteriano o vírico proporcionando una información clave para su control. En el campo de la Medicina Veterinaria Clínica no tenemos constancia de que se haya implementado nunca antes un modelo de estas características, por lo que abre un camino que ofrece grandes posibilidades y que tendrían una repercusión directa sobre la salud animal y por ende, la salud pública.

Por otro lado, ofrecemos alternativas a la antibioterapia convencional para infecciones por los microorganismos Gram positivos *S. pseudintermedius* y *S. aureus* y para Gram negativos, por *E. coli* y *P. aeruginosa*, que como se ha explicado con anterioridad, son patógenos muy relevantes en infecciones multirresistentes.

Por un lado, los patógenos Gram positivos hemos estudiado la acción antimicrobiana y frente a la formación del biofilm, un importante factor de virulencia clave en el desarrollo de resistencias antimicrobianas, de diferentes azocompuestos. Estos compuestos se utilizan ampliamente en la industria como tintes sintéticos y se aplican como colorantes sintéticos para pinturas, textiles, industria alimentaria o cosmética (Hinks et al., 2000; Wang et al., 2003). También se ha extendido su uso en otros campos, entre los que destacamos la biomedicina, como indicadores en sensores que utilizan materiales funcionales con fluorescencia u optoelectrónica (Wolfbeis, 2005; Fan et al., 2018, Ali et al., 2018). Asimismo, los compuestos con funciones azo pueden unirse a numerosos metales, formando complejos que muestran propiedades antifúngicas y antibacterianas relacionadas con el mecanismo de inhibición del ADN (Ronson et al., 2005). A pesar de la abundante literatura acerca de las propiedades antimicrobianas de estos azocompuestos (Piotto et al., 2013 a, b; Kofie et al., 2014; Concilio et al., 2015; 2017; Rezaei-Seresht et al., 2019), su efecto sobre la formación del biofilm, un importante factor de virulencia, por parte de las bacterias patógenas (Piotto et al., 2013a; Sessa et al., 2016), así como de los mecanismos de acción exactos de toxicidad no son del todo conocidos. En la presente Tesis Doctoral hemos podido determinar que

los compuestos con funciones azo ensayados poseen una notoria acción antimicrobiana frente a las cepas de *S. pseudintermedius* y *S. aureus*, también hemos podido dilucidar su mecanismo de acción, es decir, cómo daña a los microorganismos, así como su acción frente a la formación del biofilm, un importantísimo factor de virulencia bacteriano. Todo ello nos ha permitido diseñar una aplicación terapéutica tópica que consideramos de gran utilidad.

Finalmente, como estudio complementario centrado en las especies Gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa* hemos podido determinar que ciertos carbenos heterocíclicos metálicos de plata, así como compuestos tipo carboxilatos de nueva síntesis de este mismo metal son muy efectivos frente a estos patógenos. Numerosos estudios muestran que tanto determinados complejos metal-carbeno como los dicarboxilatos poseen propiedades antimicrobianas, sin embargo sus mecanismos concretos de acción continúan en estudio. Al igual que para los azocompuestos, hemos podido determinar su mecanismo de acción y su acción frente al biofilm. Asimismo, hemos podido determinar una relación estructural-funcional muy significativa en el campo de la terapéutica.

Personalmente, este trabajo de investigación ha supuesto un resto profesional y personal. Su carácter ampliamente multidisciplinar ha resultado duro, pero inspirador e increíblemente enriquecedor. Como sanitaria y acompañada de una familia de médicos, siempre he sido muy consciente del problema de las resistencias a los antibióticos y del gran riesgo de salud pública que supone. El hecho de poder contribuir, de poder aportar, aunque sea algo ínfimo, a la investigación en este campo, que en un futuro pueda ayudar a salvar vidas (humanas y de animales) me hace sentir tremendamente honrada y afortunada. Espero poder haberlo plasmado y transmitir en este texto la ilusión y la convicción con las que se ha realizado

Referencias

1. Ali, Y., Abd Hamid, S., Rashid, U. (2018). Biomedical Applications of Aromatic Azo Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 18(18). doi:10.2174/1389557518666180524113111.
2. Alós, JI. (2003). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21(5):261-8
3. Boireau, C., Morignat, É., Gazeau, G., Jarrige, N., Jouy, É., Haenni, M. et al. (2017). Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: A 14-year period time-series study. *Zoonoses and Public Health*.1-9. doi: 10.1111/zph.12412
4. Breilh, D., Texier-Maugein, J., Allaouchiche, B., Saux, M.C., Boselli, E. (2013). "Carbapenems". *Journal of Chemotherapy*. 25 (1): 1–17. doi:10.1179/1973947812Y.0000000032. PMID 23433439. S2CID 218660238.
5. Cain, C.L. (2013). Antimicrobial Resistance in Staphylococci in Small Animals. *Veterinary Clinic in Small Animals* 43: 19-40. doi: <http://dx.doi.org/10.16/j.cvsm.2012.09.003>.
6. Chambers, FH. (2003) Antimicrobianos. En Goodman & Gilman. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. McGraw Hill.
7. Christaki, E., Marcou, M., Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*. 88:26–40. doi: <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
8. Concilio, S., Iannelli, P., Sessa, L., Olivieri, R., Porta, A., De Santis, F., Pantani, R., Piotto, S.(2015). Biodegradable antimicrobial films based on poly (lactic acid) matrices and active azo compounds. *Journal of Applied Polymer Science*. 132, 42357. doi: <https://doi.org/10.1002/app.42357>.
9. Concilio, S., Sessa, L., Petrone, A.M., Porta, A., Diana, R., Iannelli, P., Piotto, S. (2017). Structure Modification of an Active Azo-Compound as a Route to New Antimicrobial Compounds. *Molecules*. 25;22(6). doi: pii: E875. doi:10.3390/molecules22060875.
10. Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*. 12: 3903–3910. doi: 10.2147/IDR.S234610
11. Fan, W.-J. , Shi, H., Tan, D.-Z., Xu, Z.-N., Yu, N.-K., Zhao, J.-L.(2018). Design of novel phenanthrocarbazole dyes for efficient applications in dye-sensitized solar cells. *Computational Materials Science*. 151, 34-40. doi: 10.1016/j.commatsci.2018.04.061.
12. García-Sánchez, J.E., García-Merino, E., Martín-del-Rey, A., García, E. (2012). Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? *Revista Española de Quimioterapia*. 25(2): 100-121.
13. Gupta, V. (2007) An update on newer beta-lactamases. *Indian Journal of Medical Research*. 126(5):417-27.
14. Hensel, N., Zabel, S., Hensel, P. (2016). Prior antibacterial drug exposure in dogs with meticolin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) pyoderma. *Veterinary Dermatology*. 27:72-e20. doi: 10.1111/vde.12292.

15. Hinks, D., Freeman, H.S., Nakpathom, M., Sokolowska, J. (2000). Synthesis and evaluation of organic pigments and intermediates non mutagenic benzidine analogs. *Dyes and Pigments*. 44:199-207. doi: 10.1016/S0143-7208(99)00078-9.
16. Hyun, J.-E., Chung, T.-H., Hwang, C.-Y. (2018). Identification of VIM-2 metallo-lactamaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with pyoderma and otitis in Korea. *Veterinary Dermatology* 29 (3), 186–e68. doi:10.1111/vde.12534.
17. Kofie, W., Dzidzoramengor, C., Adosraku, R.K. (2014). Synthesis and evaluation of antimicrobial properties of azo dyes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 7, 4: 398-401. doi: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/5799>.
18. Laborda, F. (2002). Conceptos microbiológicos. Principios básicos de la farmacología antibacteriana. En: Argentina FC, editor. *Farmacología de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Capital Federal: Alfa Beta 9.
19. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M E., Giske, C.G. et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18: 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
20. Katzung, B.G. (2007). Chapter 44. Chloramphenicol, Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, & Streptogramins». *Basic & Clinical Pharmacology* (9 edición). McGraw-Hill. 1064-1074. ISBN 0071451536.
21. Martinez, J.L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technology*. doi: [http://dx. Doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001)
22. Mulani, S.M., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre M.S., Pardesi K.R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*. Volume 10. Article 539. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539.
23. O'Connor, R., O'Dherty, J., O'Regan, A., Dunne, C. (2018). Antibiotic use for acute respiratory tract infections (ARTI) in primary care; what factors affect prescribing and why is it important? A narrative. *Irish Journal of Medical Science*. 1971-. doi: <https://doi.org/10.1007/s11845-018-1774-5>
24. Paz-Zarza, V.M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S., Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de infectología*. 36 (2), 180–189. doi:10.4067/s0716-10182019000200180.
25. Piotto, S., Concilio, S., Sessa, L., Porta, A., Calabrese, E.C., Zanfardino, A., Varcamonti, M., Iannelli, P. (2013a). Small azobenzene derivatives active against bacteria and fungi. *European Journal of Medicinal Chemistry* 68, 178–184. doi:10.1016/j.ejmech.2013.07.030.
26. Pujol, M., Limón, E. (2013) Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31(2): 108–113. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.001>
27. Puzniak, L., De Pestel D.D., Srinivasan, A., Ye, G., Murray, J., Merchant, S., DeRyke, A., Puzniak V.G., et al. (2019). Early dynamics of transmission and

- control of COVID-19: a mathematical modelling study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63:4, e02564-18. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.02564-18>.
28. Rezaei-Seresht, E., Salimi, A., Mahdavi, B. (2019). Synthesis, antioxidant and antibacterial activity of azo dye-stilbene hybrid compounds. *Pigment and Resin Technology*, 48(1), 84-88. doi: 10.1108/PRT-01-2018-0005.59.
 29. Ronson, T.K., Adams, H., Ward, M.D.(2005). Bis-dentate ligands containing two N,O-chelating pyrazolyl-phenolate units: double helical complexes with Co (II), Cu (II), and Zn (II). *Inorganica Chimica Acta*, 358 (6), 1943-1954. doi:10.1016/j.ica.2004.12.009.
 30. San Román L. (2002). Antibióticos IV: tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol y otros antibióticos. En Velasco A. Farmacología Fundamental. McGraw Hill.
 31. Santajit, S. e Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. Volume 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2475067>.
 32. Sessa, L., Concilio, S., Iannelli, P., De Santis, F., Porta, A., Piotto, S. (2016). Antimicrobial azobenzene compounds and their potential use in biomaterials. AIP Conference Proceedings 1727, 020018 (2016). doi: <https://doi.org/10.1063/1.4945973>.
 33. Torres, C., Zarazaga, M (2002). Antibióticos como promotores de l crecimiento en animales, ¿vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria* 16(2): 109 -112.
 34. Wang, M., Funabiki, K., Matsui, M. (2003). Synthesis and properties of bis(hetaryl)azo dyes. *Dyes and Pigments*. 57, 77-86. doi: 10.1016/S0143-7208(03)00011-1.
 35. Wolfbeis, O.S. (2005). Materials for fluorescence-based optical chemical sensors. *Journal of Materials Chemistry*. 15, 2657-2669. doi: 10.1039/b501536g.
 36. Xiong, W., Wang, Y., Sun, Y., Ma, L., Zeng, Q., Jiang, X., et al. (2018). Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*. 6:34. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0419-2>.

OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral se enumeran a continuación:

1.1. Analizar en profundidad y valorar la aplicabilidad del estudio de los datos de multirresistencia bacteriana obtenidos en la práctica clínica veterinaria.

El análisis de los datos de resistencia obtenidos de la práctica clínica diaria nos permitirá conocer los perfiles de resistencia, dilucidar ciertos mecanismos de resistencia y utilizando técnicas de modelización matemática avanzadas, podremos prever ciertas circunstancias clínicas, para instaurar tratamientos empíricos eficaces para un tipo de infecciones concreto.

1.2. Síntesis, caracterización y valoración de entidades químicas no catalogadas como antimicrobianos, como alternativa a la antibioterapia convencional.

Está demostrado que el mecanismo de resistencia antimicrobiana por parte de las bacterias es adaptativo y es resultado del enfrentamiento o exposición repetida de los microorganismos a los antimicrobianos. La valoración y uso de entidades químicas no convencionales y no catalogadas como antimicrobianos al uso permitirá evadir estos mecanismos de resistencia y obtener una respuesta eficaz.

1.3. Realizar los estudios de sensibilidad bacteriana frente a los distintos compuestos elegidos.

La realización de estudios de sensibilidad mediante protocolos estandarizados de carácter cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo nos permitirá obtener resultados fiables de las propiedades antimicrobianas de los compuestos y su comparación con otras entidades ya establecidas, para valorar su eficacia y aplicabilidad. Asimismo, será necesaria la evaluación de la toxicidad bacteriana de ciertos disolventes orgánicos necesarios en los procesos de estudio de estos compuestos.

1.4. Determinación del mecanismo de acción antimicrobiano.

El conocimiento del mecanismo de acción de los compuestos nos permitirá un conocimiento más certero y profundo de los mismos, que a su vez permitirá impedir, mediante un correcto uso, la aparición de mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos. Asimismo, permitirá establecer sus características de aplicación idóneas, como son la vía de administración o la naturaleza de los microorganismos a los que va destinado.

1.5. Estudio de la acción frente a la formación del biofilm bacteriano.

El biofilm es un factor de virulencia clave en patógenos que favorece la resistencia a los antibióticos y la cronificación de las infecciones. Por tanto, el efecto de los compuestos frente a este factor de virulencia es clave para evitar la aparición y desarrollo de multirresistencias. Cuanto más efectivo sea el compuesto frente al biofilm, más indefensos quedarán los microorganismos frente a la acción del mismo.

“El avance y perfeccionamiento de las Matemáticas está estrechamente relacionado con la prosperidad de la nación”

Napoleón Bonaparte

CAPÍTULO PRIMERO:

APLICACIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO PREDICTIVO PARA LA TERAPIA DE INFECCIONES POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MULTIRRESISTENTES

“Few would take issue with the idea that 2020 was a challenging year. The work you chose to publish with us is, more than ever, the result of passion, dedication and hard work, in often very difficult circumstances.”

Philippe Terheggen. *Managing Director Elsevier Journals.*
Recibido el 26 de enero de 2021

Índice

1. Introducción y antecedentes
2. Objetivos
3. Materiales y métodos
4. Resultados
 - 4.1 Datos de sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a los diferentes antimicrobianos
 - 4.2 Implementación del modelo matemático
5. Discusión
6. Conclusiones
7. Referencias

1. Introducción y antecedentes

Las infecciones multirresistentes, definidas por estar causadas por un microorganismo que es resistente a 3 o más familias de antibióticos, son un problema en auge y que supone una gran amenaza para la salud pública, siendo la causa de más de 700.000 muertes anuales en todo el mundo (Rubin et al., 2008, Aloush et al. 2006., Van Duin y Paterson 2016). El último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) constata que, si no se toman medidas ante este tipo de infecciones, se estima que para el año 2050 provocarán más muertes que el cáncer, pudiendo llegar a ser más de 10 millones de fallecimientos anuales y causar un daño en la economía de dimensiones catastróficas.

Por su naturaleza, este tipo de infecciones son un desafío terapéutico tanto en medicina humana como en veterinaria, dado que estas bacterias han desarrollado mecanismos muy complejos para resistir a la acción de los distintos antimicrobianos desarrollados hasta la actualidad y además, pueden transmitirlos tanto verticalmente (a sus descendientes) como horizontalmente (a otras bacterias), lo que supone un factor extra de expansión de esta capacidad de resistencia (Rubin et al., 2008, Aloush et al., 2006).

En particular, *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos más virulentos y que además posee una notoria capacidad de desarrollar y adquirir fácilmente este tipo de resistencias a los antimicrobianos. Se trata de un bacilo Gram negativo (**Figura 1**) que es muy ubicuo en el medio y que es capaz de resistir condiciones ambientales extremas, persistiendo en agua y suelo durante largos periodos de tiempo (Paz-Zarza et al., 2019, Hyun et al., 2018).

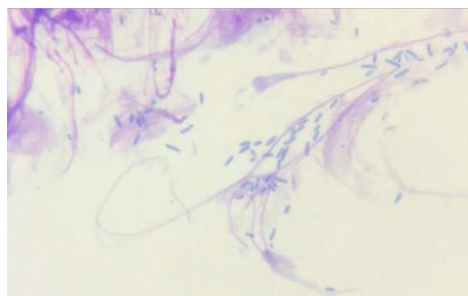


Figura 1. Ctología de exudado purulento en el que se pueden observar numerosos bacilos (*Pseudomonas aeruginosa*).

Por tanto, su gran capacidad de resistencia en el medio y su ubicuidad, así como la notoria capacidad de desarrollar y adquirir las resistencias a los fármacos antimicrobianos hacen que se trate de un patógeno potencialmente muy peligroso. De hecho, lidera la lista de patógenos responsables de infecciones nosocomiales y supone un 10 % del total de las infecciones contraídas en centros hospitalarios. En numerosas ocasiones estas infecciones son de carácter grave y ponen en peligro la vida del paciente, debido a la baja sensibilidad de esta bacteria a la mayoría de antibióticos disponibles (Rubin et al., 2008, Van Duin y Paterson 2016, Paz-Zarza et al., 2019). De hecho, numerosos estudios constatan una mortalidad en torno al 40% en neumonías, asociadas o no a respiradores, y bacteriemias adquiridas en hospitales (Puzniak et al.,

2019). Asimismo, según datos de las Sociedades Españolas de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), de Farmacia Hospitalaria (SEFH), y de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene, en España fallecen ocho veces más personas por infecciones multirresistentes que en accidentes de tráfico.

En este sentido, *Pseudomonas aeruginosa* se aísla aproximadamente en un 20% de las otitis bacterianas caninas, que a su vez suponen entre un 50 y 60% de todas las otitis en el perro. Se trata de un patógeno oportunista que coloniza el conducto auditivo cuando éste experimenta un cambio significativo en sus condiciones de humedad, temperatura, pH y microbioma. Por tanto, su aislamiento es casi en su totalidad en casos de otitis crónicas que además han recibido numerosos tratamientos antibióticos previos. La patología primaria que más frecuentemente da lugar a este escenario es la Dermatitis Atópica Canina (DAC). Se trata de una enfermedad alérgica de carácter crónico que provoca una inflamación cutánea, incluyendo los conductos auditivos, que si no se controla, da lugar a otitis recurrentes. Numerosas razas como West Highland white terrier, bulldogs, american staffordshire terrier, pitbull terrier, o labrador retriever entre otras, presentan una alta prevalencia de esta condición alérgica, aunque también se puede presentar en mestizos. Como hemos mencionado con anterioridad, *P. aeruginosa* posee una gran capacidad para desarrollar resistencias a múltiples antibióticos y de familias distintas. La resistencia a diferentes antibióticos de cada especie bacteriana depende de varios factores, entre los que destacan la exposición a tratamientos antimicrobianos previos y la zona geográfica (Cole et al., 2005; Nuttall y Cole 2001; Huerta et al., 2011, Hnilica y Patterson 2017). Por todos estos motivos, es importante la realización de estudios de sensibilidad o antibiogramas siempre que se sospeche de una infección por un microorganismo de estas características, aunque en ocasiones no será posible bien por motivos económicos o porque la gravedad del cuadro haga que sea necesario un inicio inminente del tratamiento. Es importante destacar que es un patógeno que afecta a personas y a animales indistintamente y que además, se puede transmitir entre estas especies, lo que hace que los datos obtenidos, a pesar de ser de infecciones en perros, sean significativos. De hecho, numerosos estudios han demostrado su capacidad zoonótica, es decir, su transmisión de mascotas a propietarios. El contacto cercano entre propietarios y sus animales constata un riesgo de transmisión significativo (Hyun et al., 2005, Pomba et al., 2016, Pye et al., 2013). Asimismo, es importante destacar que existen restricciones de acceso y prescripción de antibióticos en Medicina Veterinaria por motivos de salud pública, lo que en muchas ocasiones, debido a la presencia de las resistencias, dificulta mucho la instauración de una terapia adecuada. La Agencia Europea del Medicamento, en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) crearon el primer grupo de expertos para la categorización de los antibióticos basándose en el posible riesgo para la salud pública (AMEG, antimicrobial expert group). Por tanto, los diferentes grupos de antibióticos se clasificaron en distintos niveles de seguridad (European Medicines Agency (EMA), 2019):

- Categoría A, “AVOID” (evitar): fármacos cuyo uso está prohibido su uso en animales destinados a la alimentación y sólo se pueden administrar en animales de compañía en ocasiones excepcionales, siempre valorando el riesgo para la

salud pública. En esta categoría se incluyen los carbapenemes, gliciliclinas, monobactamas y amidinopenicilinas entre otros.

- Categoría B, “RESTRICT”(restringido): se incluyen las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, quinolonas y polimixinas como la colistina. Estos antibióticos se deben usar únicamente cuando no sea posible el uso de otros pertenecientes a las categorías C o D y siempre basados en estudios de sensibilidad del patógeno a tratar.
- Categoría C, “CAUTION” (precaución): aminoglucósidos, aminopenicilinas en combinación con inhibidores de las betalactamasas, anfenicoles, cefalosporinas de primera y segunda generación, macrólidos, lincosaminas. Estos fármacos deberán usarse sólo en caso de no poder utilizar un principio activo perteneciente a la categoría D.
- Categoría D, “PRUDENCE”(prudencia): aminopenicilinas sin inhibidores de las betalactamasas, bacitracina, nitroimidazoles y derivados de los nitrofuranos de uso veterinario, penicilinas. Estos fármacos no carecen de riesgo de generación de resistencias. Su uso debe ser con responsabilidad y estar justificado.

Por otro lado, varios estudios realizados en diferentes países muestran que en el caso de *Pseudomonas* spp., los perfiles de resistencia a antibióticos difieren en función de la zona geográfica (Huerta *et al.*, 2011). Este hecho resalta la necesidad de realizar estudios de sensibilidad específicos (antibiogramas) en todos los casos de sospecha de infección dónde citológicamente observemos la presencia de bacilos que puedan ser compatibles con *Pseudomonas* spp.

Situaciones como las causadas por este patógeno dejan gran constancia de la necesidad de la instauración de varias medidas como son un correcto uso de los antimicrobianos disponibles, ya que su uso indiscriminado e incorrecto es la causa del desarrollo de las resistencias, así como la implementación de herramientas que permitan predecir y prever el comportamiento epidemiológico de estos patógenos y que por ende, permitan establecer medidas eficaces para su prevención, diagnóstico y tratamiento. Afortunadamente, actualmente están a disposición numerosas herramientas tecnológicas de análisis de datos que permiten implementar dichas medidas, teniendo una repercusión positiva a muchos niveles, desde la salud hasta la economía. Una de estas herramientas es la modelización matemática. Se basa principalmente en el uso de programas informáticos en los que se implementa computacionalmente un modelo matemático permitiendo simular el comportamiento de una epidemia (Fresnadillo *et al.*, 2013). Es importante resaltar que, el modelo matemático es la pieza clave sobre la que se basa la herramienta informática de simulación, y para ello, la previa comprensión de la dinámica y evolución de la propia enfermedad infecciosa es imprescindible. Por tanto, el objetivo principal de la su utilización es el de traducir los problemas a un lenguaje matemático para poder ser analizado posteriormente para entender los mecanismos que lo rigen. Es obvio que se trata de una herramienta de investigación muy importante y complementaria a métodos de experimentación y teóricos. Por tanto, los modelos matemáticos se consideran representaciones simplificadas de naturaleza matemática de un fenómeno concreto y se caracterizan por hacer suposiciones en base a una serie de variables, parámetros y relaciones funcionales entre ellos, plasmando finalmente unas hipótesis sobre lo estudiado, que

podremos comparar con datos empíricos obtenidos a partir de la observación del fenómeno real. Si se observa que las predicciones realizadas por el modelo se ajustan a lo que está aconteciendo en la realidad, se podrá afirmar que el modelo es adecuado. Si por lo contrario no se ajusta, el proceso de modelización se deberá iniciar de nuevo revalorando las variables a tener en cuenta. La gran mayoría de los modelos matemáticos se basan en el uso de ecuaciones diferenciales ordinarias, lo que los hace ser de carácter continuo y determinista. Los modelos continuos se caracterizan por que las variables pueden tomar un número infinito de valores dentro de un rango determinado. Asimismo, los modelos deterministas son aquellos cuyos parámetros y variables no son de naturaleza aleatoria (Fresnadillo et al 2013). Dentro de estos modelos, los modelos SIR y SIRC juegan un papel crucial. Así, Kermack y McKendrick (Kernack y McKendrick 1927, 1932, 1933) propusieron, a finales del primer cuarto del siglo XX, un modelo compartimentado basado en asunciones de las tasas de flujo entre diferentes grupos de individuos de una misma población. Básicamente, la población se divide en tres grupos: susceptibles (S), que son los individuos que no están infectados aún pero que pueden infectarse, infectados (I) y recuperados (R), los cuales no pueden reinfectarse. Desde que Kermack y McKendrick propusieron el modelo SIR, numerosos autores han trabajado para implementar mejoras en el mismo, con el objeto de que pudiera ser aplicable a situaciones más complejas (Caraballo y Han 2016, Caraballo y Colucci 2017). De entre esas modificaciones destacamos el modelo SIR con reinfección, denominado SIRC, el cual contempla que los individuos recuperados puedan ser susceptibles de volver a infectarse.

El modelo SIRC se describe matemáticamente con la siguiente serie de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dS}{dt} = \Lambda(S + I + R) - \beta SI - \mu S$$

$$\frac{dI}{dt} = \beta SI - (\alpha + \kappa + \mu)I + \gamma R$$

$$\frac{dR}{dt} = \kappa I - (\mu + \gamma)R$$

Dónde :

- $S=S(t)$ indica el número de individuos susceptibles en un tiempo determinado.
- $I=I(t)$ indica el número de individuos infectados en un tiempo determinado.
- $R=R(t)$ indican el número de individuos recuperados en un tiempo determinado.
- Λ corresponde a la tasa de natalidad
- μ corresponde a la tasa de mortalidad.
- β es el coeficiente de transmisión de la enfermedad.

- α corresponde a la tasa de mortalidad de la infección.
- κ indica la tasa de recuperación de los infectados.
- Υ corresponde a la tasa de reinfección.

Todas las constantes son positivas. El flujo entre poblaciones se indica en el siguiente esquema (**Figura 2**):

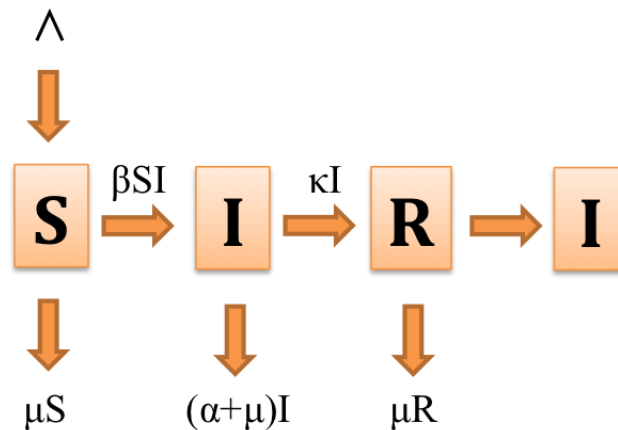


Figura 2: Esquema del flujo entre las poblaciones de individuos susceptibles (S), Infectados (I), recuperados (R) y reinfectados (I)

La presentación del modelo matemático por parte de Kermack y McKendrick supuso el inicio de la ciencia conocida como Epidemiología Matemática moderna. A partir de entonces, se han empleado numerosos modelos matemáticos en una amplia variedad de enfermedades infecciosas de gran importancia, como la tuberculosis (Wu et al., 2010, Waaler et al., 1962), meningitis meningocócica (Coen et al., 2000), gripe A(H1N1) (Balcan et al., 2009, Coburn et al., 2009), enfermedad de Chagas (Inaba y Sekine 2004), SARS (Choi et al., 2004, Kwok et al., 2007), viruela (Phkusa et al., 2005), SIDA (Wassertein-Robbins, 2010, Mesa-Mazo et al., 2010), cólera (Andrews y Basu, 2011), o malaria (Chitnis et al., 2010).

De manera muy reciente, debido a la crisis sanitaria causada por la pandemia causada por el Coronavirus (SARS-Cov-2), este tipo de modelos están siendo una herramienta clave para su gestión en numerosos países de todo el mundo y para la toma de decisiones de acciones futuras, basándose en la dinámica del contagio, con y sin medidas de intervención, y sobre el comportamiento del virus permitiendo realizar predicciones acerca de aspectos tan variados como son la distribución del tiempo de incubación y contagio, duración de la fase activa de la enfermedad, tasa de letalidad por edad, distribución de la gravedad y por tanto de la necesidad de recursos sanitarios como camas de UCI y en planta de hospitalización (Wu et al., 2019, Cortés et al., 2020). En España se han realizado y publicado numerosos estudios epidemiológicos en los que se utiliza la modelización matemática como herramienta esencial. Un ejemplo es el del equipo de Data Scientists de Mática Partners, con el conocimiento aportado por el Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias de la Universidad de las Palmas de Gran Canarias, que ha desarrollado un simulador de la

propagación del virus COVID-19. Para ello se ha basado en el modelo SEIR. El código base es una transcripción del código proporcionado por Gabriel Goh, publicado en <https://gabgoh.github.io/COVID/> como una “calculadora epidemiológica” online que permite una actualización a tiempo real de los datos. El modelo de Gabriel evoluciona el modelo SEIR incluyendo 3 estados de recuperación del virus (sintomatología leve, severa y severa en hospital). Este modelo, a diferencia del SIRI, no tiene en cuenta los individuos re-infectados. Otro ejemplo es el del estudio realizado por el Grupo de investigación MUNQU (Modelling Uncertainty Quantification) del Instituto Universitario de Matemática Multidisciplinar, de la Universidad Politécnica de Valencia, que implementa un modelo Markovian-SIR (Cortés et al., 2020). De la misma manea, a nivel internacional también se han realizado numerosos estudios. La ciudad de Wuhan en China, considerada el origen de la pandemia, ha sido objeto de estudio desde un primer momento. Ya en el mes de enero de 2020 Wu et al., publicaron un trabajo en el que propusieron un modelo SEIR (susceptibles, expuestos, infectados y recuperados), que no tiene en cuenta los re-infectados, para simular la dinámica de la infección en la ciudad de Wuhan desde el mes de diciembre de 2019. Asimismo, transformaron este modelo SEIR en un modelo “SEIR-meta-population” para simular el avance y extensión del virus entre otras ciudades de China (**Figura 3**). Estos estudios se están realizando en un gran número de ciudades de todo el mundo. Dado que se trata de un problema muy reciente y que no existen antecedentes, actualmente existen numerosos estudios en curso que se basan en la información obtenida en estos meses de pandemia y presentan continuas actualizaciones es estos modelos para que se adecuen de manera más precisa y fiable. Toda esta situación evidencia, más si cabe, que la utilización de la modelización matemática como una parte fundamental y complementaria a la investigación de enfermedades infectocontagiosas aporta grandes avances.

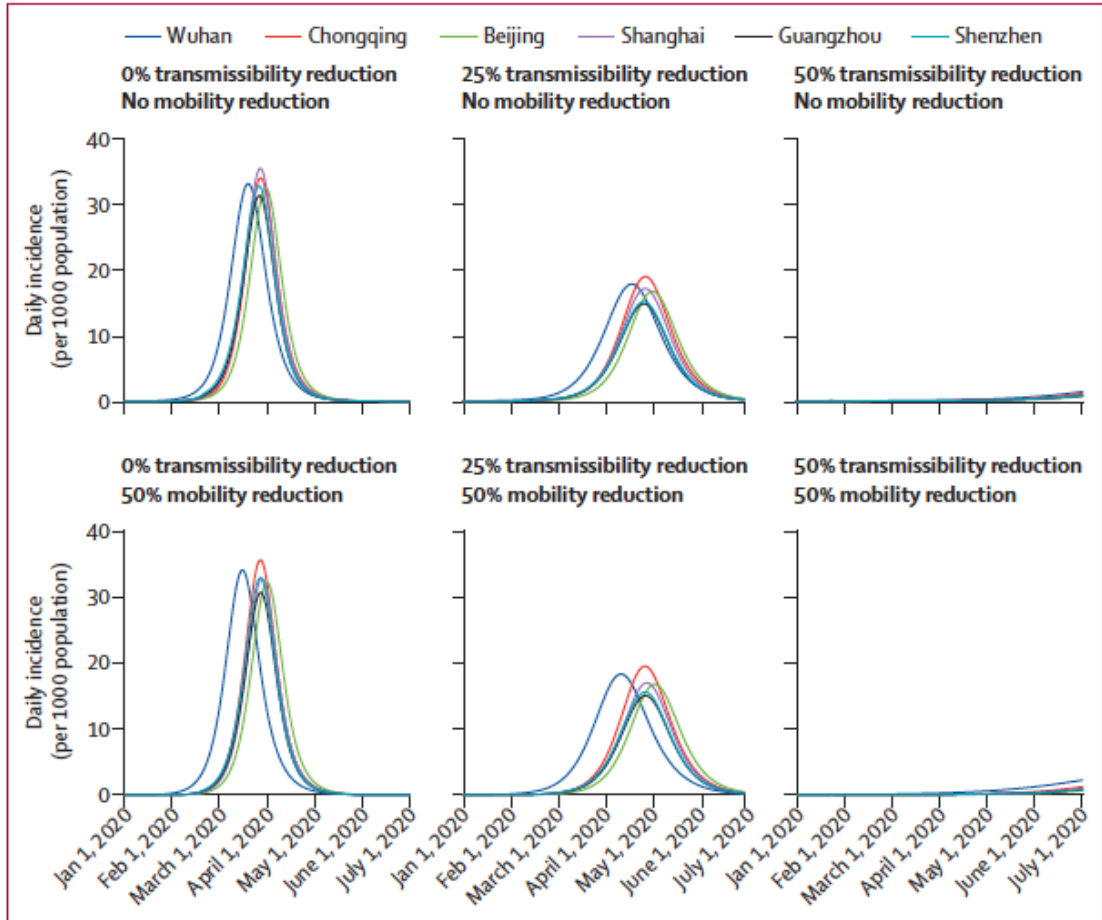


Figura 3: Predicciones epidémicas de la dinámica de infección por coronavirus en diferentes ciudades chinas contemplando diferentes escenarios de reducción en la transmisibilidad y en la movilidad entre ciudades (Wu et al. 2020).

2. Objetivos.

Los objetivos se detallan a continuación:

1. Evidenciar y estudiar en profundidad de las tasas de resistencia a los fármacos antibióticos generados por el patógeno *Pseudomonas aeruginosa* en relación a las diferentes familias, subfamilias y generaciones de antibióticos, así como su relación con el mecanismo de acción y el impacto en la aplicabilidad terapéutica.
2. Implementar, basándose en los datos de resistencias previos, un modelo matemático SIRI que realiza simulaciones numéricas dinámicas, es decir que contemplan un tiempo determinado, para concretar un panel de antibióticos aplicables de manera empírica en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

Aunque el protocolo a seguir ante la sospecha de una infección multirresistente es el de realizar un cultivo y un antibiograma, que permitirá conocer a qué antibióticos es sensible o resistente el patógeno para poder instaurar un tratamiento basado en la evidencia (Van Duin y Paterson, 2016), existen ocasiones en que su realización no es posible, bien por motivos económicos, de disponibilidad de recursos o porque la gravedad del paciente no permita la espera a los resultados, ya que es una prueba que suele demorarse varios días. Por tanto, la finalidad de la implementación de esta herramienta matemática es el de, basándose en datos epidemiológicos y de sensibilidad previos de esta bacteria en concreto, predecir y determinar un panel de antibióticos que puedan usarse en nuestra zona geográfica, con una garantía de éxito de más de un 90%, evitando así el desarrollo de resistencias y permitiendo la curación del paciente.

3. Materiales y métodos.

Para la realización de este estudio se recabaron los datos de sensibilidad antimicrobiana de 40 casos de otitis externa por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en perros atendidos en dos centros clínicos veterinarios de referencia en las provincias de Sevilla y Córdoba (Servicio de Dermatología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba (UCO), a cargo de D. Pedro Ginel Pérez y en el Centro Veterinario Aljarafe Norte) realizados por 6 laboratorios acreditados diferentes: Laboratorio Veterinario Garfia (Córdoba), Laboratorios Gasset (Granada), Laboratorios IDEXX (Barcelona); Univet (Barcelona) y Laboklin (Madrid). En pacientes con sintomatología de otitis purulenta compatible con un cuadro causado por *Pseudomonas aeruginosa*, se tomaron muestras para una evaluación in situ de los microorganismos causantes de la otitis. Si en la citología se evidenciaba la presencia de bacilos (**Figura 1**), se procedía a una toma de muestra utilizando un hisopo estéril y se enviaron a laboratorios especializados para la realización de los cultivos y estudios de sensibilidad.



Figura 4. Otitis externa purulenta causada por *Pseudomonas aeruginosa* en un perro.

En todos los laboratorios, dichos análisis identificaron el patógeno *Pseudomonas aeruginosa* y se realizaron siguiendo el método estandarizado de Kirby-Bauer, también conocido como test de sensibilidad por difusión en disco, siguiendo las guías del Instituto Clínico de Estándares de Laboratorio o CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)(Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2019). Este método consiste en, sobre la superficie de una placa de agar Müeller-Hinton, medio específico para este tipo de ensayos, compuesto por 2.0 g de extracto de carne, 17.5 g/L de hidrolizado de caseína, 1.5 g/L de almidón, 17.0 g /L de agar y con un pH ajustado a 7.3 ± 0.1 a 25°C , se inocula una cantidad estandarizada de bacterias y se realiza una siembra en césped la cepa a testar. A continuación, se colocan discos estériles estandarizados proporcionados por casas comerciales, impregnados con una concentración de antibiótico determinada, normalmente la concentración mínima inhibitoria (CMI), sobre la placa y se incuba durante 18-24 horas a 37°C . La selección de antibióticos a testar dependerá del propio microorganismo causante de la infección y del lugar anatómico de la misma. Por tanto, el antibiótico difundirá de forma radial desde el disco hacia el agar, y una vez incubada las placas, se medirán los halos de inhibición de crecimiento formados alrededor de los discos (**Figura 5**). En función de dichos halos, se determina si el microorganismo testado es sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) a los distintos antimicrobianos testados mediante la consulta de las tablas de susceptibilidad publicadas anualmente por el CLSI (CLSI 2019, 2020).

Al tratarse de un estudio multicéntrico, el número total de principios activos que

incluyen los estudios de sensibilidad varían según el laboratorio. Laboratorios Gasset incluye 23 antibióticos, Garfia 22, IDEXX 20, Univet 16, Laboklin 14 y el Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Córdoba incluye 16. Los grupos antibióticos incluidos en todos los laboratorios son: cefalosporinas inhibidores de betalactamasas quinolonas (enrofloxacina), aminoglucósidos y sulfamidas potenciadas con trimetoprim. Las tetraciclinas (doxiciclina) y penicilinas (piperaciclina) se incluyen en 4 de los 5 laboratorios. La polimixina B es incluida en dos , al igual que los macrólidos, los anfenicoles y los monobactamas. Finalmente los carbapenems (imipenem) se incluyen en tres de ellos. A pesar de la falta de consenso con respecto al panel por parte de los laboratorios, el número de antibióticos incluidos en cada antibiograma es superior al de publicaciones previas, que oscila entre 8 (Guedeja-Marron et al., 1997) a 14 (Cole et al., 1998). En el presente trabajo se han dispuesto de más de 10 antibiogramas para 30 antibióticos diferentes, lo que supone un número de muestras muy significativo para su estudio.

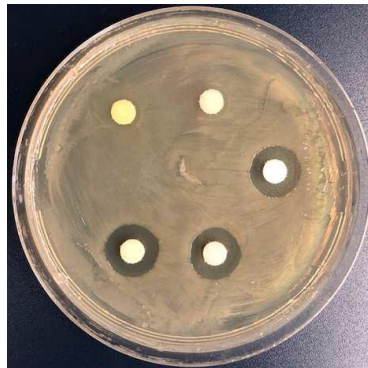


Figura 5. Ejemplo de test de sensibilidad por difusión en disco de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*.

Una vez recabados los datos de sensibilidad, se organizan en función del porcentaje de resistencias para que éstos pueden ser analizados e interpretados por el modelo SIRI:

- Grupo 1: Antibióticos con una tasa de resistencia del 100%.
- Grupo 2: Antibióticos con una tasa de resistencia cercana al 100%.
- Grupo 3: Antibióticos con una tasa de resistencia de entre el 50 y 30%.
- Grupo 4: Antibióticos con una tasa de resistencia de entre el 30 y 20%.
- Grupo 5: Antibióticos con una tasa de resistencia de entre el 20 y 10%.
- Grupo 6: Antibióticos con una tasa de resistencia de entre el 10 y 1%.
- Grupo 7: Antibióticos con una tasa de resistencia del 0%.

Para el análisis, este modelo utiliza un software de simulaciones numéricas llamado Matlab, abreviatura de MATrix LABoratory o laboratorio de matrices. Se trata de una herramienta muy utilizada en investigación y que permite la manipulación

de matrices, la representación de datos y funciones, la implementación de algoritmos, la creación de interfaces de usuario (GUI) y la comunicación con programas en otros lenguajes y con otros dispositivos *hardware* (MATLAB & Simulink R2016b (Professional & Student Versions)). En este modelo, como hemos mencionado con anterioridad, divide a la población en 4 grupos: Susceptibles (S), Infectados (I), Recuperados (R), e infectados de nuevo (I) y contempla las siguientes variables:

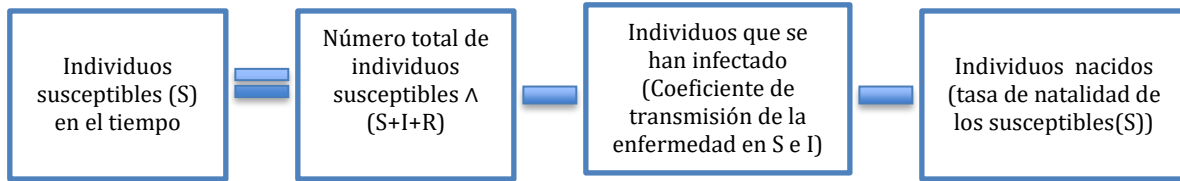
- Λ : número de individuos susceptibles. En este caso, $\Lambda = 152$, ya que partimos de 40 individuos infectados. La población total es de 192 individuos. Este parámetro se ha determinado teniendo en cuenta que el número de animales infectados por este patógeno es de 40 y que la prevalencia general otitis externa es del 10-20 %, de las que un 50-60 % son de origen bacteriano. A su vez un 20 % de las mismas son causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Nuttal, 2016).
- μ : tasa de natalidad, considerada 0.
- α : tasa de mortalidad, considerada 0.

En nuestro caso, tanto μ como α se consideran 0 ya que durante la duración del estudio, ningún individuo nació o falleció.

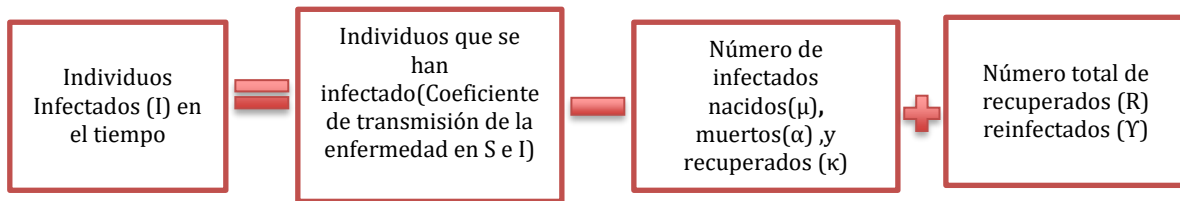
- β : coeficiente de transmisión de la enfermedad, considerado entre 0,1 y 1. Este dato no se conoce con exactitud y además dependerá del antibiótico al que se haga referencia.
- κ : tasa de infectados que pasan a recuperados, que varía en función del antibiótico.
- Υ : tasa de recuperados que pasan a infectados o tasa de reinfección, también determinada en función del antibiótico.
- t = tiempo del estudio, que es de 14 semanas.

Por tanto, la serie de ecuaciones diferenciales utilizadas por el modelo se podrían explicar de la siguiente manera (**Figura 6**):

$$\frac{dS}{dt} = \Lambda(S + I + R) - \beta SI - \mu S,$$



$$\frac{dI}{dt} = \beta SI - (\alpha + \kappa + \mu)I + \gamma R,$$



$$\frac{dR}{dt} = \kappa I - (\mu + \gamma)R.$$

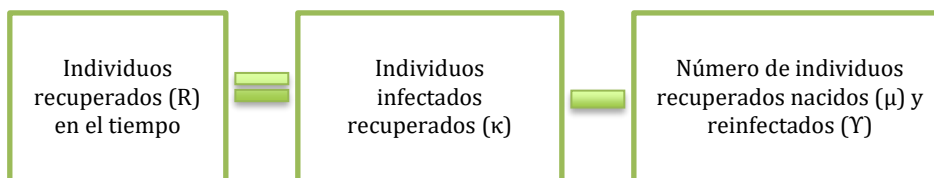


Figura 6: Ecuaciones diferenciales del modelo SIRI utilizado.

Para la implementación, comprensión y análisis posterior de los datos del modelo, se consideraron esenciales tres representaciones:

1. Figuras, que representan las simulaciones numéricas del modelo SIRI realizadas con un código desarrollado con el software Matlab, que permitieron determinar la dinámica de las poblaciones en el tiempo estimado y su comportamiento asintótico. En matemáticas puras y aplicadas, en particular en el análisis de algoritmos, el análisis asintótico es un método de descripción del comportamiento en el límite.

2. Tablas, en las que se plasmaron el número límite de los distintos grupos de individuos en función del uso de diferentes valores del coeficiente de transmisión de la enfermedad, así como en qué tiempo se alcanza dicho valor. Para ello se utilizó un código programado en Matlab. Estas tablas son muy útiles para convertir los datos de las simulaciones dinámicas en información numérica.

3. Diagramas de barras, donde se plasmaron el número final correspondiente a cada grupo de individuos de la población en función de diferentes valores del coeficiente de transmisión de la infección.

4. Resultados.

4.1 Datos de sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a los diferentes antimicrobianos.

En la siguiente tabla (Tabla 1) mostramos los datos obtenidos de los cultivos y antibiogramas realizados en el laboratorio.

FAMILIA	SUBFAMILIA	PRINCIPIO ACTIVO	TOTAL ENSAYOS	% ENSAYOS	TOTAL RESISTENCIAS	% RESISTENCIA	
Betalactámicos	Cefalosporinas	Cefalotina	17	42,50%	17	100%	
		Ceftazidima	24	60%	4	16,67%	
		Cefotaxima	19	47,50%	9	47,37%	
		Cefepime	19	47,50%	4	21,05%	
		Cefoxitina	19	47,50%	19	100%	
		Cefuroxima	18	45%	18	100%	
		Cefazolina	18	45%	18	100%	
		Ceftazidima/CA	17	42,50%	14	82,35%	
		Cefovecina	21	52,50%	20	95,24%	
		Cefalexina	20	50%	20	100,00%	
		Cefotaxima/CA	14	35%	14	100,00%	
		Ceftiofur	14	35%	14	100,00%	
		Cefpodoxima	11	27,50%	11	100,00%	
		Cefoperazona	2	5%	0	0,00%	
		Cefquinoma	1	2,50%	0	0,00%	
		Inhibidor beta-lactamasas	Amx-Clavulánico	40	100%	39	97,50%
			Ampicilina	30	75%	30	100,00%
			Piperacilina-tazobactam	17	42,50%	1	5,88%
		Carbapenem	Imipenem	28	70%	2	7,14%
			Ertapenem	13	32,50%	7	53,85%
		Meropenem	4	10%	0	0,00%	
	Monobactamas	Aztreonam	29	72,50%	6	20,69%	
	Penicilinas	Piperacilina	9	22,50%	0	0,00%	
		Ticarcilina	3	7,50%	0	0,00%	
		Penicilina G	1	2,50%	0	0,00%	
Aminoglicosidos		Tobramicina	33	82,50%	5	15,15%	
		Gentamicina	38	95%	9	23,68%	
		Amikacina	32	80%	2	6,25%	
		Neomicina	12	30%	6	50,00%	
		Kanamicina	1	2,50%	0	0,00%	
		Sisomicina	1	2,50%	0	0,00%	
		Estreptomina	1	2,50%	0	0,00%	
Quinolonas		Ciprofloxacina	35	87,50%	10	28,57%	
		Enrofloxacin	38	95%	13	34,21%	
		Marbofloxacina	21	52,50%	5	23,81%	
		Nalidixico c	15	37,50%	14	93,33%	
		Pradofloxacina	7	17,50%	2	28,57%	
		Levofloxacino	2	5%	0	0,00%	
		Acido oxolinico	1	2,50%	0	0,00%	
		Maxifloxacino	1	2,50%	0	0,00%	
		Lomefloxacina	1	2,50%	0	0,00%	
Tetraciclinas		Doxiciclina	14	35%	13	92,86%	
		Tetraciclina	6	15%	5	83,33%	
		Tigeciclina	2	5%	0	0,00%	
Afenicol		Cloranfenicol	12	30%	12	100,00%	
		Florfenicol	3	7,50%	3	100,00%	
Miscelánea		Polimixina B	19	47,50%	3	15,79%	
		Colistina	1	2,50%	0	0,00%	
		Acido fusídico	1	2,50%	1	100,00%	
		Fosfomicina	1	2,50%	1	100,00%	
Macrólido		Eritromicina	3	7,50%	1	33,33%	
Sulfamida		Sulfamidas + Trimetoprim	38	95%	38	100,00%	

Tabla 1. Relación de los antibióticos testados y sus correspondientes datos de resistencias.

Los antibióticos están organizados por familias, y como en el caso de los betalactámicos, también en subfamilias. Una familia de fármacos engloba una base de mecanismo de acción común. En el caso de las cefalosporinas y quinolonas, a su vez se diferencian en generaciones, en función de su espectro de microorganismos frente a los

cuales poseen actividad, el cual se va ampliando conforme se avanza de generación. Por ejemplo, las cefalosporinas de cuarta generación han incrementado su actividad frente a bacterias Gram negativas en comparación con las de primera y de segunda generación, y una mayor cobertura frente a bacterias Gram positivas que los agentes de tercera generación, así como actividad frente a *Pseudomonas* spp. y a algunas enterobacterias, incluyendo las que producen bectalactamasas (Martín-Aragón, 2011).

En los resultados obtenidos de los 51 fármacos antibióticos testados pudimos observar lo representado en la siguiente figura (Figura 7):

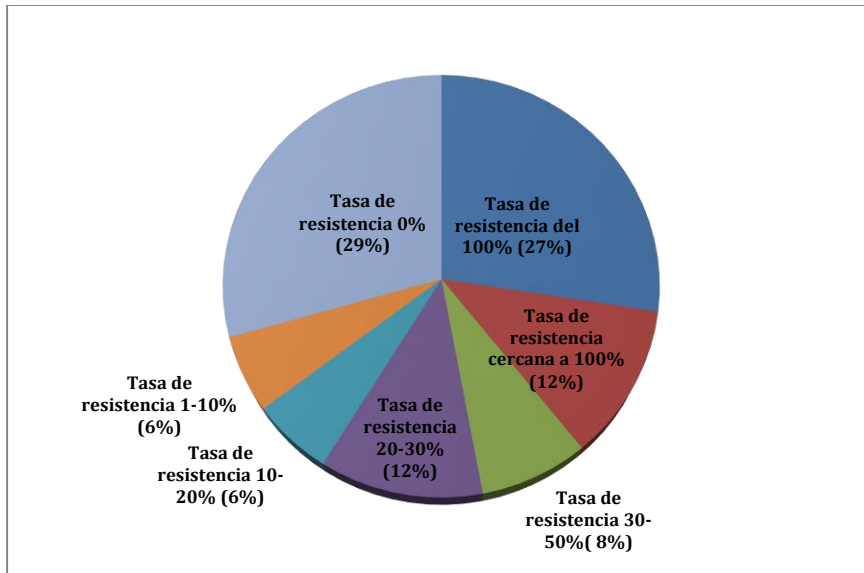


Figura 7. Diagrama de sectores que indica el porcentaje de antibióticos en función de su tasa de resistencia.

Los resultados muestran lo siguiente:

- Casi un tercio (27%) de los fármacos testados poseen una tasa de resistencia del 100%, por lo que son completamente inefectivos ante la infección por *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, un 12 % de los antibióticos poseen una tasa de resistencia de casi el 100 %, lo que también dará como resultado una inefectividad del tratamiento. Por tanto, un 39 % de los 51 antibióticos testados (20 fármacos en total) son completamente ineficaces en el tratamiento de la infección.
- Por otro lado, existe un 8% de antibióticos (4 de los 51) que poseen una tasa de resistencia del 30 al 50 %, por lo que, en el caso de que se usen, existe una probabilidad del 50-70% de que funcionen.
- Asimismo, un 12% (algo más de 6 fármacos de los 51) presentan una resistencia de entre el 20 y el 30%, lo que supondría una efectividad de entre el 70 y 80%.

- En cuanto a los fármacos que presentaron tasas de resistencias bajas, de entre el 10 y 20% y entre el 1 y 10%, ambos fueron del 6% (lo que equivaldría a 3 fármacos de los 51, por grupo).
- Finalmente, un 29 % de los fármacos testados, que son algo menos de 15 de los 51, presentaron una sensibilidad del 100%, es decir, una efectividad total frente a la infección.

A continuación, mostramos los datos en relación a cada familia de antibióticos:

1. Los **antibióticos betalactámicos (Figura 8)** actúan inhibiendo las fases finales de la síntesis de peptidoglicano, que es un polímero esencial para la formación de la pared bacteriana. Esta alteración de la pared desencadena una producción de enzimas autolíticas bacterianas que provocan su muerte. Por tanto, estos fármacos actúan cuando existe reproducción bacteriana, por lo que no afectará a microorganismos latentes o que carezcan de pared como los micoplasmas (Guía de Prescripción terapéutica. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Vademecum Internacional). Esta familia a su vez se divide en varias subfamilias: cefalosporinas, inhibidores de las betalactamasas, carbapenemes, monobactamas y penicilinas.

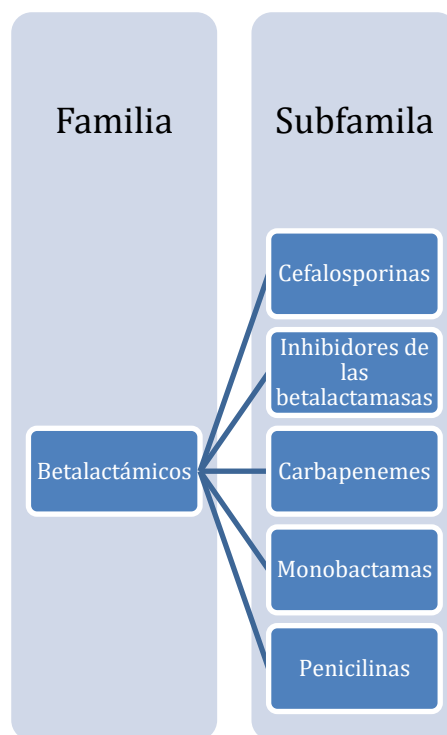


Figura 8: Familia de antibióticos betalactámicos y sus subfamilias.

1.1. En el caso de las cefalosporinas, antibióticos semisintéticos de amplio espectro derivados del antibiótico natural cefalosporina C, es una familia muy utilizada en el tratamiento de numerosas infecciones y que tienen un papel esencial en las estrategias terapéuticas de las enfermedades infecciosas bacterianas (Martín-Aragón 2011, Guía de Prescripción terapéutica (AEMPS), Vademecum Internacional), se pudo observar que de las 15 cefalosporinas testadas (**Tabla 2**), 8 mostraron una resistencia del 100%, siendo completamente ineficaces frente a *Pseudomonas aeruginosa*. De estas 8, 3 son de primera generación, 2 de segunda generación y 3 de tercera generación. Asimismo, 2 fármacos mostraron una tasa de resistencia cercana al 100%, siendo ambas de tercera generación. De los 5 fármacos restantes, 1, de tercera generación, mostró una tasa de resistencia de casi el 50%, 2 de ellas, de tercera y cuarta generación, de en torno al 20% y 2 de ellas, también de tercera y cuarta generación, mostraron una sensibilidad del 100%.

Tabla 2. Porcentaje de resistencia de las Cefalosporinas.

Cefalosporinas	Nº
Resistencia 100%	8/15
Resistencia 95,24%	1/15
Resistencia 82,35%	1/15
Resistencia 47,37%	1/15
Resistencia 21,05%	1/15
Resistencia 16,67%	1/15
Resistencia 0%	2/15

1.2. Los inhibidores de las betalactamasas (**Figura 9**) se unen de manera irreversible a estas enzimas bacterianas, impidiendo su acción (Martín-Aragón 2011, Guía de Prescripción terapéutica (AEMPS), Vademecum Internacional). En relación a esta subfamilia se pudo observar que la ampicilina presentó una tasa de resistencia del 100% y la amoxicilina-clavulánico muy cercana al 100% (97,5%). Ambos son antimicrobianos de amplio espectro utilizados muy frecuentemente en la clínica diaria. Por otro lado, piperacilina-tazobactam, fármaco de uso hospitalario, presentó una tasa de resistencia mucho menor, del 5,88%.

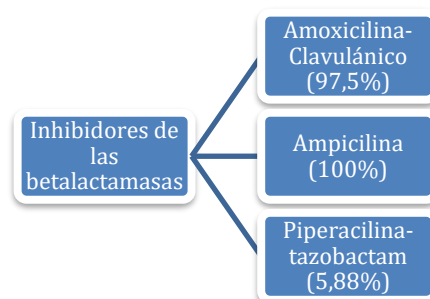


Figura 9: Subfamilia de antibióticos inhibidores de las betalactamasas.

1.3. En el caso de los carbapenemes (**Figura 10**), que se administran únicamente por vía intravenosa, poseen el mayor espectro de acción que se conoce incluyendo Gram positivos y Gram negativos así como gérmenes anaerobios. Es importante destacar que son potentes inductores de betalactamasas por lo que, aunque a los carbapenemes no les afecte, pueden inducir resistencias a otros betalactámicos (Martín-Aragón 2011, Guía de Prescripción terapéutica (AEMPS), Vademecum Internacional, Azanza Perea et al., 2000). Nuestros datos mostraron que el ertapenem mostró una tasa de resistencia de casi el 54%, mientras que el imipenem fue del 7,14% y el meropenem mostró una tasa del 0%.

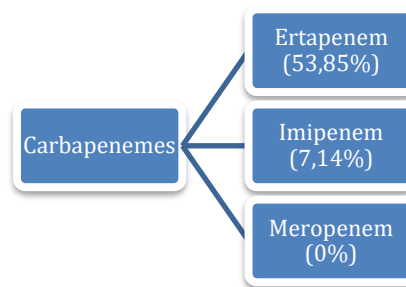


Figura 10: Subfamilia de antibióticos carbapenemes.

1.4. En cuanto a los monobactamas (**Figura 11**), que también se administran únicamente por vía parenteral, su espectro es específico de microorganismos Gram negativos aeróbicos, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Gilbert et al., 2006, Martín-Aragón 2011, Guía de Prescripción terapéutica (AEMPS), Vademecum Internacional). Los resultados revelaron que el aztreonam mostró una tasa de resistencia de casi el 21 %.



Figura 11: Subfamilia de antibióticos monobactamas.

1.5. Finalmente, la subfamilia de las penicilinas (**Figura 12**), comprende importantes fármacos de amplio espectro frente a gérmenes Gram positivos y negativos (Gilbert et al., 2006, Martín-Aragón 2011). Los datos mostraron que tanto la piperacilina, como la ticarcilina y la penicilina G mostraron una tasa de resistencia del 0%.

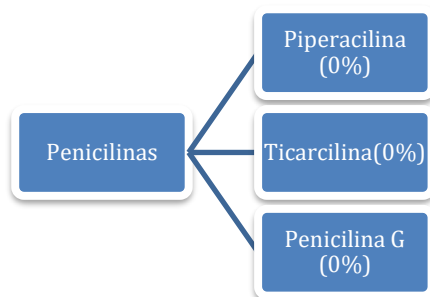


Figura 12: Subfamilia de antibióticos penicilinas.

- El mecanismo de acción de los fármacos pertenecientes a la familia de los **aminoglucósidos (Figura 13)** se caracteriza por unirse a los ribosomas bacterianos, lo que ocasiona la producción de proteínas bacterianas defectuosas, o bien la inhibición total de la síntesis proteica de la bacteria. No se absorben por vía oral, el único principio activo utilizado por esta vía es la neomicina para el tratamiento de infecciones intestinales. Su espectro de acción es frente a bacilos Gram negativos aerobios, como es el caso de *Pseudomonas* spp. (Martín-Aragón 2011, Guía de Prescripción terapéutica (AEMPS), Vademecum Internacional). En los resultados pudimos observar que la neomicina mostró una tasa de resistencia del 50%, seguida de la gentamicina con un 23,68%, tobramicina con 15,15% y amikacina con 6,25%. Tanto la kanamicina como la sisomicina y estreptomycin mostraron 0% de resistencias.

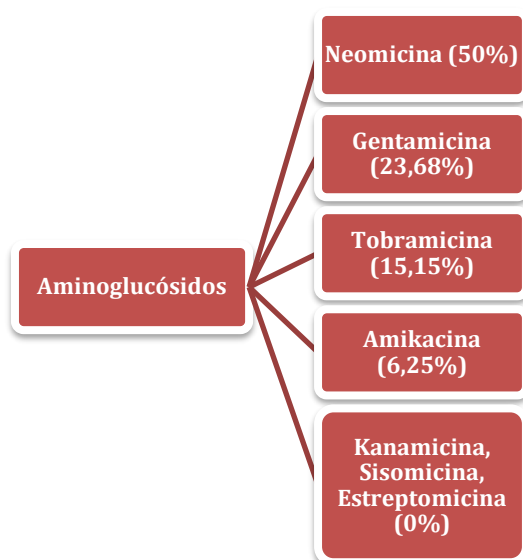


Figura 13: familia de antibióticos aminoglucósidos.

- Las **quinolonas (Figura 14)** son una familia de fármacos de origen sintético que actúan inhibiendo selectivamente la ADN-girasa bacteriana, enzima que interviene en el plegamiento de la doble hélice del ADN, y que es fundamental para su estructura. Todas son efectivas por vía oral y se pueden clasificar por generaciones (Marín-Carrillo, 2008) al igual que las cefalosporinas. En nuestro estudio pudimos observar que el nalixídico C mostró una tasa de resistencia de casi el 94%, seguido de enrofloxacin con una tasa del 34,21%, ciprofloxacino y pradofloxacino de en

torno al 29% y marbofloxacino con casi un 24%. El ácido oxonílico, levofloxacino, lomefloxacino y maxifloxacino mostraron un 0% de resistencias.

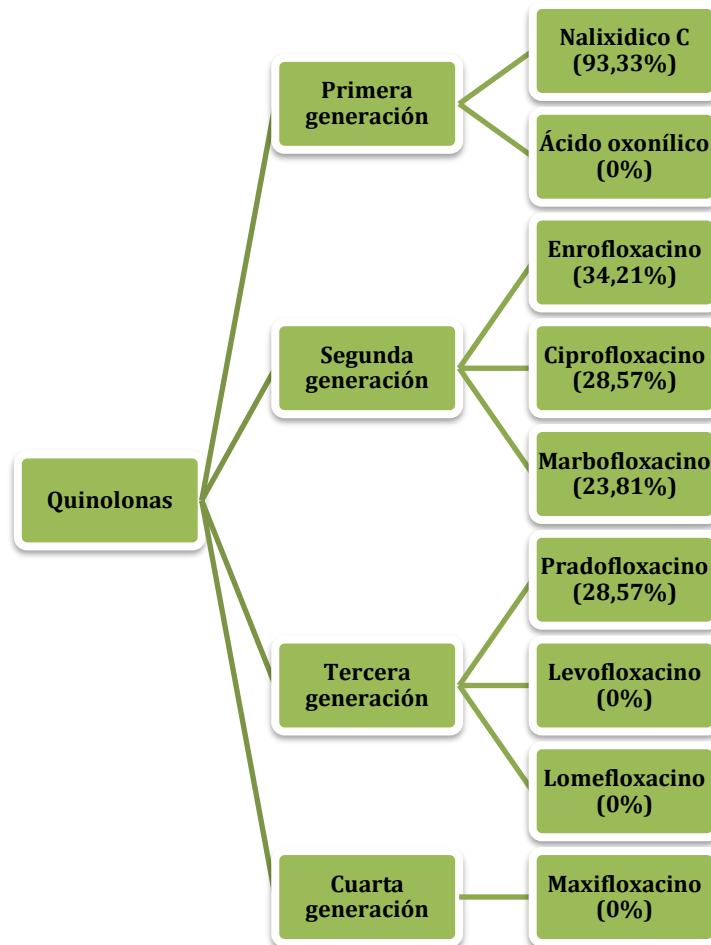


Figura 14: familia de antibióticos quinolonas.

- La familia de las **tetraciclinas (Figura 15)** actúa de manera similar a las penicilinas y aminoglucósidos interfiriendo en la síntesis proteica de las bacterias, pero a diferencia de estas familias, las tetraciclinas son generalmente bacteriostáticas a las concentraciones alcanzadas en los tejidos. Son activas por vía oral aunque la tigleciclina sólo se administra por vía intravenosa (Honorato-Pérez et al., 2000, Gilbert et al., 2006, Martín-Aragón 2011,). Tanto la doxiciclina como la tetraciclina mostraron unas tasas muy altas de resistencia, de 93 % y 84 % respectivamente. Por el contrario, la tigeiclina mostró un 0% de resistencia generada.

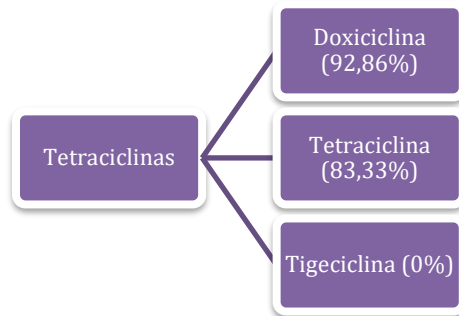


Figura 15: familia de antibióticos tetraciclinas.

5. Los **anfenicoles (Figura 16)**, al igual que en el caso anterior, también interfieren con la síntesis de proteínas bacterianas y son bacteriostáticos. El cloranfenicol fue el primer fármaco antibiótico de amplio espectro descubierto, siendo efectivo frente a gérmenes Gram positivos y negativos (Honorato-Pérez et al., 2000, Gilbert et al., 2006). En nuestro estudio, todos los fármacos de esta familia (cloranfenicol y florfenicol) mostraron una tasa de resistencia de un 100%.

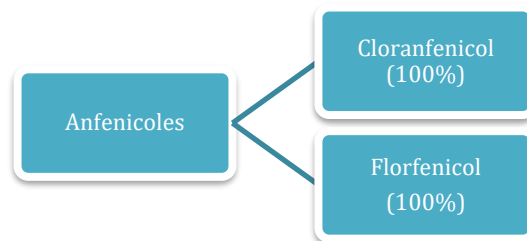


Figura 16: familia de antibióticos anfenicoles.

6. La familia de **miscelánea (Figura 17)**, que engloba a varios fármacos con diferentes mecanismos de acción como son polimixina B, colistina, ácido fuscídico y fosfomicina. La polimixina B y la colistina no se absorben por vía oral, pero muestran nefrotoxicidad y neurotoxicidad si se usan por vía sistémica. Por tanto, principalmente se han utilizado en infecciones gastrointestinales por su acción contra bacterias Gram negativas y en preparados tópicos (Honorato-Pérez et al., 2000, Azanza Perea et al., 2000, Gilbert et al., 2006). En nuestro estudio mostraron un 16 % y un 0% de tasa de resistencia respectivamente. En cuanto al ácido fuscídico, utilizado de forma tópica y sistémica, y la fosfomicina, usado de forma oral y parenteral, ambos presentaron una resistencia del 100 %.

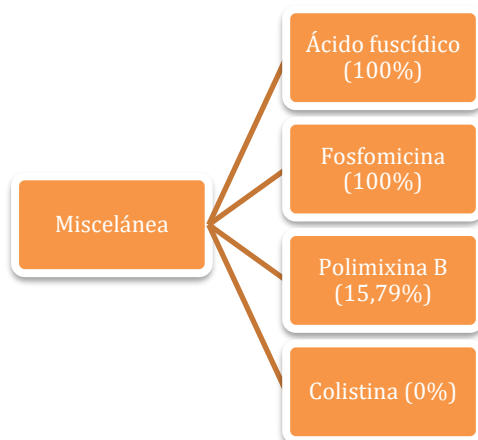


Figura 17: familia de antibióticos miscelánea.

7. Los **macrólidos (Figura 18)**, de espectro similar pero más amplio que las penicilinas, inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas por fijación a la subunidad 50S de los ribosomas. Pueden ser bacteriostáticos o bactericidas (Honorato-Pérez et al., 2000, Azanza Perea et al., 2000, Gilbert et al., 2006). Los datos obtenidos de la eritromicina mostraron que más de un 33% de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* eran resistentes a este antibiótico.



Figura 18: familia de antibióticos macrólidos.

8. Por último, las **sulfamidas (Figura 19)** es una familia de antibióticos de amplio espectro que inhibe la síntesis del ácido fólico en los microorganismos que son susceptibles. La mayoría se absorben por vía oral y también se aplican de manera tópica. En el presente estudio se testó la combinación sulfamida-trimetoprim. Éste último es una diaminopirimidina, que también inhibe la síntesis del ácido fólico pero en otra fase metabólica que las sulfamidas, por lo que se usa de manera sinérgica (Martín-Aragón 2011, Guía de Prescripción terapéutica (AEMPS), Vademecum Internacional). Los resultados mostraron una tasa de resistencia del 100 %.



Figura 19: familia de antibióticos sulfamidas.

4.2. Implementación del modelo matemático.

Como se ha mencionado anteriormente, se han realizado simulaciones numéricas dinámicas con el software Matlab de los diferentes grupos de antibióticos ordenados en grupos por tasa de resistencia. Para la comprensión y análisis de los resultados, cada simulación va acompañada de una tabla de datos numéricos y un diagrama de barras. Es importante resaltar que los resultados de las simulaciones de los antibióticos correspondientes a un mismo grupo poseen una misma estructura y tendencia, por lo que se realizará un análisis de una simulación representativa de cada grupo. Asimismo, todas las simulaciones muestran datos de dinámica poblacional que son lógicos y apoyan el comportamiento clínico y evolución de la enfermedad, por lo que el modelo es adecuado y por tanto, aplicable.

Las simulaciones se realizaron para varios valores de β o coeficiente de transmisión de la enfermedad, considerado entre 0,1 y 1, ya que es un dato que depende de circunstancias clínicas y del antibiótico que se utilice.

4.2.1 Fármacos con una tasa de resistencia del 100%. Cefalotina, cefoxitina, cefuroxima, cefazolina, cefalexina, ceftiofur, cefpodoxima, cefotaxima/CA, ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, ácido fuscídico, fosfomicina, sulfamida-tripetoprim.

En el diagrama de simulación numérica (**Figura 20**) podemos observar que, inicialmente existe una población susceptible de casi 150 individuos, que va disminuyendo conforme pasa el tiempo. Lo contrario ocurre con los individuos infectados, que al inicio partimos de 40 y conforme va pasando el tiempo, asciende a la totalidad de la población. Por último, en la dinámica de los individuos recuperados se puede observar que se mantiene en 0 durante todo el período de tiempo. Todos estos datos concuerdan con una tasa de resistencia del 100%, todos los individuos susceptibles van a infectarse y ninguno va a poder recuperarse puesto que el tratamiento es completamente inefectivo.

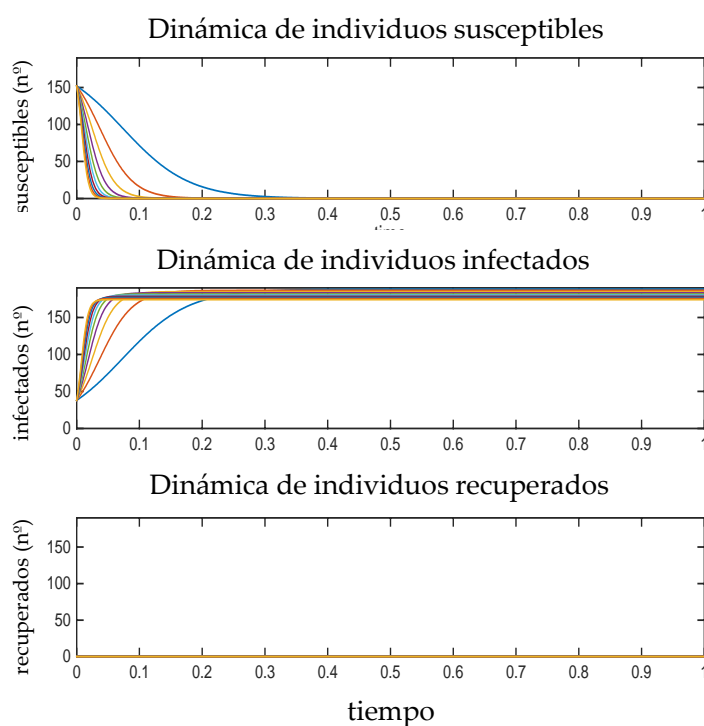


Figura 20: Modelización lineal de los fármacos con una tasa de resistencia del 100%.

La **Tabla 3** refleja el número límite o medición a tiempo final del experimento, de individuos de las tres poblaciones en función de los distintos valores del coeficiente de transmisión β . Se observa que cuanto menor es este coeficiente, para un mismo tiempo, el número de individuos infectados es menor, y cuanto mayor es éste número de individuos infectados aumenta. Asimismo, en este caso, el número de individuos recuperados es siempre 0.

Tabla 3: Número de individuos susceptibles, infectados y recuperados en función de distintos valores del coeficiente de transmisión β cuando los fármacos poseen una tasa de resistencia del 100%.

	Susceptibles		Infectados		Recuperados	
	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos
$\beta=0,1$	6,1075	0,9892	5,3200	186,0153	0	0
$\beta=0,2$	3,0450	0,9997	2,8175	185,0218	0	0
$\beta=0,3$	2,0300	0,9911	1,8200	183,0880	0	0
$\beta=0,4$	1,5225	0,9821	1,4525	182,0727	0	0
$\beta=0,5$	1,2250	0,9368	1,1025	180,0496	0	0
$\beta=0,6$	1,0150	0,9635	0,9800	179,0448	0	0
$\beta=0,7$	0,8750	0,9183	0,7875	177,0125	0	0
$\beta=0,8$	0,7700	0,8748	0,7350	176,0281	0	0
$\beta=0,9$	0,6825	0,8819	0,6125	174,0724	0	0
$\beta=1$	0,6125	0,8888	0,5950	173,1766	0	0

El diagrama de barras (**Figura 21**) representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión. Al igual que anteriormente, cuanto menor es el coeficiente de transmisión, menor es el número de individuos infectados en un mismo tiempo, por ende, cuanto mayor es éste, más individuos se habrán infectado para ese tiempo. Los individuos recuperados se mantienen a 0, ya que en este grupo, la tasa de resistencia es del 100 %, por lo que estos fármacos son completamente inefectivos para el tratamiento de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

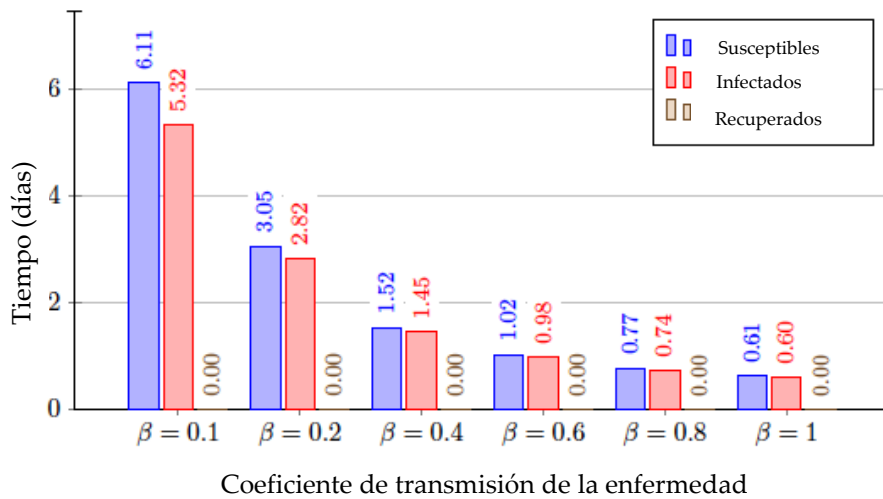


Figura 21: Diagrama de barras que representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión en los fármacos con una tasa de resistencia del 100%.

4.2.2 Fármacos con una tasa de resistencia cercana al 100%. Cefovecina 95,24%, amoxicilina-clavulánico 97,50%, nalixídico C 93,33%, doxiciclina 92,86%, ceftazidima 82,35%, tetraciclina 83,33%.

Este diagrama de simulación numérica (**Figura 22**) corresponde concretamente al caso de la cefovecina, como ejemplo representativo del grupo, con una tasa de resistencia del 95,4%. Apreciamos que, de una manera similar al caso anterior, los individuos susceptibles parten de la población susceptible (152 individuos) y que conforme pasa el tiempo desciende hasta 0, puesto que han pasado a estar infectados. De hecho, la simulación de los individuos infectados es inversa a la de susceptibles, ya que partimos de la población infectada inicial de 40 individuos, y conforme pasa el tiempo asciende hasta la población total. En función del coeficiente de transmisión de la enfermedad, habrá mayor o menor número de individuos infectados para un mismo tiempo, de ahí que las líneas de colores se separen, aunque la tendencia final es hacia un mismo punto. En los recuperados podemos observar que no es 0, pero es muy cercano a éste, ya que siendo la tasa de casi el 100%, los individuos recuperados serán muy pocos.

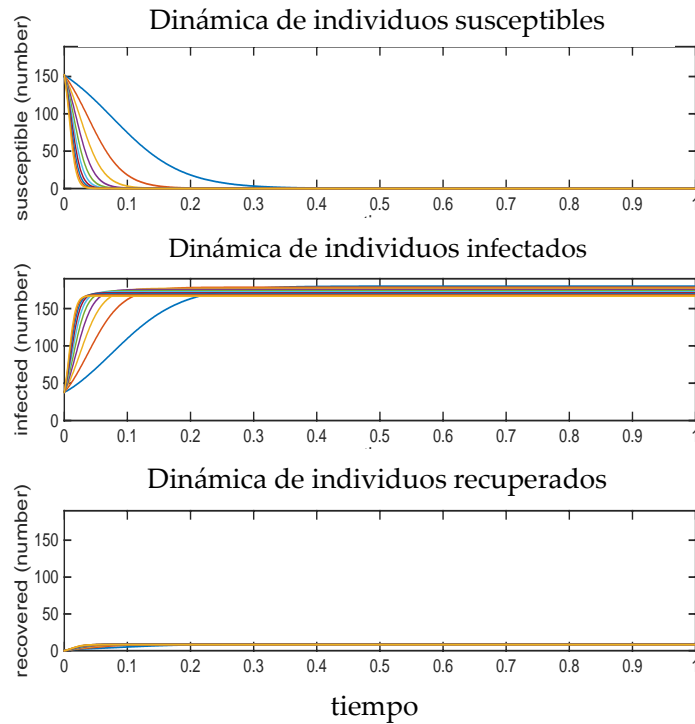


Figura 22: Modelización lineal de los fármacos con una tasa de resistencia cercana al 100%.

Como hemos mencionado con anterioridad, la **Tabla 4** muestra el valor límite de cada población en función del coeficiente de transmisión. Observamos que, como siempre ocurre, cuanto menor sea el valor del coeficiente de transmisión, menor será el número de individuos que se infectan en un mismo tiempo. Por otro lado, en este caso, el número de individuos recuperados es muy pequeño, pero queda reflejado y se observa que no varía en función del coeficiente de transmisión de la enfermedad, puesto que depende de la tasa de resistencia que muestra el microorganismo ante el fármaco antimicrobiano. Aunque el número final de recuperados no varíe, el tiempo que transcurre en la recuperación sí, ya que depende del coeficiente de transmisión.

Tabla 4: Número de individuos susceptibles, infectados y recuperados en función de distintos valores del coeficiente de transmisión β cuando los fármacos poseen una tasa de resistencia cercana al 100%.

	Susceptibles		Infectados		Recuperados	
	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos
$\beta=0,1$	6,2475	0,9857	5,5475	182,0012	1,9775	3,0085
$\beta=0,2$	3,1150	0,9875	2,9400	181,0199	1,0675	3,0005
$\beta=0,3$	2,0825	0,9541	1,8725	179,0799	0,7700	3,0049
$\beta=0,4$	1,5575	0,9571	1,4875	178,0629	0,6300	3,0395
$\beta=0,5$	1,2425	0,9603	1,1200	176,1075	0,5425	3,0513
$\beta=0,6$	1,0325	0,9637	0,9800	175,0559	0,4900	3,0900
$\beta=0,7$	0,8925	0,8982	0,7875	173,1549	0,4375	3,0372
$\beta=0,8$	0,7700	0,9709	0,7175	172,1004	0,4025	3,0154
$\beta=0,9$	0,6825	0,9746	0,5950	170,2078	0,3850	3,0559
$\beta=1$	0,6125	0,9783	0,5425	169,0158	0,3675	3,0651

En el diagrama de barras (**Figura 23**), se muestra el número final de cada población en función de β . Cuanto menor sea el coeficiente de transmisión, menor número de individuos se infectan en un mismo periodo de tiempo. Conforme aumenta este coeficiente, mayor es el número de individuos infectados para ese tiempo. Así, el número de recuperados es proporcional en todos los casos, y siempre será el mismo finalmente, ya que depende de la tasa de resistencia del microorganismo frente al antibiótico, lo que varía es el tiempo de infección y por tanto, de recuperación.

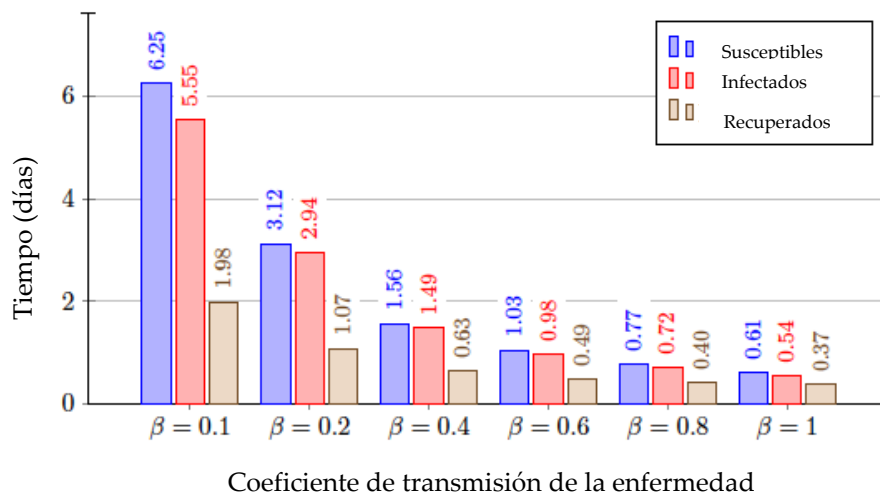


Figura 23: Diagrama de barras que representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión en los fármacos con una tasa de resistencia cercana al 100%.

4.2.3 Fármacos con una tasa de resistencia de entre el 50 y 30%. Neomicina 50%, cefotaxima 47,7%, eritromicina 33,33%, enrofloxacina 34,21%.

En la simulación (**Figura 24**), correspondiente a la enrofloxacina con una tasa de resistencia del 34,21%. Podemos observar que los individuos susceptibles van disminuyendo progresivamente hasta 0 conforme pasa el tiempo, ya que todos evolucionarán a infectados o recuperados. Al igual que las simulaciones anteriores,

cuando menor sea el coeficiente de transmisión, para un mismo tiempo menor número de individuos infectados hay (línea azul). En cuanto a los infectados, partimos como en los demás casos de un número inicial de 40 infectados, que evoluciona hasta un máximo de unos 70 individuos, ya que la población de individuos recuperados asciende hasta casi 130 individuos en el mismo tiempo. Estos datos de dinámica poblacional son coherentes con una tasa de resistencia del 34,21%, como corresponde esta simulación, puesto que la población total es de 192 individuos, el 34,21% de ellos corresponde a 66 individuos (en torno a 70) y $192-66=125$ (casi 130).

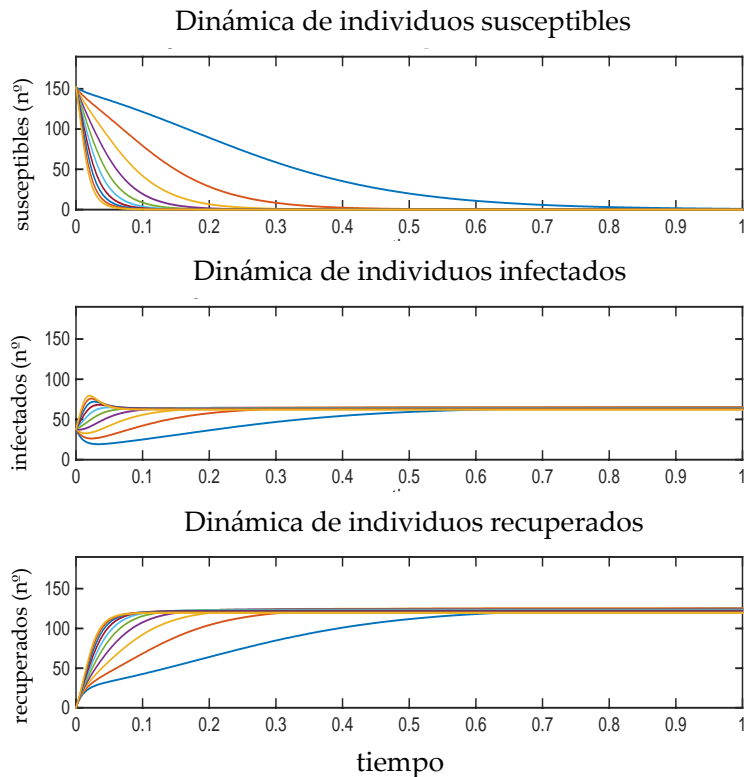


Figura 24: Modelización lineal de los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 50% y 30%.

En cuanto a los datos de número de individuos límite de cada población mostrados en la **Tabla 5**, podemos apreciar el mismo fenómeno, cuanto mayor sea el coeficiente de transmisión mayor será el número de individuos infectados para el mismo tiempo. Asimismo, el número de individuos recuperados finalmente es similar, pero el tiempo de transición entre grupos es menor cuanto mayor sea el coeficiente de transmisión de la enfermedad.

Tabla 5: Número de individuos susceptibles, infectados y recuperados en función de distintos valores del coeficiente de transmisión β cuando los fármacos poseen una tasa de resistencia de entre el 50% y 30%.

	Susceptibles		Infectados		Recuperados	
	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos
$\beta=0,1$	16,9575	0,9994	12,8275	64,0028	14,5075	124,0053
$\beta=0,2$	8,1025	0,9991	6,0375	64,0011	7,3850	124,0110
$\beta=0,3$	5,1975	0,9824	3,1325	63,0067	4,4975	123,0316
$\beta=0,4$	3,7450	0,9942	2,0475	63,0236	3,5525	122,0152
$\beta=0,5$	2,9050	0,9703	1,2250	63,0482	2,6425	122,0149
$\beta=0,6$	2,3450	0,9633	0,5250	62,2112	2,0825	121,0022
$\beta=0,7$	1,9425	0,9752	0,3150	62,8271	1,9775	212,0016
$\beta=0,8$	1,6450	0,9842	0,2100	62,7526	1,6625	120,0108
$\beta=0,9$	1,4175	0,9882	1,5225	62,9793	1,4525	119,0726
$\beta=1$	1,2425	0,9731	0,1225	62,8659	1,2775	118,0144

En lo referente a los números finales correspondientes a cada grupo de la población mostrados en la **Figura 25**, el tiempo, expresado en días, varía en función del coeficiente de transmisión de la infección. Asimismo, el número de recuperados es mayor que en otros casos puesto que la tasa de resistencia al fármaco es considerablemente menor, aunque el número de recuperados al final del ensayo es el mismo en todos los casos, es proporcional a la tasa de infección de la infección y al tiempo transcurrido.

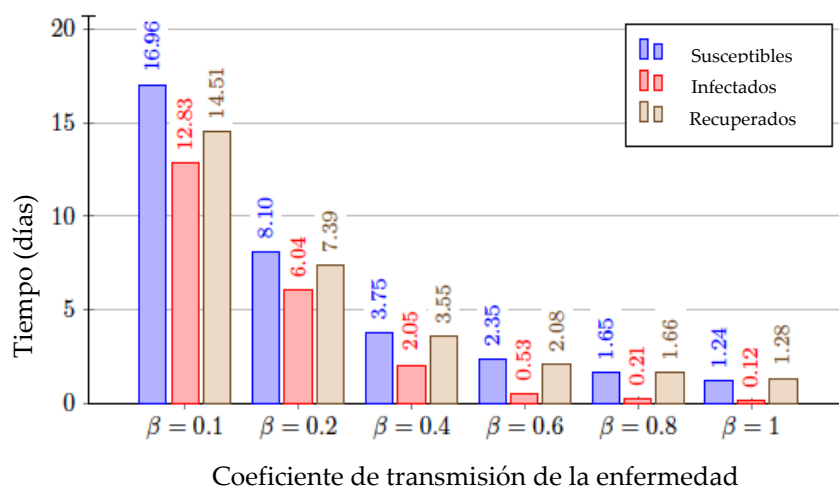


Figura 25: Diagrama de barras que representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión en los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 50% y 30%.

4.2.4 Fármacos con una tasa de resistencia de entre el 30 y 20%. Cefepime 21,05%, aztreonam 20,69%, ciprofloxacina 28,57%, gentamicina 23,68%, marbofloxacina 23,81% y pradofloxacina 28,57%.

Las gráficas corresponden al fármaco gentamicina (23,68%) tomado como ejemplo para la representación de este grupo. En la **Figura 26** se puede observar, como en los casos anteriores, que en función de la tasa de transmisión de la infección, los individuos susceptibles van progresivamente disminuyendo en número a lo largo del tiempo. Cuanto menor sea la tasa (línea azul), menor número de individuos infectados habrá para un mismo tiempo. En cuanto al grupo de los individuos infectados, se puede

observar que partimos de una población inicial de 40 individuos, y que al inicio puede aumentar ligeramente, pero se mantiene en torno a este número de individuos afectados. Esto se explica porque el 23,68 % de la población de susceptibles con 152 individuos es de 36 individuos. Este 23,68 % es la tasa de resistencia a la infección, por tanto, son individuos que no se curarán y se mantendrán infectados.

En referencia a los recuperados se observa que aumenta hasta cerca de la marca de 150 individuos. Por lo que, $192-36=156$ individuos que, según la tasa de resistencia, se irán recuperando.

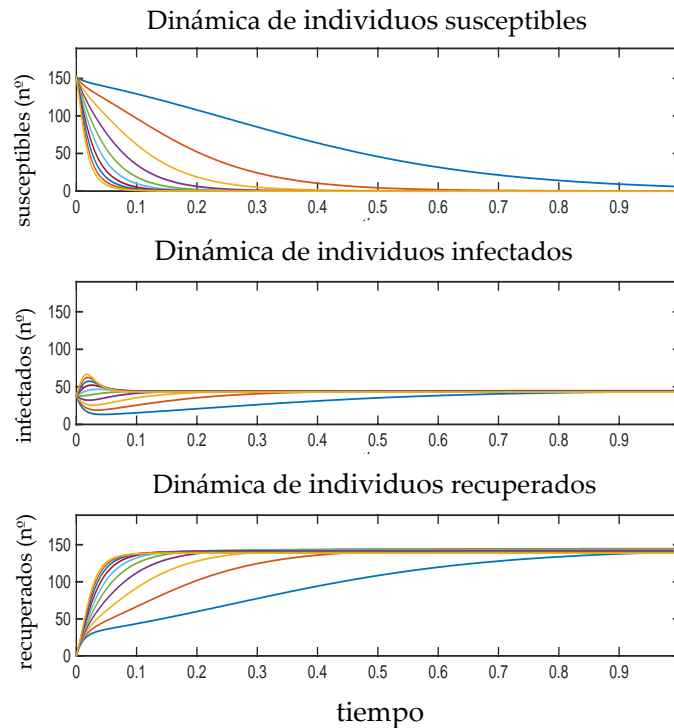


Figura 26: Modelización lineal de los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 20% y 30%.

La **Tabla 6** de valores numéricos límite refleja la misma dinámica. Cuanto más bajo sea el coeficiente de transmisión (β), menor número de individuos infectados habrá para una misma unidad de tiempo.

Los individuos infectados rondan los 40 (el 23,68% de la población de susceptibles con 152 individuos es de 36 individuos), lo que varía es el tiempo, que es menor cuanto mayor es β . Finalmente los recuperados rondan los 140 individuos finalmente, y como anteriormente, varía el número de días en función del valor del coeficiente de transmisión ($192-36=156$).

Tabla 6: Número de individuos susceptibles, infectados y recuperados en función de distintos valores del coeficiente de transmisión β cuando los fármacos poseen una tasa de resistencia de entre el 20% y 30%.

	Susceptibles		Infectados		Recuperados	
	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos
$\beta=0,1$	17,4475	5,9890	13,8425	42,0097	16,5375	139,0219
$\beta=0,2$	11,6025	0,9932	6,8075	43,0015	10,2375	143,0048
$\beta=0,3$	7,3500	0,9962	3,9025	43,0159	6,9300	143,0074
$\beta=0,4$	5,2675	0,9891	2,3450	43,0155	4,6900	142,0205
$\beta=0,5$	4,0425	0,9787	1,1025	43,0038	3,9900	142,0091
$\beta=0,6$	3,2200	0,9987	0,1925	43,2377	3,0625	141,0019
$\beta=0,7$	2,6600	0,9864	0,0525	42,0490	2,4675	140,0001
$\beta=0,8$	2,2400	0,9866	0,0350	42,6969	2,0650	139,0233
$\beta=0,9$	1,9250	0,9699	0,0175	42,2403	1,7675	138,0169
$\beta=1$	1,6625	0,9865	0,0175	43,3302	1,5575	137,0543

En cuanto a la representación de estos valores finales correspondientes a cada grupo de población en función de la tasa de infección (**Figura 27**) observamos el mismo fenómeno. En este caso los recuperados superan a los infectados, ya que la tasa de resistencia es menor que en los casos anteriores.

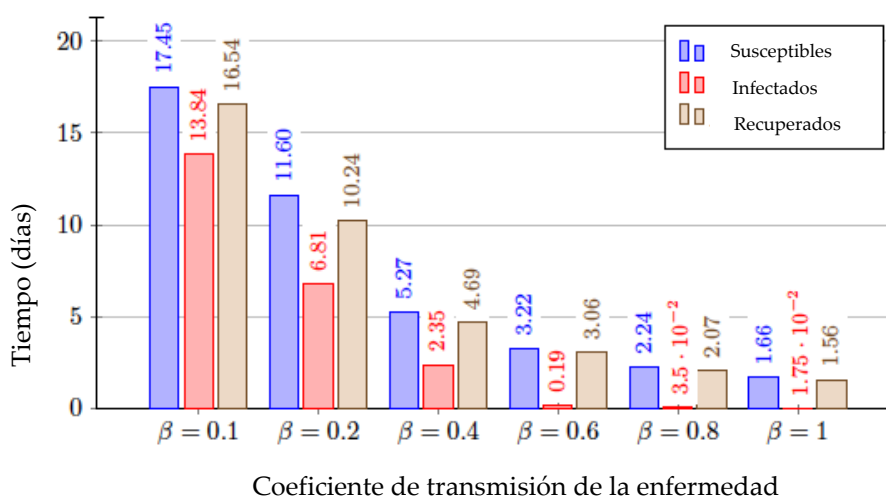


Figura 27: Diagrama de barras que representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión en los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 20% y 30%.

4.2.5 Fármacos con una tasa de resistencia de entre el 20 y 10%. Cefotaxima 16,67%, tobramicina 15,5%, polimixina B 15,79%.

Esta simulación (**Figura 28**) corresponde al antibiótico tobramicina con una tasa de resistencia del 15,15%, tomado como representativo de este grupo de fármacos. Podemos observar que en la dinámica de los individuos susceptibles, se parte de una población de 150 individuos aproximadamente, y este número va disminuyendo conforme va pasando el tiempo. Cuanto menor sea el coeficiente de transmisión de la

enfermedad, menor número de individuos habrá infectado en una misma unidad de tiempo como se manifiesta en las líneas azul, naranja y amarillo de la derecha del gráfico. Asimismo, todas las líneas acaban en 0 individuos excepto la azul, que finaliza en unos 30 individuos. Esta línea acabaría en 0 si se contemplara más tiempo en el ensayo, puesto que corresponde al menor valor del coeficiente de transmisión. En cuanto a la dinámica de los individuos infectados, como en todas las simulaciones, se parte de una población inicial de 40 individuos. En función del coeficiente de transmisión al inicio van disminuyendo pero finalmente, cuando el tiempo de la infección transcurre, todas las líneas tienden a una población de unos 30 individuos. Estos datos concuerdan con la tasa de resistencia de este fármaco, ya que el 15,15 % de 192 de la población total es de 29 individuos. Estos individuos se mantendrán infectados, ya que en esa proporción el microorganismo causante de la infección es resistente al tratamiento, por lo que no se recuperarán. Finalmente, en referencia a la dinámica de los individuos recuperados, partimos de 0 individuos y se eleva hasta por encima de la línea de 150 individuos en la mayoría de los casos. Esto concuerda con $192 - 29$ infectados = 163 individuos. En el caso de la línea azul ocurre lo mismo que lo referido en el caso de los individuos susceptibles, esta línea acabaría en torno a los 160 si se contemplara más tiempo en el ensayo, puesto que corresponde al menor valor del coeficiente de transmisión.

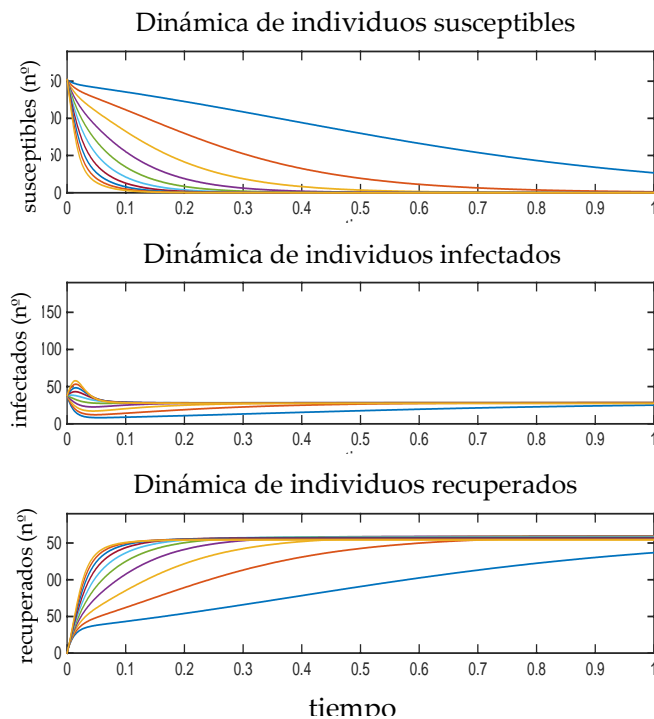


Figura 28: Modelización lineal de los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 10% y 20%.

En la **Tabla 7** de los valores límite apreciamos la misma dinámica que en los casos anteriores. La población de infectados es de entre 28 y 29 individuos, lo que varía es el tiempo de infección. Asimismo, los recuperados están entre los 152 y 158 individuos,

variando también el tiempo en función del valor del coeficiente de transmisión de la infección.

Tabla 7: Número de individuos susceptibles, infectados y recuperados en función de distintos valores del coeficiente de transmisión β cuando los fármacos poseen una tasa de resistencia de entre el 10% y 20%.

	Susceptibles		Infectados		Recuperados	
	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos
$\beta=0,1$	33,2850	1,9970	23,6075	28,0021	30,7300	157,0074
$\beta=0,2$	17,6050	0,9952	10,1500	28,0028	16,3275	158,0060
$\beta=0,3$	11,0775	0,9917	5,6175	28,0040	9,5200	157,0011
$\beta=0,4$	7,8575	0,9982	3,2025	28,0095	7,1575	157,0100
$\beta=0,5$	5,9850	0,9881	0,6300	28,9433	5,1625	156,0244
$\beta=0,6$	4,7425	0,9984	2,8350	28,9999	4,5325	156,0066
$\beta=0,7$	3,8850	0,9942	2,5200	28,9953	3,6050	155,0242
$\beta=0,8$	3,2550	0,9880	2,1175	28,9973	2,9575	154,0025
$\beta=0,9$	2,7650	0,9933	1,8025	28,9944	2,5200	153,0369
$\beta=1$	2,3800	0,9956	1,5750	28,9719	2,1875	152,0432

En esta representación de los valores anteriormente mostrados (**Figura 29**) queda patente el hecho de que cuanto menor es este coeficiente, menor será el número de individuos infectados para un mismo tiempo. Sin embargo, la población de recuperados supera a la de infectados en todos los casos, hecho que concuerda con la tasa de resistencia de este fármaco, del 15,15%, que permitirá que la mayoría de los pacientes se recuperen cuando se sometan al tratamiento.

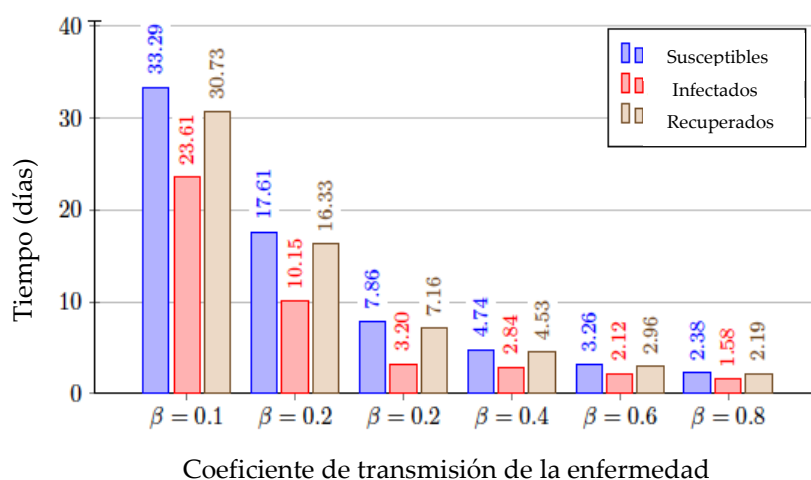


Figura 29: Diagrama de barras que representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión en los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 10% y 20%.

4.2.6 Fármacos con una tasa de resistencia de entre el 10 y 1%. Piperacilina-tazobactam 5,88%, imipenem 7,14% y amikacina 6,25%.

El diagrama de simulaciones lineales (**Figura 30**) corresponde al fármaco imipenem con un 7,14% de tasa de resistencia, tomado como representativo del grupo de antibióticos. En el grupo de los susceptibles podemos observar como en casos anteriores, que partimos de unos 150 individuos y que progresivamente va disminuyendo hasta alcanzar el valor 0. Cuanto mayor sea el coeficiente de transmisión de la enfermedad mayor es el número de infectados para un mismo tiempo. El diagrama correspondiente muestra que partimos de una población cercana a 50 y que disminuye a un valor cercano a cero en todos los casos. Esta dinámica concuerda con los datos de tasa de resistencia de este fármac. En este caso las líneas disminuyen rápidamente ya que el tratamiento es muy efectivo para el tratamiento de la infección y la mayoría de los individuos (casi el 93%) se curarán. Por tanto, en la simulación correspondiente a los individuos recuperados, las líneas ascienden hasta por encima de los 150 individuos en todos los casos excepto en la línea azul, que corresponde al valor más bajo del coeficiente de transmisión. Esta línea, si se contemplara más tiempo en el experimento, finalizaría también en esta misma cifra de individuos. Esta dinámica concuerda con los datos de recuperación, ya que un 92,86% de los individuos se recuperan, es decir, 178 individuos.

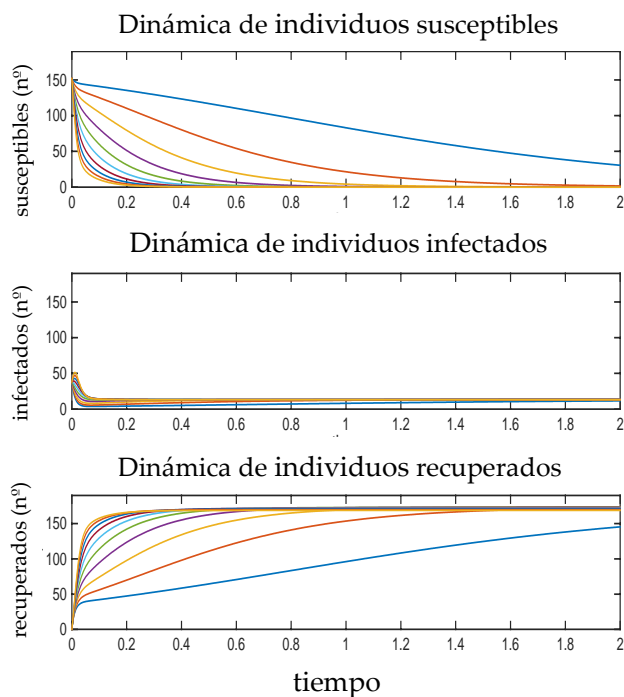


Figura 30: Modelización lineal de los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 10% y 1%.

En la tabla de valores límite (**Tabla 8**), observamos la misma dinámica mostrada. De hecho, se refleja el hecho de que esta línea no finalice en el mismo punto que las demás,

ya que sería necesario contemplar un mayor período de tiempo para que finalizara en el mismo punto.

Tabla 8: Número de individuos susceptibles, infectados y recuperados en función de distintos valores del coeficiente de transmisión β cuando los fármacos poseen una tasa de resistencia de entre el 10% y 1%.

	Susceptibles		Infectados		Recuperados	
	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos
$\beta=0,1$	34,7375	30,9964	25,6550	10,0024	34,2650	144,0183
$\beta=0,2$	33,4250	1,9991	15,4875	12,0004	30,4500	171,0015
$\beta=0,3$	23,6775	0,9966	7,5425	12,0045	21,0700	172,0027
$\beta=0,4$	16,6600	0,9966	3,3425	12,0015	15,4700	171,0035
$\beta=0,5$	12,5475	0,9978	0,9975	13,9876	10,7975	171,0122
$\beta=0,6$	9,8875	0,9940	1,6275	13,9938	9,2575	171,0008
$\beta=0,7$	8,0325	0,9916	1,9950	13,9923	7,1750	170,0007
$\beta=0,8$	6,6675	0,9927	1,9600	13,9912	5,8100	169,0100
$\beta=0,9$	5,6350	0,9884	1,8025	13,9858	4,8475	168,0026
$\beta=1$	4,8125	0,9920	5,9500	12,9997	4,1650	167,0077

Al representarlo en forma de diagrama de barras (**Figura 31**) se observa claramente lo mencionado con anterioridad. En todas las valoraciones, el número de recuperados supera al de infectados excepto en la última, en la que β tiene su valor máximo =1, y en la que el número de infectados supera al de recuperados. Este hecho ocurre porque el tiempo transcurrido es muy breve y no ha dado tiempo aún a que los infectados se recuperen.

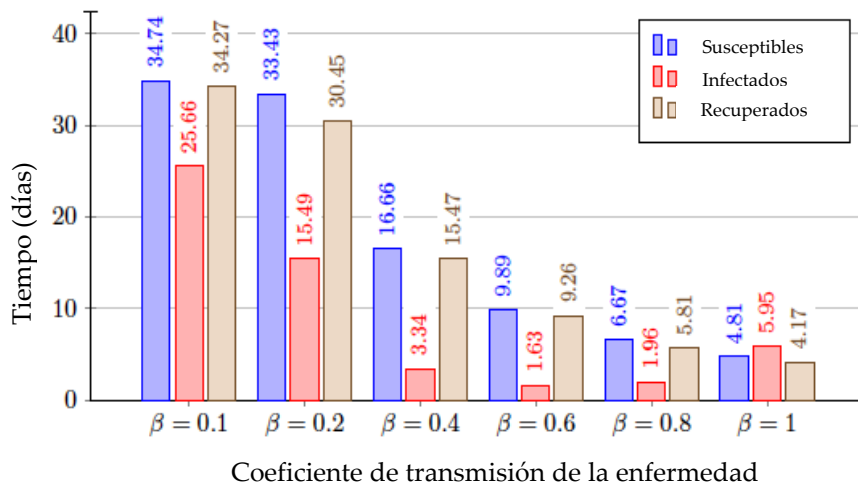


Figura 31: Diagrama de barras que representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión en los fármacos con una tasa de resistencia de entre el 10% y 1%.

4.2.7 Fármacos con una tasa de resistencia del 0%. Cefoperazona, cefquinoma, meropenem, piperacilina, ticarcilina, penicilina G, kanamicina, sisomicina, estreptomina, levofloxacino, ác. oxolínico, maxifloxacino, lomefloxacina, tigeciclina y colistina.

Por último se muestra la simulación (**Figura 32**) en la que los fármacos utilizados tienen una tasa de resistencia del 0%, es decir, son completamente efectivos contra la enfermedad. Por tanto, los individuos infectados tienden a 0 muy rápidamente. Cuando estos individuos se recuperan, ya no queda ninguno infectado, de ahí que la curva de infectados sea 0 para el resto del tiempo. Observamos que tanto en la población de susceptibles como en la de recuperados, las líneas son paralelas, en función de los distintos valores de β . Esto ocurre porque la dinámica se estabiliza. Los individuos infectados que pasan a recuperados quedarán como recuperados para el resto del tiempo y los que nunca se llegaron a infectar continuarán como individuos susceptibles.

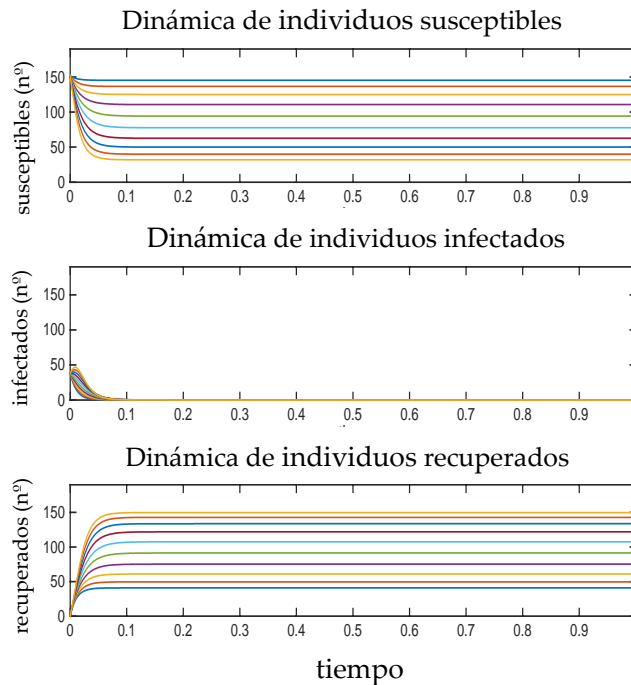


Figura 32: Modelización lineal de los fármacos con una tasa de resistencia del 0%.

En la tabla de los valores límite (**Tabla 9**) observamos este fenómeno. El número de individuos infectados es de menos de 1, por lo que se considera 0. Asimismo, el número de susceptibles y recuperados varía en función del valor del coeficiente de transmisión para un mismo tiempo, pero estabiliza. Cuanto mayor es el valor de β , más días tarda la población en estabilizarse.

Tabla 9: Número de individuos susceptibles, infectados y recuperados en función de distintos valores del coeficiente de transmisión β cuando los fármacos poseen una tasa de resistencia del 0%.

	Susceptibles		Infectados		Recuperados	
	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos	Tiempo (días)	Individuos
$\beta=0,1$	0,4375	145,9988	0,7000	0,9824	0,5950	39,0306
$\beta=0,2$	0,8225	136,9863	0,8400	0,9809	0,8050	48,0938
$\beta=0,3$	0,9100	125,9459	1,0150	0,9564	0,9450	59,0773
$\beta=0,4$	1,4875	110,9878	1,1900	0,9695	1,3125	74,0443
$\beta=0,5$	1,3825	94,9995	1,3300	0,9970	1,4525	90,0654
$\beta=0,6$	1,6800	77,9836	1,4175	0,9886	1,4875	106,0461
$\beta=0,7$	1,6275	62,9900	1,4350	0,9982	1,4175	120,0633
$\beta=0,8$	2,6425	49,9998	1,4175	0,9869	1,4175	132,0735
$\beta=0,9$	1,7850	39,9951	1,3825	0,9673	1,3300	141,0661
$\beta=1$	1,6975	31,9943	1,3300	0,9899	1,2775	148,0393

Por último, en el diagrama de barras (**Figura 33**) se ve representado el fenómeno expuesto anteriormente.

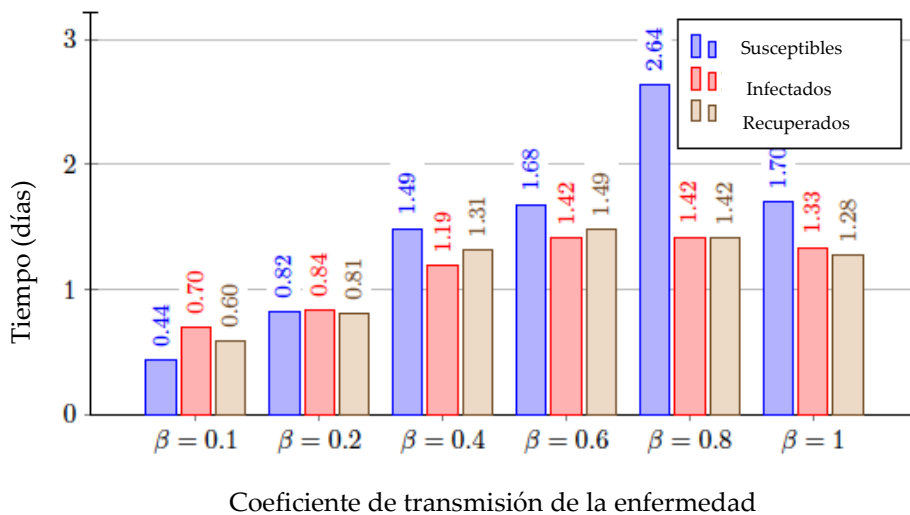


Figura 33: Diagrama de barras que representa el número final de cada grupo en función de distintos valores del coeficiente de transmisión en los fármacos con una tasa de resistencia del 0%.

Finalmente, con los resultados obtenidos y su análisis correspondiente, proponemos el siguiente panel de antibióticos (**Figura 34**) para el tratamiento empírico de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en el sur de España. Este panel proporciona una lista de fármacos antimicrobianos que poseen, todos por igual, una probabilidad de éxito en el tratamiento superior al 90%. Dicha lista se ha organizado por familias de

antimicrobianos, que como se ha explicado con anterioridad, comparten el mecanismo de acción. Dado que la probabilidad de éxito es la misma para todos los principios activos, la elección de los mismos dependerá del criterio clínico del profesional (médico o veterinario) y de las particularidades del paciente. La obtención de este panel es clave para un correcto uso de tratamientos empíricos para prevenir la propagación de las resistencias y garantizar un éxito en el tratamiento de los pacientes.

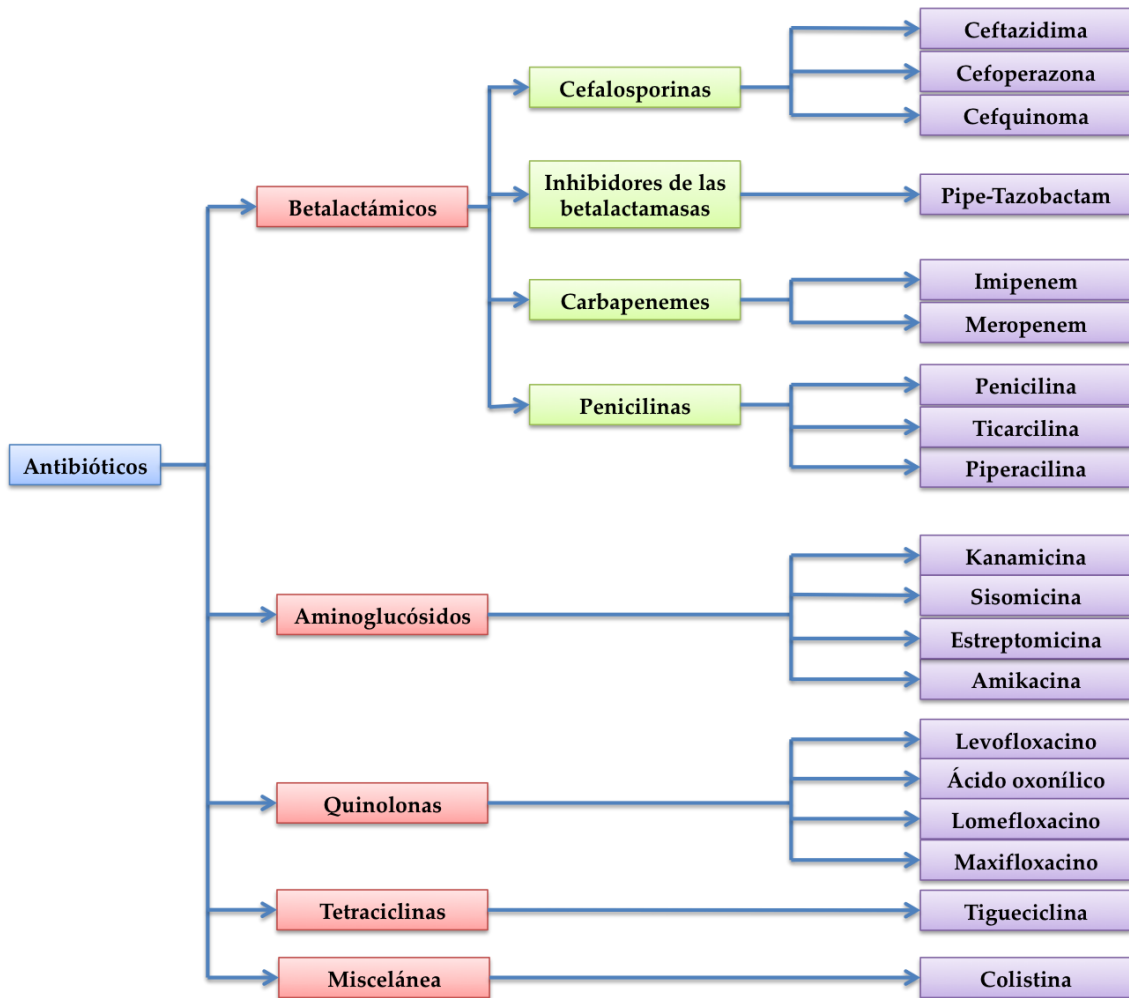


Figura 34: Panel de antibióticos para el tratamiento empírico de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.

5. Discusión

En las infecciones por microorganismos con alta capacidad de desarrollo de resistencias es crítico disponer de datos de sensibilidad frente a las diferentes familias de antimicrobianos. El estudio que hemos llevado a cabo en colaboración con el profesor Tomás Caraballo de la Facultad de Matemáticas de la Universidad de Sevilla, que posee una amplia experiencia en este tipo de modelizaciones, evidencia las numerosísimas resistencias desarrolladas por el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, con casi un 40% de los fármacos ensayados con una tasa de resistencia del 100% o muy cercana. Esto último supone un potencial riesgo para la salud pública, ya que se trata de una bacteria muy ubicua y resistente en el medio ambiente siendo responsable del 10 % de las infecciones nosocomiales hospitalarias y que infecta tanto a perros como a la especie humana, pudiendo haber contagios entre ambas especies. Hoy en día, desgraciadamente, el estrecho contacto entre propietarios y sus mascotas hacen que el riesgo de transmisión de este tipo de patógenos sea elevado.

En Medicina Veterinaria en España se han realizado dos estudios previos acerca de las resistencias de *Pseudomonas aeruginosa* en perros, uno realizado en Madrid en 1997 y otro en Las Palmas de Gran Canaria en el año 2000. En el estudio realizado en Madrid se evaluaron diferentes bacterias y hongos y en el caso concreto de *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo una pobre sensibilidad a la enrofloxacin (Guedeja-Marrón et al., 1997). En Gran Canaria, el antibiótico más efectivo contra *P. aeruginosa* resultó ser la tobramicina (con una sensibilidad del 100%, seguida por marbofloxacin (89,9 %) y ceftazidima (89,9 %). La sensibilidad frente a gentamicina resultó ser del 64,8 % mientras para la enrofloxacin fue del 42,1 % (Martín-Barrasa et al., 2000). La alta sensibilidad frente a la tobramicina es probablemente debida a que no existen preparados comerciales con este principio activo y por tanto la bacteria no ha sido expuesta. Nuestro estudio muestra unas tasas de resistencia diferentes a las anteriormente expuestas. El aumento de las resistencias a varias familias de antibióticos, proceso conocido como multirresistencia cuando es a más de tres familias, ha aumentado de manera exponencial en las últimas décadas y depende de factores como la exposición previa a tratamientos antibióticos, la incorrecta dosificación o aplicación del tratamiento y la zona geográfica. La exposición previa y repetida a tratamientos antibióticos permite a las bacterias familiarizarse con los mecanismos de acción de los mismos y desarrollar cambios adaptativos que le permitan evadir su acción. Asimismo, la incorrecta dosificación o duración del tratamiento hace que este no sea eficaz y por tanto, las bacterias presentes en la infección entren en contacto con el fármaco de manera directa y desarrollen mecanismos como la modificación enzimática del antibiótico, activación de bombas de expulsión que evitan que lleguen a su lugar de acción, cambios de permeabilidad en la membrana externa para evitar su penetración o modificaciones en el lugar de acción. Como sabemos, estos cambios se pueden traducir en su material genético como mutaciones y transmitirse de manera horizontal o vertical a otras bacterias, expandiendo rápidamente los mecanismos de resistencia sin necesidad de que esas bacterias “hijas” o “hermanas” hayan entrado en contacto con el antibiótico previamente (Tafur et al., 2008, Van Duin et al., 2016). Por último, se ha demostrado que en función de la zona geográfica existe variabilidad en el perfil de resistencia. Esto se debe principalmente a factores ambientales y atmosféricos de humedad y temperatura, que afectan a la prevalencia de la presencia de ciertos

tipos de microorganismos y también de factores humanos de prescripción y uso de antibióticos en la región (Van Duin et al., 2016).

Por otro lado, hemos de tener en cuenta que el desarrollo de nuevos fármacos es un proceso tedioso, largo y económicamente muy costoso. Normalmente, transcurren de 10 a 15 años desde que comienza la investigación inicial hasta que se lanza al mercado. Asimismo, son numerosos los fármacos que a lo largo del proceso de desarrollo se han de descartar por no cumplir con los requisitos de seguridad y/o eficacia requeridos. Informes recientes de la OMS (enero 2020) ponen de manifiesto que la disminución de la inversión privada y la falta de innovación en el desarrollo de nuevos antibióticos están socavando los esfuerzos por combatir las infecciones farmacorresistentes. Aunque los candidatos preclínicos son más innovadores, pasarán unos 15 años antes de que lleguen a los pacientes (Proceso de desarrollo de fármacos, World Health Organization (WHO), 2017, 2019). Todo ello deja constancia de la inminente necesidad de la implementación de herramientas que permitan optimizar y personalizar los tratamientos ya existentes, que permitan aumentar su eficacia y que además añadan un valor predictivo para el control de este tipo de patologías infecciosas.

Dado el carácter oportunista de este patógeno así como su gran capacidad de desarrollar resistencias a los antimicrobianos es vital que, cuando la situación requiera de la prescripción de un tratamiento empírico, bien sea por falta de recursos o por la imposibilidad de espera a los resultados del estudio de sensibilidad debido a la gravedad del paciente a tratar, dicho tratamiento ofrezca altas garantías de éxito. Para la implementación del modelo SIRI es necesario disponer de datos previos de sensibilidad significativos, con un tamaño de muestra analizado suficiente. En nuestro caso, dado que es un patógeno oportunista que causa en torno al 20 % de las otitis bacterianas, que a su vez suponen entre un 50 y un 60% de la casuística de otitis (Nuttal, 2016), 40 casos confirmados y analizados son un tamaño de muestra poblacional suficiente y representativo. El modelo matemático SIRI reúne las características necesarias para la obtención de unos datos aplicables y significativos, ya que contempla numerosas variables que cubren un gran abanico de posibilidades. Es importante subrayar que estos ensayos no se limitan a la simple aplicación del modelo, si no que los datos obtenidos son posteriormente analizados y comparados con las características epidemiológicas de la patología infecciosa en cuestión. Si no hubiera concordancia con estos datos, el modelo no podría utilizarse. En nuestro caso, los datos obtenidos de las modelizaciones de los distintos grupos de fármacos, organizados por tasa de resistencia, son coherentes y muestran la realidad de la evolución de la infección, por lo que es un modelo fiable y extrapolable. Esto es esencial puesto que el estudio se basa en 40 individuos, con sus circunstancias individuales. Si para la elección del tratamiento empírico nos limitáramos a la elección del grupo de fármacos con menor tasa de resistencia, no podríamos garantizar una seguridad de éxito, ya que no se habría comprobado la aplicabilidad o capacidad de esos datos de poder ser extrapolados a otra población distinta. El modelo matemático es una pieza clave, puesto que aporta un valor predictivo que es aplicable a otros individuos fuera de la población estudiada. El valor añadido por este tipo de modelos a la investigación y toma de decisiones en relación a las patologías infecciosas es muy alto, ya que por un lado, contribuye a que no se sigan desarrollando más resistencias a antimicrobianos por parte de estos patógenos puesto que proporciona tratamientos empíricos eficaces y por otro lado ayudaría a reducir costes añadidos en sanidad debidos a este tipo de

infecciones. Asimismo, este modelo podría aplicarse a otras muchas enfermedades infecciosas de carácter bacteriano o vírico proporcionando una información clave para su control. De hecho, este tipo de modelos han sido aplicados para en el análisis de la pandemia del COVID-19 y han sido clave en la toma de decisiones con respecto a la misma.

En el campo de la Medicina Veterinaria Clínica no tenemos constancia de que se haya implementado nunca antes un modelo de estas características, por lo que abre un camino que ofrece grandes posibilidades y que tendrían una repercusión directa sobre la salud animal y por ende, la salud pública.

Este trabajo, por tanto, ofrece un panel de antibióticos concreto, pertenecientes a distintas familias, con una eficacia de más de un 90%. Es destacable que la utilización de gran parte de estos antibióticos del panel está restringido en medicina veterinaria, lo que supone un gran desafío terapéutico y vuelve a evidenciar la necesidad de prevenir la infección por este tipo de patógenos. Del panel propuesto, los fármacos piperacilina-tazobactam, los carbapenemes (imipenem y meropenem) y tigeciclina pertenecen a la categoría A y son de presentación exclusivamente inyectable. Asimismo, dos cefalosporinas son de tercera generación y la tercera es de cuarta generación, las quinolonas y colistina pertenecen a la categoría B y todas son para uso inyectable excepto el levofloxacino. Finalmente los aminoglucósidos pertenecen a la categoría C pero todos son de uso inyectable y la mayoría (amikacina, kanamicina y sisomicina) de uso restringido en medicina humana. Por tanto, en medicina veterinaria se plantean dificultades a la hora de prescribir un tratamiento para este tipo de infecciones, que vuelve a resaltar una vez más la necesidad de prevenir que los procesos de multirresistencia sigan generándose y extendiendo en la población.

Por tanto, para ilustrar la utilidad de los resultados obtenidos del modelo aplicado en el caso de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* se presentan dos ejemplos de utilización del panel propuesto:

Ejemplo 1: Paciente (humano) que padece fibrosis quística (FQ) pulmonar que presenta fiebre, dificultad respiratoria severa y en la radiografía de tórax se evidencia la presencia de focos de neumonía. Dada la gravedad del cuadro requiere hospitalización de urgencia en la unidad de cuidados intensivos. Se toma una muestra de esputo en la que la citología evidencia la presencia de numerosos bacilos Gram negativos. Dada la patología crónica que sufre el paciente y la evidencia de estos bacilos en la citología la sospecha de una infección por *Pseudomonas aeruginosa* es muy alta. Se necesita instaurar un tratamiento antibiótico empírico, ya que el riesgo de esperar a los resultados del cultivo y antibiograma de muestra de esputo es muy alto. Basándonos en el panel proporcionado y teniendo la posibilidad de instaurar una terapia intravenosa las posibilidades de elección de tratamiento con una probabilidad de éxito superior al 90 % son los expuestos en el panel (**Figura 34**):

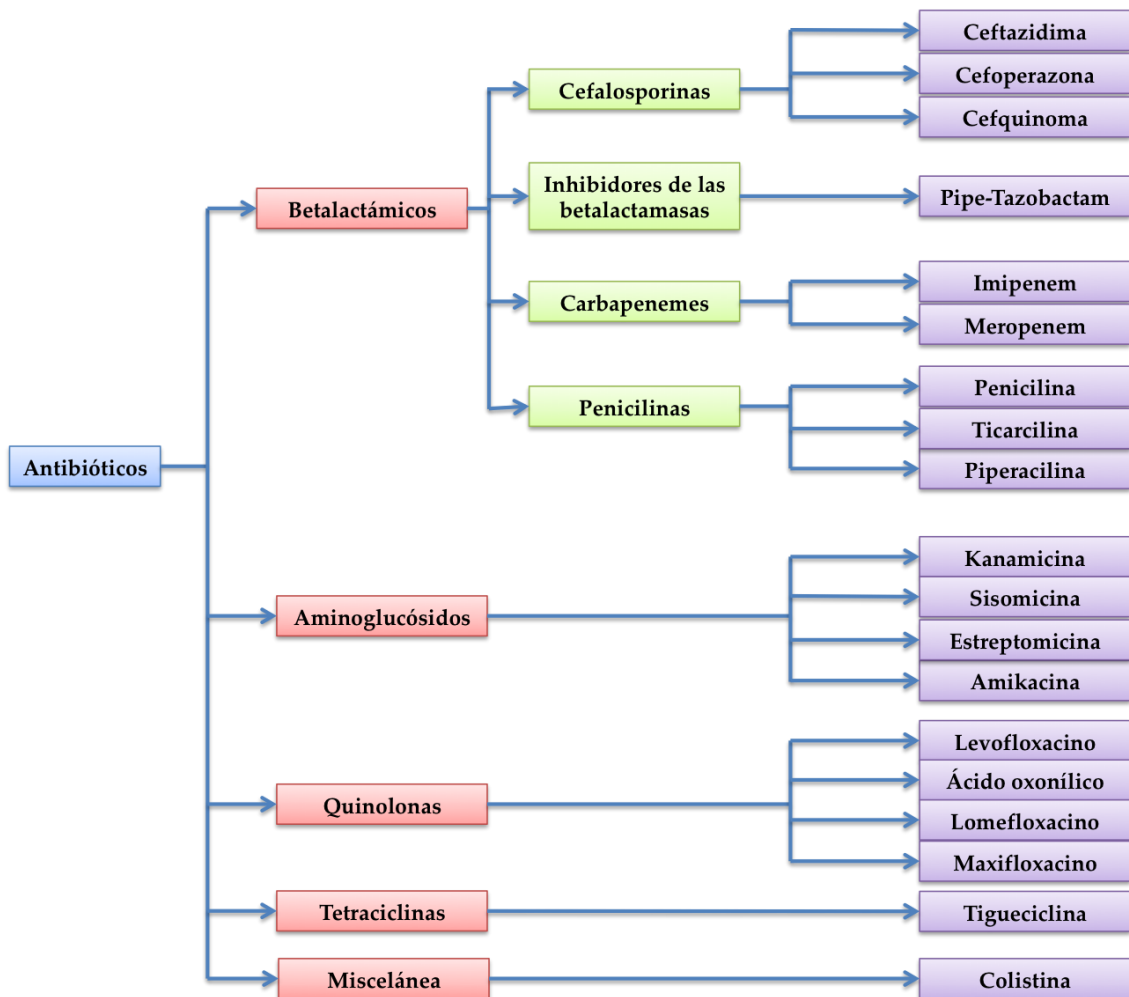


Figura 34: Panel de antibióticos para el tratamiento empírico de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.

Dentro del panel disponible, la elección del fármaco dependerá del criterio clínico del profesional al cargo del caso. Una buena opción de tratamiento en este caso sería la utilización de los aminoglucósidos kanamicina, sisomicina o estreptomicina por vía intravenosa. Su espectro de acción es ante bacilos Gram negativos aerobios, como es el caso de *Pseudomonas spp.*, su uso se restringe al ámbito hospitalario y su administración es por vía intravenosa, por lo que la rapidez de acción es mayor. Si el paciente presentara alteraciones en la funcionalidad renal, estos fármacos no serían recomendables debido a su nefrotoxicidad, por lo que se debería recurrir a otros fármacos como las quinolonas de tercera o cuarta generación o bien de la familia de los betalactámicos. En este caso, dado que el paciente es humano y está hospitalizado, el panel proporciona multitud de combinaciones terapéuticas eficaces.

Ejemplo 2: Paciente canino de raza bulldog francés de 6 años de edad que presenta una otitis severa crónica muy dolorosa con descarga purulenta abundante. El animal está diagnosticado de dermatitis atópica canina y a lo largo de su vida ha recibido varios ciclos de tratamientos antibióticos diferentes por vía ótica. La citología revela la presencia de numerosos bacilos Gram negativos. El propietario posee recursos

económicos limitados y no puede afrontar los gastos de la realización de las pruebas de sensibilidad pertinentes. Dado que el animal presenta un dolor muy marcado y la evidencia de bacilos Gram negativos en la descarga purulenta lo hace un posible foco de contagio para otros individuos, ya sean perros o personas, la necesidad de tratamiento es imperante. Dentro del panel propuesto, basándonos en la normativa de categorías de fármacos para uso veterinario (EMA, 2019) que los clasifica en las categorías A o “AVOID”, B o “RESTRICT” , C o “CAUTION” y D o “PRUDENCE” concluimos lo siguiente:

El panel no dispone de fármacos de la categoría D. Dentro de la categoría C, y como primera opción terapéutica se utilizarían fármacos aminoglucósidos. Los propuestos en el panel son de uso intravenoso, que se podrían reformular para su uso ótico. Sin embargo, dada su ototoxicidad, si no se ha podido comprobar la integridad de la membrana timpánica, el uso de estos fármacos supone un riesgo para la salud del paciente. La siguiente opción terapéutica sería las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, quinolonas o la colistina propuestas en el panel. Son de uso intravenoso y su uso debe estar sujeto a estudios de sensibilidad, ya que pertenecen a la categoría B, por lo que no se podrían utilizar ya que no se ha realizado cultivo y antibiograma.

En este caso las opciones terapéuticas son muy limitadas, y suponen un potencial riesgo para la salud de los individuos que conviven con el animal y los profesionales que lo atienden. Este ejemplo vuelve a poner de manifiesto la gran dificultad a la hora de instaurar una terapia en este tipo de infecciones en animales y la importancia de un uso correcto de la antibioterapia y la prevención en la aparición de este tipo de infecciones.

6. Conclusiones

1. El modelo SIRI adaptado ha resultado ser una herramienta de gran valor para el entendimiento de la dinámica poblacional de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y nos ha permitido disponer de un tratamiento empírico de muy altas garantías de éxito cuando no sea posible la realización de pruebas de sensibilidad. Esta aplicación es pionera en el campo de la Medicina Veterinaria y abre puertas hacia la investigación conjunta de este tipo de procesos.
2. La implementación de este tipo de modelos basados en los datos epidemiológicos son una pieza clave para la prevención, control y manejo de patologías infecciosas y que pueden suponer el salvar numerosas vidas y un ahorro de costes en gasto de salud pública muy significativo.

7. Referencias

1. Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y. (2006). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (1), 43–48. doi:10.1128/aac.50.1.43-48.2006.
2. Andrews, JR., Basu, S. (2011). Transmission dynamics and control of cholera in Haiti: an epidemic model. *Lancet*. 377: 1248-55. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60273-0.
3. Azanza Perea, JR., Sádaba Díaz de Rada, B., García Quetglás, E. (2000). Bases del tratamiento antimicrobiano en situaciones especiales. En: Picazo J, Gómis M, editores. Biblioteca básica. Bases para el tratamiento antimicrobiano. Barcelona: Doyma; 2000. p. 190-6.
4. Balcan, D., Hu, H., Gonçalves, B., Bajardi, P., Poletto, CH., Ramasco, JJ., et al. (2009). Seasonal transmission potential and activity peaks of the new influenza A(H1N1): a Monte Carlo likelihood analysis based on human mobility. *BMC Medicine*. 7: 45. doi: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-45>.
5. Caraballo, T., Han, X. (2016). Applied Nonautonomous and Random Dynamical Systems: Applied Dynamical Systems. *Springer International Publishing*. doi:10.1007/978-3-319-49247-6.
6. Caraballo, T., Colucci, R. (2017). A comparison between random and stochastic modeling for a SIR model. *Communications on Pure and Applied Analysis* 16 (1), 151–162. doi:10.3934/cpaa.2017007.
7. Chitnis, N., Schapira, A., Smith, T., Steketee, R. (2010). Comparing the effectiveness of malaria vector-control interventions through a mathematical model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 83: 230-40. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0179.
8. Choi, BC., Pak, AW. (2004). A simple approximate mathematical model to predict the number of severe acute respiratory syndrome cases and deaths. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 57: 831-5. (Erratum in: *Journal of Epidemiology and Community Health* 2004; 58: 531). doi: <http://dx.doi.org/10.1136/jech.2003.011296corr1>.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition (2019).
10. Coburn, BJ., Wagner, BG., Blower, S. (2009). Modeling influenza epidemics and pandemics: insights into the future swine flu (H1N1). *BMC Medicine*. 7: 30. doi: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-30>.
11. Coen, PG., Cartwright, K., Stuart, J. (2000). Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *International Journal of Epidemiology*. 29: 180-188. doi: <https://doi.org/10.1093/ije/29.1.180>.
12. Cole, LK., Kwochka, KW., Kowalski, JJ., Hillier, A. (1998). Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 212: 534-538.
13. Cole, LK., Kwochka, KW., Hillier, A., Kowalski, JJ., Smeak, DD. (2005). Comparison of bacterial organisms and their susceptibility patterns from otic

- exudate and ear tissue from the vertical ear canal of dogs undergoing total ear canal ablation. *Veterinary Therapeutics* 6: 252-259.
14. Cortés, J-C, El-Labany, S.K., Navarro-Quiles, A., Selim, M., Slama, H. (2020). A comprehensive probabilistic analysis of approximate SIR-type epidemiological models via full randomized discrete-time Markov chain formulation with applications. *Mathematical Methods in the Applied Sciences*. 1–19. doi: 10.1002/mma.6482.
 15. European Medicines Agency. (2019). Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals - Categorisation of antimicrobials EMA/CVMP/CHMP/682198/2017. Recuperado de: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/answer-request-european-commission-updating-scientific-advice-impact-public-health-animal-health-use_en.pdf.
 16. Fresnadillo-Martínez, MJ., García-Sánchez, E., García-Merino, E., Martín del Rey, A., García-Sánchez, JE. (2013). Modelización matemática de la propagación de enfermedades infecciosas: de dónde venimos y hacia dónde vamos. *Revista Española de Quimioterapia*. 26(2):81-91.
 17. Gilbert, DN., Moellering, RC., Eliopoulos, GM. et al. (2006). Guía de terapéutica antimicrobiana. Guía Sanford. 36th ed. Sperryville, VA: Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA, editors; 2007.
 18. Guedeja-Marrón, J., Blanco, JL., García, MF. (1997). Antimicrobial sensitivity in microorganisms isolated from canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine*. 44:341-346. doi: 10.1111/j.1439-0450.1997.tb00984.x
 19. Guía de Prescripción Terapéutica. Información de medicamentos autorizados en España. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. GPT. Recuperado de: <http://www.imedicinas.com/GPTage>
 20. Hnilica, KA., Patterson, AP., eds. (2017). Diseases of eyes, claws, anal sacs and ear canals. En: *Small animal dermatology – A color atlas and therapeutic guide* 4th ed. Elsevier 413-447.
 21. Honorato Pérez, J., Campanero Martínez, MA., Sádaba Díaz de Rada, B. (2000). Bases del tratamiento antimicrobiano. Bases farmacológicas. En: Picazo J, Gómis M, editores. Biblioteca básica. Bases para el tratamiento antimicrobiano. Barcelona: Doyma; 28-45.
 22. Huerta, B., Maldonado, A., Ginel, PJ., et al. (2011). Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pioderma. *Veterinary Microbiology*. 150: 302-308. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.002.
 23. Hyun, J.-E., Chung, T.-H., Hwang, C.-Y. (2018). Identification of VIM-2 metallo-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with pyoderma and otitis in Korea. *Veterinary Dermatology* 29 (3), 186–e68. doi:10.1111/vde.12534.
 24. Inaba, H., Sekine, H. (2004). A mathematical model for Chagas disease with infection-age-dependent infectivity. *Mathematical Biosciences*. 190: 39-69. doi:10.1016/j.mbs.2004.02.004.
 25. Kernack, W. O., McKendrick, A. G. (1927). A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proceedings of the Royal Society of London* 115, 700–721. doi: 10.1007/BF02464423.

26. Kernack, W. O. McKendrick, A. G. (1932). A contribution to the mathematical theory of epidemics II: The problem of endemicity. *Proceedings of the Royal Society of London* 138, 834. doi: <https://doi.org/10.1098/rspa.1932.0171>
27. Kernack, W. O., McKendrick, A. G. (1933). A contribution to the mathematical theory of epidemics III. Further Studies of the problem of endemicity. *Proceedings of the Royal Society of London* 141, 94–112.
28. Kucharski, AJ., Russell, TW., Diamond, C., Liu, Y., Edmunds, J., Funk, S., Eggo, RM. (2020). Early dynamics of transmission and control of COVID-19: a mathematical modelling study. *Lancet Infectious Diseases*. 20: 553–58. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30144-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30144-4).
29. Kwok, KO., Leung, GM., Lam, WY., Riley, S.(2007). Using models to identify routes of nosocomial infection: a large hospital outbreak of SARS in Hong Kong. *Proceedings of Biological Sciences*. 274: 611-7. doi: 10.1098/rspb.2006.0026.
30. Mesa-Mazo, MJ., Vergaño-Salazar, JG., Sánchez-Botero, CE., Muñoz-Loaiza, A. (2010). A mathematical model representing HIV/AIDS transmission dynamics in a sexually active population. *Revista de Salud Pública (Bogotá)* 12: 308-16.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7th ed. Approved standard. M2-A7. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, 2000.
32. Nuttal, T. (2016). Diagnostic approach to otitis externa. *Proceedings of the World Congress of Veterinary Dermatology*. Burdeos.
33. Nuttal, T., Cole, LK. (2001). Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for treatment of *Pseudomonas* otitis in dogs. *Veterinary Dermatology*.18: 69-77. doi: 10.1111/j.1365-3164.2007.00575.x.
34. Marín Carrillo, P. (2008). Aplicación de fluoroquinolonas en medicina veterinaria: criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos (pk/pd). Universidad de Murcia. (Tesis Doctoral). Recuperado de: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/10796;jsessionid=0D4B78E13F755ACA29C186866696D0EF>
35. Martín-Aragón, S. (2011). Antibióticos de última generación: revisión. *Ámbito Farmacéutico y Farmacoterapia. Of.* 30, 6.
36. Martín-Barrasa, JL., Lupiola-Gomez, P., Gonzalez-Lama, Z., Tejedor-Junco, T. (2000). Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine*. 47: 191-196.
37. Ohkusa, Y., Taniguchi K., Okubo, I. (2005). Prediction of smallpox outbreak and evaluation of control-measure policy in Japan, using a mathematical model. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 11: 71-80. doi: 10.1007/s10156-005-0373-3.
38. Paz-Zarza, V.M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S., Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de infectología*. 36 (2), 180–189. doi:10.4067/s0716-10182019000200180.
39. Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K. E., Catry, B., Van Duijkeren, E., Mateus, A., Moreno, M. A., Pyyörälä, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E. J., Kunsagi, Z., Torren-Edo, J., Jukes, H., Torneke, K. (2016). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (4), 957–968. doi:10.1093/jac/dkw481.

40. Proceso de desarrollo de fármacos. Recuperado de:
<https://www.novartis.es/innovacion/proceso-de-desarrollo-de-farmacos>
41. Puzniak, L., De Pestel DD., Srinivasan, A., Ye, G., Murray, J., Merchant, S., DeRyke, A., Puzniak VG., et al. (2019). Early dynamics of transmission and control of COVID-19: a mathematical modelling study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63:4, e02564-18. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.02564-18>.
42. Pye, C.C., Yu, A. A., Weese, J. S. (2013). Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Veterinary Dermatology* 24 (4), 446–e99. doi:10.1111/vde.12040.
43. Rubin J., Walker, R., Blickenstaff, K., Bodeis-Jones, S., Zhao, S. (2008). Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology* 131 (1-2). 164–172. doi:10.1016/j.vetmic.2008.02.018.
44. Tafur, JD., Torres, JA., Villegas, MV. (2008). Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*. 12:3.
45. 15 «System Requirements for MATLAB & Simulink R2016b (Professional & Student Versions)». Recuperado de: [MathWorks.com](http://www.mathworks.com).
46. Vademecum Internacional, España. Recuperado de:
<http://www.vademecum.es/>
47. Van Duin, D., Paterson D.L. (2016). Multidrug-resistant bacteria in the community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America* 30 (2), 377–390. doi:10.1016/j.idc.2016.02.004.
48. Waaler, H., Geser, A., Andersen, S. (1962). The use of mathematical models in the study of the epidemiology of tuberculosis. *American Journal of Public Health*. 52: 1002–13.
49. Wasserstein-Robbins, F. (2010). A mathematical model of HIV infection: Simulating T4, T8, macrophages, antibody, and virus via specific anti-HIV response in the presence of adaptation and tropism. *Bulletin of Mathematical Biology*. 72: 1208-53. doi: <https://doi.org/10.1007/s11538-009-9488-5>.
50. Wu, P., Lau E.H., Cowling, B.J., Leung, C.C., Tam, C.M., Leung, G.M. (2010). The Transmission Dynamics of Tuberculosis in a Recently Developed Chinese City. *PLoS One* 5: e10468. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010468>.
51. Wu, JT., Leung, K., Leung, GM. (2019). Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*. 395: 689–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30260-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30260-9).
52. World Health Organization (2017). Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. World Health Organization. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258965>.
53. World Health Organization (2019). Antibacterial agents in preclinical development: an open access database. World Health Organization. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330290>.

“El alma se queda teñida por el color de los pensamientos”

Marco Aurelio

CAPÍTULO SEGUNDO:

PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DE LOS COMPUESTOS 1,4-AMINOFENOL Y 4,4'-AZODIFENOL. DISEÑO DE UNA APLICACIÓN TERAPÉUTICA TÓPICA PARA SU USO EN INFECCIONES CUTÁNEAS

Índice:

1. Introducción y antecedentes
2. Objetivos
3. Materiales y Métodos
 - 3.1. Síntesis y caracterización del compuesto 4,4-azodifenol.
 - 3.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.
 - 3.3. Estudios microbiológicos.
 - 3.3.1. Determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a los compuestos.
 - 3.3.1.1. Método cualitativo.
 - 3.3.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).
 - 3.3.1.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).
 - 3.4. Ensayos de crecimiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en medio mínimo.
 - 3.5. Determinación de enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARs).
 - 3.6. Efecto de los compuestos sobre la formación de biofilm bacteriano.
 - 3.6.1. Técnica de George O'Toole.
 - 3.6.2. Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
 - 3.7. Diseño de una aplicación terapéutica tópica para su uso en infecciones cutáneas.
 - 3.7.1. Ensayo de parches de algodón.
 - 3.7.2. Diseño de apósitos de algodón y composites para el tratamiento de infecciones cutáneas.
 4. Análisis estadístico
 5. Resultados
 - 5.1. Síntesis y caracterización del compuesto 4,4'-azodifenol.
 - 5.2. Estudios microbiológicos.
 - 5.2.1. Determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a los compuestos.
 - 5.2.1.1. Método cualitativo.
 - 5.2.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).
 - 5.2.1.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).
 - 5.3. Ensayos de crecimiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en medio mínimo.
 - 5.4. Determinación of de enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido

- tiobarbitúrico (TBARs).
- 5.5. Efecto de los compuestos sobre la formación de biofilm bacteriano.
 - 5.5.1. Técnica de George O'Toole.
 - 5.5.2. Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
 - 5.6. Diseño de una aplicación terapéutica tópica para su uso en infecciones cutáneas.
 - 5.7. Ensayo de parches de algodón.
 - 5.8. Diseño de apósitos de algodón y composites para el tratamiento de infecciones cutáneas.
6. Discusión
 7. Conclusiones
 8. Referencias

1. Introducción y antecedentes.

Como se ha mencionado previamente el desarrollo de resistencias a los tratamientos antibióticos por parte de las bacterias patógenas es un problema que se ha visto incrementado de manera exponencial en la última década y que supone una grave amenaza para la salud pública (Aslam et al 2018). En este sentido, el último informe de la OMS advierte que para el año 2050 los fallecimientos por infecciones multirresistentes está previsto que superarán a los fallecimientos por cáncer (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>). La búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones se plantea como una necesidad urgente para evitar la aparición y propagación de estas resistencias entre los microorganismos (Chaudhary, 2016). Concretamente, las infecciones cutáneas son muy frecuentes tanto en Medicina como en Medicina Veterinaria y en algunos casos, por ejemplo, en pacientes quemados, pueden llegar a poner en riesgo la vida del paciente. Entre los microorganismos responsables de este tipo de infecciones destacan *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius* (éste último más común en animales de compañía) así como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Ki y Rotstein, 2008). Hemos de resaltar que en numerosas ocasiones estos patógenos presentan resistencias o multirresistencias (cuando son resistentes a 3 o más familias de antibióticos) lo que suponen un riesgo añadido para el paciente y un desafío terapéutico para los profesionales. Así, numerosos estudios demuestran que la exposición a tratamientos antibióticos sistémicos previos es un factor clave para el desarrollo de resistencias, por lo que el uso de tratamientos tópicos con propiedades antibacterianas, sin ser antibióticos “clásicos”, puede suponer una interesante alternativa para evitar la aparición de estas resistencias (Chaudhary, 2016).

Los compuestos azo son entidades químicas que se caracterizan por contener en su estructura molecular el grupo funcional $R-N=N-R'$, en el cual R y R' pueden ser indistintamente grupos arilo o alquilo, si bien es conocido que los derivados más estables contienen dos grupos arilo (Aljamali, 2015). Dichos compuestos se sintetizan siguiendo un protocolo de dos fases. En la primera, se realiza la síntesis del correspondiente ión diazonio aromático partiendo de un derivado anilínico. En la segunda, se produce un acoplamiento entre la sal de diazonio correspondiente y el compuesto aromático (Hegarty, 1978). Estos compuestos se utilizan ampliamente en la industria como tintes sintéticos ya que, debido a su extensa deslocalización de electrones, poseen una coloración muy viva de tonos rojos, amarillos, naranjas o púrpuras, y se aplican como colorantes sintéticos para pinturas, textiles, industria alimentaria o cosmética (Hinks et al., 2000; Wang et al., 2003). Asimismo, también se ha extendido su uso en otros campos, entre los que destacamos la biomedicina, como indicadores en sensores que utilizan materiales funcionales con fluorescencia u optoelectrónica (Wolfbeis, 2005; Fan et al., 2018, Ali et al., 2018).

Así, hasta la segunda mitad del siglo XX no se describieron por primera vez las propiedades antimicrobianas de estos compuestos azo. Desde entonces, sus propiedades y actividad farmacológica ha sido descrita los siguientes contextos:

- a) Notoria actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* utilizando un compuesto que combina funciones azo

dentro de la estructura de la aspirina (AAS). Asimismo, estudios computacionales del fármaco Prontosil® (sulfamidocrisoidina, uno de los primeros antibióticos) demostraron efectos antibacterianos de amplio espectro frente a cocos gram positivos, pero no frente a enterobacterias (Ngaini and Mortadza, 2015; Piotto et al., 2017; Ashraf, 2017; Hager, 2006).

- b) Compuestos como azul Evans o rojo congo, utilizados como indicadores colorimétricos en procesos bioquímicos, han demostrado ser inhibidores del virus del VIH, ya que son capaces de unirse a la enzima proteasa y revertir la transcriptasa (Karipcin and Kabalcilar, 2007).
- c) Compuestos de la familia de los 1,3,4-oxadiazoles, poseen potentes propiedades antifúngicas, antimicrobianas, analgésicas, antituberculosas y citotóxicas (Akhter et al., 2009). De entre todos estos fármacos, los más reconocidos son los derivados de triazoles heterocíclicos como el Ketoconazol o Fluconazol, comúnmente utilizados como antifúngicos (Kuruba et al., 2017).

Asimismo, los compuestos azo pueden unirse a numerosos metales, formando complejos que muestran propiedades antifúngicas y antibacterianas relacionadas con el mecanismo de inhibición del ADN (Ronson et al., 2005). Con respecto al citado mecanismo de acción, Gerhardt Domagk pudo establecer que las propiedades antimicrobianas de la sulfamidocrisoidina se deben al proceso de reducción del enlace azo, dando lugar al producto sulfanilamina, tóxico para los microorganismos (Domagk, 1935). De hecho, se ha podido constatar que numerosos microorganismos son capaces de reducir este enlace azo, incluidos los pertenecientes a la microbiota intestinal tanto de animales como de personas, microbiota cutánea, así como microorganismos medioambientales (Chung, 2016). La reducción de este enlace es realizada por las azorreductasas, un grupo de enzimas que contienen la coenzima FAD (flavina adenina dinucleotido) que utilizan NADH o NADPH como donantes de electrones, pudiendo así llevar a cabo la reducción tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, dando lugar a las correspondientes aminas aromáticas (Misal and Gawai, 2018).

Por otro lado, es importante destacar que, a pesar de la abundante literatura acerca de las propiedades antimicrobianas de estos azocompuestos (Piotto et al., 2013 a, b; Concilio et al., 2015; 2017; Kofie et al., 2014; Rezaei-Seresht et al., 2019), su efecto sobre la formación del biofilm, un importante factor de virulencia de las bacterias patógenas (Piotto et al., 2013a; Sessa et al., 2016), así como de los mecanismos de acción exactos de toxicidad no son del todo conocidos. En esta área en particular, se conoce que los tintes azo pueden inducir los mecanismos de estrés oxidativo en animales (Amin et al., 2010; Abe et al., 2017) y plantas (Jadhav et al., 2012) así como en bacterias gram negativas (Ben Mansour et al., 2007) deducido del incremento de los niveles de enzimas indicadoras de estrés oxidativo que se encargan de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Otros estudios han mostrado que también pueden inducir daños en las membranas, así como genotoxicidad (Ben Mansour et al., 2009 a,b).

2. Objetivos:

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Describir un método de síntesis eficiente del compuesto 4,4'-azodifenol (4,4'-ADF).
2. Establecer la posible actividad antimicrobiana de los compuestos 1,4-aminofenol (4-AF) y 4,4-ADF frente a *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* como bacterias Gram positivas así como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* como Gram negativas, debido a su importancia clínica y su carácter zoonótico.
3. Estudiar y comprender los mecanismos de toxicidad bacteriana de dichos compuestos.
4. Investigar el posible efecto de 4,4-ADF en la formación de biofilms por parte de las bacterias.
5. Realizar un estudio comparativo entre 4,4-ADF y 4-AF, siendo éste último un producto de degradación potencial del primero.
6. Diseñar y desarrollar la aplicación de parches terapéuticos conteniendo 4,4-ADF como potencial tratamiento para infecciones cutáneas.

3. Materiales y métodos:

3.1 Síntesis y caracterización del compuesto 4,4'-azodifenol.

Tanto los productos químicos de síntesis como los disolventes provienen de Aldrich Chemical Co., utilizándose para el proceso sin purificación posterior. El compuesto 4,4'-azodifenol se sintetizó siguiendo la metodología clásica de diazotización seguido de acoplamiento como se muestra a continuación en la **Figura 1**.

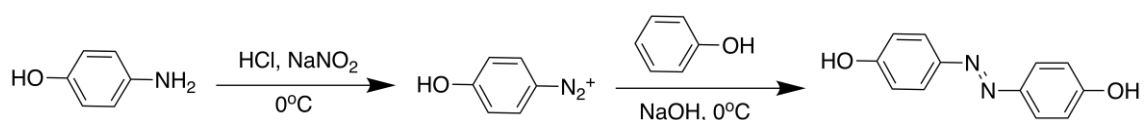


Figura 1: síntesis del compuesto 4,4'-azodifenol

Para el procedimiento de síntesis, se disolvieron 20 g de 4-AF (0,1834 mol) en una disolución de 200 mL de HCl 1M, enfriándolo posteriormente a 0°C. Tras esto, con agitación vigorosa, se añadió una disolución de 12,6 g de NaNO₂ (0,1826 mol) disueltos en 300 mL de agua destilada a la misma temperatura, y se dejó agitando durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 400 ml de MeOH enfriado previamente, y por último se adicionó una disolución de 17 g de fenol (0,1808 mol) en 120 mL de KOH 3M. Esta reacción se mantuvo con agitación constante durante dos horas y tras esto se procedió a la evaporación completa del MeOH, acidificando sus residuos con HCl concentrado hasta alcanzar pH 4, obteniendo así un precipitado de color marrón oscuro. Dicho precipitado se filtró y lavó con agua hasta su completa neutralización. A continuación, el producto se purificó por recristalización con una mezcla de EtOH/H₂O 1:1, para obtener finalmente el compuesto 4,4'-azodifenol como un polvo muy fino de color morado oscuro con un 95% de rendimiento.

Para su caracterización, se realizó el espectro correspondiente FTIR en un espectrofotómetro Jasco FT/IR 4200 equipado con ATR. El espectro RMN de ¹H y ¹³C se realizó a 300 °K en un aparato Bruker Avance AV-500. Los desplazamientos químicos (δ) se muestran en ppm, utilizando el Me₄Si como referencia. Finalmente, el espectro de masas se obtuvo utilizando aparato de cromatografía líquida Thermo Scientific Orbitrap Elite.

La estructura química del compuesto 4,4'-ADF se muestra a continuación en la **Figura 2**:

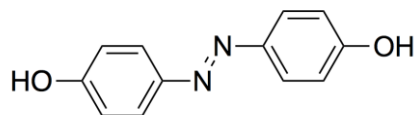


Figura 2: estructura química del compuesto sintetizado 4,4'-ADF.

Asimismo, se obtuvo una caracterización completa del compuesto utilizando métodos de RMN, FTIR, HRMS: ESI-MS.

^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz), δ (ppm): 10.09 (br s, 2H), 7.22 y 6.93 (8H, AA'BB').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz), δ (ppm): 159.9; 145.2; 124.1; 115.7.

HRMS: ESI-MS: peso molecular calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_2$ (M+H) $^+$: 215.0815; teórico: 215.0813.

FTIR: 1505 cm^{-1} (N=N), 1247 cm^{-1} (C-N), 3445 y 3185 cm^{-1} (OH libres o enlaces intermoleculares).

3.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Como bacterias Gram positivas, han sido utilizadas dos especies de estafilococos: *Staphylococcus pseudintermedius* LMG 22219, obtenida de la Colección Belga de Microorganismos Tipo y *Staphylococcus aureus* CECT 5190 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia). Asimismo, como bacterias Gram negativas se han utilizado *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de la colección Española de Cultivos Tipo con números de registro CECT 434 y CECT 110 respectivamente.

Todas las cepas se sembraron en placa de agar triptona soja (TSA) para la obtención de colonias individuales. Para su conservación, a partir de estas colonias se prepararon cultivos líquidos en medio triptona soja (TSB), añadiendo posteriormente glicerol hasta alcanzar una concentración del 15% (v:v) para su conservación en congelación a -76°C .

3.3 Estudios microbiológicos

3.3.1 Determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a los azocompuestos.

3.3.1.1. Método cualitativo.

Como pruebas preliminares decidimos realizar unos experimentos de carácter cualitativo utilizando discos de papel estériles estandarizados para la realización de antibiogramas. En estos discos se depositaron 15 microlitros del compuesto a una concentración de 100 mM. Con dicha cantidad quedan saturados y difunden correctamente en el agar, pudiendo obtener un halo de inhibición uniforme y fácilmente medible. Una cantidad mayor supera su saturación y queda esparcido por el agar de alrededor del disco, mientras que, si se deposita una cantidad menor, no lo satura por completo.

Utilizamos una suspensión de los compuestos en agua y una disolución de estos en glicerol. Asimismo, tanto el agua como el glicerol se utilizaron como controles negativos. Las placas de agar TSA, medio en el que crecen tanto bacterias gram

positivas como negativas, se sembraron en césped. Tras la siembra, se colocaron los discos y se instilaron los 15 microlitros de cada sustancia. Finalmente se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se evaluó la presencia de inhibición del crecimiento alrededor del disco y se midió dicho halo de inhibición.

La localización de los discos en la placa siguió el siguiente esquema (**Figura 3**):

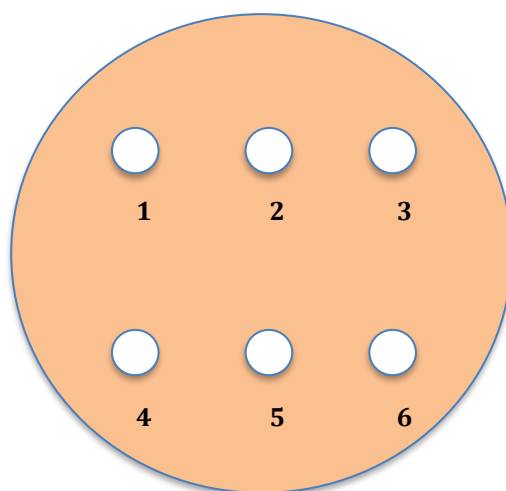


Figura 3: Esquema de la placa de Petri utilizada para testar los discos impregnados con: 1. Agua destilada control 2. 1,4-aminofenol (suspensión en agua) 3. 4,4'-azodifenol (suspensión en agua) 4. Glicerol (control) 5. Dilución de 4-aminofenol en glicerol 6. Dilución de 4,4'-azodifenol en glicerol.

3.3.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La concentración mínima inhibitoria o CMI, se define como la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en condiciones estandarizadas. En nuestro caso, se ha determinado mediante la técnica de microdilución en caldo (CLSI, 2012). Para su determinación, utilizamos placas de 96 micropocillos. Se realizó una valoración cualitativa de la presencia de turbidez de manera visual y se midió la absorbancia a 600 nm de longitud de onda como método cuantitativo. En ocasiones utilizamos radiación ultravioleta para observar la presencia de los pigmentos fluorescentes pociarina y pioverdina de *Pseudomonas aeruginosa*. Estas mediciones son directamente proporcionales a la tasa de crecimiento microbiano.

En primer lugar, preparamos una disolución de ambos compuestos en glicerina a una concentración de 100 mM. Para ello fue necesario utilizar sonicación. A continuación se prepararon las disoluciones a utilizar así como los controles:

- **Control 1** : 3,3 ml de TSBx3+6,6 ml de agua destilada estéril.
- **Control 2**: 3,3 ml de TSBx3+5,6 ml de agua destilada estéril+ 1ml de glicerina.

Para ir diluyendo las siguientes soluciones utilizamos una disolución de agua y TSBx3: 6,66 ml de TSB x3+ 13,33 ml de agua destilada estéril (1 parte de agua y 2 de TSB x3), por lo que finalmente se obtuvo TSB a una concentración estándar.

Partimos de una concentración a 10 mM que se ubicó en la última columna de la placa: 3,33ml TSBx3+5,66 ml agua destilada estéril + 1ml de compuesto disuelto en glicerina a 100mM.

Se preparó un volumen total de 10 ml, de los cuales 5 ml se utilizaron para llenar los pocillos de la correspondiente columna, y los otros 5 ml para preparar la siguiente disolución, que se realizó añadiéndole 5 ml de la solución preparada previamente para diluir, disminuyendo así su concentración a la mitad. Este proceso se repitió 8 veces más hasta completar todas las columnas de la placa.

Cada pocillo contenía un volumen de 200 μ l.

Las disoluciones en la placa de micropocillos quedaron ubicadas de la siguiente manera:

- Columna 1: Control 1 (agua y TSB)
- Columna 2: Control 2 (agua, TSB y glicerina)
- Columna 3: 0,0195 mM
- Columna 4: 0,039 mM
- Columna 5: 0,078 mM
- Columna 6: 0,156 mM
- Columna 7: 0,3125 mM
- Columna 8: 0,625 mM
- Columna 9: 1,25 mM
- Columna 10: 2,5 mM
- Columna 11: 5mM
- Columna 12: 10 mM

La primera mitad de la placa (hasta la fila 4 inclusive) se utilizó para el ensayo del compuesto 4-AF mientras que la otra mitad fue para el ensayo del compuesto 4,4'-ADF (Figura 4).

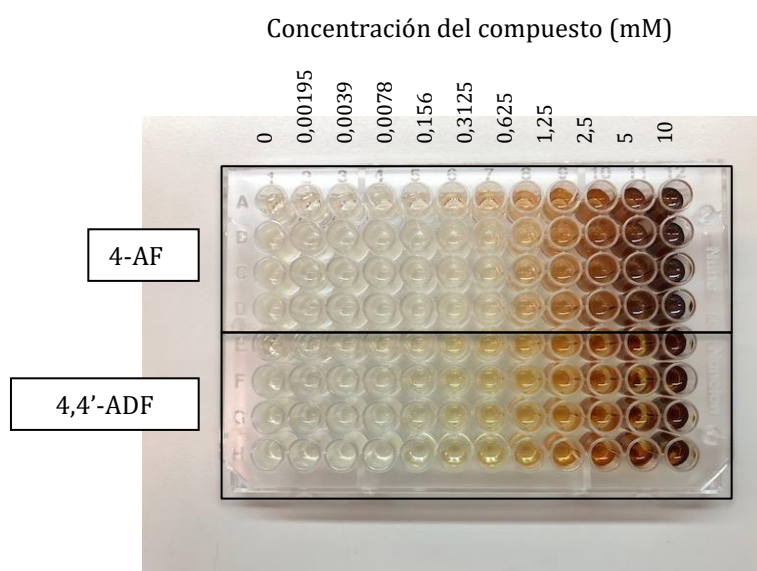


Figura 4. Placa de microtitulación conteniendo concentraciones crecientes de 1,4-aminofenol (4-AF) y 4,4'-azodifenol (4,4'-ADF) para la determinación de la CMI. Las cuatro primeras filas corresponden al primer compuesto mientras que las cuatro filas siguientes para el segundo.

Por último, se inocularon 5 µl de cultivo líquido en TSB en todos los pocillos exceptuando la primera y la quinta fila de la placa, las cuales se consideraron como controles negativos.

Una vez inoculados, se incubaron a 37°C durante 24 horas las placas correspondientes a las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y durante 48 horas las Gram positivas (*Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*), ya que estas últimas necesitan un mayor tiempo de incubación para crecer. Tras la incubación se procedió a la lectura de la absorbancia a 600nm utilizando para ello un lector de placas de microtitulación ASYS UVM340.

3.3.1.3 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).

Una vez determinada la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada compuesto se procedió a la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) que se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que mata al 99,9% de las bacterias.

Para ello se sembraron con espátula en placas de TSA 100 microlitros de la dilución correspondiente a la CMI para cada compuesto y entre 2 y 3 concentraciones por encima de ésta (Tablas 1 y 2).

Las placas se incubaron 24 horas en el caso de las bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*) y 48 horas las Gram positivas (*Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*).

Tabla 1: Concentraciones sembradas para determinación de la CMB del compuesto 4-AF

Cepa bacteriana	Concentraciones sembradas para determinación de CMB
1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0,3125 mM
	0,625 mM
	1,25 mM
	2,5 mM
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	2,5 mM
	5 mM
	10 mM
3. <i>Escherichia coli</i>	1,25 mM,
	2,5 mM
	5 mM
	10 mM
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 mM
	10 mM

Tabla 2: concentraciones sembradas para determinación de la CMB del compuesto 4,4'-ADF

Cepa bacteriana	Concentraciones sembradas para determinación de CMB
1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0,039 mM
	0,078 mM
	0,156 mM
	0,312 mM
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	0,156 mM
	0,3125 mM
	0,625 mM
	1,25 mM
3. <i>Escherichia coli</i>	2,5 mM
	5 mM
	10 mM
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 mM
	10 mM

3.4 Ensayos de crecimiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en medio mínimo.

El objetivo de estos experimentos es el de comprobar si las bacterias Gram negativas utilizadas son capaces de utilizar estos compuestos como fuente nutricional de C y N, para así dar explicación a la falta de inhibición en estas cepas.

Definimos medio mínimo como aquel que posee la mínima cantidad de nutrientes para soportar el crecimiento de un microorganismo y además su composición es perfectamente conocida, no incluyendo sustancias complejas. En este caso, formulamos un medio sin ninguna fuente de carbono, siendo los compuestos, a unas concentraciones inferiores a la CMI, las únicas fuentes de este elemento.

Por tanto, el medio mínimo utilizado está compuesto por una mezcla de sales denominada M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaCl} + \text{NH}_4\text{Cl}$) junto a MgSO_4 , CaCl_2 y agua. Como control negativo utilizamos el medio mínimo únicamente, mientras que como control positivo utilizamos este medio habiéndole añadido glucosa a 2,5g /100ml. Posteriormente ambos compuestos, 4,4'-ADF y 4-AF se añadieron al medio mínimo por separado. Se utilizaron cuatro tubos por cada cepa bacteriana, uno para cada control y uno para cada compuesto. A continuación, se inocularon con 5µl de una suspensión de bacterias previamente centrifugadas y resuspendidas en agua estéril (para que no incluyese restos de medio TSB) y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Finalmente se realizó una siembra en placa de diluciones seriadas para poder realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y determinar el crecimiento en las distintas condiciones de cultivo.

3.5 Determinación de las enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARs).

Las enzimas antioxidantes presentes en las bacterias constituyen una parte muy importante de la barrera antioxidante de estos microorganismos. Estas enzimas ejercen una acción protectora frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS). Durante el metabolismo bacteriano, en los procesos de reducción de O_2 a H_2O se pueden generar los denominados ROS, productos intermedios inestables y muy reactivos, pudiendo reaccionar con gran variedad de componentes celulares, como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. (Fridovich, 1998). En el caso de producirse un aumento de las ROS, puede instaurarse un estado conocido como estrés oxidativo, que supone un alto riesgo para la viabilidad celular (Videla & Fernandez, 1988; Sies, 1997). Las membranas lipídicas celulares, especialmente sus fosfolípidos, son muy susceptibles a la peroxidación como consecuencias de las ROS (Catala, 2006).

La acción de la superóxido dismutasa se puede considerar como una de las primeros mecanismos de defensa antioxidante enzimática, encontrándose incluso en microorganismos anaerobios. Esta enzima cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, por lo que constituye una defensa ante la exposición al O_2 . (Perry y col., 2010).

Por su parte, la catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, sustancia oxidante, en oxígeno y agua (Nicholls et al., 2000).

Asimismo, las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de gran variedad de sustratos utilizando la capacidad oxidante del H_2O_2 (Pandey y col., 2017). Una detección de un aumento de la actividad de estas enzimas pondría de manifiesto la presencia de un daño producido por estrés oxidativo y por tanto, que éste fuera el mecanismo responsable de la inhibición del crecimiento bacteriano.

Por otro lado, las sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARs) se forman a partir de la peroxidación de los lípidos citada anteriormente, considerándose como productos de las reacciones causadas por las especies reactivas de oxígeno. Dado que la mayoría de estas especies poseen una vida media muy corta, son muy difíciles de cuantificar o medir, por lo que resulta mucho más fácil y efectivo cuantificar los productos de sus reacciones. Dentro de los TBARs, el malondialdehído o MDA es un producto de bajo peso molecular generado concretamente por la descomposición de ciertos productos primarios y secundarios de la peroxidación de los lípidos de membrana (Hong et al., 2012). Por tanto, la determinación del MDA permitirá cuantificar el grado de peroxidación de lípidos de membrana y así, su daño.

Las cepas bacterianas se cultivaron en tubos de 50 ml de medio TSB durante 24 horas a $37^\circ C$ y a 200 rpm. Tras esto, cada cultivo se separó en 5 alícuotas de 10 ml cada una, la primera correspondiente al control positivo (sólo con medio TSB) y las otras cuatro a ambos compuestos (1,4-AF y 4,4'-ADF) a concentraciones de CMI y CMB respectivamente. Tras añadir los compuestos, se vuelven a incubar otras 24 horas a $37^\circ C$ y 200 rpm. Una vez finalizado el período de incubación, cada alícuota se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y cada pellet bacteriano se resuspendió en 2,5 ml de tampón de extracción (fosfato potásico 50 mM pH 7.0 conteniendo EDTA 2 mM). A continuación, cada suspensión se sometió a sonicación durante 3 periodos de 30 segundos, separados por periodos de 1

minuto, utilizando un sonicador Ultrasonic Processor (Hielscher) con una amplitud del 100% y ciclos de 0.8. Todo este procedimiento se realizó con los tubos colocados en un baño de hielo, para evitar así alcanzar altas temperaturas que puedan alterar el proceso. La sonicación provoca la rotura celular, liberando al tampón de extracción el contenido celular, en el cual se encuentran las enzimas.

A continuación, para separar los restos celulares de membranas, las suspensiones previamente sometidas a sonicación se centrifugaron en tubos eppendorfs a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante de cada tubo se traspasó a tubos limpios para realizar los ensayos enzimáticos.

Una vez obtenido el extracto crudo, se procedió a determinar las actividades enzimáticas. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Cálculo de proteínas de los extractos.

Todas las actividades enzimáticas, así como el MDA están expresadas en función de la concentración de proteína del extracto crudo. Para ello, se realizaron las mediciones de dichos extractos utilizando el método de Bradford (1976) de acuerdo con una curva de calibrado realizada con albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma) como control. Este método se basa en utilizar un colorante hidrofóbico, el colorante azul Coomassie, el cual forma un compuesto de adsorción de coloración azul al reaccionar con los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Al unirse, forman un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción molar mayor que el colorante libre. La absorbancia se lee a 595 nm y la intensidad de la absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos. Cuanto mayor sea la concentración de proteínas, más intensidad tendrá el color desarrollado y, por lo tanto, mayor valor de absorbancia. La determinación del contenido proteico de una muestra requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con los que se construye una curva de calibración (**Figura 5**). En primer lugar, se realizó una curva de calibración empleando como proteína patrón la albúmina sérica bovina. Se prepararon tubos con distintas cantidades de albúmina y el "blanco" que no contiene proteína, para calibrar el espectrofotómetro. En los tubos se mantuvo constante el reactivo Bradford, cambiando la concentración de albúmina. Una vez preparados los tubos se midió la absorbancia de cada uno de ellos a una longitud de onda de 595nm, construyendo la gráfica de absorbancia versus concentración.

A continuación, para el cálculo de la concentración proteica de los extractos crudos se midieron a 595 nm en las cubetas del espectrofotómetro. Para ello se prepararon las siguientes muestras, como se indica en la **Tabla 3**. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos protegidos de la luz para permitir la formación del complejo coloreado. Posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro ASYS UVM340.

Tabla 3: Volúmenes de preparación de las muestras para la determinación de las proteínas.

Tubo	Agua destilada (μl)	Extracto crudo (μl)	Reactivo de Bradford (μl)	Volumen final (μl)
Blanco	800	--	200	1000
15	785	15	200	1000
50	750	50	200	1000

Para el cálculo de la concentración de proteínas totales se utilizó la siguiente fórmula: $PT \text{ (mg/ml)} = (\text{Abs}/34,5) \cdot 1000/V$, donde V es el volumen de extracto crudo en microlitros.

Siendo $\epsilon = 34,5 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1}$ el coeficiente de extinción molar del reactivo de Bradford.

Finalmente, se realizaron las medias de todas las mediciones de cada extracto.

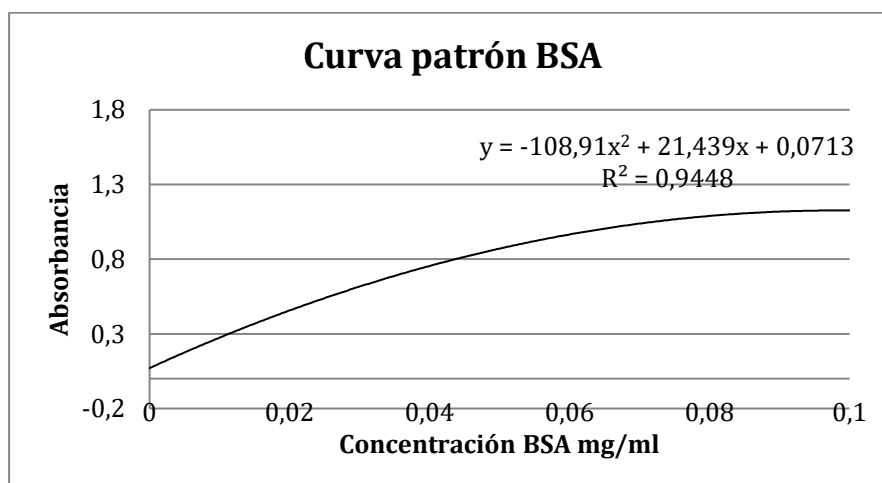


Figura 5: Curva de calibración o patrón para la determinación de las proteínas de los diferentes extractos.

Catalasa (CAT):

La actividad catalasa se midió cuantificando la desaparición de H_2O_2 a una longitud de onda de 240 nm ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis (Shelton, Connecticut, USA) (Pine et al., 1984). Para su medición, se utilizaron cubetas de cuarzo que contenían 800 μl de tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7.6) y 0.1 mM EDTA y 100 μL de H_2O_2 al 15%. Para iniciar la reacción se añadió 100 μL de extracto crudo, registrando el decrecimiento de los valores de absorbancia a 240 nm durante 2 minutos.

Para su cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

Actividad catalasa (U) = $(\text{Valor medio } \Delta\text{absorbancia} / \epsilon) \cdot 10^{-3} / 1 \cdot \text{vol extracto en ml}$

Actividad catalasa en función de proteína (U/mg) = $\text{CAT(U)}/\text{mg proteína extracto}$

Siendo $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1 corresponde a 1 cm de paso de luz de espectrofotómetro

Peroxidasas totales:

La actividad de las peroxidasas totales se analizó monitorizando la oxidación del pirogalol a purpurogalina por medio de H₂O₂ a una longitud de onda de 420 nm (Chance and Maehly, 1955). Para su medición se utilizaron cubetas de espectrofotometría de 3 ml que contenían un volumen final de 2 ml compuesto de: 1,5 ml de tampón fosfato potásico a 10 mM y pH 6,0, 0,1 ml de pirogalol a 0,4 M recién preparado y de 0,1 a 0,2 ml de extracto crudo. La reacción se desencadenó añadiendo 0,15 ml de H₂O₂ al 0,3% (v:v) recién preparada. Una vez añadida el H₂O₂, el contenido de las cubetas se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y tras esto, se midió la absorbancia a 420 nm. Para el cálculo de la actividad también se preparó una cubeta control sin extracto crudo para obtener la oxidación basal del pirogalol durante 5 minutos. El incremento de absorbancia con respecto al control de pirogalol indicó la actividad peroxidasa total de las muestras. Para los cálculos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$U/ml \text{ extracto} = ((\Delta \text{absorbancia}_{5 \text{ min}} - \Delta \text{absorbancia}_{5 \text{ min blanco}}) \cdot 3 \cdot fd) / \epsilon \cdot \text{vol extracto}$$

Siendo:

$$\epsilon = 12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} (\text{coeficiente de extinción molar del pirogalol})$$

3= ml volumen del ensayo

fd: factor de dilución

Superóxido dismutasa (SOD):

Esta actividad enzimática se evaluó por refractometría a 560 nm de longitud de onda utilizando un ensayo basado en la fotorreducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) en presencia de riboflavina (Beyer and Fridovich, 1987). Para ello, se partió de una solución stock de 30 ml compuesta por 27,5 ml de tampón fosfato potásico a pH 7,6, 1 ml de EDTA a 0,2 M, 1 ml de NBT recién preparado a 1,5 mM y 0,5 ml de Triton X-100. En cada cubeta de espectrofotometría se vertieron 2,88 ml de dicha solución stock y 20 μ l de extracto crudo. Como control, para obtener la fotorreducción basal del NBT, se utilizó una cubeta sin extracto crudo. Para desencadenar la reacción, se añadió a cada cubeta 0,1 ml de riboflavina y a continuación se expusieron a luz blanca (fluorescentes comerciales) durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 560 nm. Se consideró como una unidad de actividad SOD como la cantidad de enzima capaz de inhibir el 50% de la fotorreducción del NBT por la riboflavina (Beyer and Fridovich 1987).

Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):

Para la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en concreto el malondialdehído (MDA), las cepas se cultivaron como se ha descrito con anterioridad en el caso de las actividades enzimáticas. Tras el período de incubación, los tubos de cultivo se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos. Tras desechar el sobrenadante, los pellets o precipitados se disolvieron en 3 ml de una mezcla de ácido tricloroacético (TCA) al 20% con un 0,5 % de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ong et al., 2017). A continuación, las disoluciones se calentaron en un baño de agua a 95°C durante 30 minutos como se muestra en la imagen a continuación (**Figura 6**).

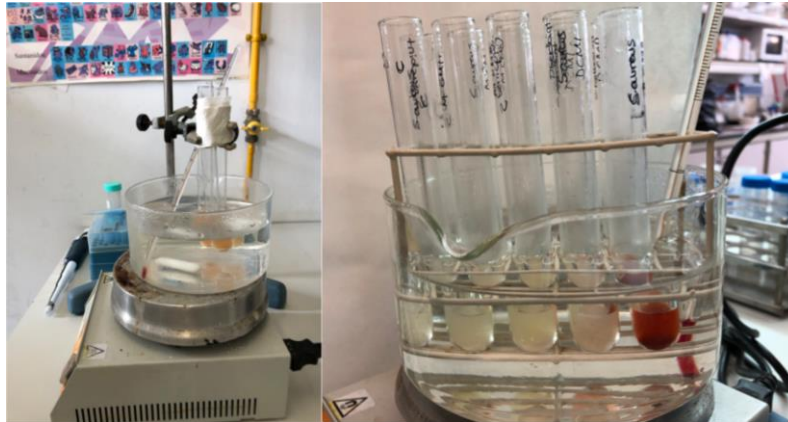


Figura 6: Preparación del baño de agua a 95°C para la determinación de TBARS.

Pasados los 30 minutos, para detener la reacción, los tubos se enfriaron en el hielo durante 30 segundos. Tras esto, se someten a centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se recolectó el sobrenadante para la determinación de los parámetros TBARS y se desechó el precipitado, compuesto por los restos de las membranas celulares.

La concentración de TBARS, en concreto el MDA, se calculó a partir del valor de absorbancia a 532 nm medida con un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer (Shelton, Connecticut, USA), utilizando el coeficiente de extinción molar $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.6 Efecto de los compuestos sobre la formación de biofilm.

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (López et al., 2010). El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por polisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias. Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido (Lasa et al. 2005).

El objetivo de los siguientes experimentos es el de valorar la acción de los compuestos sobre la formación y estructura del biofilm bacteriano.

3.6.1 Determinación de la acción sobre la formación de biofilms sobre placa de micropocillos mediante la técnica de George O'Toole.

El propósito del siguiente ensayo es el de determinar la variación de la formación de biofilm de dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus psuedintermedius* y *Staphylococcus aureus*) y dos Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) ante la presencia de concentraciones crecientes de 4-AF y 4,4'-ADF.

La determinación se llevó a cabo mediante la técnica de George O'Toole (Figura 7) (O'Toole, 2011). Para ello, se prepararon placas de microtitulación en las mismas condiciones que las anteriormente descritas para la CMI. Tras la incubación de la placa, se vació el contenido volcando la placa y agitándola para eliminar el cultivo líquido de los pocillos. Posteriormente, se sumergió cuidadosamente la placa en un baño de agua, eliminándola posteriormente volcando la placa y agitándola. Este proceso se repitió en tres ocasiones para eliminar células libres que no forman el biofilm. La tinción se llevó a cabo añadiendo 200 μ l de una solución de cristal violeta al 0,1% en cada pocillo e incubando a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Tras la tinción se volcó el colorante agitando la placa vigorosamente. Se realizaron tres lavados sumergiendo la placa en un baño de agua limpia cada vez. Finalmente, se dejó secar la placa boca abajo sobre papel de filtro durante varias horas. Finalmente, se añadieron 200 μ l de ácido acético al 30% a cada pocillo para disolver el biofilm teñido con cristal violeta. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10-15 minutos y se determinó la absorbancia a 550 nm utilizando el ácido acético al 30% como blanco.

Inicialmente el biofilm queda teñido con el cristal violeta. El ácido acético disuelve el biofilm adherido y lo resuspende, pudiendo así medir su absorbancia a 550 nm de longitud de onda. Cuanto más biofilm se haya formado, mayor valor de absorbancia se obtendrá.

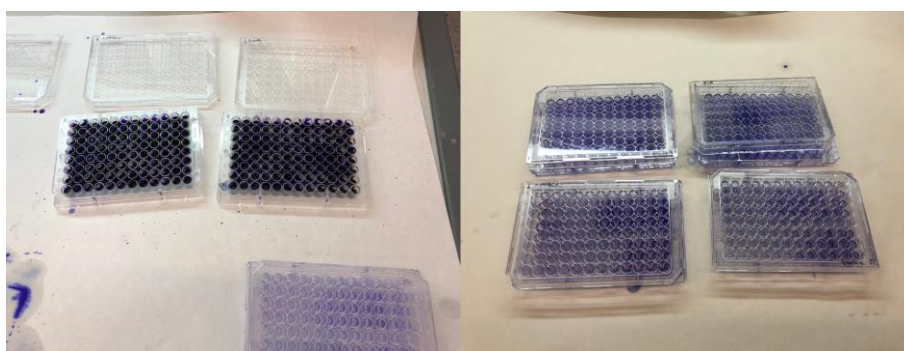


Figura 7: Técnica de George O'Toole realizada en la placa de microtitulación de 96 pocillos.

3.6.2 Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

El objetivo del ensayo es el de la valoración visual mediante microscopía electrónica del efecto de los compuestos sobre el crecimiento bacteriano y sobre la formación del biofilm. Para ello, se utilizó una placa de 6 pocillos en la que se cultivaron las bacterias sobre unos portaobjetos circulares de cristal de 1 cm de diámetro colocados en el fondo de los pocillos siguiendo el esquema mostrado a continuación (**Figura 8**).

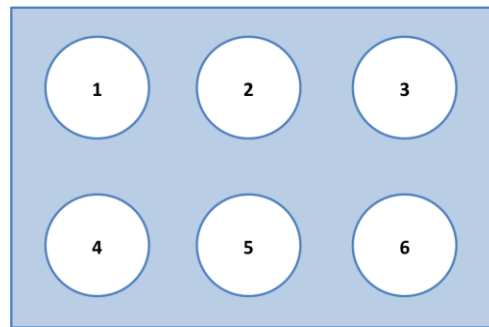


Figura 8. Esquema de la placa de 6 pocillos utilizada para la formación de biofilms en presencia de 1,4-aminofenol y 4,4'-azodifenol. 1. Control *S. pseudintermedius*; 2. CMI *S. pseudintermedius*; 3. CMB *S. pseudintermedius*; 4. Control *S. aureus*; 5. CMI *S. aureus*; 6. CMB *S. aureus*.

Una vez colocados los portaobjetos en el fondo de los pocillos, se vertieron 2 ml, volumen suficiente para cubrir todo el fondo del pocillo, de TSB (controles) así como TSB en presencia de los compuestos, 4-AF y 4,4'-ADF a CMI. A continuación, se inocularon los pocillos con 100 μ l de cultivo bacteriano líquido de *S. pseudintermedius* o *S. aureus* (con densidad óptica ajustada a 1.0). Tras esto, las placas se incubaron a 28°C durante 4 días para permitir el desarrollo del biofilm. Una vez incubadas, los portaobjetos se extrajeron cuidadosamente con ayuda de unas pinzas y se trasladaron a una placa limpia para lavarse con agua destilada y volcar el contenido cuidadosamente. Este proceso de lavado se repitió tres veces y después, se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, para la fijación de las muestras, se utilizó un volumen de 5ml de glutaraldehído al 5% preparado en tampón cacodilato 0,2 M y pH 7,2 y se dejaron incubar durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, se lavaron 3 veces con 5 ml de tampón cacodilato. Las muestras se deshidrataron en serie de acetona (30% al 100%) y se sometieron a un proceso de secado de punto crítico utilizando un secador Leica EM CPD300 a 31°C y 73,8 bar. Una vez secadas, las muestras se sometieron a un recubrimiento de Au-Pd (10 nm) y se observaron con un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO LS15.

3.7 Diseño de una aplicación terapéutica tópica para su uso en infecciones cutáneas.

3.7.1 Ensayo de parches de algodón.

En este primer ensayo se utilizaron apósitos de algodón de uso quirúrgico estériles impregnados con 30 μ l de una disolución en glicerol o una suspensión en agua a 100 mM de los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF. Como controles se tomaron tanto el agua como el glicerol.

El objetivo del ensayo es el de determinar la difusión de los compuestos en el medio así como su actividad antimicrobiana para valorar su potencial uso en parches terapéuticos en afecciones cutáneas de carácter infeccioso provocadas por *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se realizó la siembra en césped con espátula de las placas de agar TSA con las diferentes cepas bacterianas. A continuación, con la ayuda de unas pinzas estériles se situaron los parches de algodón y finalmente se depositan 30 μ l de cada compuesto y su control en los diferentes parches. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas para su evaluación. El esquema seguido es el que se muestra a continuación (**Figura 9**).

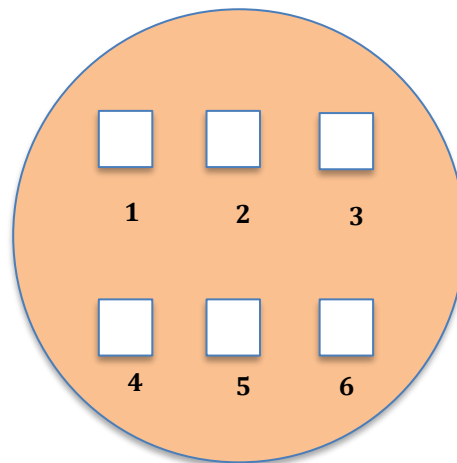


Figura 9. Esquema de la placa de Petri utilizada para testar parches de algodón impregnados con 4-AF y 4,4'-ADF como inhibidores del crecimiento de las bacterias. 1. Agua destilada; 2. Suspensión en agua de 4-AF; 3. Suspensión en agua de 4,4-ADF; 4. Glicerol; 5. Dilución de 4-AF en glicerol; 6. Dilución de 4,4'-ADF en glicerol.

3.7.2 Diseño de apósitos de algodón y composites para el tratamiento de infecciones cutáneas.

El objetivo de los siguientes ensayos es el diseño de apósitos compuestos de una capa de algodón estéril junto con otra conformada por materiales compuestos biodegradables para proporcionar una acción antibacteriana por la liberación prolongada de los compuestos así como una humedad para favorecer el desarrollo y mantenimiento de un tejido de granulación sano en el lecho de la herida. Ambos aspectos son esenciales para un tratamiento exitoso, así como para evitar la aparición

de complicaciones secundarias como extensión de las lesiones, dificultad en la cicatrización o necrosis, y en casos más severos, septicemia (Ki y Rotstein, 2008).

Todos los apósitos fueron testados en placas de agar TSA sembradas previamente en césped con las diferentes cepas bacterianas. Tras la siembra, se colocaron los apósitos en el centro de la placa y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Finalmente se valoró la presencia del halo de inhibición alrededor del parche. Se realizaron tres diseños utilizando distintos compuestos.

1. Apósitos conformados por esferificaciones de un composite de alginato y los diferentes compuestos.

La aplicación del compuesto en forma de esferificaciones permite una liberación sostenida del compuesto. Para la realización de las esferificaciones se prepararon unas disoluciones de alginato al 3% y 1,4-AF y 4,4'-ADF a una concentración de CMI en agua que se esterilizaron en el autoclave. A continuación, utilizando una jeringa y aguja fina, se depositaron pequeñas gotas en una disolución de 5 g de Cl_2Ca en 100 ml de agua para formar las esferificaciones, que posteriormente se esparcieron sobre un apósito de algodón estéril de 4,5x3cm para finalizar la confección del parche (**Figura 10**).



Figura 10: Apósito conformado por esferificaciones de un composite de alginato y los diferentes compuestos (1,4-aminofenol y 4,4'-azodifenol).

2. Apósitos conformados por un composite de gelatina neutra y compuestos.

En este experimento se realizó, por cada placa, una mezcla de 15 g de gelatina neutra de origen porcino estéril en 15 ml de agua estéril caliente junto con cada uno de los azocompuestos a una concentración de CMI. Posteriormente se vertieron en placas de Petri en las que se había delineado en su superficie exterior inferior dos áreas de 4,5x3 cm correspondientes al área del apósito de algodón como se muestra a continuación en la **Figura 11**.

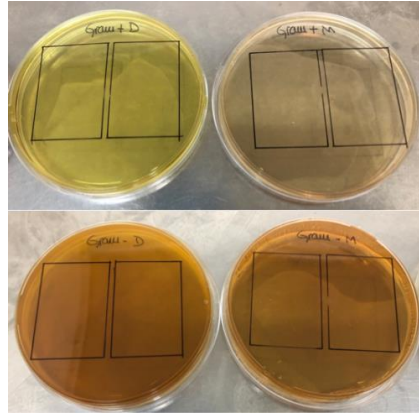


Figura 11: Áreas de 4,5x3 cm dibujadas en las diferentes placas. Posteriormente se recortaron los rectángulos de gelatina conteniendo los compuestos (4-AF en la izquierda y 4,4'-ADF en la placa de la derecha) y se depositaron sobre parches de algodón estéril para configurar el apósito.

Una vez enfriado y solidificado el composite, se recortó y depositó en la pieza de apósito de algodón estéril para completar su conformación como se muestra en la **Figura 12**.

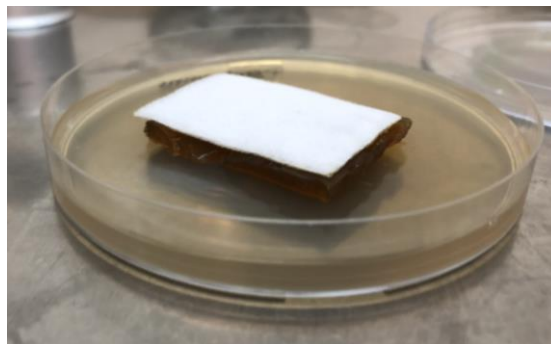


Figura 12: Apósito completo conformado por el composite de gelatina solidificado y el algodón estéril.

3. Apósitos conformados por un composite de agar al 0,9% y los compuestos.

La metodología es la misma mostrada en el caso anterior, vertiendo una disolución de agar al 0,9 % con los diferentes azocompuestos a concentraciones de CMI en las placas con las áreas previamente delineadas para, finalmente, una vez enfriado, unirlo a la lámina de apósito de algodón estéril (**Figura 13**).

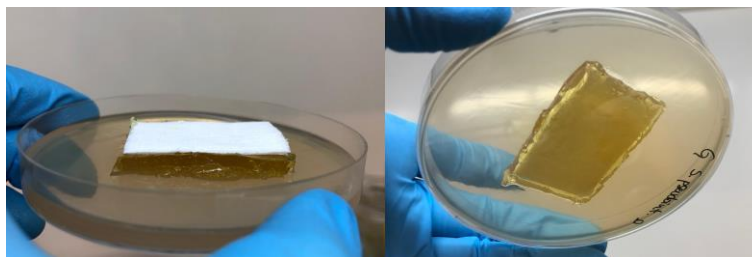


Figura 13: apósito conformado por un composite de agar y los compuestos.

4. Análisis estadístico.

Los experimentos realizados en el presente estudio se llevaron a cabo asegurándose de que los datos obtenidos fuesen estadísticamente representativos. Tanto la determinación de la CMI como la CMB se realizaron por triplicado. Asimismo, las actividades enzimáticas y MDA se muestran como las medias obtenidas \pm las desviaciones estándar de las determinaciones en dos cultivos independientes. Finalmente, las determinaciones de la formación de biofilm por la técnica de George O'Toole también se realizaron por triplicado y los datos han sido expresados teniendo en cuenta sus correspondientes desviaciones estándar.

En las comparaciones de los efectos de los compuestos sobre diferentes variables se ha aplicado el test Student y las diferencias significativas de $p < 0.05$ han sido indicadas en las tablas y figuras. Este tipo de test o análisis estadístico se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal, que es una de las distribuciones de probabilidad de variable continua que con más frecuencia aparece en estadística y en la teoría de probabilidades, pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el número muestral en el que está basado esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación estándar en lugar del valor real. Su aplicación nos ha permitido cerciorarnos de que los resultados obtenidos son fiables y de poder evidenciar las diferencias estadísticamente significativas.

5. RESULTADOS.

5.1 Síntesis y caracterización del compuesto 4,4'-azodifenol.

En la presente Memoria se ha preparado el compuesto 4,4'-azodifenol, cuya estructura se encuentra indicada en la **Figura 14**. Aunque este compuesto aparece en el catálogo comercial de alguna pequeña empresa química, la realidad es que no hemos encontrado ninguna parte experimental en la que se describa ni su preparación completa ni se recojan los datos necesarios para una correcta determinación estructural.

Así, se sintetizó, utilizando como compuesto de partida el producto comercial 1,4-aminofenol, siguiendo la metodología clásica de diazotización como primer paso, en la que es necesario la utilización de nitrito de sodio en presencia de un ácido mineral, como el ácido clorhídrico (Hegarty, 1978). La reacción se realiza a cero grados centígrados ya que las soluciones acuosas de estas sales son altamente inestables a temperaturas superiores a cinco grados centígrados, por lo que es necesario la utilización de un baño de hielo con temperatura controlada. De esta manera se generará de una forma eficiente el catión nitrosonio, el cual se someterá a un proceso de acoplamiento diazoico en presencia de un compuesto aromático activado del tipo fenol, como parte de un proceso del tipo sustitución electrófila aromática (Hegarty, 1978). Finalmente se obtendrá el compuesto sustituido en la posición para y de tipo azoico, concretamente el 4,4'-azodifenol, perteneciente al grupo de los denominados azocompuestos, según se recoge en la **Figura 14**.

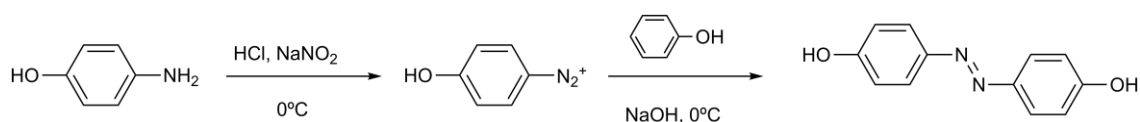


Figura 14: síntesis del compuesto 4,4'-azodifenol

El compuesto 4,4'-azodifenol se obtuvo como un polvo muy fino de color morado oscuro y se logró sintetizar con un rendimiento superior al 95% en una escala multigramo, pudiéndose purificar con una mezcla etanol/agua apropiada de manera completa de una forma eficiente y rápida. Este compuesto es muy estable al ser almacenada en oscuridad y a temperatura ambiente durante años y sin observar ningún tipo de degradación.

Como está descrito ampliamente en la literatura la geometría de los azocompuestos de este tipo son completamente planas y con una disposición *trans* con respecto al doble enlace de nitrógeno, al ser este el isómero más estable ya que tiene minimizadas las interacciones estéricas entre los grupos aromáticos respectivos. Aunque la barrera de paso del isómero *trans* al *cis* en este tipo de compuesto suele ser de 50 KJ/mol, es fácilmente sobrepasada mediante reacciones de fotoisomerización de una manera reversible y mediante el uso de una radiación de luz ultravioleta. El isómero *cis* en

estos casos suele sufrir una relajación térmica muy lenta cuando se cursa a temperatura ambiente que conduce al trans que en algunas ocasiones es utilizada para aplicaciones como sensores químicos (Wolfbeis, 2005; Fan et al., 2018, Ali et al., 2018).

Con objeto de utilizarse con fines de evaluación antimicrobiana, se determinó que se trata de un compuesto insoluble en agua, pero fácilmente soluble en DMSO, Cl_2CH_2 y glicerol.

5.2 Estudios microbiológicos.

5.2.1 Determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a los compuestos.

5.2.1.1 Método cualitativo:

La evaluación inicial de las propiedades antimicrobianas de los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF mostró que ambos compuestos produjeron halos de inhibición en Gram positivas (Figura 14, A, B) pero no en Gram negativas (Fig. 14, C,D).

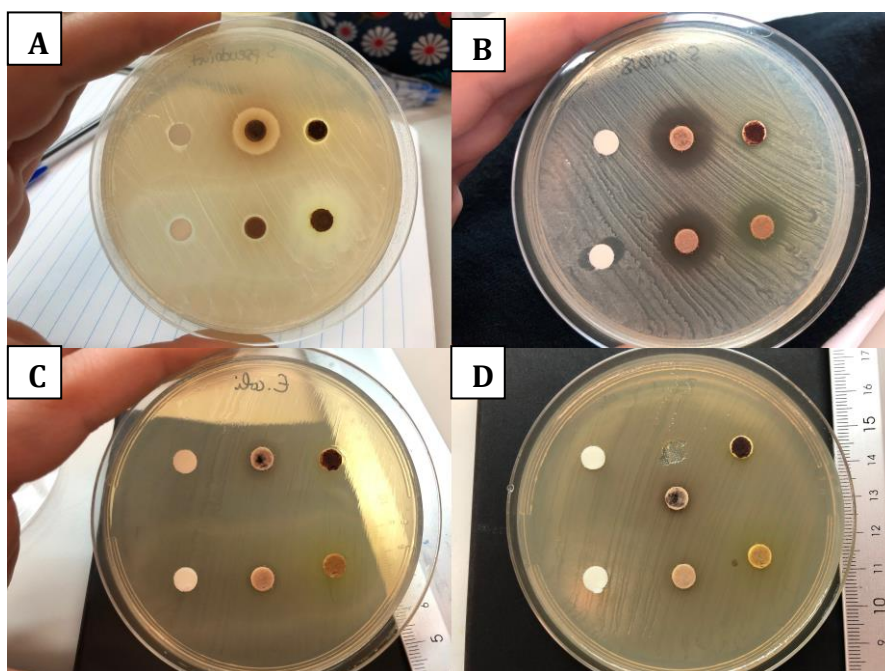


Figura 14. Evaluación inicial de la capacidad antibacteriana de 4-AF y 4,4'-ADF mediante discos de papel cargados con 15 μL de disoluciones 100 mM de estos compuestos. **A.** *S. pseudintermedius*; **B.** *S. aureus*; **C.** *E. coli*; **D.** *P. aeruginosa*. Para cada placa, los tres discos superiores contienen de izquierda a derecha: agua, 4-AF suspendido en agua y 4,4'-ADF suspendido en agua; y los tres discos inferiores contienen: glicerol, 4-AF disuelto en glicerol y 4,4'-ADF disuelto en glicerol.

En la **tabla 4** se reflejan los diámetros en milímetros de los halos de inhibición obtenidos tras la incubación.

Tabla 4: Tamaño de los halos de inhibición (en mm) producidos por los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF para las cepas bacterianas de estudio.

Cepa bacteriana	agua	4-AF en agua	4,4'-ADF en agua	Control glicerol	4-AF en glicerol	4,4'-ADF en glicerol
<i>S. pseudintermedius</i>	0 mm	4 mm	0 mm	1 mm	1mm	4 mm
<i>S. aureus</i>	0 mm	5 mm	1 mm	0 mm	5 mm	4 mm
<i>E. coli</i>	0 mm	1 mm	0mm	0mm	1mm	0mm
<i>P. aeruginosa</i>	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm

Podemos apreciar que mientras que en Gram las cepas Gram positivas se pueden observar halos de inhibición con claridad, en las cepas Gram negativas no aparecen. Tras la realización de las pruebas preliminares de carácter cualitativo, procedimos a realizar los ensayos cuantitativos para las distintas cepas bacterianas para la determinación de la CMI y CMB de los compuestos. Es importante mencionar que, debido a que el compuesto en agua forma una suspensión, mientras que en glicerol se disuelve, se decidió utilizar la disolución en glicerol para los siguientes ensayos.

5.2.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

1. *Staphylococcus pseudintermedius*.

En la determinación de la CMI mediante método cualitativo de observación de turbidez, en los pocillos correspondientes a 4-AF apreciamos que no hubo turbidez en la columna número 8, que corresponde a una concentración de 0,625 mM mientras que en el caso de 4,4'-azodifenol no se observó turbidez en la columna 6, que corresponde a una concentración de 0,156 mM.

Con respecto a la determinación de la CMI por método cuantitativo mediante medición de absorbancia a 600 nm de longitud de onda, para el compuesto 4-AF (**Figura 15**) pudimos apreciar que a una concentración de 0,625 mM la medición de absorbancia disminuía de manera muy considerable con respecto a las concentraciones anteriores, considerándose la CMI para este compuesto. En cuanto al 4,4'-ADF (**Figura 16**) se evidenció que a una concentración de 0,156 mM la medición de absorbancia disminuyó notoriamente, considerándose la CMI para este compuesto.

Se pudo observar que a mayores concentraciones (5mM y 10 mM) se producía un aumento del valor de absorbancia. Esto se debe a que los compuestos poseen un color marrón amarillento intenso, y a concentraciones altas puede interferir con la medición de la absorbancia. Este hecho se evidenció en las mediciones realizadas en todas las placas para ambos compuestos, independientemente de la bacteria inoculada.

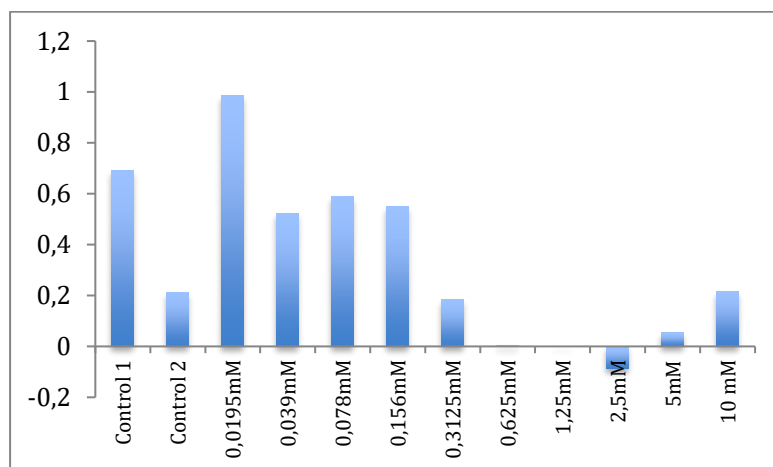


Figura 15: Gráfica de valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 4-AF en presencia de *Staphylococcus pseudintermedius*.

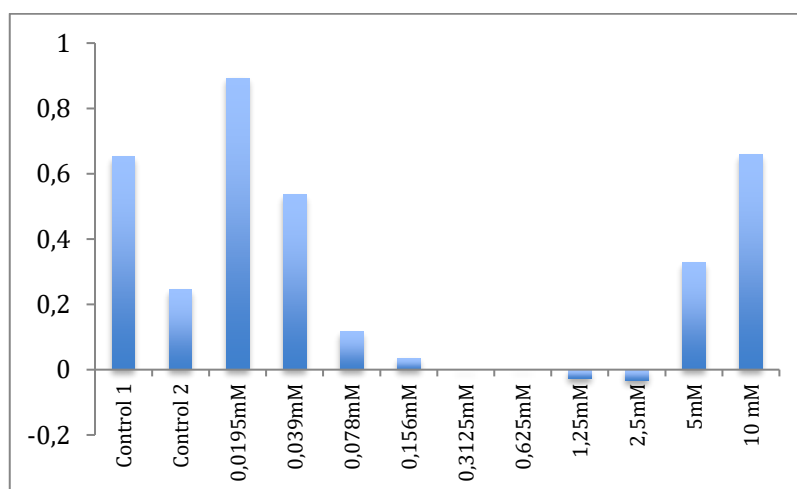


Figura 16: Gráfica de valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 4,4'-ADF en presencia de *Staphylococcus pseudintermedius*.

2. *Staphylococcus aureus*:

Al observar las placas no se evidenció turbidez en los controles negativos, por lo que el experimento estaba realizado correctamente. Asimismo, para 4-AF apreciamos que no había turbidez en la columna número 9, que corresponde a una concentración de 1,25 mM. En cuanto al compuesto 4,4'-ADF no se observó turbidez en la columna 6, que corresponde a una concentración de 0,156 mM. Con respecto a los valores de absorbancia mostrados en la **Figura 17** apreciamos que para 4-AF una concentración de 1,25 mM, la medición de absorbancia disminuyó notoriamente, considerándose la CMI para este compuesto, datos que concuerdan con la valoración visual realizada previamente. En el caso del compuesto 4,4'-ADF (**Figura 18**) los datos mostraron que a una concentración de 0,3125 mM los valores de absorbancia disminuyeron de manera muy considerable, considerándose la CMI para este compuesto.

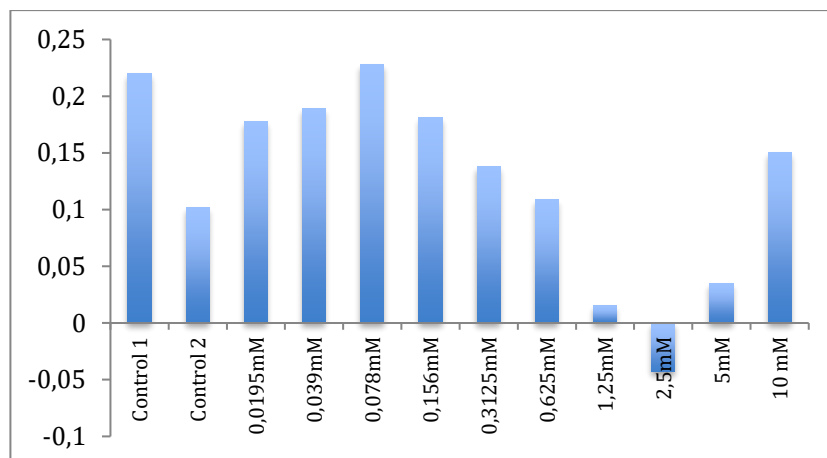


Figura 17: Gráfica de valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 4-AF en presencia de *Staphylococcus aureus*.

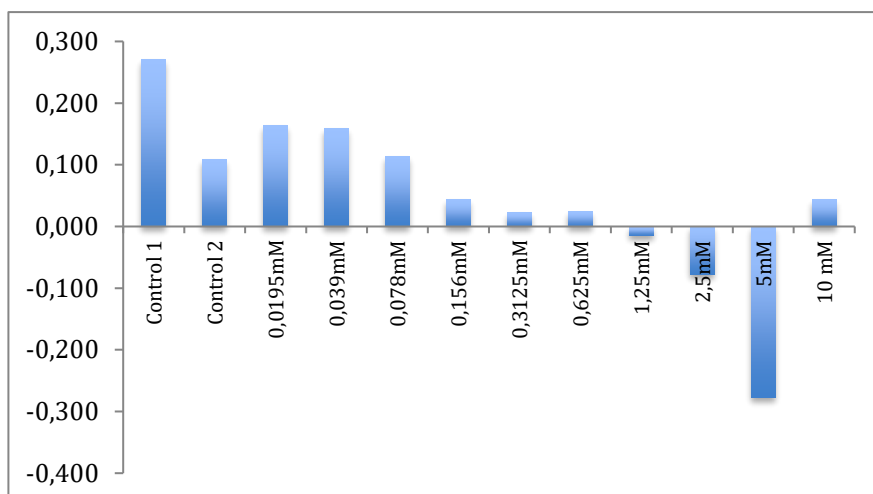


Figura 18: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 4,4'-ADF en presencia de *Staphylococcus aureus*.

3. *Escherichia coli*.

En la determinación de la CMI mediante método cualitativo de observación de turbidez se apreció que en el caso de 4-AF no hubo turbidez en la columna número 10, que corresponde a una concentración de 2,5 mM. Asimismo, para el compuesto 4,4'-ADF no se observó turbidez en la columna 11, que corresponde a una concentración de 5 mM. Tras la medición de absorbancia (**Figura 19**) pudimos determinar que para *E. coli*, a una concentración de 2,5 mM de 4-AF la medición de absorbancia disminuyó de manera muy notoria, estableciéndose como la CMI para este compuesto. Con respecto al 4,4'-ADF (**Figura 20**), observamos una disminución de los valores a una concentración de 5 mM, por lo que se considera como CMI para este compuesto. De nuevo, estos datos coinciden con la valoración visual de turbidez realizada con anterioridad.

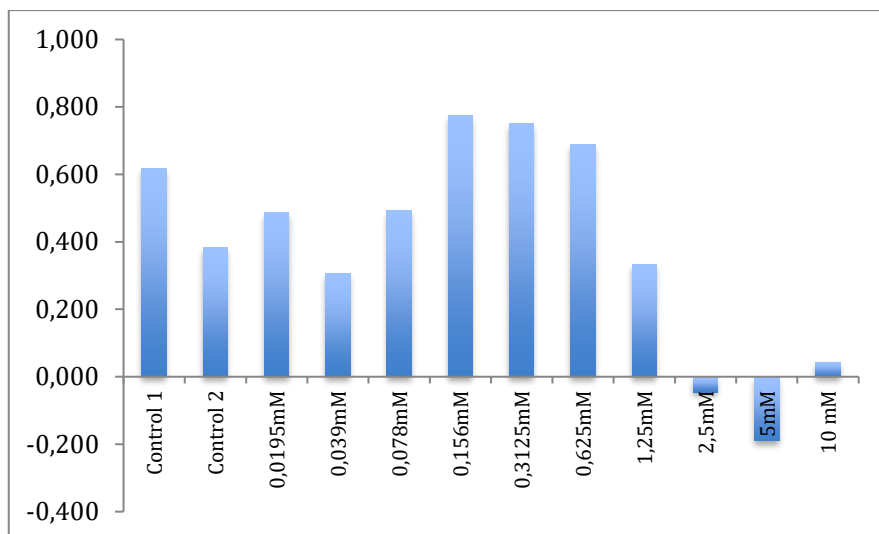


Figura 19: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 1,4-aminofenol en presencia de *E.coli*.

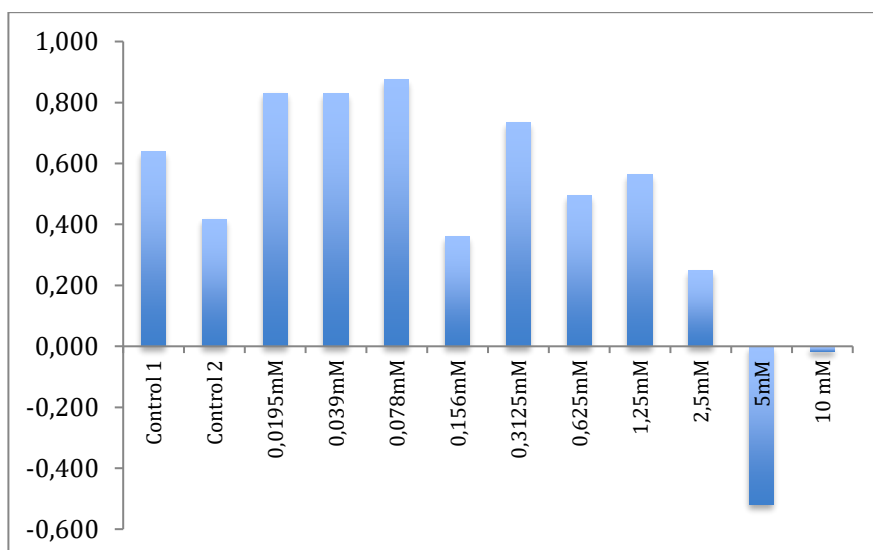


Figura 20: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 4,4'-azodifenol en presencia de *E.coli*.

4. *Pseudomonas aeruginosa*

Al igual que en el caso anterior, en las filas correspondientes a los controles no se observó turbidez. Observando la placa pudimos determinar que para 4-AF no hubo turbidez en la columna número 11, correspondiente a una concentración de 5 mM. Asimismo, para 4,4'-ADF no se observó turbidez en la columna 11, que corresponde a una concentración de 5 mM.

Visualización sometida a luz ultravioleta:

Pseudomonas aeruginosa son bacterias que se caracterizan por emitir fluorescencia ante la luz ultravioleta debido a la presencia de pigmentos fluorescentes como la pioverdina

y la piocianina. Mediante esta visualización (**Figura 21**) se pudo comprobar que conforme se inhibe el crecimiento bacteriano la intensidad de la bioluminiscencia iba disminuyendo. Asimismo, es reseñable que en el control 2, correspondiente a TSB, agua y glicerina, la bioluminiscencia fue menor que en control 1 y que en los siguientes pocillos.

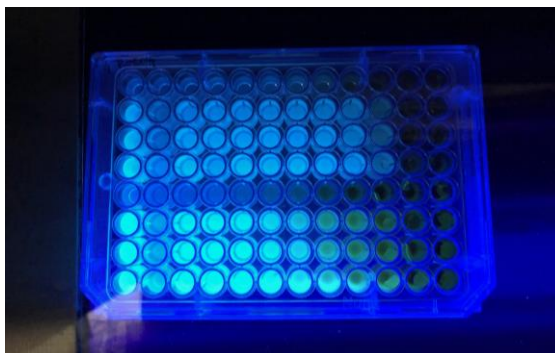


Figura 21: Placa de micropocillos sometida a luz ultravioleta.

En cuanto a la medición de absorbancia pudimos observar que en el caso de 4-AF (**Figura 22**), a una concentración de 5 mM el valor de absorbancia disminuyó de manera muy considerable con respecto a las concentraciones anteriores, considerándose la CMI para este compuesto, datos que concuerdan con la valoración cualitativa realizada previamente. Respecto al 4,4'-ADF (**Figura 23**) se pudo observar que a una concentración de 5 mM la medición de absorbancia disminuyó de manera muy notoria, considerándose la CMI para este compuesto. Ambos datos coincidieron con la valoración cualitativa realizada previamente.

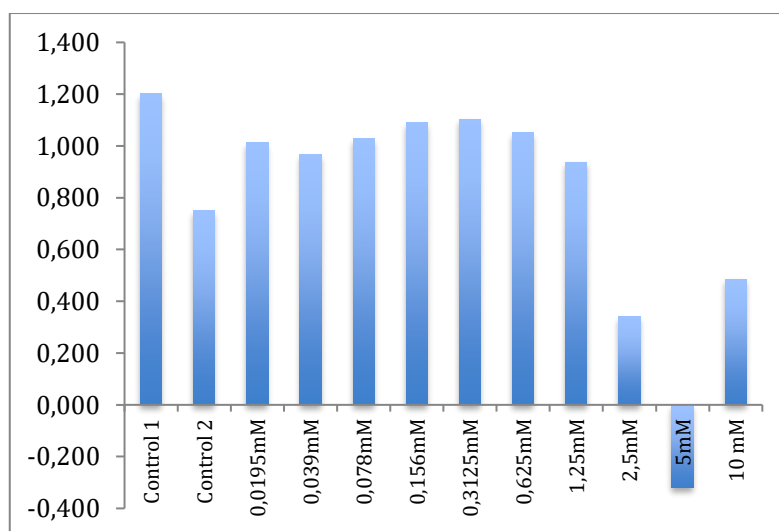


Figura 22: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 4-AF en presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

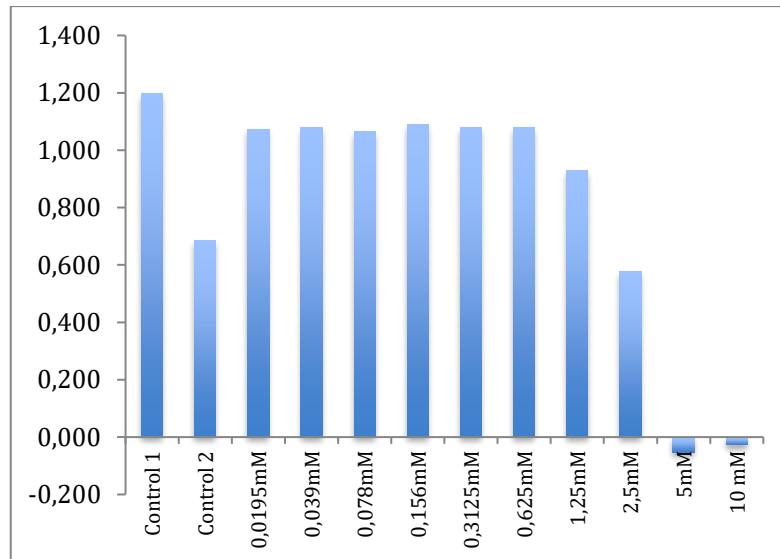


Figura 23: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de 4,4'-ADF en presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2.1.3 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).

1. *Staphylococcus pseudintermedius*:

Para 4-AF se observó que a las concentración más baja estudiada (0,3125 mM) hubo un crecimiento profuso (**Figura 24, A**), luego fue disminuyendo el número de colonias (**Fig. 24, B,C**) y a una concentración de 2,5 mM no existía crecimiento alguno (**Fig. 24, D**), considerándose como la CMB para este compuesto.

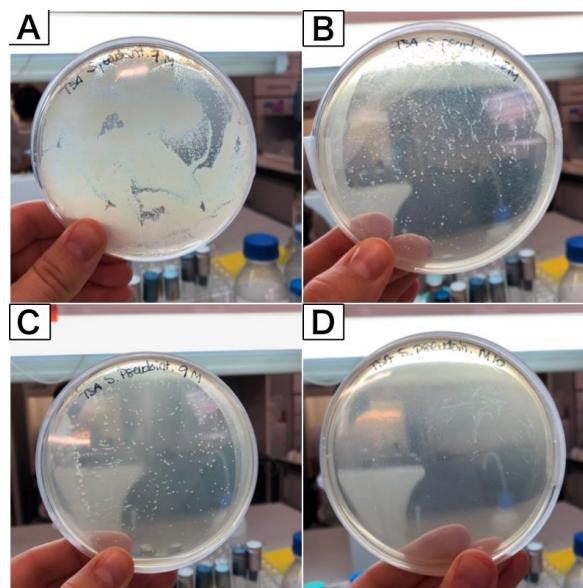


Figura 24. Placas para la determinación de CMB de *S. pseudintermedius* frente a 4-AF. A: 0,3125 mM; B: 0,625 mM; C: 1,25 mM; D: 2,5 mM.

En el caso de 4,4'-ADF se pudo comprobar que a una concentración de 0,039 mM y 0,078 mM (**Figura 25, A y B**) se produjo un crecimiento en césped. Sin embargo, a 0,156 mM (**Figura 25, C**) este crecimiento fue mucho menor. Finalmente, a 0,3125 mM (**Figura 25, D**) no existía crecimiento bacteriano, considerándose como la CMB para este compuesto.

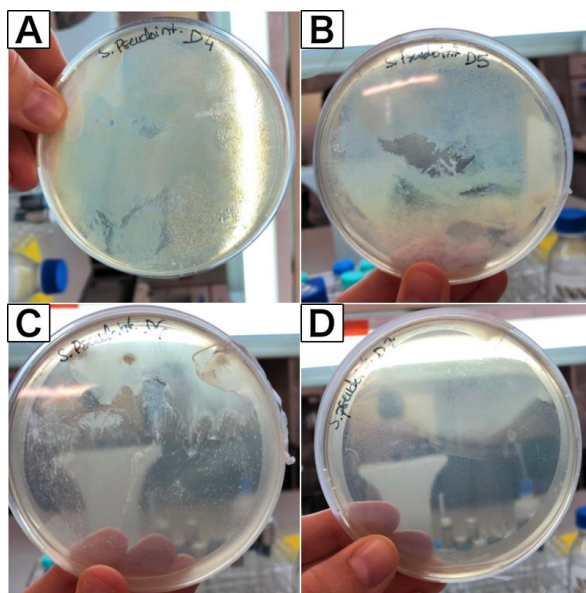


Figura 25. Placas para la determinación de CMB de *S. pseudintermedius* frente a 4,4'-ADF. A: 0,039 mM; B: 0,078 mM; C: 0,156 mM; D: 0,3125 mM.

2. *Staphylococcus aureus*:

En el caso de *S. aureus*, para 4-AF se sembraron alícuotas de las filas 10-12, correspondientes a concentraciones de 2,5 a 10 mM. Como puede verse en la **Figura 26**, no se observó desarrollo de colonias en ninguna de las placas, por lo que se consideró la CMI 2,5 mM.

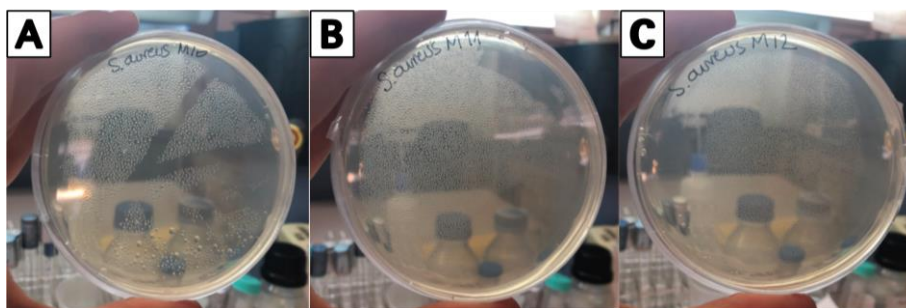


Figura 26: Placas para la determinación de CMB de *S. aureus* frente a 4-AF. A: 2,5 mM; B: 5 mM; C: 10 mM.

Asimismo, para el compuesto 4,4'-ADF se sembraron las concentraciones de 0,156 mM (**Figura 27, A**), 0,3125 mM (**Fig.23 B**), 0,625 mM (**Fig. 27 C**) y 1,25 mM (**Fig. 27 D**). Se

apreció que no se había producido crecimiento en ninguna de las placas, por lo que la CMB se consideró inferior a 0,625 mM.

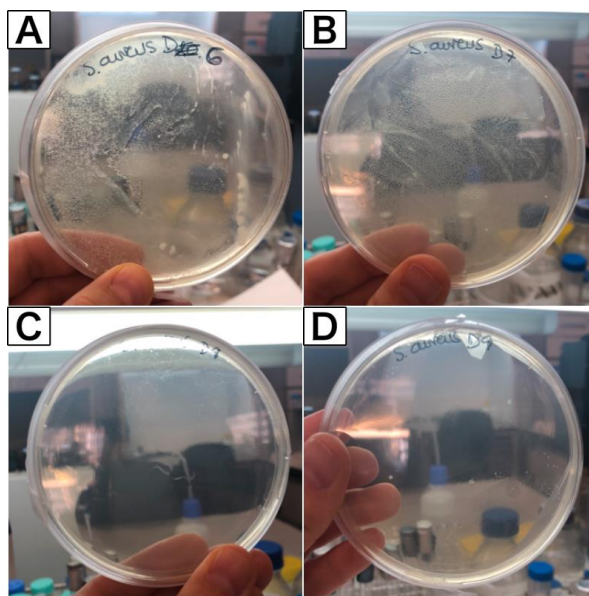


Figura 27: Placas para la determinación de CMB de *S. aureus* frente a 4,4'-ADF. A: 0,156 mM; B: 0,3125 mM; C: 0,625 mM; D: 1,25 mM.

3. *Escherichia coli* :

Para el compuesto 4-AF se sembraron las concentraciones de 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM y 10 mM (**Figura 28 A, B, C y D**). Tras la incubación se pudo observar que a una concentración de 10 mM no existía crecimiento bacteriano, considerándose como la CMB para este compuesto

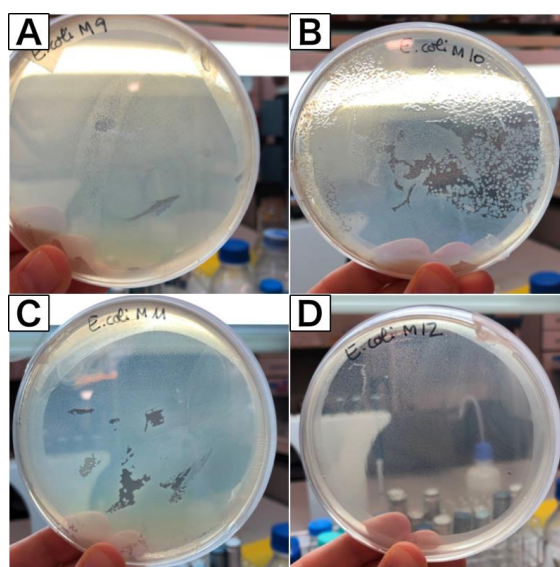


Figura 28: Placas para la determinación de CMB de *E. coli* frente a 4-AF. A: 0,125 mM; B: 2,5 mM; C: 5 mM; D: 10 mM.

En el caso de 4,4'-ADF , se sembraron las concentraciones de 2,5 mM, 5 mM y 10 mM (Figura 29 A ,B y C). En los resultados se pudo observar que a una concentración de 5 mM (Fig. 29, B) no se evidenció crecimiento bacteriano, determinándose como la CMB para este compuesto

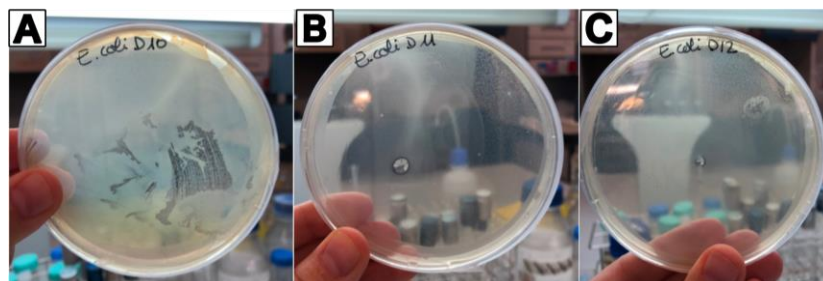


Figura 29: Placas para la determinación de CMB de *E.coli* frente a 4,4'-ADF. A: 2,5 mM; B: 5 mM; C: 10 mM.

4. *Pseudomonas aeruginosa*:

Con respecto al compuesto 4-AF se sembraron las concentraciones de 2,5 y 5 mM (Figura 30 A y B). Tras la incubación se pudo apreciar que había abundante crecimiento en ambas placas, por lo que se determinó que la CMB para este compuesto es superior a 10 mM.

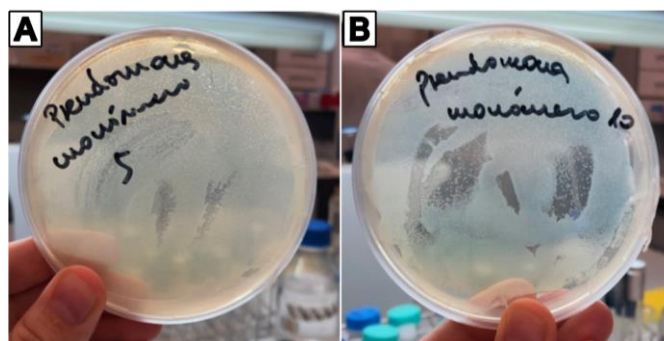


Figura 30. Placas para la determinación de CMB de *P. aeruginosa* frente a 4-AF. A: 5 mM; B: 10 mM.

En el caso de 4,4'-ADF se pudo observar el mismo fenómeno (Figura 31 A y B) por lo que también se determinó que la CMB para este compuesto era superior a 10 mM.

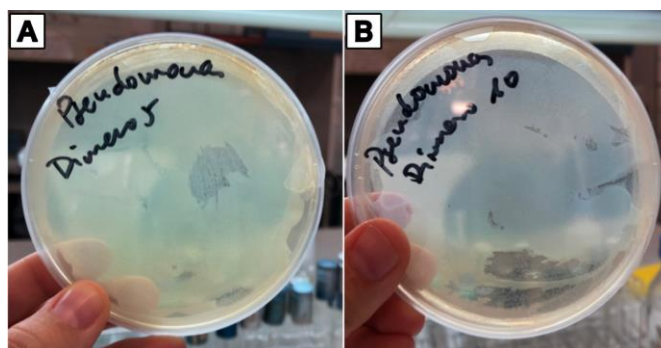


Figura 31. Placas para la determinación de CMB de *P.aeruginosa* frente a 4,4'-ADF. A: 5 mM; B: 10 mM.

RESUMEN DE RESULTADOS:

La **tablas 4 y 5** resumen los datos de determinación de CMI y CMB para ambos compuestos.

Tabla 4. Valores de CMB y CMI para 4-AF en las cepas bacterianas estudiadas.

Cepa bacteriana	Valor CMI	Valor CMB
1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0,625 mM / 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,5 mM/ 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	1,25 mM / 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,5 mM/ 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$
3. <i>Escherichia coli</i>	2,5 mM/ 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10 mM/ 1120 $\mu\text{g mL}^{-1}$
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 mM/ 560 $\mu\text{g mL}^{-1}$	>10 mM/ > 1120 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Tabla 5. Valores de CMI y CMB para 4,4'-ADF en las cepas bacterianas estudiadas.

Cepa bacteriana	Valor CMI	Valor CMB
1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0,156 mM/ 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,3125 mM/ 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	0,3125 mM/ 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$	<0,625 mM/ 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$
3. <i>Escherichia coli</i>	5 mM/ 560 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5 mM/ 560 $\mu\text{g mL}^{-1}$
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 mM/ 560 $\mu\text{g mL}^{-1}$	>10 mM/ > 1120 $\mu\text{g mL}^{-1}$

5.3 Ensayos de crecimiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en medio mínimo.

Como se muestra en la **Figura 32 (A y C)**, tras la incubación, se pudo observar una notoria turbidez en el control positivo, mientras que en el control negativo, en ausencia

de fuente de carbono, no era evidente. Asimismo, también se podía observar cierto grado de turbidez en ambos tubos de los compuestos.

Al exponerlas a la luz ultravioleta (**Figura 32 B y D**), pudimos comprobar la emisión de bioluminiscencia en aquellos tubos en los que había un mayor crecimiento bacteriano. Esta fluorescencia es más marcada en *Pseudomonas aeruginosa* que en *Escherichia coli*.

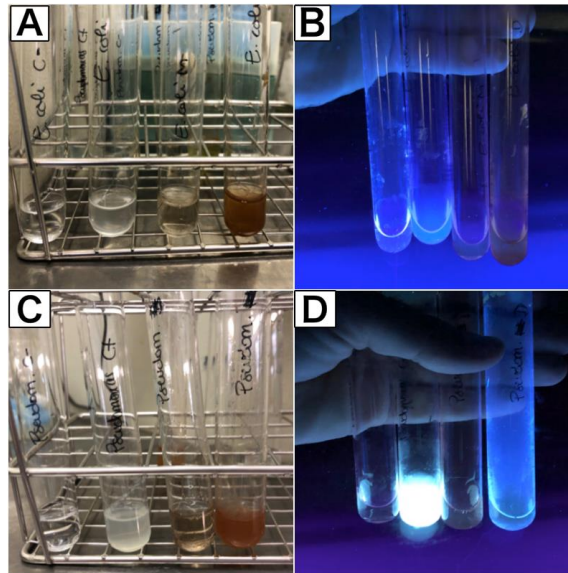


Figura 32: Ensayos de crecimiento de *Escherichia coli* (Ay B) y *Pseudomonas aeruginosa* (CyD) en medio mínimo.

En la siguiente tabla (**Tabla 6**) se muestra el recuento de UFC/ ml de cada ensayo:

Tabla 6: UFC/ml de cada muestra para ambas cepas bacterianas. ND: no determinado debido al crecimiento en césped o confluyente.

Cepa bacteriana	Control negativo	Control positivo	4-aminofenol	4,4'-azodifenol
<i>E. coli</i>	$1,296 \times 10^5$ UFC/ml	$4,13 \times 10^8$ UFC/ml	$7,938 \times 10^4$ UFC/ml	$1,795 \times 10^7$ UFC/ml
<i>P. aeruginosa</i>	$3,292 \times 10^5$ UFC/ml	ND	$2,44 \times 10^6$ UFC/ml	$9,17 \times 10^6$ UFC/ml

Para que su representación gráfica sea adecuada calculamos el logaritmo en base 10 de las UFC (\log_{10} UFC) (**Figuras 33 y 34**):

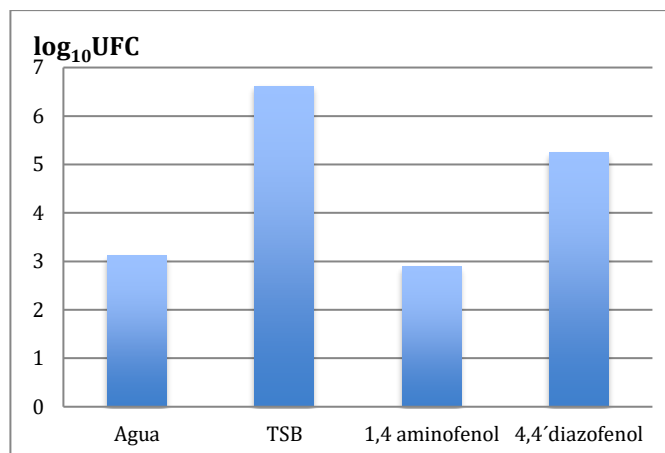


Figura 33. Representación gráfica de las UFC/ml correspondientes al ensayo de crecimiento de *E. coli* en medio mínimo suplementado con los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF.

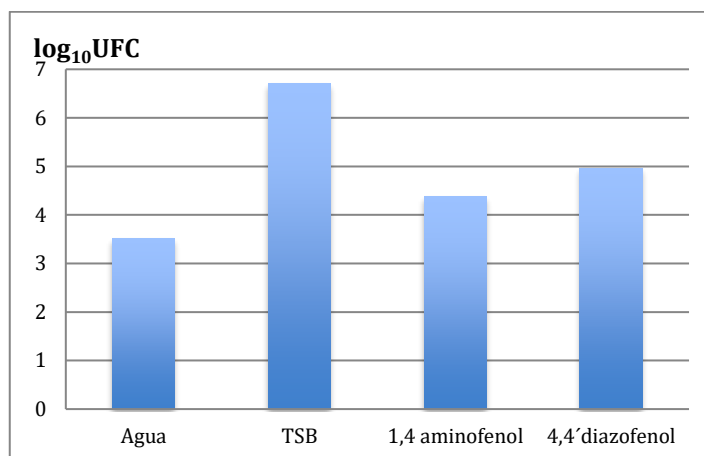


Figura 34. Representación gráfica de las UFC/ml correspondientes al ensayo al ensayo de crecimiento de *P. aeruginosa* en medio mínimo suplementado con los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF.

Como podemos observar, ambas cepas fueron capaces de crecer en presencia de los compuestos, sobre todo con 4,4'-ADF. En el caso de *E. coli* (**Figura 31**), no se detectó crecimiento en presencia de 4-AF respecto al control negativo (en agua) mientras que sí hubo un cierto crecimiento en 4,4'-ADF. Por su parte, *P. aeruginosa* (**Figura 32**) fue capaz de utilizar ambos compuestos, con crecimiento moderado respecto al control. Hay que tener en cuenta que la cantidad de carbono suministrado en estos experimentos es pequeña, razón por la cual no se pueden conseguir crecimientos muy abundantes. Tampoco se puede incrementar mucho la concentración de los compuestos, puesto que se alcanzaría la CMI, con lo cual no podríamos concluir si los microorganismos son capaces de degradar el producto.

Por tanto, determinamos que estos compuestos no son adecuados como antibacterianos en estas cepas de bacterias Gram negativas.

Una vez comprobado el efecto antimicrobiano de estos compuestos en las cepas Gram positivas y habiéndolo descartado en las Gram negativas, procedimos a indagar acerca del mecanismo de acción para producir dicha inhibición en las cepas Gram positivas.

Para ello, se realizaron ensayos de determinación de parámetros enzimáticos y de daño a membranas celulares.

5.4 Actividades enzimáticas para *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*.

Actividad Catalasa (CAT) U/mg proteína:

Los resultados obtenidos (**Tabla 7**) indicaron que la actividad catalasa no sufrió cambios significativos y que eran en ocasiones variables con respecto al control en presencia de los azocompuestos y la concentración de éstos. Por lo que pudimos determinar que no existió una inducción de esta actividad enzimática.

Actividad Peroxidasa total U/mg proteína:

Pudimos observar con claridad que la presencia de los compuestos, independientemente de su concentración, no indujeron un aumento de la actividad enzimática de las peroxidasa total en todos los casos exceptuando el caso de 4,4'-azodifenol en *S.aureus*. De hecho, se pudo apreciar que esta actividad fue menor en presencia de los compuestos que en el control (**Tabla 7**).

Actividad Superóxido dismutasa (SOD) (μ l inhibición 50% oxidación):

En el caso de la actividad SOD, sólo se vio inducida en el caso de *S. pseudintermedius* en presencia de 4,4'-ADF. En este caso se duplicó la actividad a concentración de CMB. Sin embargo en *S. aureus* no se observó inducción de la actividad en ningún caso (ver **Tabla 7**).

Tabla 7: se muestran los valores de las distintas actividades enzimáticas con las desviaciones estándar obtenidas de tres determinaciones independientes. Nótese que, para la actividad SOD, cuanto mayor es el volumen de extracto crudo necesario para la fotoinhibición del NBT, menor es la actividad. ND: no detectada.

Cepa bacteriana	Compuesto	Enzima	Actividad (mU. mg ⁻¹ proteína)		
			Control	CMI	CMB
<i>S. pseudintermedius</i>	4,4'-azodifenol	Catalasa	0.75 ± 0.12	0.38 ± 0.06	0.66 ± 0.04
		Peroxidasas Totales	26 ± 2	4 ± 1	21 ± 6
		Superóxido dismutasa	11,09 ± 1,33	12,6 ± 1,5	23,75 ± 1,93
	4 -aminofenol	Catalasa	0.75 ± 0.08	0.36 ± 0.04	0.28 ± 0.05
		Peroxidasas Totales	26 ± 4	3 ± 0.4	22 ± 8
		Superóxido dismutasa	11,09 ± 1,33	12,33 ± 1,41	14,62 ± 1,5
<i>S. aureus</i>	4,4'-azodifenol	Catalasa	0.74 ± 0.14	0.44 ± 0.07	0.84 ± 0.06
		Peroxidasas Totales	26 ± 6	70 ± 14	2.6 ± 0.4
		Superóxido dismutasa	4,90 ± 0,5	3,94 ± 0,3	5,09 ± 0,52
	4 -aminofenol	Catalasa	0.74 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.57 ± 0.10
		Peroxidasas Totales	26 ± 4	15 ± 6	23 ± 8
		Superóxido dismutasa	4,90 ± 0,5	6,89 ± 0,62	3,70 ± 0,28

Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS): MDA (µMol/mg prot) para *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*:

En ambos casos (**Figuras 35 y 36**) los resultados mostraron que había un incremento muy notorio del MDA con respecto al control en presencia de los azocompuestos, particularmente en el caso del 4,4'-ADF, en el que se incrementó en el orden de 15 a 17 veces con respecto al control, mientras que en el caso del 4-AF iba del orden de 2 a 5 veces el control. Asimismo, se pudo observar que el aumento de MDA es dosis dependiente, por lo que a concentraciones de CMB para ambos compuestos está presente en mayor proporción que a CMI. Por tanto, es evidente que los azocompuestos produjeron un marcado daño a las membranas celulares.

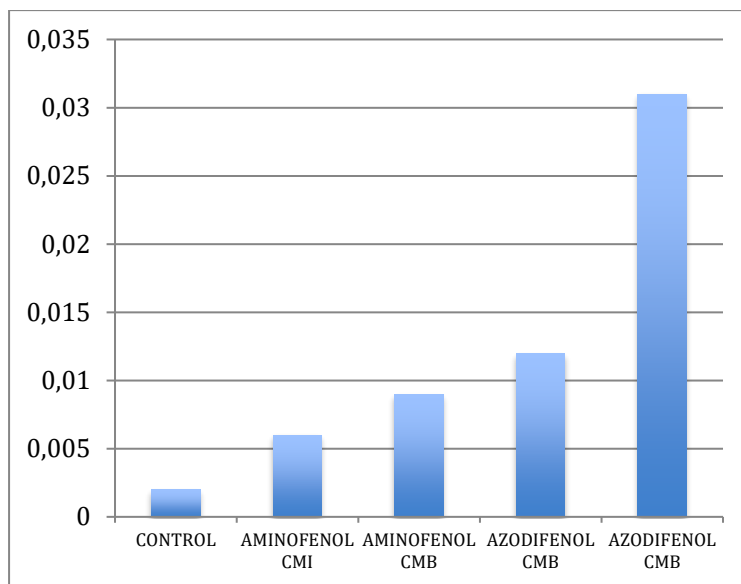


Figura 35: MDA($\mu\text{Mol/mg prot}$) de *Staphylococcus pseudintermedius* en presencia de 4-AF y 4,4-ADF a CMI y CMB.

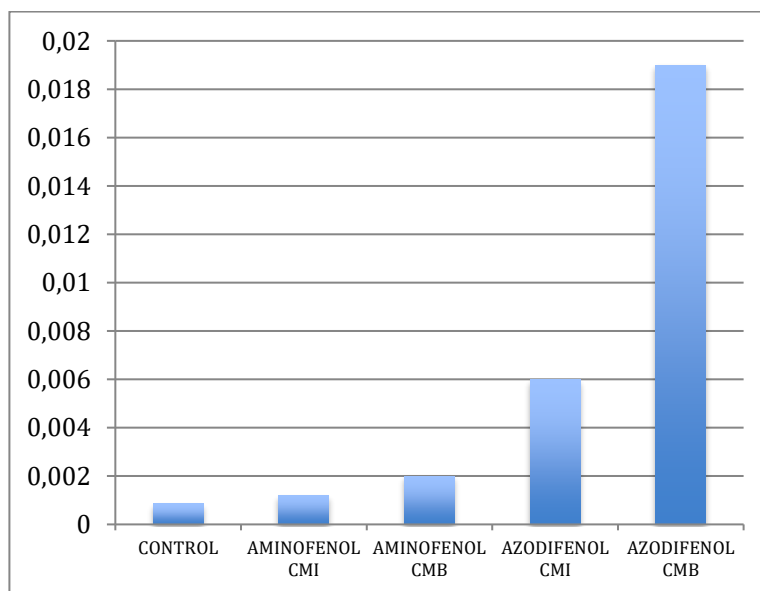


Figura 36: MDA ($\mu\text{Mol/mg prot}$) de *Staphylococcus aureus* en presencia de 4-AF y 4,4-ADF a CMI y CMB.

5.5. Efecto de los compuestos sobre la formación de biofilm bacteriano.

5.5.1 Determinación de la acción sobre la formación de biofilms sobre placa de micropocillos mediante la técnica de George O'Toole.

Staphylococcus pseudintermedius:

En el ensayo del compuesto 4-AF (**Figura 37 A**), a partir de una concentración de 0,625 mM apreció un descenso drástico de los niveles de absorbancia, lo que indicaría la inhibición de formación de biofilm. Esta medición concuerda con la valoración cualitativa de apreciación de color una vez añadido el ácido acético. En el caso del 4,4'-ADF (**Figura 37 B**) pudimos apreciar un notorio descenso de los niveles de absorbancia a partir de una concentración de 0,078 mM, lo que indicó una inhibición de formación de biofilm. Esta apreciación coincidió con la valoración del color de los pocillos.

Staphylococcus aureus:

Para 4-AF (**Figura 37 C**) en el caso de *S. aureus*, se evidenció una bajada significativa de los valores de absorbancia a partir de una concentración de 1,25 mM, ésta inclusive, indicando una inhibición de la formación del biofilm. Asimismo, en presencia del compuesto 4,4'-ADF, la disminución de la absorbancia se observó a una concentración mucho menor, de 0,3125 mM (**Figura 37 D**).

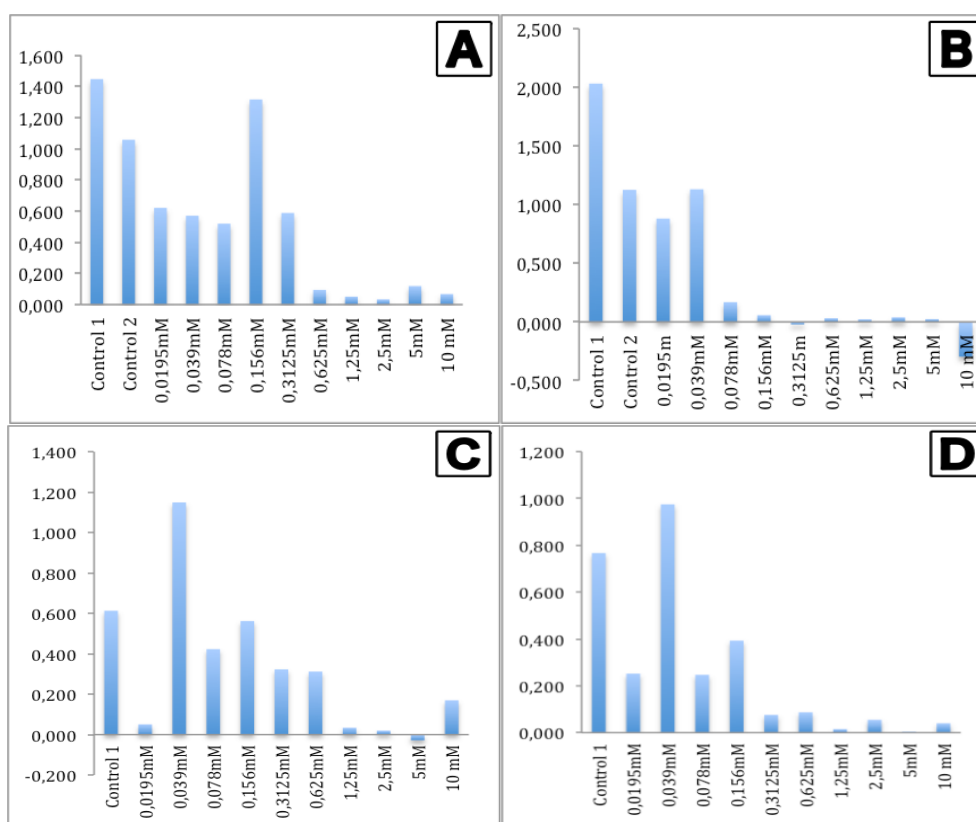


Figura 37: Valores de absorbancia de los ensayos de los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF en *S.pseudintermedius* (A y B) y *S.aureus* (C y D).

Escherichia coli:

Para 4-AF (**Figura 38 A**), a partir de una concentración de 2,5 mM se evidenció un descenso notorio de los niveles de absorbancia, lo que indicaría la inhibición de formación de biofilm. Esta apreciación, como en todos los casos anteriores, coincidió con la valoración del color de los pocillos observada. En el caso de 4,4'-ADF (**Figura 38 B**), a partir de una concentración de 5 mM se observó un descenso notorio de los niveles de absorbancia, coincidiendo con la valoración del color de los pocillos observada tras la adición del ácido acético.

Pseudomonas aeruginosa:

En el ensayo del compuesto 4-AF (**Figura 38 C**) fue a una concentración de 10 mM cuando se evidenció un descenso muy significativo del valor de absorbancia, coincidiendo con la valoración cualitativa. Asimismo, en el caso de 4,4'-ADF (**Figura 38 D**), al igual que con el compuesto anterior, a 10 mM se apreció un descenso del valor de absorbancia, coincidiendo con la valoración cualitativa. Asimismo, conforme se aumenta la concentración de compuesto se pudo observar que existe un rango en el cual aumenta también los valores de absorbancia, hecho que podría explicarse porque el compuesto posee un color marrón oscuro que puede absorber a la misma longitud de onda.

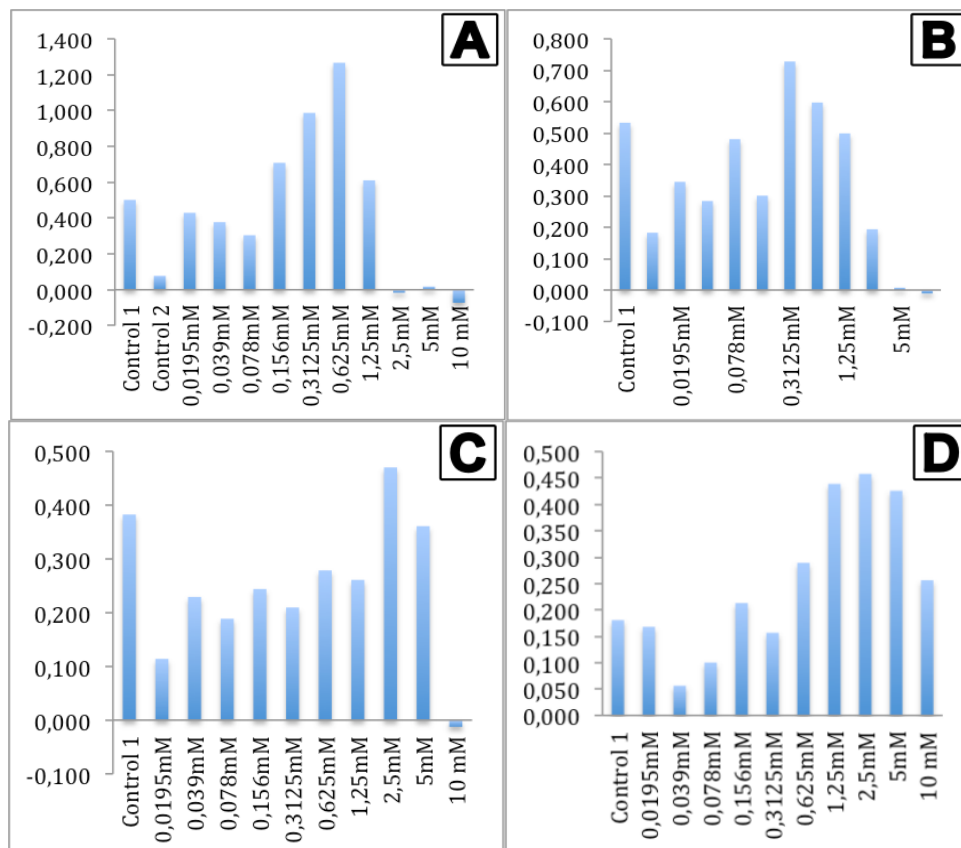


Figura 38: Valores de absorbancia de los ensayos de los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF en *E. coli* (A y B) y *P. aeruginosa* (C y D).

Las **Tablas 8 y 9** recogen los resultados de la valoración de la inhibición de la formación del biofilm por la técnica de George O'Toole para los compuestos 4-AF (**Tabla 8**) y 4,4'-ADF (**Tabla 9**).

Tabla 8: Concentraciones del compuesto 4-AF para las cuales se produce un inhibición de la formación del biofilm según la técnica de George O'Toole.

Cepa bacteriana	Valor CMI	Valor CMB	Valoración cualitativa inhibición biofilm	Valoración cuantitativa inhibición biofilm
<i>S.pseudintermedius</i>	0,625 mM	2,5 mM	0,3125 mM	0,625 mM
<i>S. aureus</i>	1,25 mM	<1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
<i>E. coli</i>	2,5 mM	10 mM	2,5 mM	2,5 mM
<i>P. aeruginosa</i>	5 mM	<10 mM	>10 mM	10 mM

Tabla 9: Concentraciones del compuesto 4,4'-ADF para las cuales se produce un inhibición de la formación del biofilm según la técnica de George O'Toole.

Cepa bacteriana	Valor CMI	Valor CMB	Valoración cualitativa inhibición biofilm	Valoración cuantitativa inhibición biofilm
<i>S.pseudintermedius</i>	0,156 mM	0,3125 mM	0,078 mM	0,078 mM
<i>S. aureus</i>	0,3125 mM	<0,625 mM	0,3125 mM	0,3125 mM
<i>E. coli</i>	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
<i>P. aeruginosa</i>	5 mM	<10 mM	10 mM	10 mM

En todas las bacterias la valoración de la inhibición de la formación del biofilm o bien coincide con el valor de la CMI o bien se encuentra entre la CMI y la CMB, hecho que sugiere que hay un descenso en la formación de biofilm porque existe una menor concentración bacteriana y no por que se inhiba su formación por parte de las bacterias.

Hay que tener en cuenta que la toxicidad del compuesto no tiene por qué estar directamente relacionada con la formación de biofilm. Es decir, no por ser más tóxico habrá menos biofilm, ya que se trata de un mecanismo de defensa por parte de los microorganismos, por lo que es posible que un producto tóxico induzca en la bacteria una respuesta de formación del mismo.

5.5.2 Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Basándonos en los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, consideramos que eran necesarios estudios para esclarecer y evidenciar el efecto de estos compuestos en la formación de biofilm, por lo que se decidió realizar una valoración mediante microscopía electrónica. Dado que el efecto bactericida y sobre el biofilm no es

significativo en las bacterias Gram negativas, se realizó únicamente en las dos cepas de estafilococos.

Como se muestra en las imágenes correspondientes a los controles de ambas cepas bacterianas (**Figura 39 A, D, E**), en ausencia del compuesto 4,4'-ADF se apreció un marcado crecimiento bacteriano, dónde se pudieron observar grandes colonias con presencia de cuantioso material extracelular y fibras que componen el biofilm. Cuando ambas cepas se cultivaron en presencia del compuesto a una concentración de CMI (**Figura 39 B y F**), el número de dichas colonias disminuyó de manera significativa y la formación del biofilm se vio gravemente afectado. Finalmente, al aumentar la concentración del compuesto a CMB (**Figura 39 C y G**), únicamente se observaron bacterias aisladas y no formando colonias, indicando que su crecimiento se encontraba completamente abolido. Asimismo, no se observó presencia de material extracelular y la morfología de algunas de las bacterias, sobre todo en el caso de *S. pseudintermedius*, se encontraba alterada siendo más pequeñas y deformes. Por tanto, se evidencia claramente la afectación tanto del crecimiento bacteriano como de la formación del biofilm de ambas cepas de estafilococos.

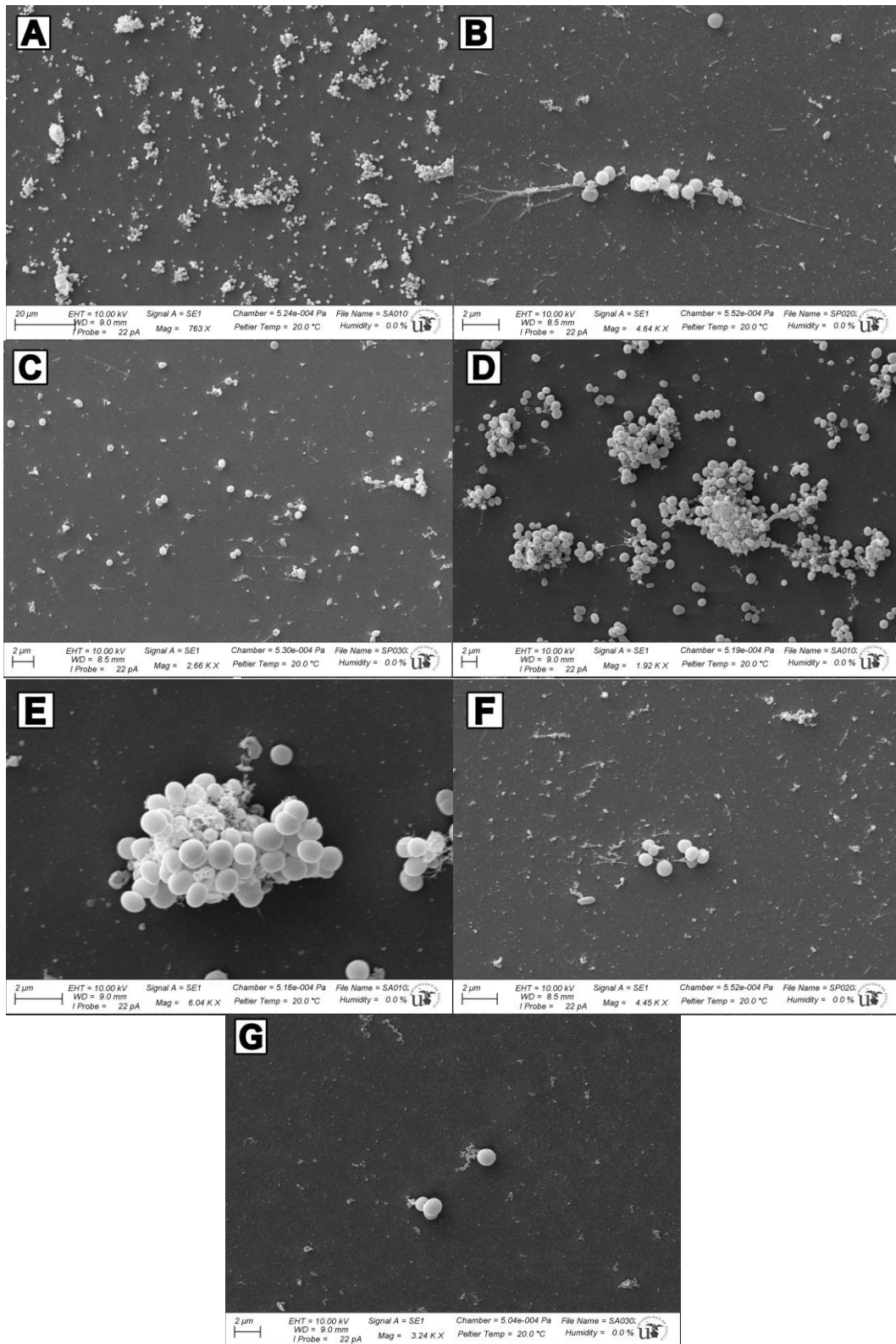


Figura 39: **A:** *Staphylococcus pseudintermedius* control. **B.** *Staphylococcus pseudintermedius* en presencia de 4,4'-ADF a CMI. **C.** *Staphylococcus pseudintermedius* en presencia de 4,4'-ADF a CMB. **D y E:** *Staphylococcus aureus* control. **F.** *Staphylococcus aureus* en presencia de 4,4'-ADF a CMI. **G.** *Staphylococcus aureus* en presencia de 4,4'-ADF a CMB.

5.6 Diseño de una aplicación terapéutica tópica para su uso en infecciones cutáneas.

5.6.1 Ensayo de parches de algodón.

En la medición de los halos de inhibición que se formaron tras la incubación de las placas se pudieron obtener los datos que se muestran en la **Tabla 10**:

Tabla 10. Tamaño del halo observado para las cepas estudiadas utilizando parches de algodón impregnados con 30 μ l de solución de 4-AF o 4,4'-ADF 100 mM.

Cepa bacteriana	Agua	4-AF en agua	4,4'-ADF en agua	Glicerol	4-AF en glicerol	4,4'-ADF en glicerol
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0 mm	5 mm	3 mm	0 mm	5 mm	5 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 mm	6 mm	2 mm	0 mm	7 mm	5 mm
<i>Escherichia coli</i>	0 mm	1 mm	0mm	0mm	1mm	0mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm

Al igual que el las pruebas de los discos pudimos observar unos halos de inhibición marcados en ambas cepas de estafilococos mientras que no se apreciaron en en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* o *E.coli* (**Figura 40**).

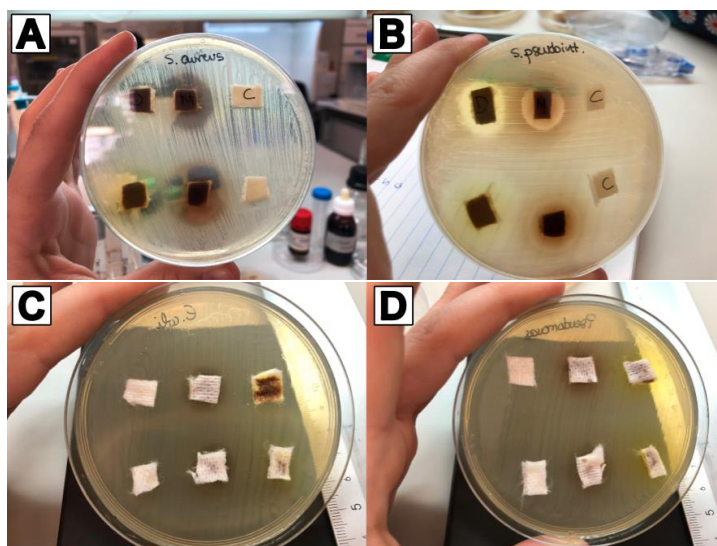


Figura 40: Parches de algodón impregnados con 30 μ l de solución de 4-AF o 4,4'-ADF 100 mM suspendidos en agua (fila superior) o disueltos en glicerol (fila inferior). A. *Staphylococcus pseudintermedius*, B. *Staphylococcus aureus*, C. *E.coli*, D: *Pseudomonas aeruginosa*.

5.6.2 Diseño de apósitos de algodón y composites para el tratamiento de infecciones cutáneas.

a) Apósitos conformados por esferificaciones de un composite de alginato y los diferentes compuestos.

Como mostramos en **Figura 41** no se produjo una difusión adecuada del azocompuesto contenido en las esferificaciones hacia el medio circundante, por lo que no pudo ejercer su efecto bactericida.

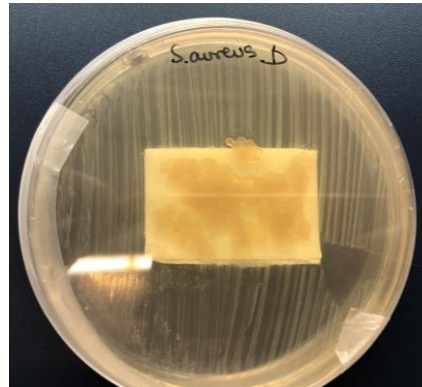


Figura 41: Apósito conformado por esferificaciones de composite de alginato y los compuestos.

b) Apósitos conformados por un composite de gelatina neutra y compuestos.

En el caso del uso de la gelatina neutra, se puede apreciar en la **Figura 42** que ésta perdió consistencia haciendo que la estructura del parche se deshiciera, no siendo funcional. Hay que tener en cuenta que muchos microorganismos son capaces de hidrolizar la gelatina.

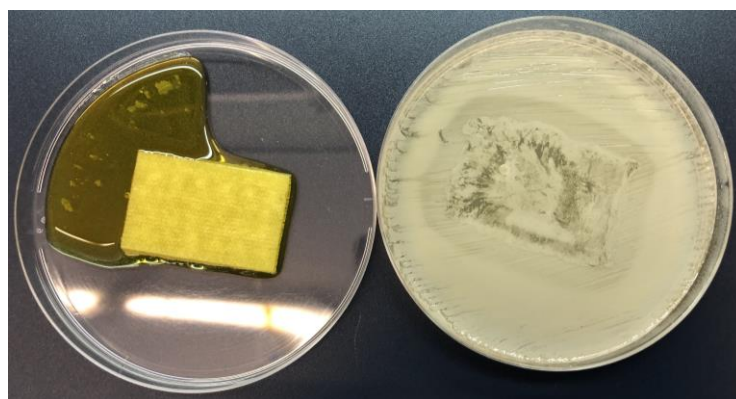


Figura 42: Apósito conformado por gelatina neutra. Se puede observar una desestructuración del mismo.

c) Apósitos conformados por un composite de agar al 0,9% y los compuestos.

Finalmente, el uso del agar al 0,9% como base para el composite (**Figura 43**) permitió una estabilidad del parche y una buena difusión en el medio, pudiéndose observar claros halos de inhibición alrededor y debajo del mismo, más marcados en *S.pseudintermedius* (Fig. 37 A) que en *S. aureus* (Fig. 37 B,C)

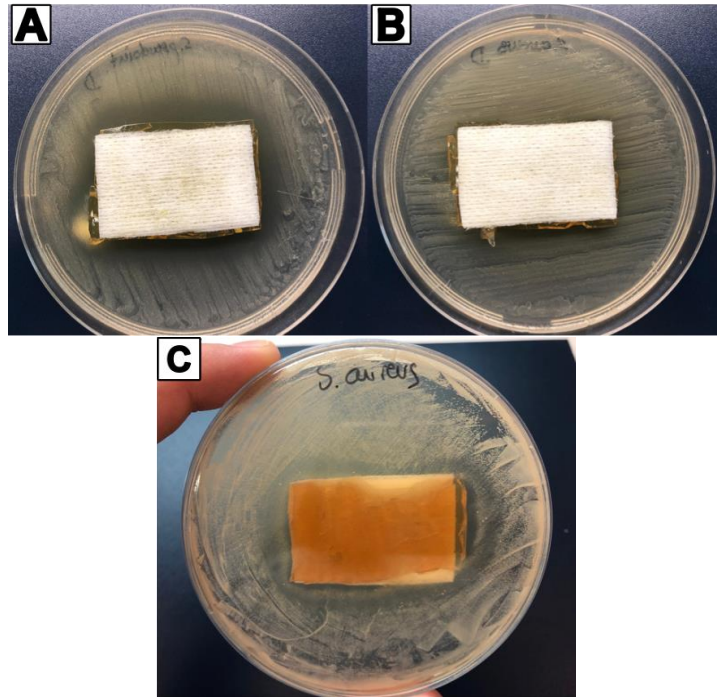


Figura 43. Apósito conformado por un composite de agar al 0,9% y los compuestos. A. *Staphylococcus pseudintermedius*. B, C: *Staphylococcus aureus*.

6. Discusión

Las infecciones de carácter zoonótico, bien producidas por animales de compañía o en zoológicos, o bien desde animales de producción o abasto, constituyen una amenaza para la salud pública (Shin and Park, 2018). En cuanto a las infecciones de carácter bacteriano, algunos de los patógenos más prevalentes en animales son *Campylobacter*, *Salmonella*, *Bartonella* y *Staphylococcus* (Shin and Park, 2018; O'Neil, 2018). En el caso de este último género, *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) son los causantes de la mayor parte de las infecciones cutáneas en animales de compañía y son de carácter zoonótico, por lo que pueden transmitirse a los humanos, siendo cada vez más frecuente este tipo de contagio (Somayaji et al., 2016; Lozano et al., 2017; Robb et al., 2017; Kmiecik and Szewczyk, 2018). Este aumento del número de contagios, unido a la aparición de multirresistencias (resistencia a 3 o más familias de antibióticos) y a la limitación del uso de algunos antimicrobianos de uso únicamente hospitalario por parte de los profesionales veterinarios debido a principios preventivos, hacen que, en ocasiones, el tratamiento de las infecciones cutáneas en animales sea todo un reto (Cox and Ricci, 2008; Wegener et al., 1999). Debido a todo lo expuesto, existe una clara necesidad de encontrar alternativas al uso de los antibióticos para el tratamiento de las infecciones (Shin and Park, 2018). En este sentido, es conocido que alguno de los azocompuestos son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, particularmente el de las bacterias Gram positivas (Piotto et al., 2017; Concilio et al., 2017). No hemos encontrado referencias con respecto al compuesto 4,4'-ADF ni trabajos que profundicen en el mecanismo de acción antibacteriana de estos compuestos o su capacidad de afectación del biofilm. Por tanto, en este trabajo de investigación se decidió estudiar las propiedades antimicrobianas 4,4'-ADF y, puesto que la degradación de este producto en el organismo debido al metabolismo, da lugar a 4-AF, se ha incluido este producto en el estudio para comparar el efecto de ambos compuestos, ya que además es el producto de partida de la síntesis de 4,4'-ADF.

La síntesis de este último a escala de multigramo se ha llevado a cabo con éxito y se han caracterizado por métodos de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía de masas (HRMS) y métodos de espectroscopía ultravioleta visible. Para poder realizar estudios de comparación, el producto 4-aminofenol se incluyó en el estudio. Este compuesto no es únicamente el producto de partida de la síntesis según la metodología desarrollada en este trabajo, si no que también es un producto de degradación del 4,4'-ADF, como otras aminas aromáticas, debido a la actividad de las enzimas azorreductasas. Estas enzimas tienen diferentes estructuras químicas pero una característica en común: son capaces de catalizar la reducción de enlaces azo muy estables ($-N=N-$) (Misal and Gawai, 2018). Las azorreductasas bacterianas pertenecen a dos familias distintas de enzimas: la primera está compuesta por enzimas monoméricas sin flavina que unen NADPH en su extremo N-terminal, mientras que la segunda familia comprende a unas enzimas poliméricas que contienen un cofactor de flavina FMN (Chen, 2006). Esta diversidad de enzimas hace que algunas de ellas usen NADH o NADPH como donadores de electrones, unas sean sensibles al oxígeno y otras no (Misal and Gawai, 2018). Algunos microorganismos que pueden causar patologías cutáneas poseen este tipo de enzimas, destacando entre ellos *S. aureus* (Zou et al. 2009). En nuestro trabajo, además de testar estos compuestos frente a estafilococos zoonóticos también se

testaron en dos cepas Gram negativas muy relevantes ya que también son responsables de numerosas infecciones y destaca su capacidad de desarrollar resistencias a los antibióticos: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se pudo observar que estos compuestos no ejercen acción antimicrobiana frente a estas bacterias Gram negativas, tanto por métodos cualitativos, en los que no se pudo observar halo de inhibición alguno alrededor de los discos y parches, como en los métodos cuantitativos de medición de absorbancia, en los que no hubo una disminución significativa de la misma que indicara un menos crecimiento bacteriano. De hecho, se pudo comprobar que estas cepas no sólo son capaces de tolerar la presencia de estos azocompuestos si no que además son capaces de degradarlos e utilizarlos como fuente nutricional. Asimismo, numerosos estudios revelan que estas bacterias son capaces de mineralizar los tintes azo en las aguas residuales tanto en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis, siendo muy útiles para la bioremediación de estas sustancias (Lade et al., 2015; Garg and Tripathi, 2017; Singh and Singh, 2017). Por tanto, los resultados obtenidos mostraron una buena actividad antimicrobiana del compuesto 4,4'-ADF frente a los estafilococos zoonóticos *S. pseudintermedius* y *S. aureus*, más marcada en el primero, con unas CMI de 30 y 60 microgramos por mililitro respectivamente. Asimismo, la CMB para estas cepas fue de 60 y 120 microgramos por mililitro. Estos resultados están en concordancia con datos previos de otros azocompuestos (**Tabla 11**) con estructuras comparables (**Figura 44**), confirmando que estas sustancias son efectivas para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas, pero no son útiles para Gram negativas.

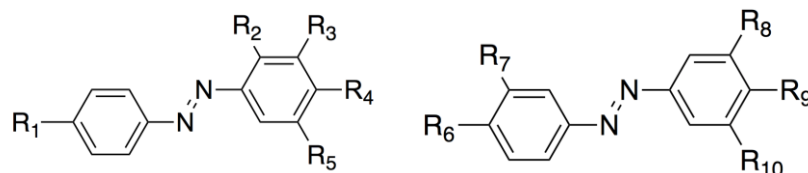


Figura 44. Esquemas de compuestos con estructura azo.

Tabla 11: CMI de diferentes compuestos azo para *E. coli* y *S. aureus*. N.D., no determinado.

Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5	CMI mg.ml ⁻¹		Ref.
						<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	
1	OH	OH	H	OH	H	>128	>128	Piotto et al.,2017
2	CH ₃	OH	H	OH	H	>32	>32	Piotto et al.,2017
3	OCH ₃	OH	H	OH	H	>128	16	Piotto et al.,2017
Compuesto	R6	R7	R8	R9	R10	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Ref.
4	OH	H	H	H	H	N.D.	25	Concilio et al., 2017
5	OH	H	H	CH ₃	H	N.D.	25	Concilio et al., 2017
6	OH	H	H	OCH ₃	H	N.D.	20	Concilio et al., 2017
7	OH	H	H	OH	H	>280	60	Este trabajo

Asimismo, en este trabajo se ha investigado el mecanismo de acción de los compuestos 4-AF y 4,4'-ADF mediante la determinación de actividades enzimáticas y de MDA. Como hemos explicado con anterioridad, estas enzimas ejercen una acción protectora frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS), responsables del estrés oxidativo, generadas durante el metabolismo bacteriano (Bedekar et al., 2014). Nuestros resultados mostraron que no se produjo una inducción aparente ni de la actividad catalasa o de las peroxidasas en ambas especies de estafilococos. Estos datos son similares a los determinados por Jadhav et al., 2012 en plantas de *Allium cepa* (cebolla), en las que se observó que la actividad catalasa se inhibía por tintes azo (Jadhav et al., 2012). De hecho, en nuestro caso, es interesante que la actividad de las peroxidasas totales fuese aún menor a CMB que a CMI, lo que podría indicar que a CMB las bacterias están tan dañadas que su respuesta antioxidante no se ha podido desarrollar correctamente. En cuanto a la actividad de la SOD, se pudo observar que pudo ser detectada en el caso de 4-AF a concentraciones de CMI y CMB en *S. pseudintermedius* y a concentraciones de CMB en *S. aureus* y 4,4'-ADF a CMB en *S. pseudintermedius*. Sin embargo, en ninguno de los controles se pudo evidenciar actividad. A diferencia de de la catalasa y peroxidasas, la SOD se vio aumentada, sobre todo en el caso del compuesto 4,4'-ADF en particular a CMB, que a su vez es el tiene mayor capacidad antimicrobiana. Por tanto, la SOD parece tener un papel relevante en la acción frente a los EROs. En 2014 Kaur y Kaur propusieron la SOD como un marcador del estrés oxidativo causado por el azocompuesto negro ácido, un colorante, en plantas (Kaur

and Kaur, 2014). Asimismo, un estudio reciente realizado por Rezaei-Seresht et al. (2019) en el que se sintetizaban 5 tintes azo diferentes derivados de estilbenos mostraron en su mayoría propiedades antioxidantes pero una acción antibacteriana muy limitada en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*.

Por otro lado, uno de los efectos más importantes que se produce por el estrés oxidativo es el daño a las membranas celulares y por tanto a la funcionalidad celular. Las TBARs se forman a partir de la peroxidación de los lípidos, considerándose como productos de las reacciones causadas por las especies reactivas de oxígeno. Dentro de los TBARs, el MDA es un producto de bajo peso molecular generado concretamente por la descomposición de ciertos productos primarios y secundarios de la peroxidación de los lípidos de membrana. (Catala, 2006, Behera et al., 2019). Nuestros resultados mostraron que había un incremento muy notorio del MDA con respecto al control en presencia de los azocompuestos ensayados, particularmente en el caso del 4,4'-ADF, siendo evidente un marcado daño a las membranas celulares. Estos datos van en consonancia con los obtenidos en estudios previos que reportaron daño en la membrana celular de los microorganismos de la microbiota intestinal humana producido por tintes azo (Pan et al., 2012).

Uno de los factores de virulencia más importantes y con una repercusión directa en su patogenicidad y capacidad de desarrollo de resistencias es la formación de biofilms (MacKenzie et al., 2017; Cattelan et al., 2017). La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas y producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido (Hong et al., 2012). Dado que las cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* y *aureus* tienen esta capacidad de general biofilm consideramos esencial el estudio del efecto de estos compuestos sobre éste (Singh et al., 2013; Arima et al., 2018). Para una primera valoración se utilizó la técnica de George O'Toole que consiste en la tinción con cristal violeta del biofilm formado en los pocillos de las placas utilizadas para la determinación de la CMI. Tras esto se realizó un estudio por microscopía electrónica de barrido. Se pudo determinar que ambos compuestos fueron capaces de inhibir la formación del biofilm, siendo más notorio el efecto del 4,4'-ADF. El estudio de microscopía nos permitió visualizar de manera muy clara que mientras que en los controles toda la superficie del portaobjetos estaba cubierta de numerosas colonias cohesionadas por abundante material extracelular (biofilm), las muestras obtenidas en presencia de los azocompuestos, sobre todo en el caso del 4,4'-ADF, mostraban que había pequeñas colonias o células aisladas y una notoria disminución del material extracelular. Asimismo, la morfología de algunas de las bacterias, sobre todo en el caso de *S. pseudintermedius*, se encontraba alterada siendo más pequeñas y deformes. Por tanto, se evidencia claramente la afectación tanto del crecimiento bacteriano como de la formación del biofilm de ambas cepas de estafilococos, hecho muy importante de cara a una posible aplicación terapéutica de estos compuestos.

Dada la naturaleza de los resultados obtenidos, decidimos diseñar una aplicación terapéutica tópica para su posible uso en infecciones cutáneas, ya que estos microorganismos son responsables de un gran porcentaje de las mismas. Asimismo,

una aplicación tópica produce, en rangos generales, menos toxicidad dada la acción localizada del compuesto. De acuerdo con la clasificación del Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS) mostrado en la **Tabla 12**, el compuesto 4,4'-ADF muestra toxicidad oral aguda, es irritante ocular y cutáneo y puede dar sensibilidad respiratoria. En lo concerniente a la aplicación tópica en forma de apósitos compuestos, los datos de toxicidad cutánea son de 1000-2000 mg kg⁻¹ (National Research Council. 2014). Dadas las CMI y CMBs obtenidas y las bajas dosis que se necesitan para la elaboración de los apósitos, la probabilidad de que se produzca una reacción cutánea tóxica es muy baja.

Tabla 12. Clasificación de los riesgos y toxicidad de 4,4'-ADF de acuerdo a los criterios GHS.

Clasificación GHS	Categoría	Dosis	Efectos
Toxicidad oral aguda	4	LD ₅₀ : 300-2000 mg kg ⁻¹	
Toxicidad cutánea aguda	4	LD ₅₀ : 1000-2000 mg kg ⁻¹	Irritación cutánea
Irritante ocular	2	--	Efectos en la córnea, iris o conjuntiva que revierten completamente en 21 días
Sensibilidad respiratoria	1	--	Asma, aunque también se consideran otras reacciones de hipersensibilidad (rinitis, conjuntivitis y/o alveolitis)

Utilizamos unos apósitos conformados de una capa de algodón estéril junto con otra conformada por materiales compuestos biodegradables para proporcionar una acción antibacteriana por la liberación prolongada de los compuestos, así como humedad, para favorecer el desarrollo y mantenimiento de un tejido de granulación sano en el lecho de la herida, esencial para la cicatrización de la misma (Ki y Rotstein, 2008). Se testaron tres tipos de materiales: esferificaciones de un composite de alginato y los diferentes compuestos, composite de gelatina neutra y compuestos y composite de agar al 0,9% y los compuestos. Las esferificaciones de alginato, a diferencia otros materiales, permiten la liberación prolongada en el tiempo del compuesto (Voo et al., 2015, Tsai et al., 2017). Nuestros resultados mostraron que ni las esferificaciones de alginato ni la gelatina neutra fueron materiales adecuados para la elaboración del apósito, ya que en el primer caso no hubo difusión del compuesto y en el segundo la gelatina se fluidificó y el apósito perdió la forma. Esto fue probablemente debido a que tanto *S. pseudintermedius* como *S. aureus* son capaces de degradar la gelatina (Chakraborty et al., 2011). Sin embargo el composite de agar mostró buenos resultados, observándose una conservación de la estructura del apósito y un claro halo de inhibición alrededor del mismo tras la incubación. Por tanto, consideramos que este último modelo es una buena opción para su utilización, ya que proviene de las características necesarias para un buen mantenimiento del lecho de la herida evitando las infecciones cutáneas. Asimismo, el material utilizado, el agar o agarosa, es muy económico. Este apósito se podría utilizar en patologías localizadas que afecten a epidermis o dermis como

quemaduras, abrasiones, heridas profundas que necesiten un cierre por segunda intención o foliculitis localizadas como las dermatitis piotraumáticas o “hot spots” (Hillier et al., 2014). Además permitiría no tener que realizar un cambio de apósito diario, puesto que se produce una liberación paulatina del compuesto, mejorando el bienestar del paciente y abaratando costes. Consideramos que sería adecuado el estudio de interacciones sinérgicas entre compuestos, pudiendo utilizar un composite incluyendo el compuesto 4,4'-azodifenol combinado con otros compuestos como la acetilcisteína, que tiene una conocida acción frente a la formación de biofilms y que pueda permitir una potencial sinergia (Smith et al., 2006, Costa et al., 2017; Eroshenko et al., 2017).

7. Conclusiones:

En base a los objetivos propuestos podemos concluir:

1. El compuesto 4,4'-azodifenol se ha sintetizado de manera eficiente siguiendo la metodología clásica de diazotización seguido de acoplamiento con un rendimiento superior al 95% en una escala multigramo, pudiéndose purificar de manera completa utilizando un método de síntesis directa optimizado en nuestro laboratorio.
2. El estudio comparativo de los compuestos 1,4-aminofenol y 4,4'-azodifenol muestra que el 4,4'-azodifenol es significativamente más efectivo que el 1,4-aminofenol en *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*, aunque ambos poseen actividad antimicrobiana frente a las mismas. Por otro lado, no son efectivas frente a los patógenos Gram negativos *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo capaces de utilizar estos compuestos como fuente nutricional para su crecimiento.
3. Se ha podido constatar que el mecanismo de acción de estos compuestos sobre las cepas Gram positivas está relacionado con un notorio daño a las membranas bacterianas por la determinación del MDA, indicador de la peroxidación de los lípidos de la membrana. Sin embargo, los datos indican que no se produce un gran estrés oxidativo, puesto que no se desencadena una notoria actividad de las enzimas indicadoras de este proceso.
4. Con respecto a la acción frente a la formación de los biofilms, es muy notoria en las cepas Gram positivas. Se trata de un factor de virulencia clave en patógenos que favorece la resistencia a los antibióticos y la cronificación de las infecciones. Es evidente que el efecto sobre la formación del biofilm de los compuestos es mucho más notoria en las bacterias Gram positivas que en las Gram negativas, hecho que está directamente relacionado con su capacidad antimicrobiana frente a las mismas.
5. El diseño de una aplicación terapéutica tópica utilizando un material compuesto ha sido exitosa, permitiendo una opción completamente biocompatible, económica y efectiva frente al género *Staphylococcus*. Dado que estos microorganismos son responsables de gran parte de infecciones cutáneas tanto en personas como en animales, especialmente la especie canina, y además tienen gran capacidad de generar resistencias, ofrecemos una opción terapéutica eficaz. Estos estudios muestran que los compuestos ensayados, especialmente el 4,4'-azodifenol podría ser buena alternativa a la antibioterapia convencional para evitar la aparición de multirresistencias en infecciones por bacterias Gram positivas.

6. Finalmente, consideramos que sería interesante y necesario realizar estudios *in vivo* con esta aplicación terapéutica así como ensayos de sinergia con otros compuestos.

7. Referencias

1. Abe, F.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., de Oliveira, D.P. (2017). Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*. 80 (23-24),1259-1268. doi: 10.1080/15287394.2017.1371091.27.
2. Akhter, M., Husain, A., Azad, B., Ajmal, M. (2009). Aroylpropionic acid based 2,5- disubstituted-1,3,4-oxadiazoles: synthesis and their anti-inflammatory and analgesic activities. *European Journal of Medical Chemistry*. 44 (6), 2372-2378. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.09.005.
3. Ali, Y., Abd Hamid, S., Rashid, U. (2018). Biomedical Applications of Aromatic Azo Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 18(18). doi :10.2174/1389557518666180524113111.
4. Aljamali, N.M., (2015). Review in Azo Compounds and its Biological Activity. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 4: 169. doi:10.4172/2161-1009.1000169.
5. Amin, K.A., Hameid, A.H., Elsttar, A.H. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 48(10), 2994-2999. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.039.
6. Antibiotic resistance. Recuperado de: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
7. Arima, S., Ochi, H., Mitsuhashi, M., Kibe, R., Takahashi, K., Kataoka, Y. (2018). *Staphylococcus pseudintermedius* biofilms secrete factors that induce inflammatory reactions in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 67(3), 214-219.65.
8. Ashraf, J., Mughal, E.U., Murtaza, S., Sadiq, A., Tanoli, S.A.K, Mumtaz, A.,Hameed, A., Khan, K.M., Ahmed, I., Khalid, B., Javid, A.(2017). Design, Synthesis and Antibacterial Activities of New Azo-compounds: An Experimental and a Computational Approach. *Letters in Drug Deing and Discovery*. 14, 10. doi:10.2174/1570180814666170306124134.
9. Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool M.H., Nisar, M.H., Alvi R.F,, Aslam M.A., Qamar M.U., Salamat M.K.F., Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* 11, 1645–1658. doi: <https://dx.doi.org/10.2147%2FIDR.S173867>.
10. Bedekar, P.A., Saratale, R.G., Saratale, G.D., Govindwar, S.P. (2014). Oxidative stress response in dye degrading bacterium *Lysinibacillus* sp. RGS exposed to Reactive Orange 16, degradation of RO16 and evaluation of toxicity. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(18), 11075-11085. doi: 10.1007/s11356-014-3041-2.
11. Behera, N., Arakha, M., Priyadarshinee, M., Pattanayak, B. S., Soren, Siba, Jha, S., Mallick, B.C. (2019). Oxidative stress generated at nickel oxide nanoparticle interface results in bacterial membrane damage leading to cell death. *RSC Advances*, 9, 24888–24894. doi: 10.1039/c9ra02082a.60.
12. Ben Mansour, H., Corroler, D., Barillier, D., Ghedira, K., Chekir, L., Mosrati, R. (2007). Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. *Food and Chemical Toxicology* 45(9), 1670-1677. doi:

- 10.1016/j.fct.2007.02.033.
13. Ben Mansour, H., Mosratim R., Corrolerm D., Ghediram K., Barillierm D., Chekir-Ghediram L. (2009). Mutagenicity and genotoxicity of acid yellow 17 and its biodegradation products. *Drug and Chemical Toxicology* 32(3), 222-229. doi: 10.1080/01480540902862269.30.
 14. Ben Mansour, H., Barillier, D., Corroler, D., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., Mosrati, R. (2009). In vitro study of DNA damage induced by acid orange 52 and its biodegradation derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(3), 489-495. doi: 10.1897/08-333.1.
 15. Beyer, W.F., Fridovich, I. (1987). Assaying for Superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566. doi: 10.1016/0003-2697(87)90489-1
 16. Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7(72), 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.39.
 17. Catala, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38, 9; 1482-1495. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.010>.
 18. Cattelan Natalia, Jennings-Gee Jamie, Dubey Purnima, Yantorno Osvaldo M., Deora Rajendar. (2017). Hyperbiofilm Formation by Bordetella pertussis Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infection and Immunity*, 85(12), e00373-17. doi: 10.1128/IAI.00373-17.63.
 19. Chakraborty, SP, Mahapatra, SK, Roy S. (2011). Biochemical characters and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3):212-216. doi:10.1016/S2221-1691(11)60029-4.
 20. Chance, B., Maehly, A.C. (1955). Assay of Catalase and Peroxidase. *Methods in Enzymology*, II, 773-775. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8).
 21. Chaudhary, A.S. (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica* 6(6):552-556. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.004>
 22. Chung, K.T. (2016). Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science Health*. 34(4), 233-261. doi:10.1080/10590501.2016.1236602.
 23. Concilio, S., Iannelli, P., Sessa, L., Olivieri, R., Porta, A., De Santis, F., Pantani, R., Piotto, S.(2015). Biodegradable antimicrobial films based on poly (lactic acid) matrices and active azo compounds. *Journal of Applied Polymer Science*. 132, 42357. doi: <https://doi.org/10.1002/app.42357>.
 24. Concilio, S., Sessa, L., Petrone, A.M., Porta, A., Diana, R., Iannelli, P., Piotto, S. (2017). Structure Modification of an Active Azo-Compound as a Route to New Antimicrobial Compounds. *Molecules*. 25;22(6). doi: pii: E875. doi:10.3390/molecules22060875.
 25. Costa, F., Sousa, DM., Parreira, P, Lamghari M., Gomes P., Martins, MCL. (2017). N-acetylcysteine-functionalized coating avoids bacterial adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports*. 7, 17374. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17310-4.69>.

26. Cox, L.A. Jr., Ricci, P.F. (2008). Causal regulations vs. political will: why human zoonotic infections increase despite precautionary bans on animal antibiotics. *Environment International* 34(4), 459-475. doi: 10.1016/j.envint.2007.10.010.49.
27. Domagk, G. (1935). Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen infektionen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 61, 250–253.
28. Eroshenko, D., Polyudova, T., Korobov, V. (2017). N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 105, 145-152. doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.030.
29. European Medicines Agency, 2019. Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals - Categorisation of antimicrobials EMA/CVMP/CHMP/682198/2017.
30. Fan, W.-J. , Shi, H., Tan, D.-Z., Xu, Z.-N., Yu, N.-K., Zhao, J.-L.(2018). Design of novel phenanthrocarbazole dyes for efficient applications in dye-sensitized solar cells. *Computational Materials Science*. 151, 34-40. doi: 10.1016/j.commatsci.2018.04.061.
31. Fridovich, I. (1998). The trail to superoxide dismutase. *Protein Science*. 7:2688-2690. Cambridge University Press. doi: <https://doi.org/10.1002/pro.5560071225>
32. Garg, S.K., Tripathi, M. (2017). Microbial Strategies for Discoloration and Detoxification of Azo Dyes from Textile Effluents. *Research Journal of Microbiology*, 12 (1), 1-19. doi: 10.3923/jm.2017.1.19.55.
33. Hager T. (2006). The Demon Under the Microscope: From Battlefield Hospitals to Nazi Labs, One Doctor's Heroic Search for the World's First Miracle Drug. *Harmony Books*. ISBN 1-4000-8214-5.
34. Hegarty, A.F. (1978). Kinetics and mechanisms of reactions involving diazonium and diazo groups. In: *The Chemistry of Diazonium and Diazo groups*, pt. 2, (Patai S., Ed.), Wiley, NY, 545-551. doi: 10.1002/9780470771556.ch1.
35. Hillier, A., Lloyd, D.H., Weese, J.S., Blondeau, J.M., Boothe, D., Breitschwerdt, E., et al. (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*, 25, e142–e163. doi: 10.1111/vde.12118.67.
36. Hinks, D., Freeman, H.S., Nakpathom, M., Sokolowska, J. (2000). Synthesis and evaluation of organic pigments and intermediates non mutagenic benzidine analogs. *Dyes and Pigments*. 44:199-207. doi: 10.1016/S0143-7208(99)00078-9.
37. Hong, R., Kang, Y.T., Michels C.A, Gaduraa, N. (2012). Membrane Lipid Peroxidation in Copper Alloy-Mediated Contact Killing of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(6): 1776–1784. doi: 10.1128/AEM.07068-11.
38. Jadhav, S.B., Surwase, S.N., Kalyani, D.C., Gurav, R.G., Jadhav, J.P.(2012). Biodecolorization of azo dye Remazol orange by *Pseudomonas aeruginosa* BCH and toxicity (oxidative stress) reduction in *Allium cepa* root cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 168(5), 1319-1334. doi: 10.1007/s12010-012-9860-z.
39. Karipcin, F., Kabalcilar, E. (2007). Spectroscopic and thermal studies on solidcomplexes of 4-(2-pyridylazo) resorcinol with some transition metals. *Acta Chimica Slovenica* 54 (2), 242-247. doi:

- <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:docQIIFUKVG/ba7c9a10-8ea0-48e2-b83a-0631ad196b95/PDF>.
40. Kaur, S., Kaur, A. (2014). Variability in antioxidant/detoxification enzymes of *Labeo rohita* exposed to an azo dye, acid black (AB). *Comparative Biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology: CBP*, 167, 108-116. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.06.009.58.
 41. Ki, V.; Rotstein, C. (2008). Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 19(2):173-84. doi: 10.1155/2008/846453.
 42. Kmiecik, W., Szewczyk E.M. (2018). Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? *Folia Microbiologica (Praha)* 63(6), 743–747. doi: 10.1007/s12223-018-0615-2.48.
 43. Kofie, W., Dzidzoramengor, C., Adosraku, R.K. (2014). Synthesis and evaluation of antimicrobial properties of azo dyes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 7, 4: 398-401. doi: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/5799>.
 44. Kuruba B.K., Emmanuvel L., Sridhar B., Vasanthkumar S.(2017). Unprecedented cyclization of α -diazo hydrazones upon NH functionalization: a Et₃N base promoted one-step synthetic approach for the synthesis of N-amino-1,2,3-triazole derivatives from α -diazo hydrazone. *Tetrahedron* 73 (18), 2674-2681. doi:10.1016/j.tet.2017.03.061.
 45. Lade, H., Kadam, A., Paul, D., Govindwar, S. (2015). Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. *Experimental and Clinical Science International Journal*. 14: 158–174. doi: 10.17179/excli2014-642.
 46. Lasa, I., del Pozo J. L., Penadés J. R., Leiva J. (2005). Bacterial biofilms and infection. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28, 2.
 47. López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2012). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (7):a000398. doi:10.1101/cshperspect.a000398.
 48. Lozano, C., Rezusta, A., Ferrer, I., Pérez-Laguna, V., Zarazaga, M., Ruiz-Ripa, L., Revillo, M.J., Torres, C. (2017). *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. *Vector borne and zoonotic diseases*, 17 (4). doi:10.1089/vbz.2016.2048.
 49. MacKenzie, K.D., Palmer, M.B., Köster, W.L., White, A.P. (2017). Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic Salmonella Strains to Colonize Multiple Host Species. *Frontiers in Veterinary Science* 4:138. doi:10.3389/fvets.2017.00138.62.
 50. MIC testing. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. (2012). 32, 2. Recuperado de: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
 51. Misal, S.A., Gawai, K.R. (2018). Azoreductase: a key player of xenobiotic metabolism. *Bioresources and Bioprocessing*. 5,17. doi: 10.1186/s40643-018-0206-8.
 52. National Research Council. (2014). Committee on the Design and Evaluation of Safer Chemical Substitutions: A Framework to Guide Selection of Chemical Alternatives. Appendix D: Overview of the GHS Classification Scheme in

- Hazard Classification. Washington (DC): National Academies Press (US);
 Recuperado de:
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK253967/#:~:text=Respiratory%20Sensitization&text=Respiratory%20sensitizers%20are%20classified%20into,test%E2%80%9D%20\(UNECE%202013\).](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK253967/#:~:text=Respiratory%20Sensitization&text=Respiratory%20sensitizers%20are%20classified%20into,test%E2%80%9D%20(UNECE%202013).)
53. Ngaini, Z., Mortadza, N.A. (2018). Synthesis of halogenated azo-aspirin analogues from natural product derivatives as the potential antibacterial agent. *Natural Product Research* 33(24), 3507-3514. doi: 10.1080/14786419.2018.1486310.
 54. Nicholls, P., Fita, I., Loewen, PC. (2000). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51: 51-106.
 55. O'Neil, J. (2018). Zoonotic Infections From Common Household Pets. *The Journal for Nurse Practitioners*, 14(5), 363-370. doi: 10.1016/j.nurpra.2017.12.025.44.
 56. O'Toole, GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. JoVE 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>, doi:10.3791/2437.
 57. Ong, K.S., Cheow, Y.L., Lee, S.M. (2017). The role of reactive oxygen species in the antimicrobial activity of pyochelin. *Journal of Advanced Research*, 8(4), 393-398. doi: 10.1016/j.jare.2017.05.007.
 58. Pan, H., Feng, J., He, G.X., Cerniglia, C.E., Chen, H. (2012). Evaluation of impact of exposure of Sudan azo dyes and their metabolites on human intestinal bacteria. *Anaerobe*, 18(4), 445-453. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.05.002.61.
 59. Pandey, VP., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., Dwivedi, UN. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 6:1. doi: 10.4172/2161-1009.1000308.
 60. Perry, JJ., Shin, DS., Getzoff, ED., Tainer, JA. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2): 245-262. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.11.004
 61. Pine, L., Hoffman, P.S., Malcom, G.B., Benson, R.F., Keen, M.G. (1984). Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus *Legionella*. *Journal of Clinical Microbiology*. 20(3), 421-429. PMID: 6490828 PMCID:PMC271343.
 62. Piotto, S.; Concilio, S.; Sessa, L.; Porta, A.; Calabrese, E.C.; Zanfardino, A.; Varcamonti, M.; Iannelli, P. (2013a). Small azobenzene derivatives active against bacteria and fungi. *European Journal of Medicinal Chemistry* 68, 178-184. doi:10.1016/j.ejmech.2013.07.030.
 63. Piotto S., Concilio S. Sessa L., Iannelli P., Porta A., Calabrese E.C., Galdi M.R., Incarnato, L. (2013b). Novel antimicrobial polymer films active against bacteria and fungi. <https://doi.org/10.1002/pc.22410>. Presented at the 6th Conference on the Times of Polymers & Composites (TOP) held at Ischia Italy June 10-14, 2012.
 64. Piotto S., Concilio S., Sessa L., Diana R., Torrens G., Juan C., Caruso U., Iannelli P. (2017). Synthesis and Antimicrobial Studies of New Antibacterial Azo-Compounds Active against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Molecules*. 22(8): 1372. doi: 10.3390/molecules22081372.
 65. Rezaei-Seresht, E., Salimi, A., Mahdavi, B.(2019). Synthesis, antioxidant and antibacterial activity of azo dye-stilbene hybrid compounds. *Pigment and Resin Technology*.48(1), 84-88. doi: 10.1108/PRT-01-2018-0005.

66. Robb, A.R., Wright, E.D., Foster, A.M. E., Walker, R., Malone, C. (2017). Skin infection caused by a novel strain of *Staphylococcus pseudintermedius* in a Siberian husky dog owner. *Journal of Medical Microbiology of Case Reports* 4. doi: 10.1099/jmmcr.0.005087.47.
67. Ronson, T.K., Adams, H., Ward, M.D.(2005). Bis-dentate ligands containing two N,O-chelating pyrazolyl-phenolate units: double helical complexes with Co (II), Cu (II), and Zn (II). *Inorganica Chimica Acta*, 358 (6), 1943-1954. doi:10.1016/j.ica.2004.12.009.
68. Sessa, L., Concilio, S., Iannelli, P., De Santis, F., Porta, A., Piotta, S.(2016). Antimicrobial azobenzene compounds and their potential use in biomaterials. *AIP Conference Proceedings* 1727, 020018 (2016). doi: <https://doi.org/10.1063/1.4945973>.
69. Shin, B., Park, W. (2018). Zoonotic Diseases and Phytochemical Medicines for Microbial Infections in Veterinary Science: Current State and Future Perspective. *Frontiers in Veterinary Science*, 5: 166. doi: 10.3389/fvets.2018.0016643.
70. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82. 291-295. doi: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.
71. Singh, A., Walker, M., Rousseau, J., Weese, J.S. (2013). Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Veterinary Research*, 9:93. doi: 10.1186/1746-6148-9-93.64.
72. Singh, P.K., Singh, R.M. (2017). Bio-removal of Azo Dyes: A Review. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(2), 108-126. doi: 10.3126/ijasbt.v5i2.1688156.
73. Smith, A.W. (2005). Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1539–1550. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.007.66.
74. Somayaji, R., Priyantha, MA., Rubin, J.E., Church, D. (2016). Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 85(4), 471-476. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008.
75. Tsai, FH., Kitamura, Y., Kokawa,M. (2017). Liquid-core alginate hydrogel beads loaded with functional compounds of radish by-products by reverse spherification: Optimization by response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 96,600-610. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.056>.
76. Videla, LA; Fernandez V. (1988.) Biochemical aspects of cellular oxidative stress *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* 21(1):85-92. PMID: 2484970.
77. Voo, WP., Lee, BB., Idris, A., Islam, A., Tey, BT., Chang, ES.(2015). Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5, 36687-36695. doi: <https://doi.org/10.1039/C5RA03862F>
78. Wang, M., Funabiki, K., Matsui, M. (2003). Synthesis and properties of bis(hetaryl)azo dyes. *Dyes and Pigments*. 57,77-86. doi: 10.1016/S0143-7208(03)00011-1.
79. Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Gerner-Smidt, P., Bager, F. (1999). Transfer of

- antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*. 92, 51-57.
80. Wolfbeis, O.S. (2005). Materials for fluorescence-based optical chemical sensors. *Journal of Materials Chemistry*. 15, 2657–2669. doi: 10.1039/b501536g.
81. Zou, W., Cerniglia, C.E., Chen, H. (2009). Azoreductase in *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Toxicology*, 4.28. doi: 10.1002/0471140856.tx0428s41.

“El uso hace brillar los metales”

Horacio

CAPÍTULO TERCERO:

PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DE COMPLEJOS METAL-CARBENO Y CARBOXILATOS METÁLICOS

Índice

1. Introducción
2. Objetivos
3. Materiales y Métodos
 - 3.1. Ensayo de toxicidad de disolventes orgánicos
 - 3.2. Síntesis y caracterización de los complejos y carboxilatos metálicos para evaluar su capacidad antibacteriana
 - 3.3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo
 - 3.4. Estudios microbiológicos
 - 3.4.1. Ensayos de sensibilidad de los ligandos de los compuestos
 - 3.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)
 - 3.4.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)
 - 3.4.4. Ensayos de sensibilidad bacteriana al AgNO_3
 - 3.4.5. Efecto sobre la formación de biofilm bacteriano: método de George O'Toole
 - 3.4.6. Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
 - 3.4.7. Determinación de enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARs).
4. Estudio estadístico
5. Resultados
 - 5.1. Toxicidad de disolventes orgánicos
 - 5.2. Síntesis y caracterización de los compuestos a los que se evaluará su capacidad antibacteriana
 - 5.3. Estudios microbiológicos
 - 5.3.1. Ensayos de sensibilidad de los ligandos de los compuestos
 - 5.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)
 - 5.3.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)
 - 5.3.4. Ensayos de sensibilidad bacteriana al AgNO_3
 - 5.3.5. Efecto sobre la formación de biofilm bacteriano: método de George O'Toole
 - 5.3.6. Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
 - 5.3.7. Determinación of de enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARs).
6. Discusión
7. Conclusiones
8. Referencias

1. Introducción

Desde la antigüedad metales como la plata o el cobre se han utilizado por sus propiedades antimicrobianas. Un claro ejemplo es el de la civilización persa, en la que utilizaban vasijas hechas de estos metales para la desinfección del agua y la preservación de alimentos (**Figura 1A**). Posteriormente, fenicios, griegos, romanos y egipcios adoptaron esta práctica. Asimismo, colonos norteamericanos colocaban monedas de plata en los contenedores de agua, vino, leche y vinagre para su conservación, técnica que también utilizaron los japoneses en la Segunda Guerra Mundial para evitar la propagación de la disentería (Alexander, 2009; Borkow y Gabbay, 2009). En el campo de la medicina también existen numerosas evidencias de su uso desde épocas antiguas. Los egipcios ya utilizaron el cobre como vasoconstrictor y antiséptico en las heridas, hilo de plata para suturar desgarros vaginales tras el parto, sales de plata para prevenir lesiones oculares debido a la gonorrea en niños recién nacidos o usaban láminas de plata para prevenir las infecciones en incisiones quirúrgicas (Sims 1852; Silver et al. 2006) (**Figura 1B**).



Figura 1 izquierda, 1A: Jarra de plata del Imperio Saránida (Persa) utilizada para preservar alimentos o agua. Expuesta en el Museo Británico en Londres. Derecha, 1B: Relieve que muestra la utilización de utensilios quirúrgicos metálicos. Se puede apreciar una pequeña vasija egipcia en la que portaban sales de plata y cobre.

En este sentido, a lo largo de los dos últimos siglos, óxidos de metales o metaloides como telurio, magnesio, o arsénico, así como sales de cobre y mercurio se han utilizado para tratar enfermedades infecciosas tales como lepra, tuberculosis, gonorrea o sífilis (Pereira 1836; Frazer y Edin 1930; Keyes 1920; Hodges 1889; Ehrlich y Bertheim 1912). Desde entonces se han estudiado las propiedades antimicrobianas de diferentes metales o metaloides. Observándose que algunos de estos compuestos desempeñan funciones importantes dentro de la células, que no pueden llevarse a cabo por moléculas orgánicas, y son, por lo tanto, indispensables para la bioquímica de todos los organismos. Algunos iones metálicos son cruciales para el funcionamiento de las membranas celulares y el ADN, así como para procesos de catálisis y transferencia de electrones (Waldron y Robinson 2009; Andreini et al. 2004). En la **Figura 2**, se muestra como ejemplo la bomba de Na^+/K^+ . Estos son los denominados metales esenciales e incluyen Na, Mg, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se y Mo. Sin embargo, estos metales esenciales pueden ser letales si se encuentran en exceso en la célula. Por otro lado, se encuentran los denominados metales no esenciales, que son aquellos que no desempeñan ninguna función biológica celular. Algunos de ellos, como Ag, Hg o Te

son extremadamente tóxicos para muchos microorganismos y, por tanto, comportándose como biocidas a muy bajas concentraciones.

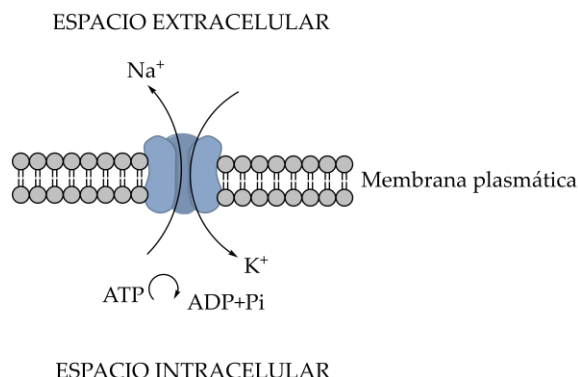


Figura 2: Bomba de Na⁺/K⁺. Se trata de una enzima presente en todas las membranas celulares que ejerce un transporte activo de estos iones, por lo que consume energía en forma de ATP. Desempeña un papel crucial en el mantenimiento del volumen osmótico celular (Pivovarov et al. 2018).

Debido a estas propiedades, en la última década se han desarrollado numerosas aplicaciones utilizando metales, como recubrimientos o como parte de novedosos nanomateriales para su uso como agentes antimicrobianos (Nies 1999, Harrison et al. 2004, Afessa et al. 2010). Aunque las capacidades antimicrobianas de los metales son ampliamente conocidas, debido a su complejidad, sus mecanismos de acción continúan en estudio. Se conoce que ciertos metales inhiben de manera competitiva el transporte de iones esenciales, lo que provoca una alteración de su bioquímica y, por tanto, su muerte. Sin embargo, el mecanismo de toxicidad considerado principal es la acumulación intracelular de los metales, provocando su envenenamiento (Waldron y Robinson 2009). Aunque los mecanismos concretos de entrada de algunos iones metálicos no esenciales como Ag, Al o Pb no se conocen con exactitud, se ha podido comprobar que normalmente están implicados los transportadores destinados a iones esenciales, tanto metálicos como no metálicos, mediante procesos de transporte directo a través de estas proteínas transportadoras ubicadas en la membrana o bien mediante co-transporte con ligandos de bajo peso molecular, como pueden ser fosfatos, aminoácidos, péptidos y otros ácidos orgánicos (Schue et al. 2009; Barkay et al. 2003; López et al. 2010; Hohle et al. 2011, Schaefer et al. 2009). Una vez dentro de la célula bacteriana, estos metales pueden desencadenar distintos mecanismos que producen la toxicidad y la muerte del organismo. Uno de ellos es el de inducir la producción de ampliamente conocidas especies reactivas de oxígeno (ROS), que son moléculas altamente reactivas y oxidantes, que incluyen iones de oxígeno, peróxidos y radicales libres, y que se forman como consecuencia del metabolismo del oxígeno. Por otro lado, los metales pueden inhibir la producción de enzimas antioxidantes por parte de la bacteria. Entre estas destacan la catalasa o la superóxido-dismutasa (SOD), ya que ejercen una función antioxidante protectora frente a las ROS. En las células existe un equilibrio entre la producción de ROS y la acción de estas enzimas, pero, si existe un desequilibrio y un aumento de las ROS, se produce un estado denominado estrés oxidativo, que puede dañar de manera irreversible las membranas, proteínas y

enzimas e incluso el material genético celular y que en casos puede desembocar en un crecimiento indiscriminado, dando lugar a procesos cancerígenos. Por tanto, la inhibición de las enzimas antioxidantes por parte de los metales deja indefensas a las bacterias ante dicho estrés oxidativo, provocando su muerte (Macomber et al. 2007; Warnes et al. 2011; Warnes et al. 2012). Otro mecanismo es el de la interferencia en la acción de ciertas enzimas bacterianas necesarias para el metabolismo celular. De esta manera, ciertos metales tienen la capacidad de unirse a las cadenas laterales de estas enzimas y provocar su disfunción (Stadman et al. 1993; 2003) (**Figura 3**). Asimismo, se ha demostrado que algunos metales provocan daño en la membrana bacteriana, provocando la peroxidación de sus lípidos (**Figura 4**) o la disrupción de la actividad de la cadena de transporte de electrones, causando un daño irreversible de la misma (Gordon et al. 2010; Hong et al. 2012). También se han demostrado que algunos de los metales son capaces de interferir con la asimilación de nutrientes por parte de la bacteria o provocar daños en su material genético (genotoxicidad) (Pereira et al. 2008; Linley et al. 2012).

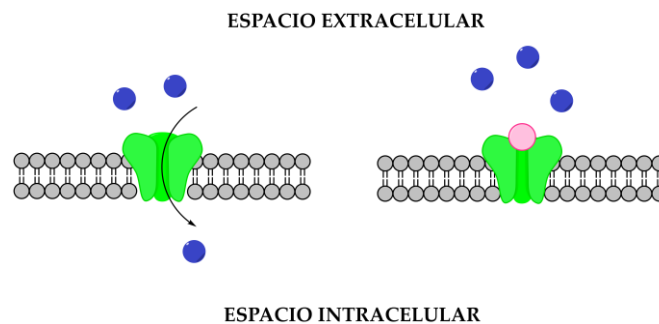


Figura 3: A. Se muestra el funcionamiento normal de una proteína transportadora de membrana, que transporta al espacio intracelular sustancias como iones o moléculas hidrófilas (representadas como esferas azules). B. El ion metálico no esencial (representado como una esfera de color rosa) se une a esta proteína, inactivando su acción transportadora y por tanto, alterando el metabolismo bacteriano.

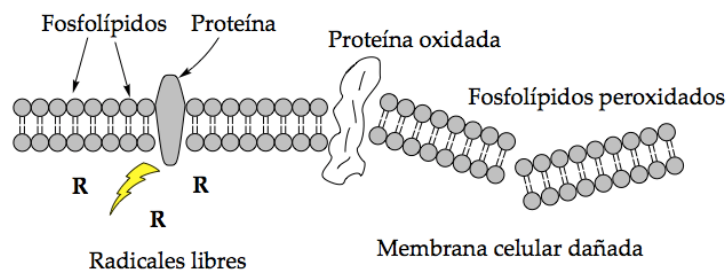


Figura 4: Proceso de peroxidación de los fosfolípidos de membrana y de sus proteínas, provocando daño de la membrana celular.

Como se ha descrito ampliamente en capítulos anteriores de la presente Tesis Doctoral, así como en el epígrafe correspondiente de este capítulo, debido a la aparición y crecimiento exponencial de las multirresistencias bacterianas, existe una necesidad urgente en la generación de nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas. Dadas sus características y propiedades, descritas ampliamente en el presente capítulo, consideramos que los complejos con metales pueden ser una muy buena alternativa para su uso como agentes antimicrobianos (Sevgi et al. 2018; Morgan et al. 2018; Frei et al. 2020; Ramesh et al. 2020, Saranya et al. 2020).

En este sentido, unos de los compuestos a tener en cuenta son los carbenos N-heterocíclicos (NHC) y sus derivados. En los últimos años estos compuestos han ido ganando relevancia debido a sus diferentes propiedades y a su papel en los procesos de catálisis. Así, tradicionalmente, los carbenos se clasifican en tres familias: los carbenos tipo Fischer o electrófilos, los carbenos tipo Schrock, son carbenos con carácter nucleófilo y los carbenos N-heterocíclicos (NHC). Estos últimos (**Figura 5**) están estabilizados por un heteroátomo, y aunque formalmente son parecidos a los de tipo Fischer, químicamente se comportan como los de Schrock.

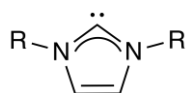


Figura 5: Esquema general de un carbeno N-heterocíclico

Los NHC son moléculas neutras cíclicas que contienen al menos un átomo de nitrógeno unido a un átomo de carbono tipo carbeno (carbono neutro divalente el cual tiene seis electrones sobre su capa de valencia) y normalmente derivan de la desprotonación de sales de imidazolio (Kascatan-Nebioglu et al. 2007). Los NHC pueden funcionalizarse combinándose con otros compuestos como son las aminas, alcóxidos, ácidos carboxílicos o ésteres entre otros, (**Figura 6**).

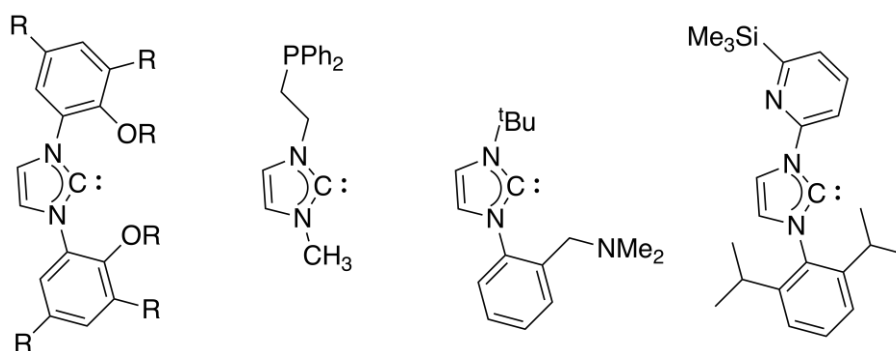


Figura 6: Algunos ejemplos de ligandos NHCs funcionalizados: Ph (fenilo); ^tBu (Terc-butilo); Me (metilo).

El hecho de poseer el átomo de carbono, en este tipo de compuestos únicamente con seis electrones en su capa de valencia, hacía que los carbenos fueran considerados como muy reactivos e inestables, con lo que no se generalizaron sus aplicaciones hasta

los primeros años de la década de los 60. De hecho, los primeros ejemplos conocidos de NHC como ligandos de complejos metálicos (Cr y Hg) fueron descritos en los trabajos pioneros de Wanzlick y Öfele en el año 1968. En los siguientes años, Lappert desarrolló distintos aspectos de química relacionados con este tipo de complejos, pero no fue hasta principios de los años noventa (1991), que Arduengo y su equipo aislaron el primer carbeno *N*-heterocíclico cristalino y estable, por desprotonación de la correspondiente sal de imidazolio, estableciendo así un antes y un después en este campo de la química (Kascatan-Nebioglu et al. 2007). Por otro lado, en los NHC como el par de electrones del carbono carbénico se encuentra en un orbital híbrido de tipo sp^2 sobre el átomo de carbono (que además es el HOMO), se puede deducir que son excelentes donadores σ . Debido a sus propiedades donadoras, estos compuestos tienen la capacidad de formar complejos estables con metales, denominados complejos metal-carbeno (**Figura 7**). Así, se han descrito muchos de estos complejos con varios metales y estados de oxidación, presentando características muy variadas (Kühl et al. 2010).

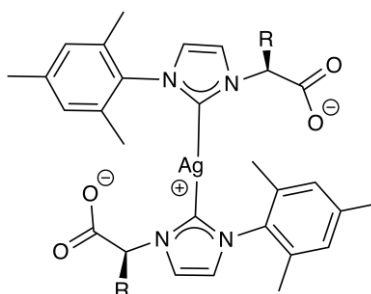


Figura 7: complejo metal-carbeno con Ag.

En el año 2004, Youngs y su equipo describieron por primera vez la capacidad antimicrobiana de un complejo NHC-Ag frente a microorganismos Gram positivos, Gram negativos y hongos con resultados prometedores (Melaiye et al. 2004). Desde entonces, se han ido estudiando estas propiedades antimicrobianas con distintos complejos metálicos, demostrando que se trata de una alternativa viable a la antibioterapia clásica (Hindi et al. 2008, Patil et al. 2011, Vinagreiro et al. 2020).

Por tanto, dada sus propiedades de estabilidad y su capacidad de formar compuestos estables con metales (complejos metal-carbeno), así como la evidencia de que algunos de ellos poseen capacidad antimicrobiana, consideramos merecedores de estudio compuestos relacionados con estas estructuras químicas concretas como una potencial alternativa a la antibioterapia convencional. Concretamente en el presente capítulo se muestran los estudios de la actividad antimicrobiana y frente a la formación del biofilm, así como los posibles mecanismos de acción de diferentes complejos metal-carbeno (Ag y Pd) y carboxilatos de Ag y Zn. En este caso, los NHC incorporan un aminoácido en el ligando de partida, introduciendo quiralidad y grupos funcionales adicionales al carbeno, dotándolos de características específicas.

Por otro lado, otros compuestos a tener en cuenta son los denominados dicarboxilatos de base de imidazolio. Éstos también han ganado protagonismo en los últimos años, especialmente aquellos que muestran quiralidad. Un carboxilato (**Figura 8**) es el producto de la reacción entre un ácido orgánico y un ión metálico. Estos dicarboxilatos quirales se preparan fácilmente siguiendo el protocolo descrito por Debus-Radziszewski, para posteriormente utilizarse como precursores de síntesis de sustratos

enantiopuros (enantiómeros más activos o eutómeros), entre los que se encuentran los NHCs anteriormente mencionados. Estos compuestos también se han utilizado como catalizadores bifuncionales ácido-base en procesos de catálisis asimétrica, dirigida al desarrollo de procesos catalíticos enantioselectivos, y como complejos de unión en la construcción de polímeros homoquirales (en los que todos sus constituyentes poseen la misma forma quiral) de coordinación o estructuras metalo-orgánicas (Caballero et al. 2020).

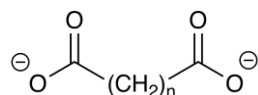


Figura 8: Estructura química básica de carboxilatos.

Numerosos trabajos muestran que los dicarboxilatos también poseen propiedades antimicrobianas, sin embargo sus mecanismos concretos de acción continúan en estudio (Hindi et al. 2008, Deally et al. 2011, Colak et al. 2013, Thorton et al. 2016, Lopes et al. 2020). De hecho, estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana puede depender de la naturaleza del ligando de partida (Sari et al. 2016). Asimismo, otros estudios sugieren que existe una relación directa entre la quiralidad de los compuestos y su actividad antimicrobiana (Guo et al 2019). Este fenómeno se ha observado en otros compuestos como antibióticos o herbicidas, siendo muy importante determinar el estereoisómero activo. Cada uno de los enantiómeros puede presentar distinta farmacocinética, biodisponibilidad y actividad farmacológica, aunque ambos presenten las mismas propiedades fisicoquímicas. Asimismo, se ha podido comprobar que la mayoría de los receptores que se encuentran en el organismo interactúan únicamente con un determinado enantiómero (Álvarez y Durán, 2002, De Melo et al. 2015,). Por estos motivos, el presente capítulo también incluye los estudios de la actividad antimicrobiana y frente a la formación del biofilm, así como los posibles mecanismos de acción de carboxilatos de Zn y de dos compuestos dicarboxilatos de plata enantiómeros sintetizados *de novo*.

Finalmente, ya que algunas de estas sustancias son de naturaleza hidrofóbica necesitarán ser disueltas en disolventes orgánicos. Algunos de estos disolventes pueden ser tóxicos también para las bacterias, afectando a sus membranas celulares (Radošević et al., 2018). Aunque existen estudios que evidencian dicha toxicidad en alguno de estos compuestos, hemos podido observar que no existe ningún estudio sistemático que aúne toda la información concerniente a la toxicidad bacteriana de los mismos. Por estos motivos consideramos necesario realizar un estudio previo de toxicidad de varios de los disolventes orgánicos más comúnmente utilizados en las cepas bacterianas a estudiar.

2. Objetivos

Los objetivos de este capítulo se detallan a continuación:

1. Determinar si existe toxicidad de distintos disolventes orgánicos en las cepas *Staphylococcus pseudintermedius* como modelo de Gram positivas y *Pseudomonas aeruginosa* como modelo de Gram negativas.
2. Llevar a cabo la síntesis y caracterización de complejos metal-carbeno de Ag, Pd y carboxilatos de Zn con potencial comportamiento antibacteriano.
3. Sintetizar y caracterizar compuestos nuevos, por un lado un complejo metal-carbeno de paladio y por otro, dos complejos enantioméricos tipo dicarboxilatos de plata, con potencial capacidad antibacteriana.
4. Determinar si existe capacidad antibacteriana de todos los compuestos anteriores frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*, y a las Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, estudiar el posible efecto de estos compuestos en la formación del biofilm bacteriano.
5. Estudiar el mecanismo de acción antimicrobiana y determinar si existe una relación estructura-actividad de estos compuestos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Ensayo de toxicidad de disolventes orgánicos

Puesto que algunos de estos disolventes pueden ser tóxicos para las bacterias, sobre todo afectando a sus membranas, fue necesario realizar un estudio previo de toxicidad de dichos disolventes para *Staphylococcus pseudintermedius* como modelo de Gram positivas y *Pseudomonas aeruginosa* como modelo de Gram negativas.

Se testaron 5 disolventes orgánicos de calidad provenientes del laboratorio Aldrich para síntesis (DLEP, 2011):

1. **DMF**: N-dimetilformamida. Disolvente amídico, polar, incoloro y miscible en agua. Muy utilizado como disolvente de polímeros que presenten alta asociación intermolecular por puentes de hidrógeno.
2. **TBME** (metil *terc*-butil éter). Líquido volátil, soluble en agua e incoloro de olor similar a los terpenos. Ampliamente utilizado al presentar menos toxicidad que otros éteres.
3. **TFH** (tetrahidrofurano). Compuesto orgánico heterocíclico, transparente, y de baja viscosidad. Es uno de los éteres más polares.
4. **DMSO** (dimetilsulfóxido). Líquido orgánico incoloro utilizado como disolvente orgánico industrial, criopreservante y como fármaco antiinflamatorio. Es un disolvente aprótico y altamente polar, por lo que es miscible en agua y en disolventes orgánicos.

5. **DCM** (diclorometano/ cloruro de metileno). Líquido incoloro, volátil y poco soluble en agua, ampliamente utilizado como disolvente, tanto en industria como en síntesis y extracciones de laboratorio.

Para esterilizar los disolventes utilizados, al no poder introducirse en el autoclave ya que la mayoría poseen puntos de ebullición bajos, entre 40 y 150°C, se utilizaron filtros estériles de 45 nanómetros. Una vez esterilizados los disolventes y cultivado las bacterias en medio líquido se realizaron tres diluciones seriadas de cada disolvente para cada cepa bacteriana:

- Dilución 1/1000: 999 μ l de medio de cultivo TSB y 1 μ l de disolvente.
- Dilución 1/100: 990 μ l de medio de cultivo TSB y 10 μ l de disolvente.
- Dilución 1/10: 900 μ l de medio de cultivo TSB y 100 μ l de disolvente

Asimismo, como controles se utilizaron medio TSB sin inocular como control negativo y medio TSB inoculado como control positivo. Por tanto, el ensayo constó de 34 tubos en total, 17 para cada cepa bacteriana (15 correspondientes a las 3 diluciones de cada uno de los 5 disolventes y los dos tubos de control). Una vez añadidos los disolventes se incubaron 24 horas a 37°C. Tras esta incubación, se valoró si se había producido crecimiento bacteriano en presencia del disolvente a las tres concentraciones, tanto de manera cualitativa valorando la generación de turbidez en el medio (**Figura 9**), como de manera cuantitativa midiendo la absorbancia a 600 nm de longitud de onda utilizando para ello un lector de placas de microtitulación ASYS UVM340.

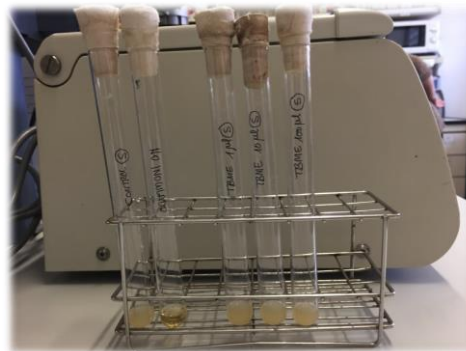


Figura 9: Ensayo de TBME. De izquierda a derecha, control positivo, control negativo (sin turbidez), concentración 1:1000, concentración 1:100, concentración 1:10.

3.2 Síntesis y caracterización de los complejos metal carbeno y carboxilatos

La síntesis de los complejos, en la que participamos en el diseño, fue llevada a cabo por el equipo liderado por el profesor Francisco J. Montilla Ramos, del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la US.

Los espectros de infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrum Two (pastillas prensadas de KBr). Los espectros RMN se tomaron utilizando espectrómetros Avance III (300 MHz) utilizando como referencia las señales residuales de disolvente. Los datos se reportaron en ppm. El poder rotatorio se determinó utilizando un polarímetro digital JASCO P-2000 y las medidas se realizaron a temperatura ambiente (concentración de *ca.* 10 mg/mL). Los estudios de difracción de rayos X en polvo (XRPD) se realizaron en un analizador Elemental LECO CHNS 93 y en un difractómetro Bruker D8 advance A25 respectivamente.

3.2.1 Dicarboxilatos de Zn:

La síntesis de estos compuestos poliméricos de Zn (mostrados en **Figura 10** y las **Tablas 1 y 2**) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Nicasio et al. en 2017, a partir de los correspondientes ácidos dicarboxílicos quirales con estructura tipo imidazol, como se indica en la **Figura 10**, y fueron preparados mediante el uso de los correspondientes aminoácidos naturales mediante la reacción de Debus-Radziszewski.

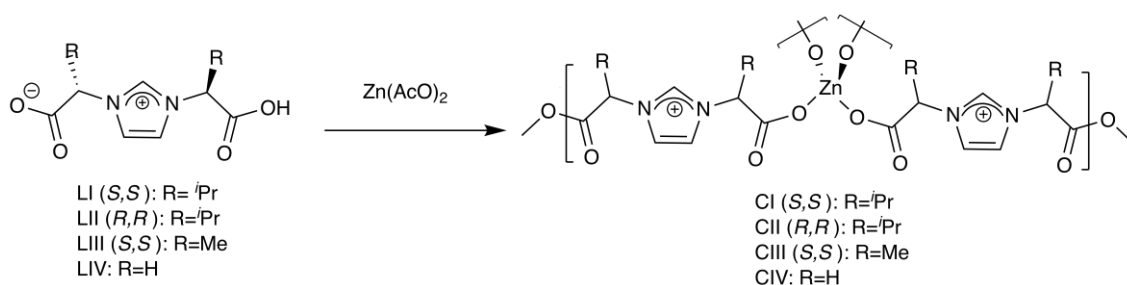
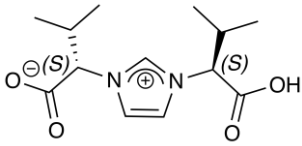
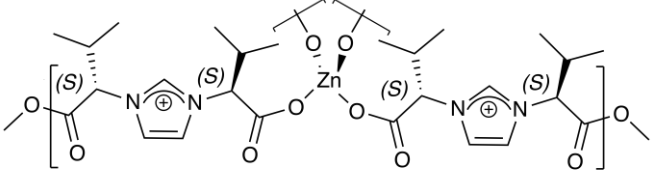
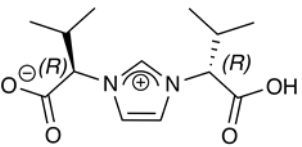
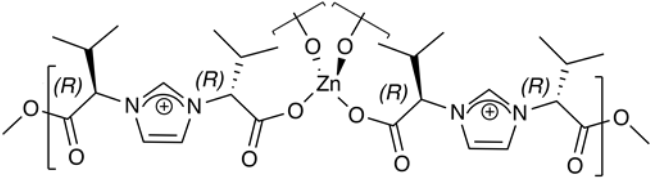
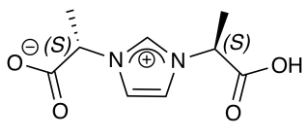
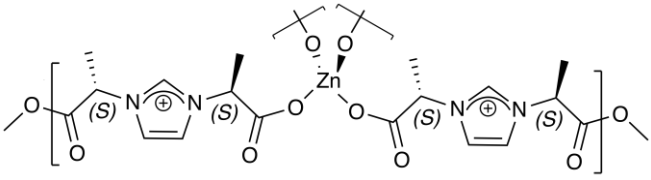
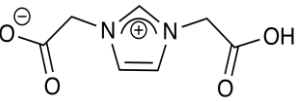
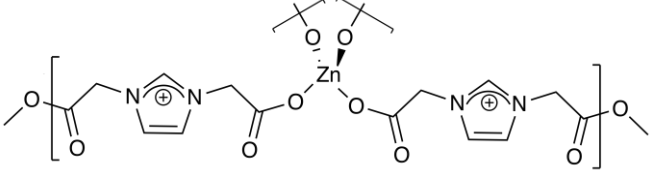


Figura 10: Síntesis de los diferentes compuestos poliméricos de zinc (CI, CII, CIII y CIV) a partir de sus precursores (LI, LII, LIII y LIV).

Todos los procesos se realizaron bajo condiciones aeróbicas. Los disolventes se purificaron antes de su uso, utilizando los procedimientos estándar adecuados. Los reactivos químicos se obtuvieron de casas comerciales, principalmente Aldrich Química, y los ligandos se prepararon según la literatura publicada (O. Köhl et al. 2010). Se trata de un proceso de síntesis de dicarboxilatos de zinc a partir de ligandos tipo imidazolio, (**Tabla 1**).

Tabla 1: Relación de ligandos y dicarboxilatos de Zn sintetizados.

Ligando (precursor)	Producto final
 <p>LI (S,S)</p> <p>LI (S,S)</p>	 <p>C1 (S,S)</p> <p>C1 (S,S)</p>
 <p>LII (R,R)</p> <p>LII (R,R)</p>	 <p>CII (R,R)</p> <p>CII (R,R)</p>
 <p>LIII (S,S)</p> <p>LIII (S,S)</p>	 <p>CIII (S,S)</p> <p>CIII (S,S)</p>
 <p>LIV</p> <p>LIV</p>	 <p>CIV</p> <p>CIV</p>

Complejo de Zn derivado CI:

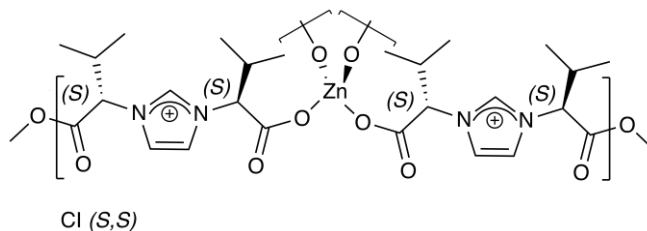


Figura 11: estructura química del complejo CI

Este complejo (**Figura 11**) se preparó utilizando el siguiente método experimental. En una disolución de LI (**Tabla 1**) (0.2683 g, 1 mmol) con una mezcla 3:1 de EtOH/H₂O se añadió una disolución de acetato de zinc(II) dihidrato (0.1097 g, 0.5 mmol) en EtOH. La mezcla resultante se mantuvo en agitación a 60 °C durante 1 hora. El disolvente se evaporó y el aceite resultante se disolvió en una mezcla de H₂O/DMF 1:3. La evaporación lenta de esta disolución dio lugar a cristales incoloros.

Complejo de Zn derivado CII :

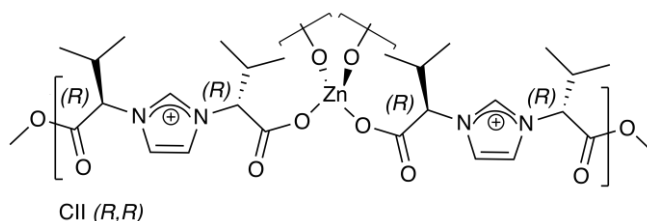


Figura 12: estructura química del complejo CII

Al igual que el CI, en el CII (**Figura 12**) se utilizó el mismo método experimental. En una disolución de LII (**Tabla 1**) (0.2683 g, 1 mmol) con una mezcla 3:1 de EtOH/H₂O se añadió una disolución de acetato de zinc(II) dihidrato (0.1097 g, 0.5 mmol) en EtOH. La mezcla resultante se mantuvo en agitación a 60 °C durante 1 hora. El disolvente se evaporó y el aceite resultante se disolvió en una mezcla de H₂O/DMF 1:3. La evaporación lenta de esta disolución dio lugar a cristales incoloros.

Complejo de Zn derivado CIII :

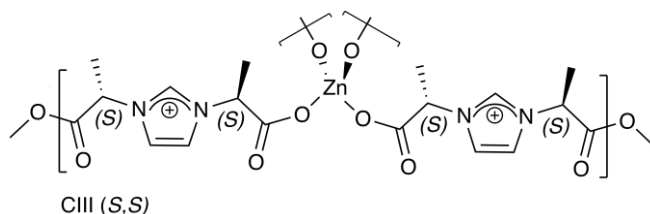


Figura 13: estructura química del complejo CIII .

Este complejo (**Figura 13**) se preparó siguiendo el siguiente método experimental. En una disolución de LIII (**Tabla 1**) (0.2122 g, 1 mmol) con una mezcla 3 : 1 de EtOH/H₂O se añadió una disolución de acetato de zinc (II) dihidrato (0.1098 g, 0.5 mmol) en EtOH. La mezcla resultante se mantuvo en agitación a 70 °C durante 1 hora. A continuación, se obtuvo por filtración un sólido blanco amarillento, que se lavó con EtOH y Et₂O y posteriormente se secó. La cristalización a partir de una mezcla de H₂O/DMF 1:3 dio como resultado unos cristales incoloros.

Complejo de Zn derivado CIV:

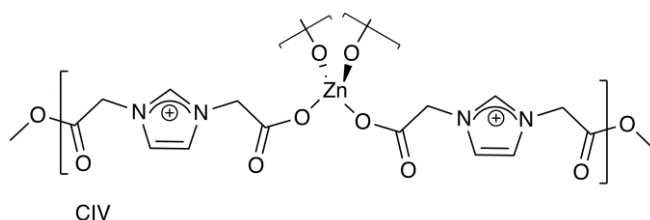


Figura 14: estructura química del complejo CIV

El procedimiento experimental utilizado para la síntesis del CIV (**Figura 14**) fue el siguiente: se disolvieron 0.0916 g (0.5 mmol) de LIV (**Tabla 1**) y 0.0549 g (0.25 mmol) de Zn(AcO)₂ en una mezcla 3:1 de EtOH/H₂O. Posteriormente se calentó a 60°C durante 1 hora y se filtró el sólido resultante. Se recrystalizó en una mezcla 1:3 de H₂O/DMF. Se obtuvieron de esta forma cristales transparentes del compuesto.

3.2.2 Complejo de carbeno-paladio CV :

La síntesis y estructura de este compuesto se muestra en la **Figura 15**.

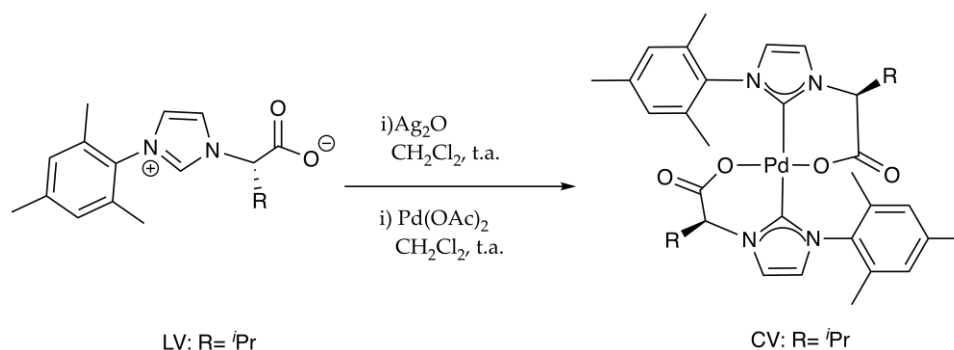


Figura 15: Síntesis del compuesto CV a partir de su precursor LV.

El complejo de carbeno-paladio CV de nueva síntesis (**Figura 15**), se preparó según la metodología publicada en la bibliografía (Jahier-Diallo et al. 2015, Tarrieu et al. 2017 y Thongpaen et al. 2018): 0,140 g, 0,5 mmol de imidazol derivado LV y 0,110g, 0,5 mmol de Ag₂O en 4 ml de CH₂Cl₂ seco. La disolución resultante se filtró, y posteriormente se le añadió una disolución de 0,56 g, 0,25 mmol de Pd(Ac)₂ en 2 ml de CH₂Cl₂ y a continuación se agitó durante 18 h bajo una atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. La disolución resultante se filtró y después se añadió 1 ml de Et₂O. Finalmente se enfrió a -20 °C, obteniendo el complejo CV como un sólido microcristalino de color marrón claro.

3.2.3 Complejos de carbeno-plata:

La síntesis y estructura de estos compuestos se muestra en la **Figura 16** y **Tabla 2**.

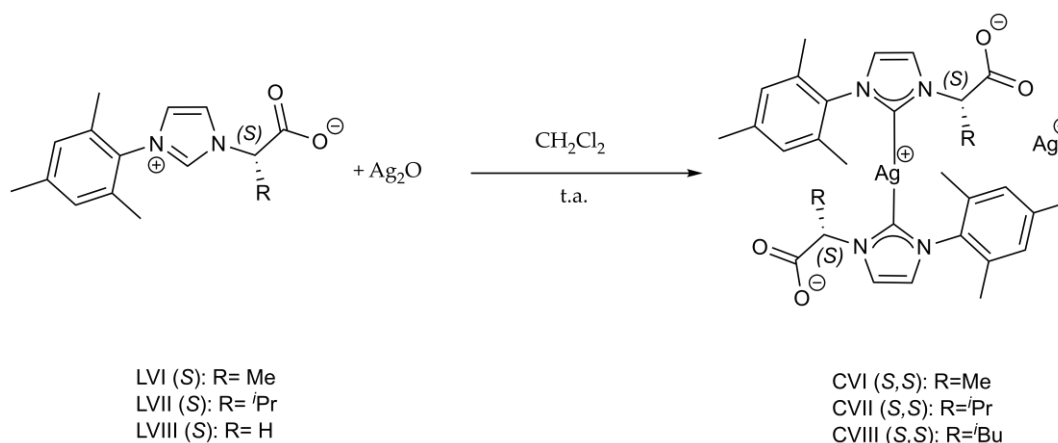
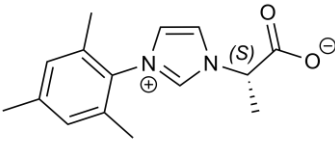
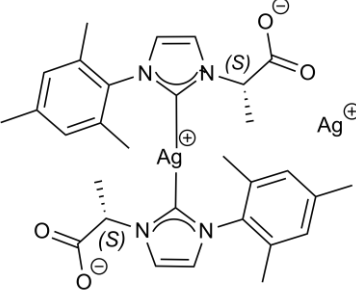
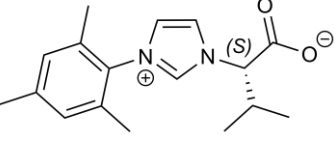
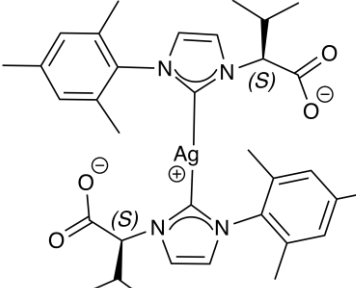
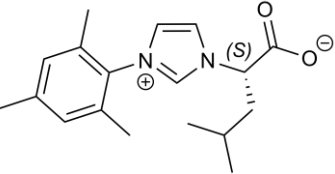
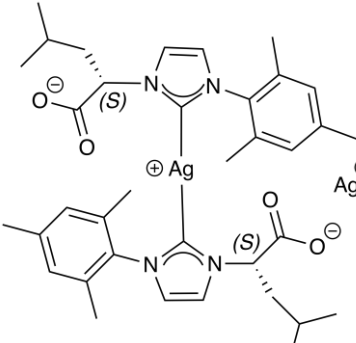


Figura 16: Síntesis de los compuestos CVI (R=Me), CVII (R= *i*Pr) y CVIII (R= *i*Bu) a partir de los ligandos LVI (R=Me), LVII (R=*i*Pr) y LVIII (R=*i*Bu).

Tabla 2: Relación de ligandos (precursores) utilizados en la síntesis de los complejos de Ag y sus correspondientes productos finales.

Nombre del ligando (precursor)	Producto final
 <p>LVI (S)</p> <p>LVI (S)</p>	 <p>CVI (S,S)</p> <p>CVI (S,S)</p>
 <p>LV (S)</p> <p>LV (S)</p>	 <p>CVII (S,S)</p> <p>CVII (S,S)</p>
 <p>LVII (S)</p> <p>LVII (S)</p>	 <p>CVIII (S,S)</p> <p>CVIII (S,S)</p>

Todos los procesos se realizaron bajo condiciones anaeróbicas y anhidras. Los disolventes se purificaron antes de su uso, utilizando los procedimientos estándar adecuados. Los ligandos LVI, LV y LVII (**Tabla 2**) se prepararon según la literatura publicada (Thongpaen *et al.* 2018). Estos ligandos del tipo carbenos derivados de N-

heterociclos, han sido desarrollados para su aplicación en catálisis (Thongpaen *et al.* 2018, Kühn *et al.* 2010, Carrasco *et al.* 2018).

- **Complejo carbeno-plata CVI :**

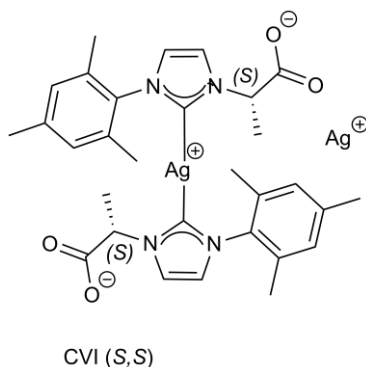


Figura 17: estructura química del complejo CVI

Este complejo se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito por Thongpaen *et al.* en 2018: el LVI (**Tabla 2**) (0.129 g, 0.5 mmol) se mezcló con Ag₂O (0.110 g, 0.5 mmol), suspendido en CH₂Cl₂ seco (4 mL) y se mantuvo en agitación durante 18 h en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. La solución restante se filtró y después se le añadió Et₂O (1 mL). El enfriamiento a -20°C dio como resultado el compuesto CVI como un sólido marrón microcristalino (**Figura 17**).

- **Complejo de plata CVII :**

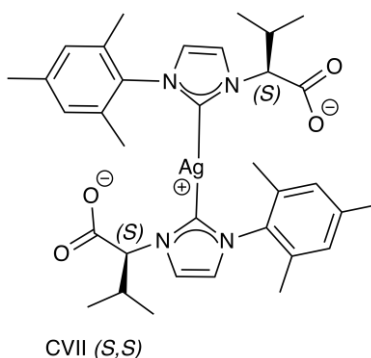


Figura 18: estructura química del complejo CVII

Este complejo, al igual que en el caso anterior, se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito por Thongpaen *et al.* 2018: el LV (**Tabla 2**) (0.140 g, 0.5 mmol) se mezcló con Ag₂O (0.110 g, 0.5 mmol), suspendido en CH₂Cl₂ seco (4 mL) y se mantuvo en agitación durante 18 h en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. La solución restante se filtró y después se le añadió Et₂O (1 mL). El enfriamiento a -20 °C dio como resultado el complejo CVII como un sólido marrón microcristalino (**Figura 18**).

- **Complejo de plata CVIII:**

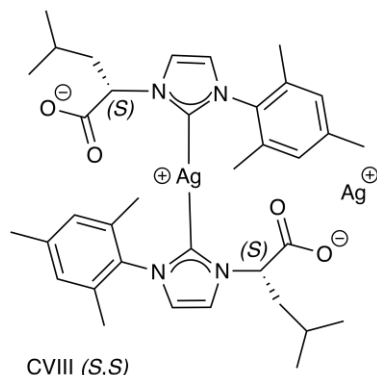


Figura 19: estructura química del complejo CVIII

Este complejo (**Figura 19**), al igual que en el caso anterior, se preparó siguiendo el procedimiento experimental descrito por Thongpaen *et al.* en 2018: el LVII (**Tabla 2**) (0.151 g, 0.5 mmol) se mezcló con Ag_2O (0.110 g, 0.5 mmol), suspendido en CH_2Cl_2 seco (4 mL) y se mantuvo en agitación durante 18 h en atmósfera de N_2 a temperatura ambiente. La solución restante se filtró y después se le añadió Et_2O (1 mL).

3.2.4 Dicarboxilatos de plata de nueva síntesis.

Las **Tabla 3** muestra los dos compuestos enantiómeros sintetizados y su estructura química, así como la de su ligando de partida. Asimismo, las **Figuras 20 y 21** muestran su proceso de síntesis. Los ligandos se prepararon según la literatura publicada (O. Köhl *et al.* 2010).

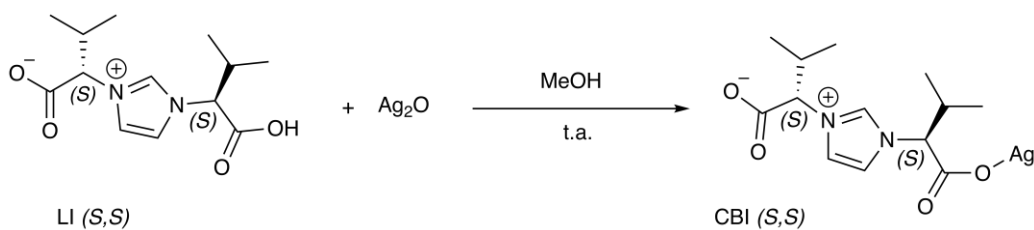


Figura 20: proceso de síntesis del complejo CBI a partir de su precursor LI

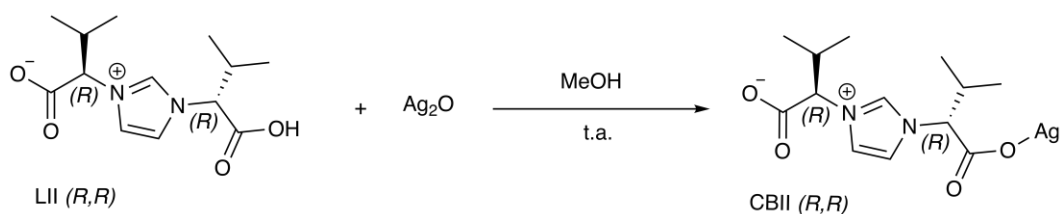


Figura 21: proceso de síntesis del complejo CBII a partir del ligando LII.

Tabla 3: relación de ligandos y productos finales (carboxilatos) sintetizados.

Ligando	Producto final
<p style="text-align: center;">LI (S,S)</p>	<p style="text-align: center;">CBI (S,S)</p>
<p style="text-align: center;">LII (R,R)</p>	<p style="text-align: center;">CBII (R,R)</p>

La síntesis *de novo* de ambos compuestos, en la que participamos en el diseño, (**Figuras 20 y 21**) fue llevada a cabo por el equipo liderado por el profesor Francisco J. Montilla Ramos, del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la US.

A una solución de LI (**Tabla 2**) (0.268 g, 1.00 mmol) en MeOH (10 mL) se le añadió Ag_2O (0.116 g, 0.50 mmol). La mezcla se mantuvo bajo agitación durante 16 h a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Después, la mezcla se filtró y el sólido resultante se disolvió en agua. Se realizó la evaporación lenta a temperatura ambiente en una caja oscura para evitar la descomposición por fotólisis, resultando en la formación de cristales incoloros del compuesto CBI (**Tabla 4**). Asimismo, se siguió el mismo procedimiento a partir de LII (**Tabla 2**) para sintetizar el compuesto CBII (**Tabla 2**).

IR (cm⁻¹): 3127 (m), 3080 (m), 2964 (m), 1620 (vs), 1595 (vs), 1546 (s), 1471 (m), 1462 (m), 1371 (vs), 1352 (s), 1260 (s), 1238 (s), 1159 (s), 1123 (w), 1105 (w), 1028 (w), 959 (w), 933 (w), 919 (w), 844 (w), 813 (m), 776 (s), 748 (s), 723 (s), 704(m), 636 (m), 475 (w), 449 (w).

¹H NMR (D₂O, 300 Hz): δ 0.78 (d, ³J_{HH} = 7 Hz, 6H, CHCH₃), 0.89 (d, ³J_{HH} = 7 Hz, 6H, CHCH₃), 2.39 (o, ³J_{HH} = 7 Hz, 2H, CHCH₃), 4.52 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 2H, CHCHCH₃), 7.51 (s, 2H, CH, H⁴/H⁵), 8.89 (s, 1H, CH, H²). ¹³C NMR (D₂O, 75.47 Hz): δ 17.5 (s, CHCH₃), 18.6 (s, CHCH₃), 31.1 (s, CHCH₃), 71.5 (s, CHCHCH₃), 121.9 (s, CH, C⁴/C⁵), 135.7 (s, CH, C²), 173.8 (s, COO). [α]_D²⁵ = +128° (H₂O).

Análisis elemental: se obtiene 41.62% C; 5.10 % H; 7.47% N. Estos resultados coinciden con los valores esperados teóricamente: 41.30 % C; 5.02 % H; y 7.51 % N.

El compuesto CBII presentó unos espectros IR y ¹H y ¹³C RMN idénticos a su enantiómero CBI [α]_D²⁵ = -100° (H₂O).

Análisis elemental: se obtiene 41.62% C; 5.10 % H; 7.47% N. Estos resultados coinciden en alto grado con los valores esperados teóricamente: 41.14 % C; 5.05 % H; y 7.46 % N.

3.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Como bacterias Gram positivas, se utilizaron dos especies de estafilococos: *Staphylococcus pseudintermedius* LMG 22219, obtenida de la Colección Belga de Microorganismos Tipo y *Staphylococcus aureus* CECT 5190 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia). Asimismo, como bacterias Gram negativas se han utilizado *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de la colección Española de Cultivos Tipo con números de registro CECT 434 y CECT 110 respectivamente. Todas las cepas se sembraron en placa de agar triptona soja (TSA) para la obtención de colonias individuales. Para su conservación, a partir de estas colonias se prepararon cultivos líquidos en caldo triptona soja (TSB), añadiendo posteriormente glicerol hasta alcanzar una concentración del 15% (v:v) para su conservación en congelación a -76°C.

3.4 Estudios microbiológicos

3.4.1 Ensayos de sensibilidad de los ligandos de los compuestos.

Se realizaron ensayos de susceptibilidad en placa de micropocillos para los ligandos de partida tanto de los precursores de los carbenos como de los carboxilatos, a base de los aminoácidos alanina, valina y leucina. El objetivo del ensayo es comprobar si estos compuestos tienen efecto antimicrobiano *per se* antes de obtener los complejos metálicos. Para ello se realizó la técnica de microdilución en caldo (CLSI, 2012), partiendo de una concentración de 5Mm hasta una concentración de 0,0097 mM en una

dilución seriada a la mitad. Los pocillos se inocularon con 5 µl de cultivo líquido y se incubaron 24 h (Gram negativas) o 48 horas (Gram positivas). Tras esto, se realizó una valoración cuantitativa midiendo la absorbancia a 600 nm de longitud de onda utilizando un lector de placas de microtitulación ASYS UVM340. Como cepas modelo se utilizaron *Staphylococcus aureus* para Gram positivas y *Pseudomonas aeruginosa* para Gram negativas.

3.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La determinación de la CMI se realizó utilizando el mismo método ya expuesto en el anterior capítulo de la presente tesis doctoral, mediante la técnica de microdilución en caldo (CLSI, 2012). Comenzamos con una concentración de 5 mM de los compuestos, que se fue diluyendo con medio TSB hasta alcanzar una concentración de 0,0097 mM. Se dispusieron de la siguiente manera:

Columna 1	Control positivo con TSB
Columna 2	Control con disolvente: TSB + cantidad máxima de disolvente utilizada en el ensayo
Columna 3	0,0097 mM
Columna 4	0,0195 mM
Columna 5	0,039 mM
Columna 6	0,078 mM
Columna 7	0,156 mM
Columna 8	0,3125 mM
Columna 9	0,625 mM
Columna 10	1,25 mM
Columna 11	2,5 mM
Columna 12	5 mM

La primera fila de la placa corresponde al control negativo, el cual no se inocula. Las tres filas siguientes corresponden al ensayo de una cepa bacteriana, de la que se realizó un triplicado, seguidas de una fila en blanco. Las tres siguientes corresponden a otra cepa bacteriana también en triplicado (**Figura 22**). El resto de pocillos se inoculó con 5µl de cultivo líquido de cada cepa. Tras esta inoculación, la placa se incubó a 37°C durante 24 horas en el caso de las cepas Gram negativas y 48 horas en el caso de las Gram positivas. Se realizó una valoración cualitativa de turbidez. Tras esto, se realizó una valoración cuantitativa midiendo la absorbancia a 600 nm. Como cepas Gram positivas se testaron *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus*. Como Gram negativas fueron *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

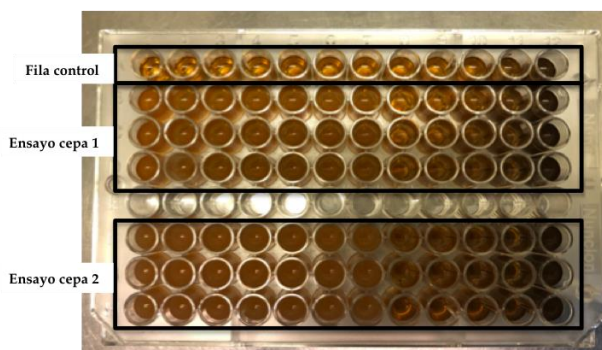


Figura 22: Placa de microtitulación conteniendo concentraciones crecientes del compuesto a testar para la determinación de la CMI. La primera fila es la fila control (sin inocular). Las tres filas siguientes corresponden al ensayo por triplicado de la primera cepa mientras que las tres filas siguientes para el ensayo de la segunda cepa. La concentración del compuesto incrementa en cada fila de izquierda a derecha de forma logarítmica.

3.4.3 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Del mismo modo, para la determinación de la CMB se realizó la misma técnica de siembra en placa expuesta en el capítulo anterior. Las cepas Gram positivas se incubaron a 37°C durante 48 horas mientras que las Gram negativas se incubaron durante 24 horas.

3.4.4 Ensayos de sensibilidad bacteriana al AgNO₃

Se realizaron estudios de sensibilidad de las cepas estudiadas frente al compuesto AgNO₃, compuesto ampliamente estudiado y utilizado por sus propiedades antimicrobianas. Se utilizaron las técnicas de determinación de concentraciones mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) explicadas en el anterior capítulo y a continuación.

3.4.5 Efecto sobre la formación de biofilm bacteriano: método de George O'Toole

El propósito del siguiente experimento es el de determinar la variación de la formación de biofilm por parte de las bacterias ante la presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos de plata ensayados. La determinación se llevó a cabo mediante la técnica de George O'Toole (**Figura 23**) (O'Toole, 2011) ya expuesta en el capítulo anterior.

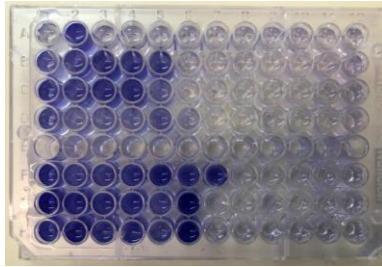


Figura 23: Placa de micropocillos para la evaluación de la formación de biofilm mediante la Técnica de George O'Toole.

3.4.6 Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

El objetivo del ensayo es el de la valoración visual mediante microscopía electrónica del efecto de los compuestos sobre el crecimiento bacteriano y sobre la formación del biofilm. Para ello, se utilizó una placa de 6 pocillos en la que se cultivaron las bacterias sobre unos portaobjetos circulares de cristal de 1 cm de diámetro colocados en el fondo de los pocillos, como se ha indicado en el capítulo primero de la presente tesis doctoral, siguiendo el esquema mostrado a continuación (**Figura 24**).

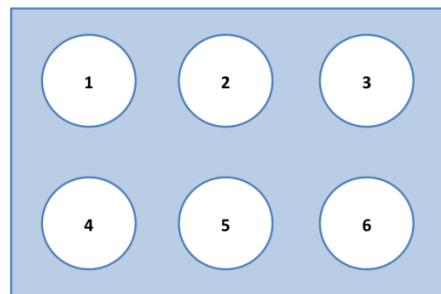


Figura 24. Esquema de la placa de 6 pocillos utilizada para la formación de biofilms en presencia de los diferentes carbenos de plata. 1. Control *E. coli*; 2. CMI *E. coli*; 3. CMB *E.coli*; 4. Control *Pseudomonas aeruginosa* ; 5. CMI *Pseudomonas aeruginosa*; 6. CMB *Pseudomonas aeruginosa*.

3.4.7 Determinación de enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARs).

La determinación de estas enzimas (catalasa, peroxidasas totales y superóxido dismutasa) y TBARs permitirá indagar en el mecanismo de acción de los compuestos ensayados, si inducen un proceso de estrés oxidativo o de peroxidación de los lípidos de membrana en las distintas cepas bacterianas.

Como se ha mencionado con anterioridad, las enzimas antioxidantes ejercen una acción protectora sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que un aumento de la actividad de estas enzimas indicará que se ha provocado un proceso de estrés oxidativo (Videla & Fernandez, 1988; Sies, 1997). Asimismo, las TBARs, en concreto el

malondialdehído o MDA es un producto generado en el proceso de peroxidación de los lípidos de membrana, siendo un indicador de este proceso (Hong et al., 2012).

La metodología utilizada es la ya descrita en el primer capítulo de esta tesis doctoral. Las cepas bacterianas se cultivaron en medio TSB durante 24 horas a 37°C y a 200 rpm. Tras esto, cada cultivo se separó en alícuotas de 10 ml cada una, la primera correspondiente al control positivo (sólo con medio TSB) y las otras correspondientes a concentraciones de CMI y CMB de cada compuesto ensayado. Tras añadir los compuestos, se vuelven a incubar otras 24 horas a 37°C y 200 rpm. Una vez finalizado el período de incubación, cada alícuota se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y cada pellet bacteriano se resuspendió en 2,5 ml de tampón de extracción (fosfato potásico 50 mM pH 7.0 conteniendo EDTA 2 mM). A continuación, cada suspensión se sometió a sonicación durante 3 períodos de 30 segundos, separados por períodos de 1 minuto, utilizando un sonicador Ultrasonic Processor (Hielscher) con una amplitud del 100% y con intensidad de 0,8, con ciclos de 30 segundos de sonicación separados por 30 segundos de descanso para evitar el calentamiento excesivo del lisado y la inactivación de las actividades enzimáticas. Todo este procedimiento se realizó con los tubos colocados en un baño de hielo, para evitar así alcanzar altas temperaturas que puedan alterar el proceso. A continuación, para separar los restos celulares de membranas, las suspensiones previamente sometidas a sonicación se centrifugaron en tubos eppendorfs a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante de cada tubo se traspasó a tubos limpios para realizar la determinaciones enzimáticas.

Catalasa (CAT):

Para su medición, se utilizaron cubetas de cuarzo que contenían 800 µl de tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 7.6) y 0.1 mM EDTA y 100 µL de H₂O₂ al 15%. Para iniciar la reacción se añadió 100 µL de extracto crudo, registrando el decrecimiento de los valores de absorbancia a 240 nm durante 2 minutos. Una unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 micromol de H₂O₂ en un minuto.

Peroxidasas totales:

Para su medición a 420 nm se utilizaron cubetas de espectrofotometría de 3ml que contenían un volumen final de 2 ml compuesto de: 1,5 ml de tampón fosfato potásico a 10 mM y pH 6,0, 0,1 ml de pirogalol a 0,4 M recién preparado y de 0,1 a 0,2 ml de extracto crudo. La reacción se desencadenó añadiendo 0,15 ml de H₂O₂ al 0,3% (v:v) recién preparada. Una unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 micromol de pirogalol en un minuto.

Superóxido dismutasa (SOD):

Se partió de una solución stock de 30 ml compuesta por 27,5 ml de tampón fosfato potásico a pH 7,6, 1 ml de EDTA a 0,2 M, 1 ml de NBT recién preparado a 1,5 mM y 0,5 ml de Triton X-100. En cada cubeta de espectrofotometría se vertieron 2,88 ml de dicha solución stock y 20 µl de extracto crudo. Como control, para obtener la

fotorreducción basal del NBT, se utilizó una cubeta sin extracto crudo. Para desencadenar la reacción, se añadió a cada cubeta 0,1 ml de riboflavina y a continuación se expusieron a luz blanca (fluorescentes comerciales) durante 5 minutos, tras lo cual se realizaron las mediciones a 560 nm. Una unidad de actividad SOD se considera a la cantidad de extracto crudo necesaria para inhibir el 50% de la fotorreducción del NBT.

Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):

Para su determinación las cepas se cultivaron como se ha descrito con anterioridad en el caso de las actividades enzimáticas. Tras esto, se centrifugaron y desechó el sobrenadante. Los pellets bacterianos se disolvieron en 3 ml de una mezcla de ácido tricloroacético (TCA) al 20% con un 0,5 % de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ong et al., 2017). A continuación, las disoluciones se calentaron en un baño de agua a 95°C durante 30 minutos. Para detener la reacción, los tubos se enfriaron el hielo durante 30 segundos. Tras esto, se someten a centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se recolectó el sobrenadante y se determinó la absorbancia a 532 nm.

Cálculo de proteínas de los extractos.

Todas las actividades enzimáticas, así como el MDA están expresadas en función de la concentración de proteína del extracto crudo. Para ello, se realizaron las mediciones de dichos extractos utilizando el método de Bradford (1976) de acuerdo con una curva de calibrado realizada con albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma) como control.

4 Estudio estadístico

Los experimentos realizados en el presente estudio se llevaron a cabo asegurándose de que los datos obtenidos fuesen estadísticamente representativos. Tanto la determinación de la CMI como la CMB se realizaron por triplicado. Asimismo, las actividades enzimáticas y MDA se muestran como las medias obtenidas \pm las desviaciones estándar de las determinaciones en dos cultivos independientes. Finalmente, las determinaciones de la formación de biofilm por la técnica de George O'Toole también se realizaron por triplicado y los datos han sido expresados teniendo en cuenta sus correspondientes desviaciones estándar.

En las comparaciones de los efectos de los compuestos sobre diferentes variables se ha aplicado el test Student y las diferencias significativas de $p < 0.05$ han sido indicadas en las tablas y figuras. Este tipo de test o análisis estadístico se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal, que es una de las distribuciones de probabilidad de variable continua que con más frecuencia aparece en estadística y en la teoría de probabilidades, pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el número muestral en el que está basado esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación estándar en lugar del valor real. Su aplicación nos ha permitido cerciorarnos de que los resultados obtenidos son fiables y de poder evidenciar las diferencias estadísticamente significativas.

5 Resultados

5.1 Ensayo de toxicidad de disolventes orgánicos

La siguiente tabla (Tabla 4) muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano con respecto al control que experimentaron las dos cepas bacterianas en presencia de los disolventes a las tres concentraciones ensayadas.

Tabla 4: % inhibición de crecimiento bacteriano de *S. pseudintermedius* y *P. aeruginosa* en presencia de las diferentes concentraciones de disolventes.

Dilución	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (% inhibición)					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (% inhibición)				
	TBME	DCM	DMF	DMSO	THF	TBME	DCM	DMF	DMSO	THF
1:1000	0	15,8	48,4	0	0	0	56,2	0	11,7	8,6
1:100	17	59,6	50,5	0	47,9	6,25	51,6	0	26,6	39
1:10	70,3	79,4	73	72,1	78,8	85,2	63,3	65,5	39	64

Pudimos observar que, a una dilución de 1:10 se produjo una notoria inhibición del crecimiento bacteriano en ambas cepas, siendo por encima del 70 % excepto en el caso del DMSO en *P. aeruginosa*. A una concentración de 1:100 la toxicidad disminuye muy notoriamente en algunos casos, destacando el TBME y el DMSO en el caso de *S. pseudintermedius* y DMF y TBME en *P. aeruginosa*. Finalmente, a una concentración de 1:1000 la toxicidad es muy baja o inexistente en todos los disolventes excepto el DMF en el caso de *P. pseudintermedius*, y de DCM en *P. aeruginosa*.

5.2 Síntesis y caracterización de los complejos

Se llevaron a cabo las síntesis de los distintos compuestos objetivo, propuestos previamente en este capítulo, con objeto de testarlos como posibles antibacterianos, basándonos en similitudes estructurales con otros compuestos que habían mostrado este efecto terapéutico.

Los complejos de Zn denominados CI, CII, CIII y CIV (Tabla 5) se obtuvieron siguiendo los procedimientos basados en la metodología Debus-Radziszewski descrita en la bibliografía por Nicassio et al. Así, para la síntesis de los compuestos de Zn se emplearon como producto de partida los ligandos LI, LII, LIII y LIV (Tabla 5) en presencia de $Zn(AcO)_2$.

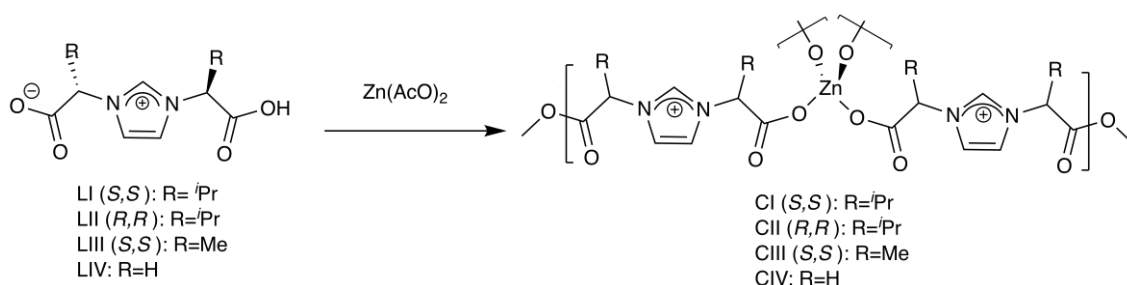
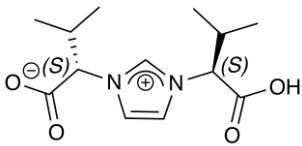
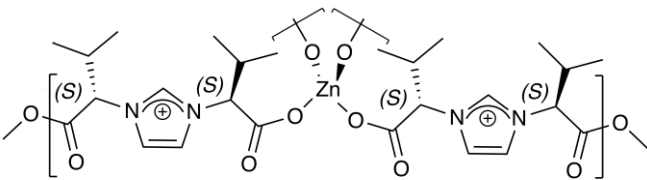
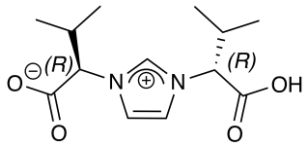
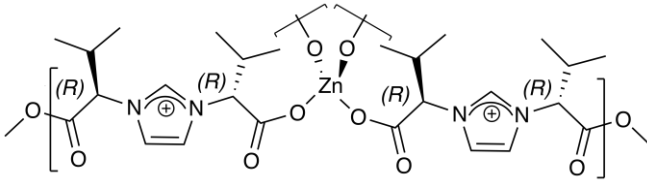
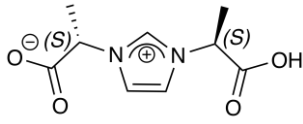
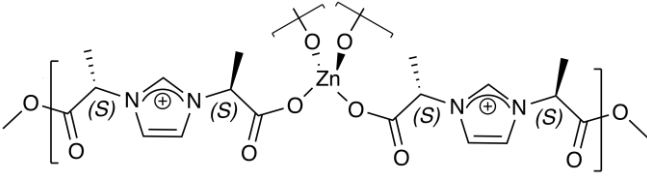

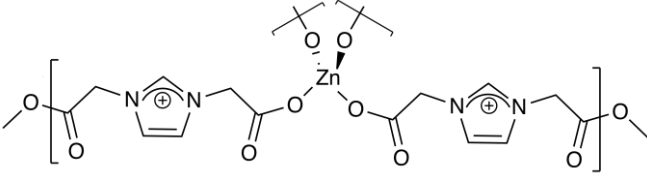


Figura 25: proceso de síntesis de los complejos de Zn

Tabla 5: relación de ligandos y sus correspondientes productos finales.

Ligando (precursor)	Producto final
 <p>LI (S,S)</p> <p>LI (S,S)</p>	 <p>C1 (S,S)</p> <p>C1 (S,S)</p>
 <p>LII (R,R)</p> <p>LII (R,R)</p>	 <p>CII (R,R)</p> <p>CII (R,R)</p>
 <p>LIII (S,S)</p> <p>LIII (S,S)</p>	 <p>CIII (S,S)</p> <p>CIII (S,S)</p>
 <p>LIV</p> <p>LIV</p>	 <p>CIV</p> <p>CIV</p>

Complejo de Zn CI :

En el procedimiento de síntesis se obtuvieron cristales incoloros con un rendimiento del 31% (0,960 g). Los datos experimentales de este complejo corresponden con los ya descritos en la bibliografía por Nicasio et al. 2017.

Complejo de Zn CII :

Al igual que en el complejo anterior, su enantiómero, la síntesis dio lugar a cristales incoloros con un rendimiento del 31% (0,960 g). Asimismo, los datos experimentales se corresponden con los ya descritos en la bibliografía por Nicasio et al. 2017.

Complejo de Zn CIII :

La cristalización dio como resultado unos cristales incoloros (0,145 g) con un 59% de rendimiento. Los datos experimentales obtenidos corresponden con los ya descritos en la bibliografía (Nicasio et al. 2017).

Complejo de Zn CIV :

En el proceso de síntesis se obtuvieron 92 mg de cristales incoloros del compuesto, lo que supone un rendimiento del 86%. Al igual que en casos anteriores, los datos experimentales de este compuesto corresponden con los ya descritos en la bibliografía (Nicasio et al. 2017).

En paralelo, se prepararon los correspondientes complejos de plata CVI, CVII y CVIII a partir de los ligandos LIV, LV, y LVII (**Tabla 6**) mediante una reacción con Ag_2O de una manera eficiente (**Figura 26**).

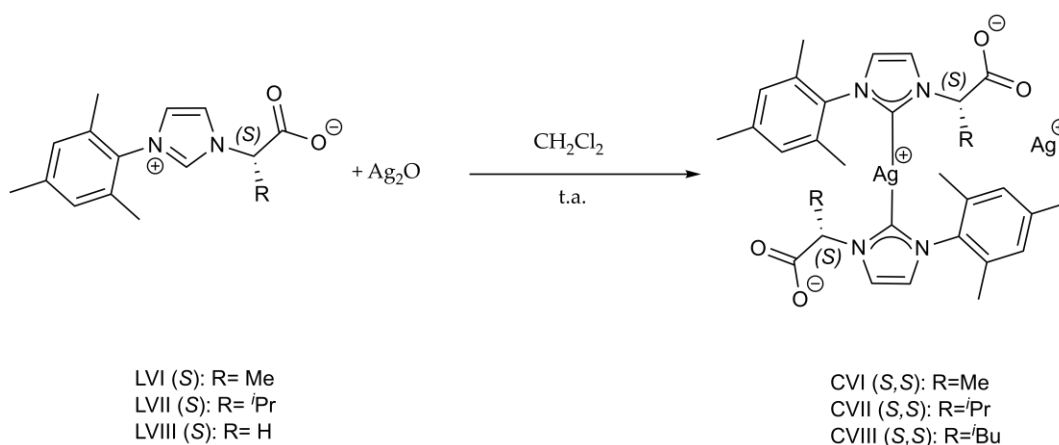
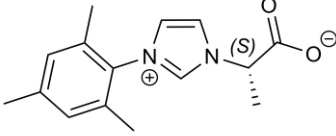
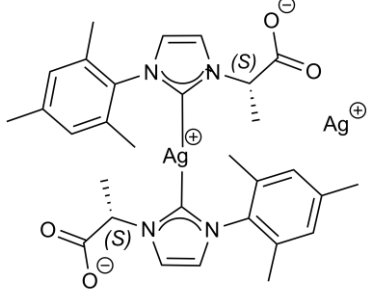
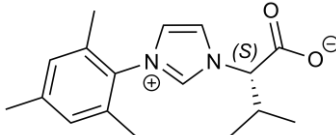
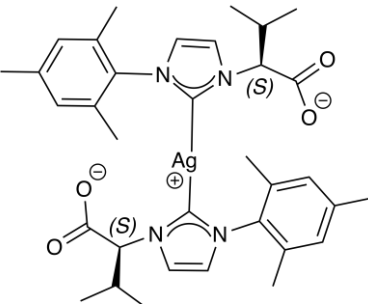
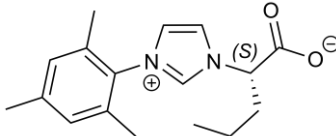
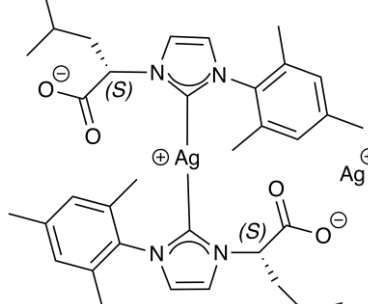


Figura 26: Síntesis de los compuestos CVI (R=Me) , CVII (R= ⁱPr) y CVIII (R=H) a partir de los ligandos LVI (alanina, R=Me), LV (valina, R= ⁱPr) y LVII (leucina, R=ⁱBu).

Tabla 6: relación de ligandos utilizados en la síntesis de los complejos de Ag y sus correspondientes productos finales

Nombre del ligando (precursor)	Producto final
 <p>LVI (S)</p> <p>LVI (S)</p>	 <p>CVI (S,S)</p> <p>CVI (S,S)</p>
 <p>LV (S)</p> <p>LV (S)</p>	 <p>CVII (S,S)</p> <p>CVII (S,S)</p>
 <p>LVII (S)</p> <p>LVII (S)</p>	 <p>CVIII (S,S)</p> <p>CVIII (S,S)</p>

Complejo de Ag CVI:

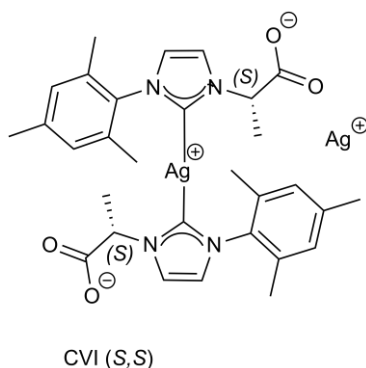


Figura 27: estructura química del complejo CVI.

El procedimiento de síntesis (**Figura 27**) dio lugar a un compuesto sólido marrón microcristalino con un rendimiento del 33% (0,102g, 0,16 mmol). Los datos experimentales de este complejo correspondieron con los ya descritos en la bibliografía por Thongpaen *et al.* 2018.

Complejo de Ag CVII:

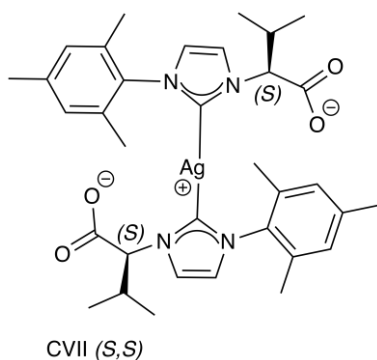


Figura 28: estructura química del complejo CVII.

En el caso del complejo CVII (**Figura 28**), sólido marrón microcristalino, el rendimiento obtenido fue del 30 % (0,098 g , 0,15 mmol). Al igual que en el caso anterior, los datos experimentales de este complejo correspondieron con los previamente descritos en la bibliografía por Thongpaen *et al.* 2018.

Complejo de Ag CVIII:

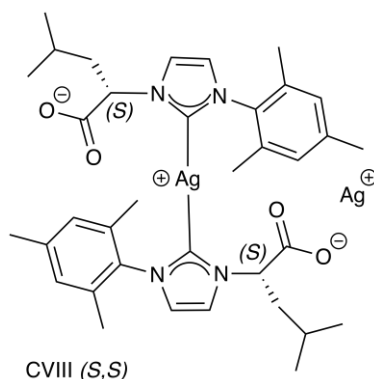


Figura 29: estructura química del complejo CVIII.

Finalmente, en el caso del complejo de Ag CVIII (**Figura 29**) también un sólido microcristalino de color marrón, se obtuvo un rendimiento del 50,866% (0,106 g (0,130 mmol)). De nuevo los datos experimentales de este complejo correspondieron con los ya descritos en la bibliografía por Thongpaen *et al.* 2018.

A continuación, se detallan los datos experimentales de los compuestos que no han sido descritos previamente en la bibliografía y que se sintetizaron en el grupo del profesor Francisco Montilla como parte de una colaboración, encuadrada dentro de la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral

El complejo de paladio CV se obtuvo siguiendo los procedimientos que se habían descrito en la bibliografía por Jahier-Diallo *et al.* 2015, Tarrieu *et al.* 2017 y Thongpaen *et al.* 2018. Así, para la síntesis de los compuestos de Pd se utilizó como producto de partida LV en presencia de Ag₂O y Pd(OAc)₂ como reactivos mediante una reacción de catálisis homogénea (**Figura 30**).

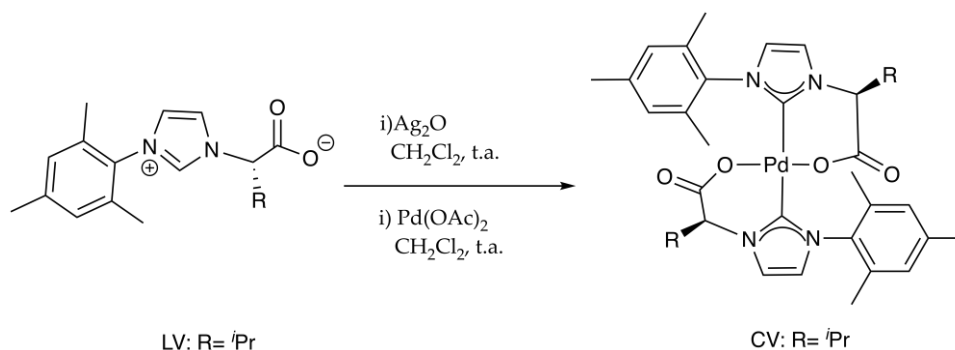
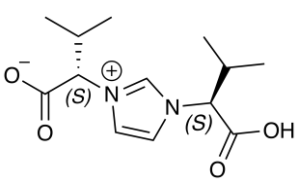
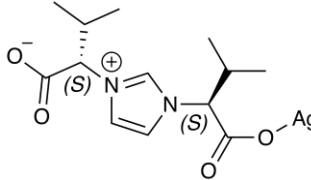
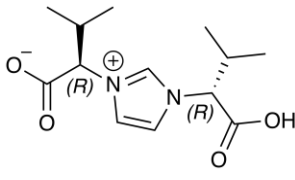
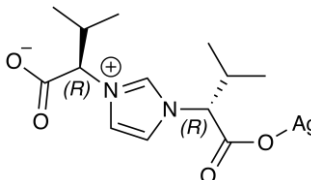


Figura 30: síntesis del complejo NHC-Pd

La síntesis del complejo de paladio CV dio como resultado un sólido microcristalino de color marrón claro con un rendimiento de 0,149 g (0,22 mmol, 88%).

Por otro lado, se prepararon los correspondientes carboxilatos CBI y CBII (Tabla 7) a partir de sus ligandos LI y LII (Tabla 7) mediante una reacción con Ag_2O de una manera eficiente. Las Figuras 31 y 32 muestran de nuevo el proceso de síntesis de ambos compuestos enantiómeros.

Tabla 7: relación de los ligandos y los productos finales (carboxilatos) sintetizados.

Ligando	Producto final
 <p>LI (S,S)</p>	 <p>CBI (S,S)</p>
 <p>LII (R,R)</p>	 <p>CBII (R,R)</p>

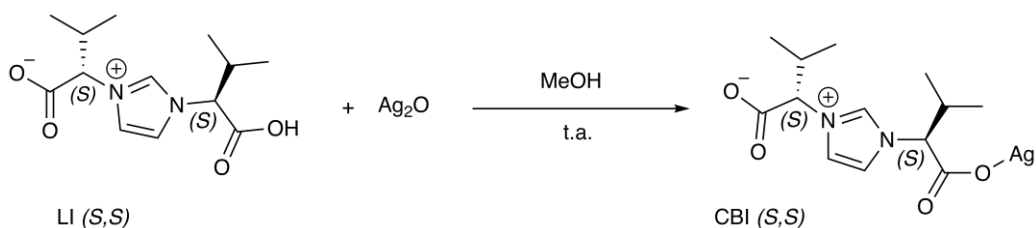


Figura 31: proceso de síntesis del complejo CBI a partir de sus precursor LI.

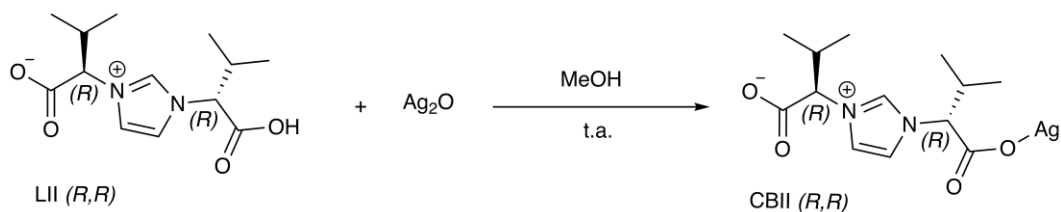


Figura 32: proceso de síntesis del complejo CBII a partir de su ligando LII.

Complejo CBI :

El proceso de síntesis dio como resultado la formación de cristales incoloros del compuesto CBI con un rendimiento del 43 % (0,160 g).

Complejo CBII :

Asimismo, siguiendo el mismo procedimiento a partir de LVIII se sintetizó el compuesto CBII en forma de cristales incoloros con un rendimiento del 30%.

En resumen, todos los compuestos fueron obtenidos en buenos rendimientos y en cantidades necesarias para llevar a cabo las repeticiones adecuadas de los experimentos de evaluación biológica de su potencial efecto farmacológico, sin observar en ninguno de los casos degradación en condiciones de almacenamiento habituales.

5.3 Estudios microbiológicos

5.3.1 Ensayos de los ligandos LI-LVII.

Ligando LV:

Como podemos observar en la **Figura 33**, los ensayos mostraron que no se evidenciaba una disminución de la turbidez y de la absorbancia de los cultivos en presencia del ligando LVI, por lo que se pudo confirmar que este compuesto no presentaba actividad antimicrobiana frente a las cepas testadas.

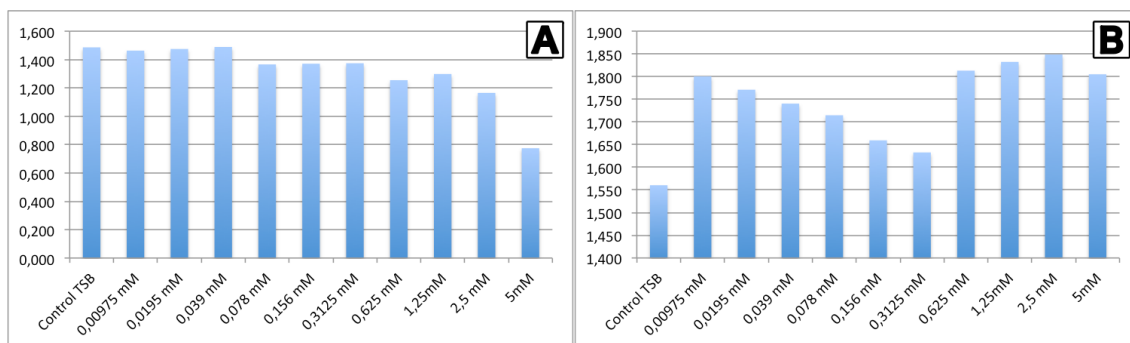


Figura 33: Gráficas de valores de absorbancia de los ensayos del ligando LV para Gram positivas (A) y Gram negativas (B).

Ligando LVI:

Al igual que en el caso anterior, la **Figura 34** muestra la ausencia de inhibición de crecimiento bacteriano por parte del LVI.

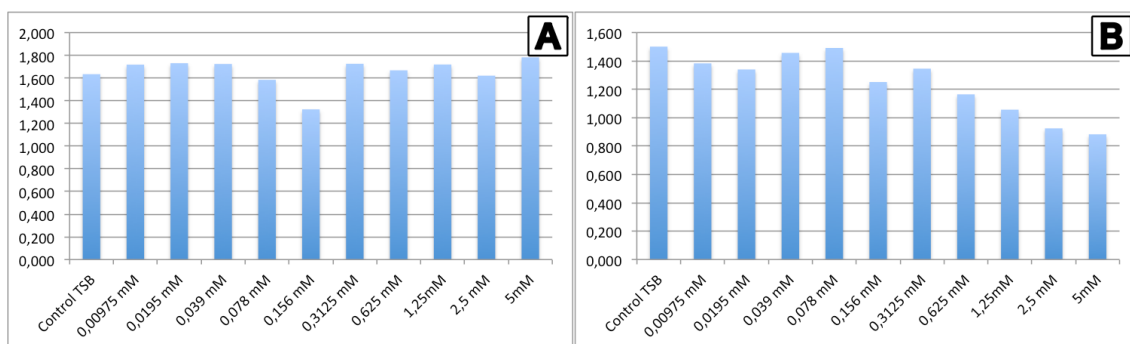


Figura 34: Gráficas de valores de absorbancia de los ensayos del ligando LVI para Gram positivas (A) y Gram negativas (B).

Ligando LVII:

Al igual que en los casos anteriores, los ensayos no evidenciaron inhibición alguna del crecimiento bacteriano tanto de cepas Gram positivas como de cepas Gram negativas (**Figura 35**).

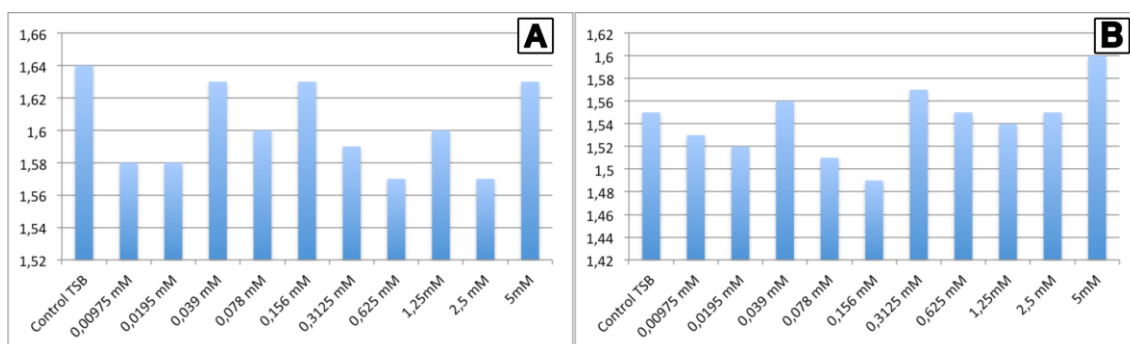


Figura 35: Gráficas de valores de absorbancia de los ensayos del ligando LVII para Gram positivas (A) y Gram negativas (B).

Ligando LI:

En este caso los experimentos frente a las cepas Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* no mostraron actividad antimicrobiana alguna por parte de este compuesto (**Figura 36 A y B**).

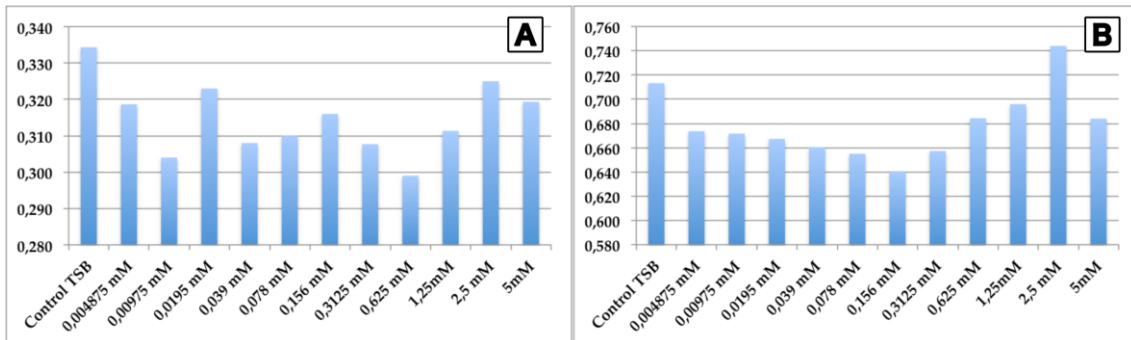


Figura 36: Gráficas de valores de absorbancia de los ensayos del ligando de alanina LI para *E.coli* (A) y *P. aeruginosa* (B).

Ligando LII:

Los ensayos mostraron los mismos resultados que para el ligando anterior, siendo inocuo para las cepas Gram negativas ensayadas (**Figura 37 A y B**).

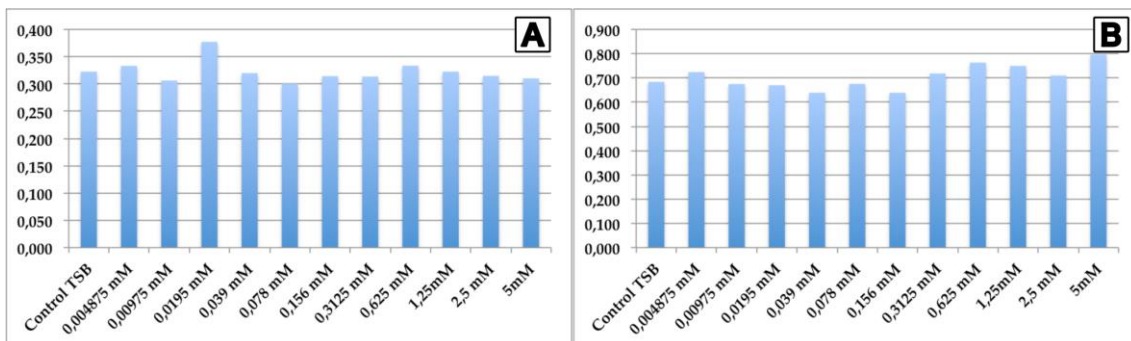


Figura 37: Gráficas de valores de absorbancia de los ensayos del ligando de alanina LII para *E.coli* (A) y *P. aeruginosa* (B)

5.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI):

Complejos de Zinc:

A continuación se detallan los resultados de los ensayos microbiológicos en las cepas Gram positivas *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* así como en las cepas Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* de los diferentes complejos de zinc.

Complejo de Zn CI:

Los resultados mostraron que tanto en los ensayos de las cepas Gram positivas (**Figura 38**) como en los de las cepas Gram negativas (**Figura 39**) no se evidenció una disminución muy significativa de los valores de absorbancia, hecho que concuerda con la valoración visual de los todos pocillos en los que se podía apreciar una turbidez marcada.

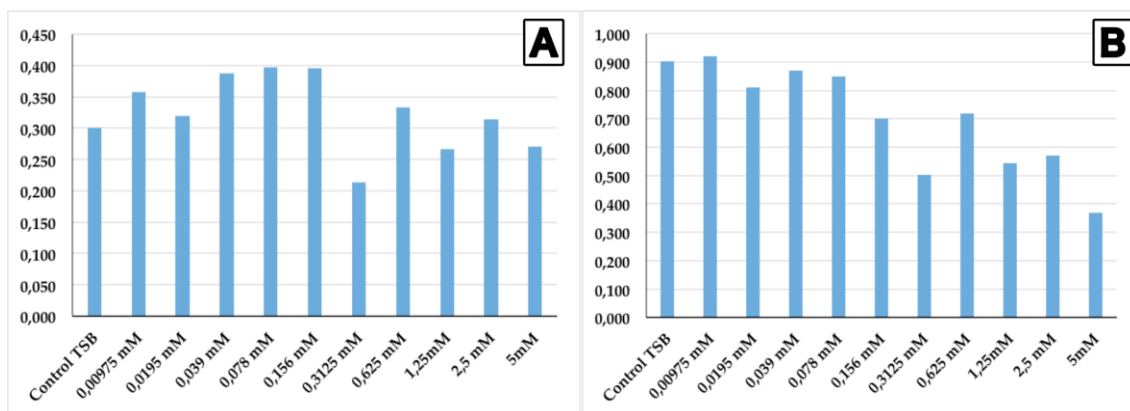


Figura 38: Valores de absorbancia de *Staphylococcus pseudintermedius* (A) y *Staphylococcus aureus* (B) en presencia de concentraciones crecientes de CI.

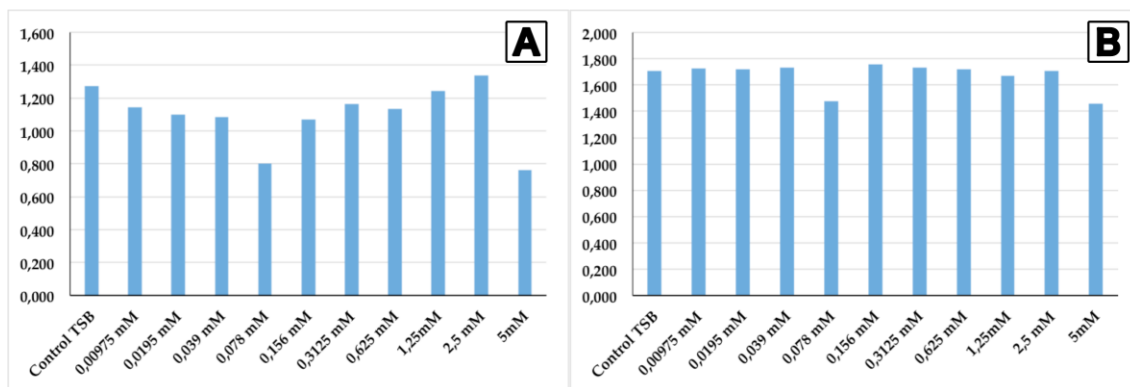


Figura 39: Valores de absorbancia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B) en presencia de concentraciones crecientes de CI.

Complejo de Zn CII :

En el caso del CII, al igual que en el caso anterior, no se produjo una disminución de los valores de absorbancia tanto en los ensayos con Gram positivas (**Figura 40**) como en los de Gram negativas (**Figura 41**).

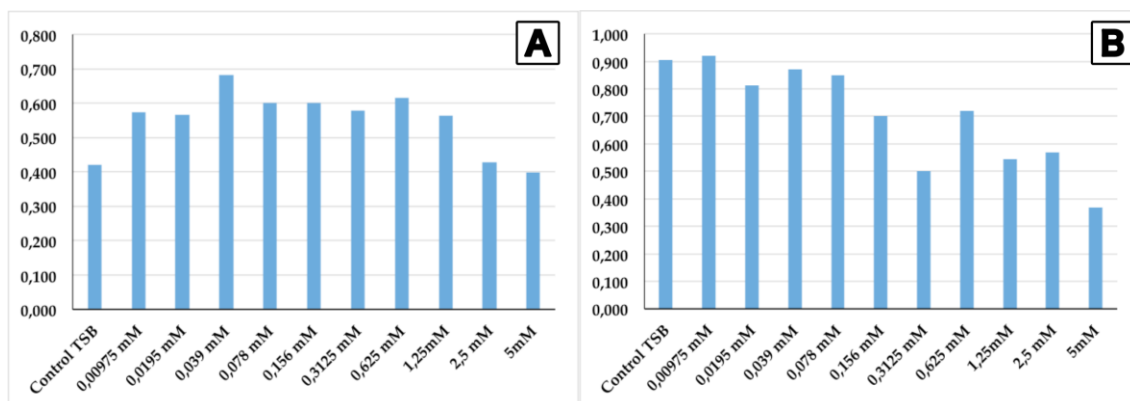


Figura 40: Valores de absorbancia de *Staphylococcus pseudintermedius* (A) y *Staphylococcus aureus* (B) en presencia de concentraciones crecientes de CII.

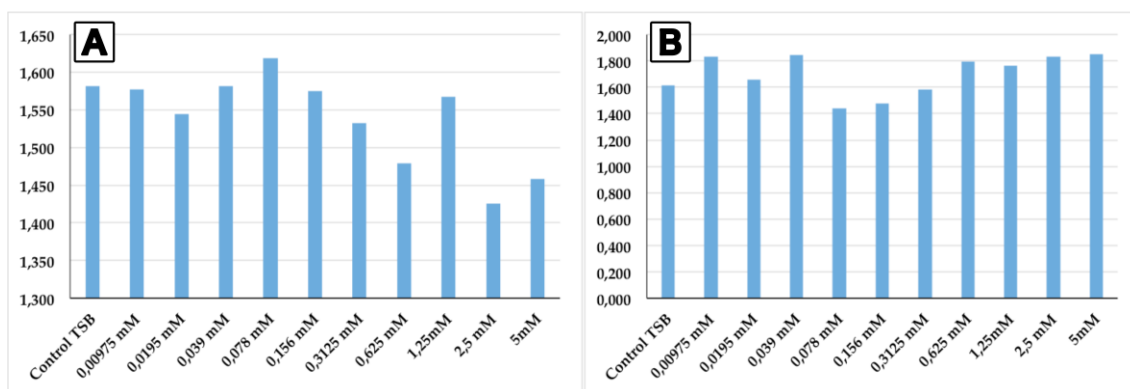


Figura 41: Valores de absorbancia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B) en presencia de concentraciones crecientes de CII.

Complejo de Zn CIII :

Los ensayos correspondientes al complejo CIII en bacterias Gram positivas (**Figura 42**) mostraron una disminución de la absorbancia a la mayor concentración ensayada de 5 mM. En el caso de Gram negativas (**Figura 43**) no se evidenció una disminución significativa de los valores de absorbancia.

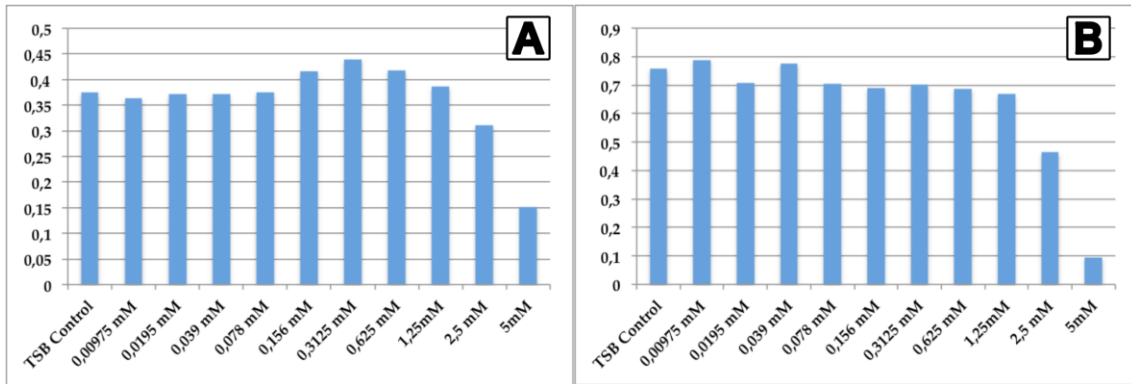


Figura 42: Valores de absorbancia de *Staphylococcus pseudintermedius* (A) y *Staphylococcus aureus* (B) en presencia de concentraciones crecientes de CIII.

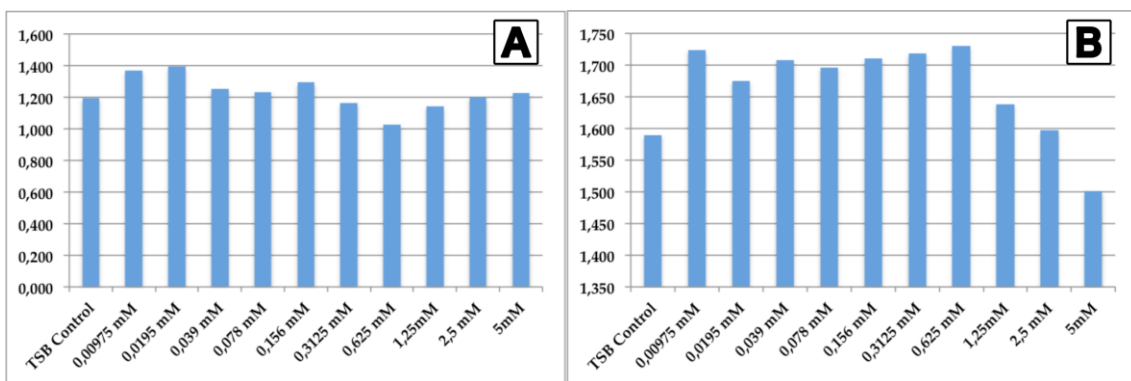


Figura 43: Valores de absorbancia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B) en presencia de concentraciones crecientes de CIII.

Complejo de Zn CIV:

Al igual que en casos anteriores, los ensayos correspondientes al complejo CIV tanto en cepas Gram positivas (**Figura 44 A**) y Gram negativas (**Figura 44 B**) no evidenciaron una disminución de los valores de absorbancia. Como cepas modelo se utilizaron *Staphylococcus aureus* para Gram positivas y *Pseudomonas aeruginosa* para Gram negativas.

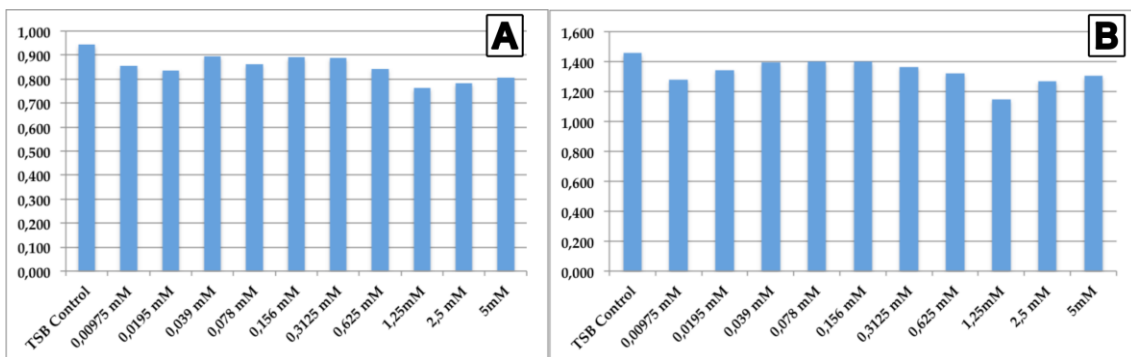


Figura 44: Gráficas de valores de absorbancia de los ensayos del compuesto CIV para Gram positivas (A) y Gram negativas (B).

Complejo de paladio CV :

Los ensayos para el complejo de paladio CV no evidenciaron disminución significativa en los valores de absorbancia ni en cepas Gram positivas (**Figura 45 A**) ni en Gram negativas (**Figura 45 B**). Como cepas modelo se utilizaron *Staphylococcus aureus* para Gram positivas y *Pseudomonas aeruginosa* para Gram negativas.

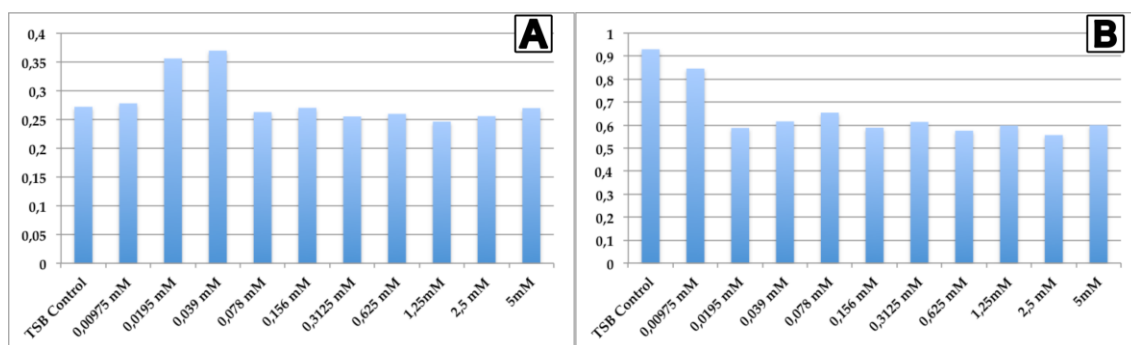


Figura 45: Gráficas de valores de absorbancia de los ensayos del compuesto CV para Gram positivas (A) y Gram negativas (B).

Complejos de plata:

- Complejo CVI:

Como se muestra en la **Figura 46**, los ensayos evidenciaron que este compuesto no produjo inhibición del crecimiento bacteriano en las cepas Gram positivas ensayadas.

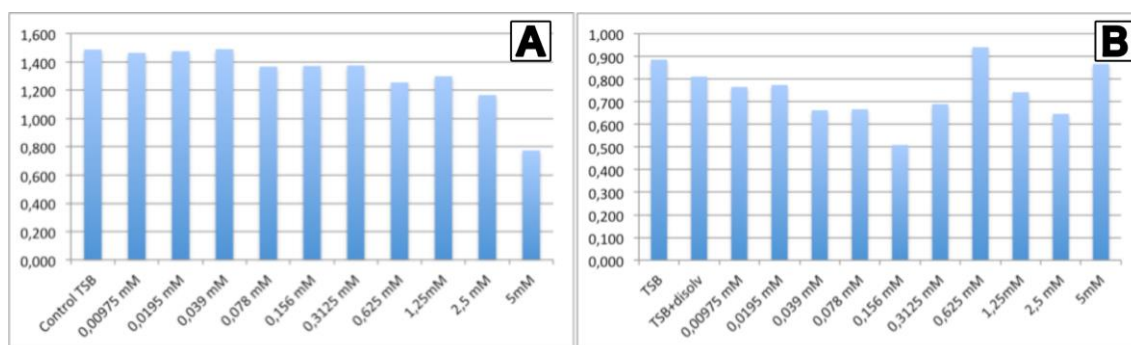


Figura 46: Gráfica de valores de absorbancia de los ensayos del compuesto CVI para Gram positivas A: *S. pseudintermedius* y B: *S. aureus*).

Sin embargo, los ensayos para las cepas Gram negativas mostraron una notoria inhibición del crecimiento bacteriano por parte de este complejo, pudiendo determinar una CMI de para *Escherichia coli* de 0,156 mM (**Figura 47 A**) y de 0,156 mM para *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 47 B**).

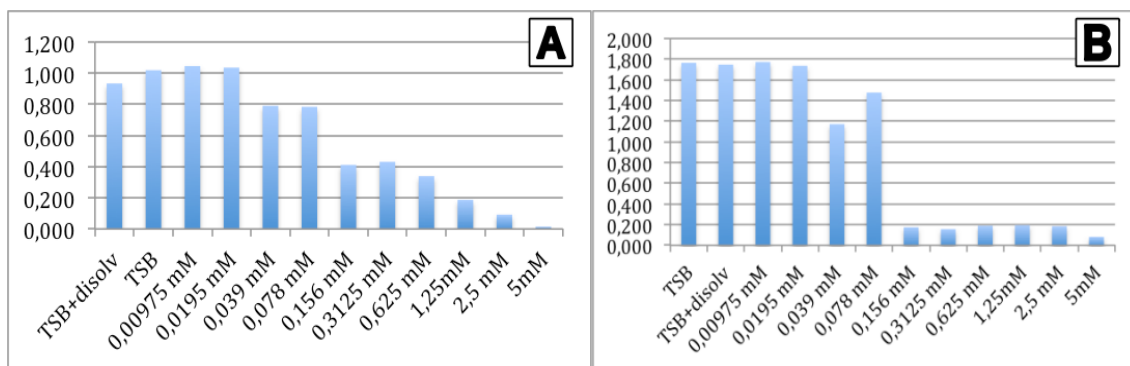


Figura 47: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de CVI en presencia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B).

- **Complejo CVII :**

Al igual que en el complejo anterior, no produjo inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas Gram positivas ensayadas (**Figura 48**).

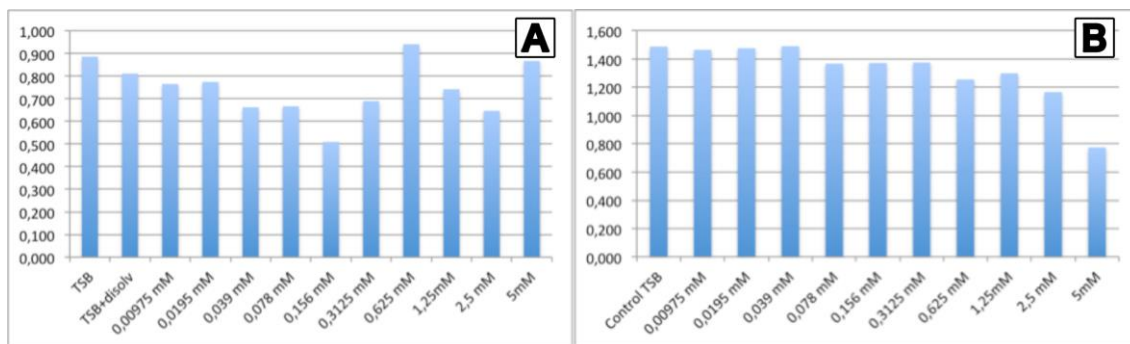


Figura 48: Gráfica de valores de absorbancia de los ensayos del compuesto CVII para Gram positivas: A: *S. pseudintermedius* y B: *S. aureus*.

Del mismo modo, los ensayos en las cepas Gram negativas sí que evidenciaron una clara inhibición del crecimiento bacteriano, pudiéndose determinar la CMI tanto para *E. coli* (**Figura 49 A**) como para *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 49 B**) en 0,3125 mM.

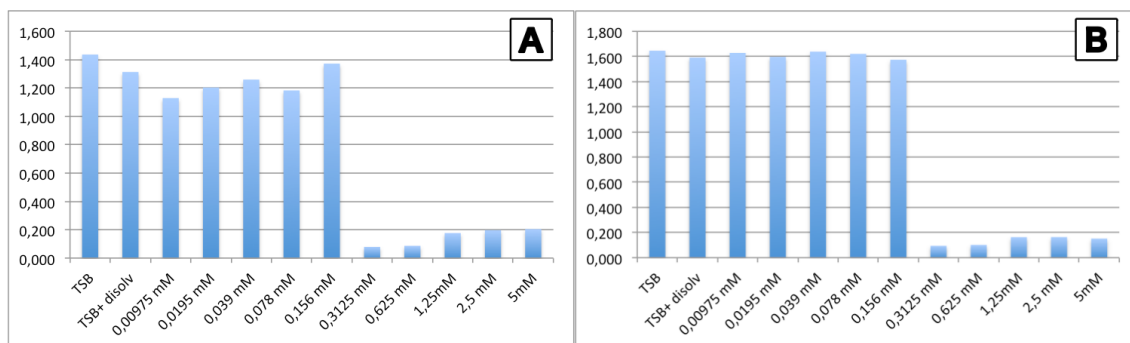


Figura 49: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de CVII en presencia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B).

- **Complejo CVIII :**

Los ensayos del complejo CVIII en cepas Gram positivas no provocaron inhibición del crecimiento bacteriano. En Gram negativas su pudo observar un claro descenso de los valores de absorbancia a una concentración de 2,5 mM tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa* (Figura 50 A y B).

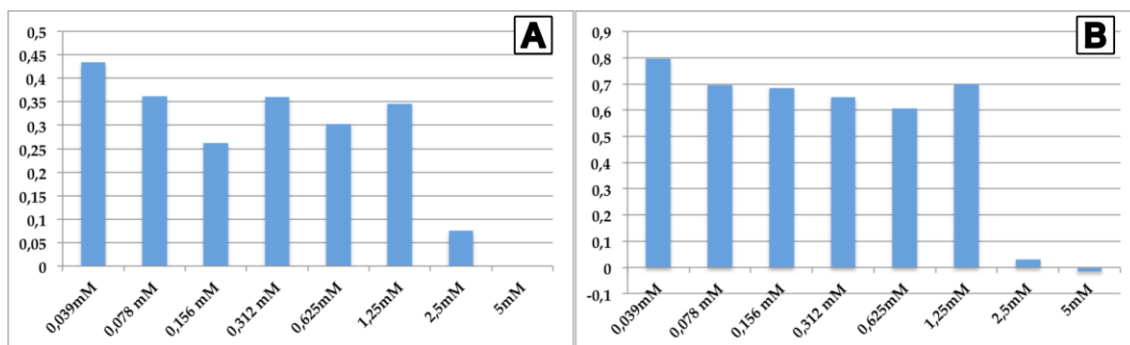


Figura 50: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de CVIII en presencia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B).

CARBOXILATOS DE NUEVA SÍNTESIS:

- **Complejo CBI :**

Al igual que en los anteriores complejos, los ensayos en bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *S. pseudintermedius*) no mostraron actividad antibacteriana alguna. Por el contrario, en cepas Gram negativas ésta sí que fue notoria. Con respecto a *E. coli* (Figura 51 A), se pudo observar una pérdida de turbidez en la columna 7, correspondiente a una concentración de 0,156 mM. En la medición de absorbancia se evidenció una marcada disminución de los valores a la misma concentración, por lo que se determinó la CMI como 0,156 mM. Lo mismo ocurrió en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 51 B), siendo la CMI por tanto de 0,156 mM.

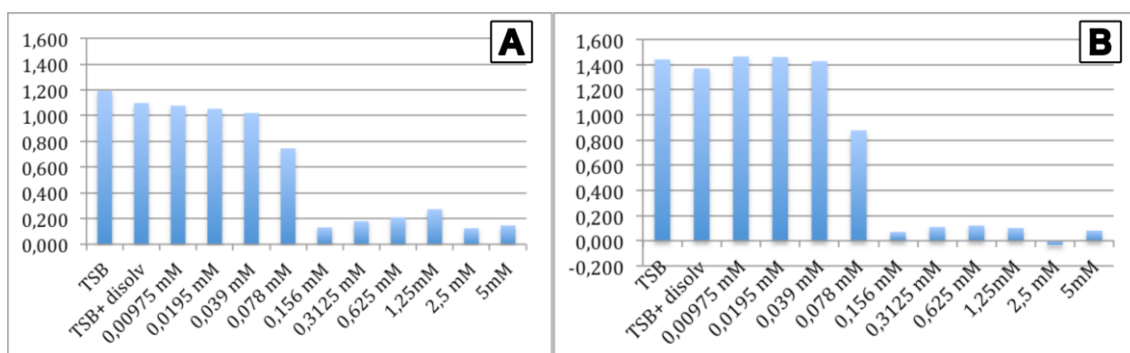


Figura 51: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de CBI en presencia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B).

- **Complejo CBII :**

Los ensayos en bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *S. pseudintermedius*) mostraron una ausencia de actividad antimicrobiana con respecto a este complejo. Sin embargo éste si fue marcado en las cepas Gram negativas ensayadas. En el ensayo de *E. coli* (**Figura 52 A**) se evidenció una marcada disminución de los valores de absorbancia en la concentración de 0,078 mM determinándose como CMI para esta cepa. Lo mismo sucedió en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, determinándose la misma concentración como CMI (**Figura 52 B**).

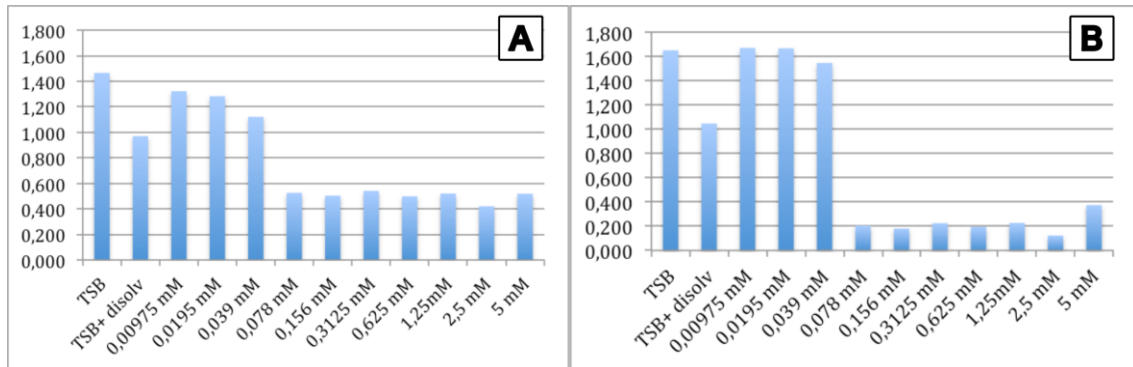


Figura 52: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de CBII en presencia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B).

5.3.3 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Complejos de plata:

Complejo CVI:

En el caso de *E. coli* (**Figura 54**), tras 24 horas de incubación a 37°C pudimos apreciar que a partir de la concentración de 0,3125 mM, ésta inclusive, no existió crecimiento alguno en las placas, por lo que pudimos determinar que la CMB para *E. Coli* es de 0,3125 mM.

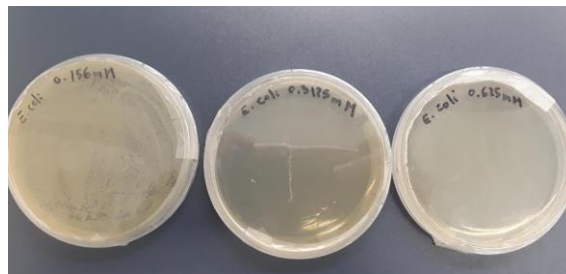


Figura 54: Placas para la determinación de CMB de *E. coli* frente a CVI. De izquierda a derecha, 0,156 mM, 0,3125 mM y 0,625 mM.

Asimismo, para determinar el valor de la CMB en *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 55**), se sembraron las concentraciones de 0,156 mM, 0,3125mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM y 5 mM. Tras la incubación observamos que a partir de la concentración de 0,625

mM , ésta inclusive, no se produjo crecimiento, por lo que determinamos que la CMB para esta cepa es de 0,625 mM.

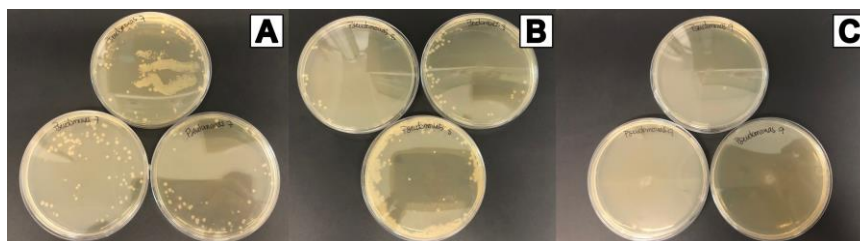


Figura 55: Placas para la determinación de CMB de *Pseudomonas aeruginosa* frente a CVI. A: 0,156 mM, B: 0,3125 mM y C: 0,625 mM.

Complejo CVII:

En el caso de *E. coli* se realizó una siembra en placa de los pocillos de 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM y 5 mM. Tras las 24 horas de incubación se observó que en la placa de la concentración de 1,25 mM no se produjo crecimiento bacteriano, por lo que se determinó que la CMB para *Escherichia coli* es de 1,25 mM.

En cuanto a *Pseudomonas aeruginosa* sembraron las concentraciones de 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM y 5 mM. Tras el período de incubación se apreció que a partir de la concentración de 2,5 mM, esta inclusive, no existió crecimiento alguno en las placas, considerándose como su CMB.

Complejo CVIII :

Los resultados del ensayo mostraron una inhibición total del crecimiento en placa a una concentración de 2,5 mM para ambas cepas bacterianas. Consideramos por tanto que la CMI y la CMB se encuentran muy próximas, encontrándose la CMI entre 1,25 y 2,5 mM y la CMB en 2,5 mM.

Complejo CBI :

En la determinación de la CMB para *E. coli* se realizó una siembra en placa de las concentraciones de 0,3125mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM y 5 mM (**Figura 56**). Tras 24 horas de incubación su pudo apreciar que a partir de la concentración de 0,625 mM ,ésta inclusive, no existió crecimiento alguno, por lo que pudimos determinar que la CMB como 0,625 mM.

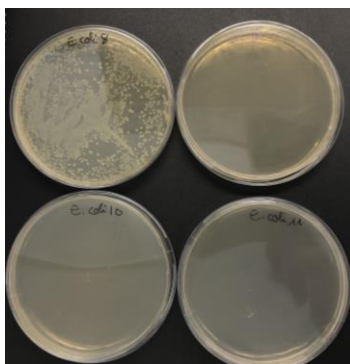


Figura 56: Placas para la determinación de CMB de *E. coli* frente a CBI. Arriba izquierda: 0,3125 mM, arriba derecha: 0,625 mM, abajo izquierda: 1,25 mM y abajo derecha: 2,5 mM.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 57**), se sembraron las concentraciones de 0,156 mM, 0,3125 mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM y 5 mM. Tras la incubación se evidenció que a partir de la concentración de 0,3125 mM incluida, no se produjo crecimiento bacteriano, por lo que se determinó como la CMB.

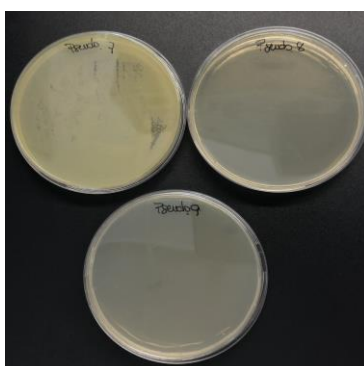


Figura 57: Placas para la determinación de CMB de *Pseudomonas aeruginosa* frente a CBI. Arriba izquierda: 0,156 mM, arriba derecha: 0,3125 mM y abajo: 0,625 mM.

Complejo CBII:

En la determinación de la CMB para *E. coli* (**Figura 58**) los resultados tras la siembra mostraron que a partir de la concentración de 0,156 mM no se produjo crecimiento alguno, por lo que la CMB es de 0,156 mM. Hemos de destacar que a la concentración de 0,078 mM sólo se apreció una UFC en cada placa, por lo que la CMI y la CMB de este compuesto para *E. coli* están muy próximas.

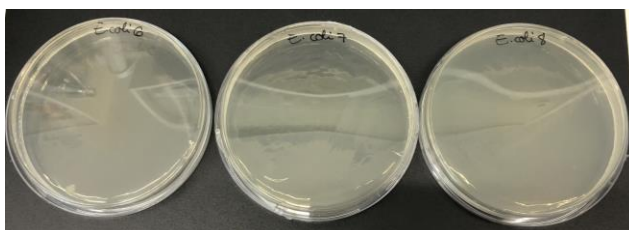


Figura 58: Placas para la determinación de CMB de *E. coli* frente a CBII. De izquierda a derecha, 0,078 mM, 0,156 mM y 0,3125 mM.

Con respecto a *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 59**), tras la incubación observamos que a partir de la concentración de 0,156 mM incluida, no existió crecimiento bacteriano, por lo que la establecimos como su CMB.

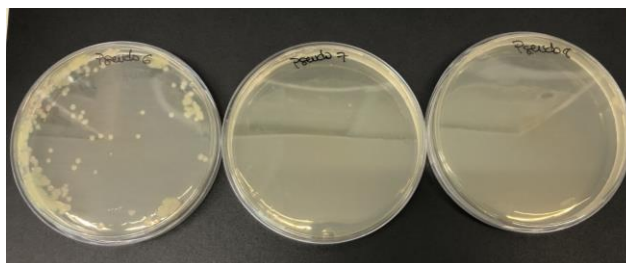


Figura 59: Placas para la determinación de CMB de *Pseudomonas aeruginosa* frente a CBII. De izquierda a derecha, 0,078 mM, 0,156 mM y 0,3125 mM.

5.3.4 Ensayos de sensibilidad bacteriana frente a AgNO₃

Los ensayos de las cepas de *Escherichia coli* y de *Pseudomonas aeruginosa* frente a concentraciones crecientes de AgNO₃ (**Figura 53**) mostraron una disminución drástica de los valores de absorbancia a 0,118 mM en el caso de *E. coli* (**Figura 53 A**) y de 0,177 mM en el caso de *P. aeruginosa* (**Figura 53 B**), considerándose estas concentraciones como las CMI's para estas cepas.

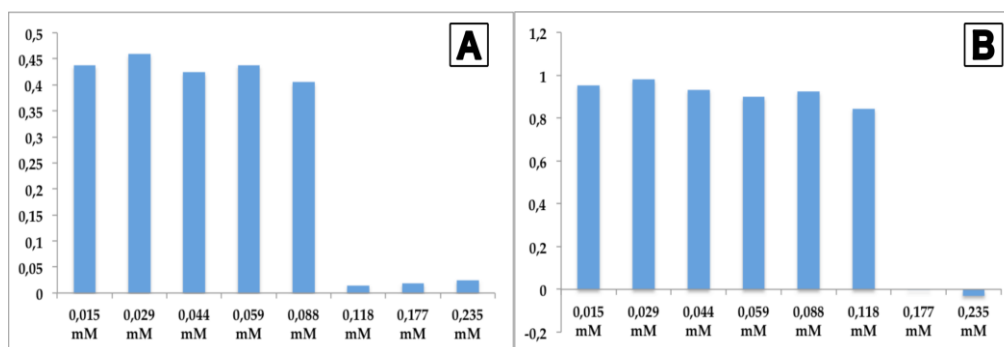


Figura 53: Valores de absorbancia de las distintas concentraciones de AgNO₃ en presencia de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B).

En cuanto a la determinación de la CMB del AgNO₃ pudimos determinar que para *Escherichia coli* fue superior a una concentración de 0,236 mM y en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* fue de 0,236 mM.

5.3.5 Efecto sobre la formación de biofilm bacteriano: Método de George O'Toole.

Dada su mayor efectividad, únicamente los complejos CVI y CVII fueron testados. En el caso del complejo CVI (**Tabla 8**) se observó una afectación de la formación del biofilm en concentraciones significativamente más bajas que su correspondiente CMI, lo que indica que afecta a este factor de virulencia aunque no ejerza aún su efecto antimicrobiano. Sin embargo este hecho no lo apreciamos en el ensayo del complejo de CVII (**Tabla 9**), que en ambas cepas permitió una formación de abundante biofilm hasta que se alcanza la CMI. En esta situación consideramos que es la propia inhibición del crecimiento bacteriano el factor que puede estar afectando a la formación del biofilm. Dado que el biofilm confiere una capacidad de resistencia a los antimicrobianos mucho mayor, el hecho de que su formación se vea afectada aunque no haya muerte del microorganismo puede hacer a éste último mucho más sensible a sustancias que anteriormente eran repelidas por el propio biofilm.

Tabla 8: Concentraciones del complejo CVI para las cuales se produce un inhibición de la formación del biofilm según la técnica de George O'Toole.

Cepa bacteriana	CMI	Concentración a la que se comienza a afectar la formación de biofilm
<i>Escherichia coli</i>	0,156 mM	0,039 mM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,156 mM	0,0195 mM

Tabla 9: Concentraciones del complejo CVII para las cuales se produce un inhibición de la formación del biofilm según la técnica de George O'Toole.

Cepa bacteriana	CMI	Concentración a la que se comienza a afectar la formación de biofilm
<i>Escherichia coli</i>	0,3125 mM	0,3125 mM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,3125 mM	0,3125 mM

CARBOXILATOS DE NUEVA SÍNTESIS:

En el ensayo del compuesto CBI (**Tabla 10**) en *Escherichia coli* se observó una afectación de la formación del biofilm en concentraciones significativamente más bajas que su correspondiente CMI. En el ensayo de *Pseudomonas aeruginosa* se apreció una inhibición de la formación del biofilm a CMI. En esta situación consideramos que es la propia inhibición del crecimiento bacteriano es lo que probablemente está afectando a la formación del biofilm.

Tabla 10: Concentraciones del compuesto CBI para las cuales se produce un inhibición de la formación del biofilm según la técnica de George O’Toole.

Cepa bacteriana	CMI	Concentración a la que se comienza a afectar la formación de biofilm
<i>Escherichia coli</i>	0,156 mM	0,078 mM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,156 mM	0,156 mM

Finalmente, en el caso de CBII (**Tabla 11**) en *Escherichia coli* se observó una afectación de la formación del biofilm en concentraciones más bajas que su correspondiente CMI. Al igual que en el caso anterior, en el ensayo de *Pseudomonas aeruginosa* se apreció una formación de abundante biofilm hasta que se alcanza la CMI.

Tabla 11: Concentraciones del compuesto CBII para las cuales se produce un inhibición de la formación del biofilm según la técnica de George O’Toole.

Cepa bacteriana	CMI	Concentración a la que se comienza a afectar la formación de biofilm
<i>Escherichia coli</i>	0,078 mM	0,039 mM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,078 mM	0,078 mM

5.3.6 Valoración de formación de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Basándonos en los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, consideramos necesarios estudios evidenciar el efecto de estos compuestos sobre la población bacteriana y en la formación de biofilm, por lo que se decidió realizar una valoración mediante microscopía electrónica. Dado que el efecto bactericida y sobre el biofilm no es significativo en las bacterias Gram positivas, se realizó únicamente en las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Complejo CVI:

Como se muestra en las imágenes correspondientes a los controles de ambas cepas bacterianas (**Figuras 60 A y 61 A**), en ausencia del complejo CVI se apreció un marcado crecimiento bacteriano, dónde se pudieron observar grandes colonias con presencia de cuantioso material extracelular y fibras que componen el biofilm. Cuando ambas cepas se cultivaron en presencia del complejo a una concentración de CMI (**Figuras 60 B y 61 B**), el número de dichas colonias disminuyó de manera significativa y la formación del biofilm se vio gravemente afectado, hecho más marcado en la *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 61 B**). Finalmente, al aumentar la concentración a CMB (**Figuras 60 C y 61 C**),

únicamente se observaron bacterias aisladas y no formando colonias, indicando que su crecimiento se encontraba completamente abolido.

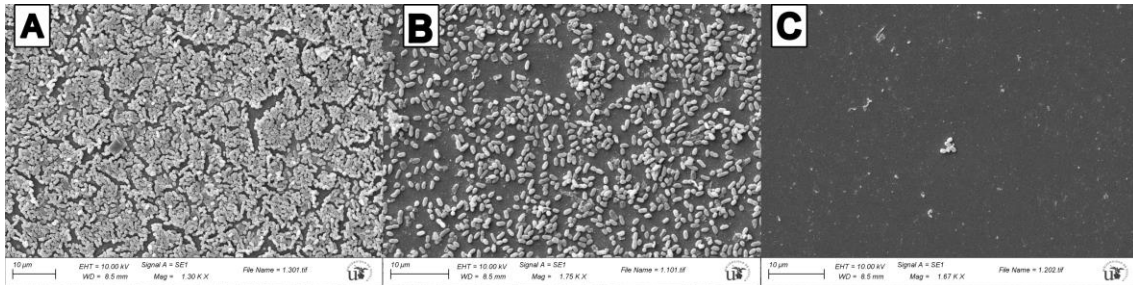


Figura 60: **A:** *Escherichia coli* control. **B.** *Escherichia coli* en presencia de CVI a CMI. **C.** *Escherichia coli* en presencia de CVI a CMB.

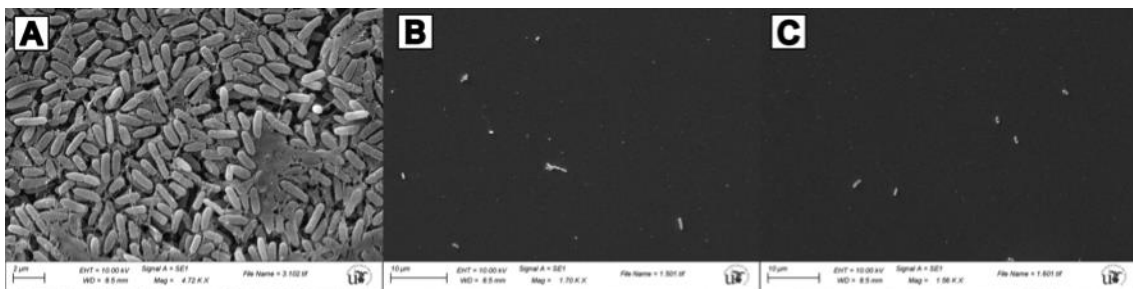


Figura 61: **A:** *Pseudomonas aeruginosa* control. **B.** *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CVI a CMI. **C.** *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CVI a CMB.

Complejo CVII :

Al igual que en el complejo anterior, en las imágenes correspondientes al control de ambas cepas se pudo apreciar un marcado crecimiento bacteriano y abundante formación de biofilm (**Figuras 62 A y 63 A**). Asimismo, en presencia del complejo CVII a CMI (**Figuras 62 B y 63 B**) se pudo observar un marcado descenso en la población bacteriana y en la presencia de biofilm, muy notorio en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, en la que casi no se apreciaron bacterias (**Figura 63 B**). En el caso de *Escherichia coli* (**Figura 62 B**) se puede observar la presencia del compuesto de plata y una marcada deformidad en las bacterias, así como una gran producción de material extracelular posiblemente polisacárido. Finalmente, en presencia del complejo a CMB (**Figuras 62 C y 63 C**) se pudieron observar únicamente bacterias aisladas, y en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 62 C**) muy escasas, completamente deformadas y restos de compuesto.

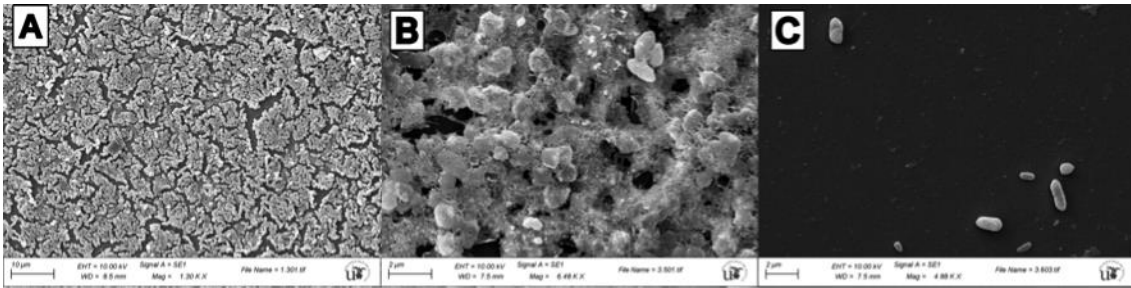


Figura 62: A: *Escherichia coli* control. B: *Escherichia coli* en presencia de CVII a CMI. C: *Escherichia coli* en presencia de CVII a CMB.

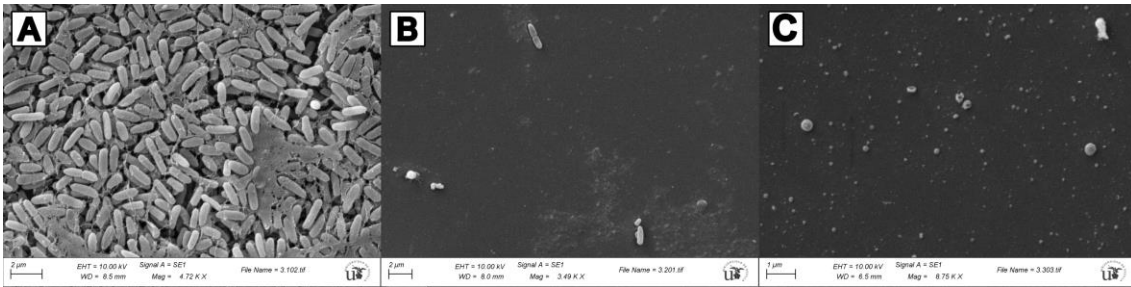


Figura 63: A: *Pseudomonas aeruginosa* control. B: *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CVII a CMI. C: *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CVII a CMB.

CARBOXILATOS DE NUEVA SÍNTESIS:

Complejo CBI :

En ambos controles (**Figura 64 A** y **65 A**) se pudo observar un cuantioso crecimiento bacteriano con abundante biofilm. A CMI (**Figuras 64 B** y **65 B**), tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa* se pudo apreciar un marcado descenso de la población bacteriana, disponiéndose de manera individual en el caso de *P. aeruginosa*. Además, es claramente observable el daño a la pared celular en la figura **64 B**. Finalmente, como se puede apreciar en las **Figuras 64 C** y **65 C**, a CMB la presencia de bacterias es casi inapreciable.

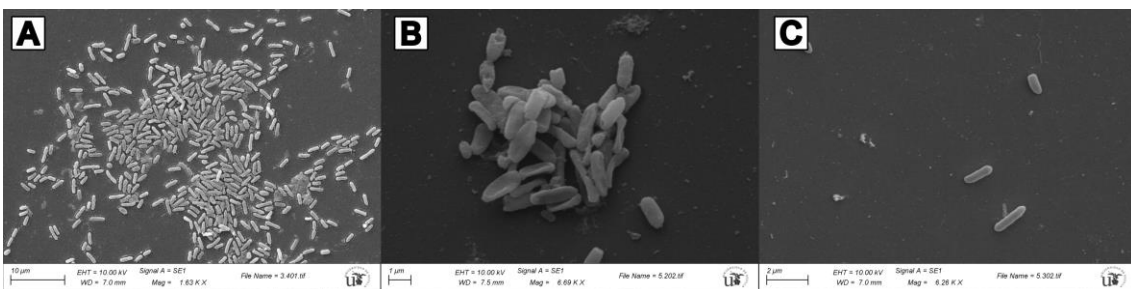


Figura 64: A: *Escherichia coli* control. B: *Escherichia coli* en presencia de CBI a CMI. C: *Escherichia coli* en presencia de CBI ([Ag(S,S-diAlaIm)]) a CMB.



Figura 65: **A:** *Pseudomonas aeruginosa* control. **B.** *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CBI a CMI. **C.** *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CBI ([Ag(S,S-diAlaIm)] a CMB.

Complejo CBII :

Al igual que en el caso de su enantiómero las imágenes del control (**Figuras 66 A y 67 A**), muestran un crecimiento en sábana de ambos microorganismos con formación de abundante biofilm. Asimismo, a CMI pudimos apreciar una disminución muy marcada en la población bacteriana formando pequeños grupos celulares (**Figuras 66 B y 67 B**) y a CMB (**Figuras 66 C y 67 C**) se disminuyó aún más esta población y se disponían de manera individual. Como ocurría anteriormente con el enantiómero PMR-R5.2, también en este caso se puede observar un daño evidente a la pared celular y células deformadas de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 67 C**).

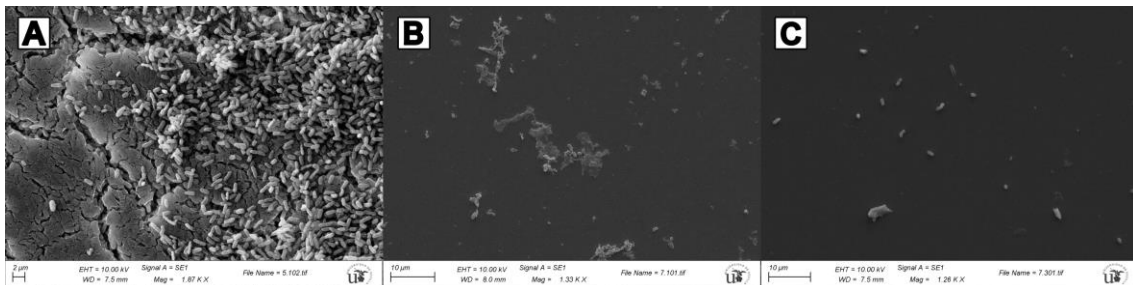


Figura 66: **A:** *Escherichia coli* control. **B.** *Escherichia coli* en presencia de CBII a CMI. **C.** *Escherichia coli* en presencia de CBII ([Ag(R,R-diAlaIm)] a CMB.

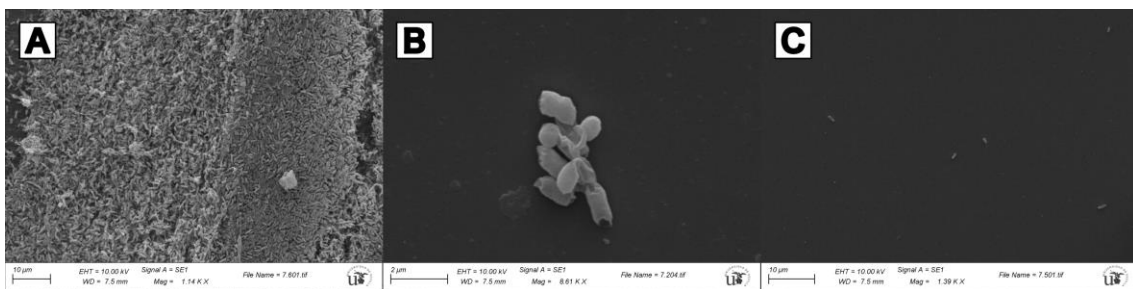


Figura 67: **A:** *Pseudomonas aeruginosa* control. **B.** *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CBII a CMI. **C.** *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de CBII ([Ag(R,R-diAlaIm)] a CMB.

5.3.7 Determinación of de enzimas antioxidantes y sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARs).

Debido a su mayor actividad antimicrobiana se testaron los complejos de Ag CVI y CVII y los dicarboxilatos de nueva síntesis CBI y CBII.

Actividad Catalasa (CAT) U/mg proteína:

Los resultados obtenidos (**Tabla 12**) indicaron que la actividad catalasa en el caso de *E. coli* fue superior al control tanto a CMI como a CMB, en el que no se detectaba dicha actividad, en los 4 compuestos ensayados. Con respecto a *P. aeruginosa*, los resultados (**Tabla 12**) muestran que, al contrario de lo que ocurre con *E. coli*, no se detecta actividad enzimática catalasa alguna a CMI o CMB en los ensayos de los 4 compuestos.

Actividad Peroxidasa total U/mg proteína:

Para *E. coli* se pudo determinar que en los ensayos de los complejos de plata CVI y CVII no se produjo un incremento de esta actividad. Sin embargo, para los complejos enantiómeros tipo carboxilato CBI y CBII se observó que, en el caso del primero se produjo un aumento a CMI y en el caso del segundo compuesto, a CMB (**Tabla 12**).

En el caso de *P. aeruginosa*, se pudo observar un aumento de esta actividad enzimática en los ensayos de los 4 productos, destacando los complejos CVII y CBI (**Tabla 12**).

Actividad Superóxido dismutasa (SOD) (μ l inhibición 50% oxidación):

Como muestran los datos recogidos en la **Tabla 12**, para *E. coli* destaca la actividad a CMI del complejo CVI, mientras que el complejo CVII, no mostró inducción alguna de esta actividad enzimática. En el caso de los carboxilatos CBI y CBII se evidenció actividad tanto a CMI como a CMB para esta cepa bacteriana. En el caso de *P. aeruginosa* no se produjo un aumento de esta actividad enzimática con respecto al control en ninguno de los ensayos de los 4 complejos.

En resumen, debemos realizar una diferenciación entre los mecanismos de detoxificación de ROS provocados por estos complejos metálicos en *E. coli* y *P. aeruginosa*. En la primera especie, esta detoxificación ocurre fundamentalmente mediante la enzima catalasa, mientras que en la segunda es preferentemente la SOD la enzima que sufre las inducciones más fuertes, de hasta 6-20 veces. Sí cabe destacar que el complejo metálico CVI parece ser que provoca el mayor estrés oxidativo, ya que induce ambas enzimas en las dos especies, con incrementos en la SOD de hasta 25-30 veces.

Tabla 12: se muestran los valores de las distintas actividades enzimáticas obtenidas de tres determinaciones independientes. ND: no detectada.

Cepa bacteriana	Complejo	Enzima	Actividad (mU. mg ⁻¹ proteína)		
			Control	CMI	CMB
<i>E. coli</i>	CVI	Catalasa	ND	2,5 . 10 ⁻⁵ ± 0,25.10 ⁻⁵	6,6.10 ⁻⁵ ± 0,9.10 ⁻⁵
		Peroxidasas Totales	ND	ND	ND
		Superóxido dismutasa	3,330 ± 0,01	1,51 ± 0,07	92,14 ± 2,3
	CVII	Catalasa	ND	5,5 × 10 ⁻⁵ ± 0,03	8,3 × 10 ⁻⁵ ± 0,02
		Peroxidasas Totales	0,485 ± 0,05	0,1656 ± 0,02	0,032 ± 0,002
		Superóxido dismutasa	3,330 ± 0,01	4,14 ± 0,07	3,66 ± 0,06
	CBI	Catalasa	ND	1,2 × 10 ⁻⁵ ± 0,12.10 ⁻⁵	5,7 × 10 ⁻⁵ ± 0,7.10 ⁻⁵
		Peroxidasas Totales	0,485 ± 0,05	1,083 ± 0,21	0,88 ± 0,018
		Superóxido dismutasa	3,330 ± 0,01	2,6 ± 0,008	3,44 ± 0,01
	CBII	Catalasa	ND	ND	6 × 10 ⁻⁵ ± 0,9.10 ⁻⁵
		Peroxidasas Totales	0,485 ± 0,05	0,954 ± 0,1	1,33 ± 0,23
		Superóxido dismutasa	3,33 ± 0,01	2,46 ± 0,012	3,065 ± 0,009
<i>P. aeruginosa</i>	CVI	Catalasa	ND	ND	ND
		Peroxidasas Totales	ND	ND	0,0024 ± 0,001
		Superóxido dismutasa	3,40 ± 0,06	20 ± 0,014	76,33 ± 0,11
	CVII	Catalasa	ND	ND	ND
		Peroxidasas Totales	0,382 ± 0,03	1,05 ± 0,1	2,54 ± 0,25
		Superóxido dismutasa	3,40 ± 0,06	9,09 ± 0,1	20 ± 0,22
	CBI	Catalasa	ND	ND	ND
		Peroxidasas Totales	0,382 ± 0,03	0,91 ± 0,1	2,3 ± 0,3
		Superóxido dismutasa	3,40 ± 0,06	9,56 ± 0,18	22,26 ± 0,26
	CBII	Catalasa	ND	ND	ND
		Peroxidasas Totales	0,382 ± 0,03	0,738 ± 0,07	0,655 ± 0,06
		Superóxido dismutasa	3,40 ± 0,06	2,98 ± 0,03	3,47 ± 0,05

MDA:

COMPLEJOS DE PLATA:

Dada su mayor actividad antimicrobiana, se realizaron los ensayos para los complejos CVI y CVII así como para los carboxilatos CBI y CBII.

Complejo CVI :

Como mostramos en la **Figura 68**, los ensayos de ambas cepas mostraron un aumento del MDA con respecto al control tanto a CMI como en CMB. Mientras que en el caso de *E. coli* este aumento fue más notorio a CMI que a CMB, en el caso de *P. aeruginosa* el valor de MDA a CMB fue mucho mayor que a CMI.

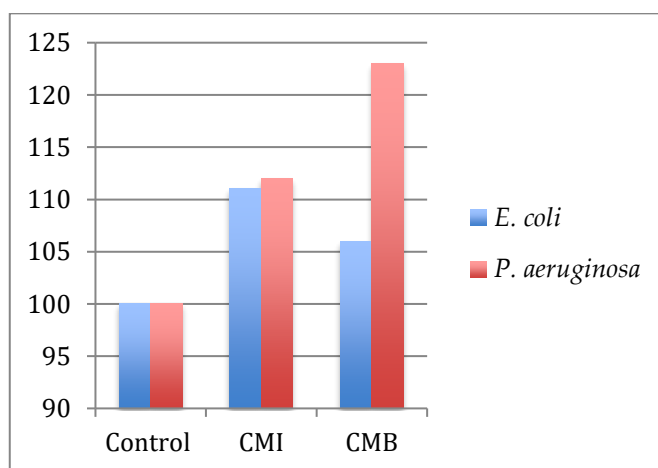


Figura 68: Cantidad de MDA relativa (el control se considera el 100%) de *E. coli* (azul) Y *P. aeruginosa* (rojo) en presencia del compuesto CVI a CMI y CMB. Los valores del control están comprendidos entre 0 y 0,2 nMol/mg prot. para *E. coli* y 0,1 y 0,27 para *P. aeruginosa*.

Complejo CVII :

Los ensayos del complejo CVII (**Figura 69**) mostraron que mientras que para *E. coli* los valores de MDA aumentaban con respecto al control tanto a CMI como a CMB, esto no ocurría para *P. aeruginosa*.

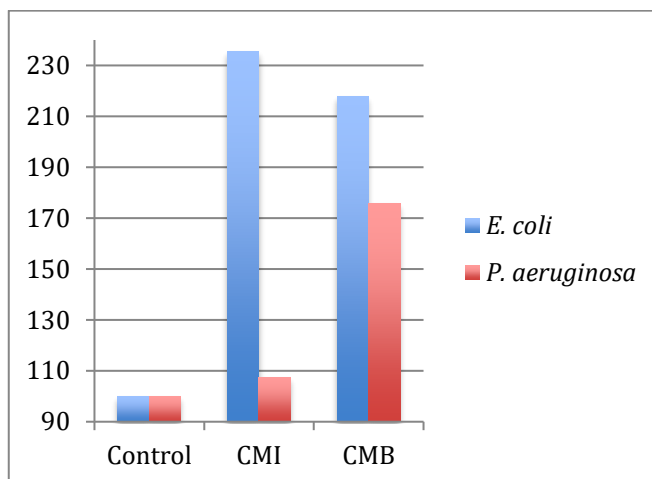


Figura 69: Cantidad de MDA relativa (el control se considera el 100%) de *E. coli* (azul) Y *P. aeruginosa* (rojo) en presencia del compuesto CVII a CMI y CMB. Los valores del control están comprendidos entre 0 y 0,2 nMol/mg prot. para *E. coli* y 0,1 y 0,27 para *P. aeruginosa*.

CARBOXILATOS DE NUEVA SÍNTESIS:

Complejo CBI :

Como mostramos en la **Figura 70**, los valores de MDA tanto a CMI como a CMB fueron inferiores al control en ambas cepas bacterianas.

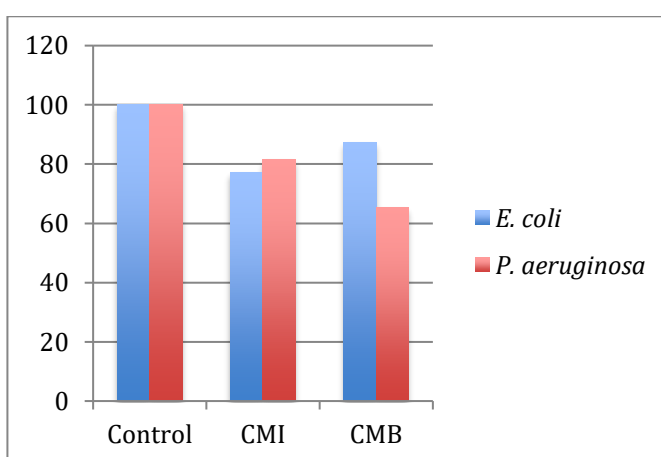


Figura 70: Cantidad de MDA relativa (el control se considera el 100%) de *E. coli* (azul) Y *P. aeruginosa* (rojo) en presencia del complejo CBI a CMI y CMB. Los valores del control están comprendidos entre 0 y 0,2 nMol/mg prot. para *E. coli* y 0,1 y 0,27 para *P. aeruginosa*.

Complejo CBII :

Finalmente, en los ensayos del complejo CBII (**Figura 71**) evidenciaron un aumento de los valores del MDA a CMB en el caso de *E. coli* y a CMI en el caso de *P. aeruginosa*.

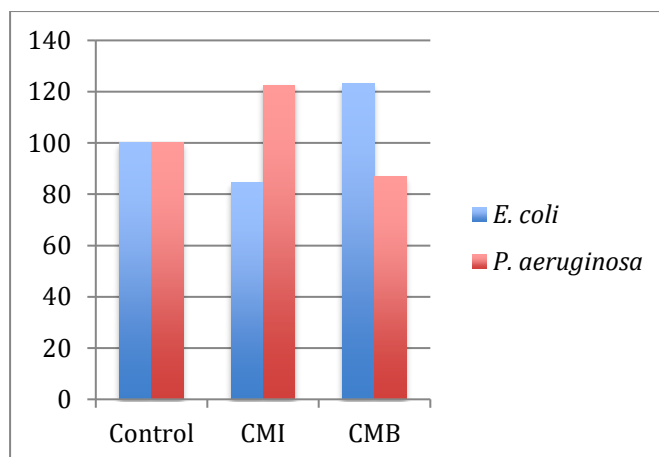


Figura 71: Cantidad de MDA relativa (el control se considera el 100%) de *E. coli* (azul) Y *P. aeruginosa* (rojo) en presencia del complejo CBII a CMI y CMB. Los valores del control están comprendidos entre 0 y 0,2 nMol/mg prot. para *E. coli* y 0,1 y 0,27 para *P. aeruginosa*.

6. Discusión

Estudio de toxicidad de diferentes disolventes

El estudio de la toxicidad bacteriana de los disolventes orgánicos más comúnmente utilizados ha resultado ser un estudio indispensable para continuar con la investigación de nuevas moléculas de carácter hidrofóbico, del que no hemos encontrado registros previos para las cepas testadas. Es importante destacar que, en función del microorganismo, la tolerancia a diferentes disolventes varía. Analizando los resultados podemos establecer que la concentración de 1:1000 garantiza que no se produzca toxicidad bacteriana alguna por parte del disolvente exceptuando el DMF en el caso de *P. pseudintermedius*, y de DCM en *P. aeruginosa*. Cuando no es posible utilizar dicha concentración, la mejor opción para cepas Gram positivas es utilizar DMSO o TBME a una concentración de 1:100. Por otro lado, para cepas Gram negativas los más adecuados son DMF o TBME a la misma concentración.

Síntesis y evaluación antimicrobiana de los diferentes complejos preparados

Como hemos mencionado con anterioridad, la acción antimicrobiana de los diferentes metales ha sido ampliamente demostrada. En el presente trabajo de investigación se han testado este tipo de ligandos con grupos funcionales ácido derivados de imidazol acomplejados con un metal esencial, como el Zn (CI, CII, CIII y CIV) y con otros no esenciales como Pd (CV) y Ag (CVI, CVII, CVIII, CBI y CBII). La síntesis de los compuestos poliméricos de Zn (CI, CII, CIII y CIV) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Nicasio et al. en 2017., a partir de los correspondientes ácidos dicarboxílicos quirales con estructura tipo imidazol. Dichos ácidos dicarboxílicos fueron preparados a su vez mediante el uso de los correspondientes aminoácidos naturales mediante la reacción de Debus-Radziszewski. El procedimiento de síntesis fue eficaz, obteniendo rendimientos similares a los publicados en la bibliografía. Por otro lado, el complejo de Pd (CV) es un producto de nueva síntesis, basado en se la metodología publicada en la bibliografía (Jahier-Diallo et al. 2015, Tarrieu et al. 2017 y Thongpaen et al. 2018), dando lugar a un sólido microcristalino estable con una alta tasa de rendimiento (88%). Finalmente, entre los complejos de plata podemos distinguir, por un lado los complejos Ag-NHC (CVI, CVII y CVIII) fueron sintetizados según la literatura publicada (Thongpaen *et al.* 2018). Son derivados de N-heterociclos y han sido desarrollados para su aplicación en catálisis (Thongpaen *et al.* 2018, Kühn *et al.* 2010, Carrasco *et al.* 2018). Finalmente se ha llevado a cabo un proceso de síntesis *de novo* de los compuestos de tipo carboxilato-Ag CBI y CBII, en la que participamos en el diseño, por el equipo liderado por el profesor Francisco J. Montilla Ramos, del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la US. Este proceso de síntesis, mediante una reacción con Ag₂O de una manera eficiente, dio lugar a dos compuestos enantiómeros estables con un rendimiento de aproximadamente el 42 %.

En resumen, todos los compuestos fueron obtenidos en buenos rendimientos y en cantidades necesarias para llevar a cabo las repeticiones adecuadas de los experimentos de evaluación biológica de su potencial efecto farmacológico, sin

observar en ninguno de los casos degradación en condiciones de almacenamiento habituales.

Una vez sintetizados, para la evaluación de su actividad antimicrobiana se han utilizado métodos cuantitativos estandarizados para determinar tanto la CMI como la CMB, valores necesarios para la evaluación de la capacidad antibiótica general y poder realizar comparativas. Dichos métodos cuantitativos por la técnica de microdilución en caldo (CLSI, 2012) mostraron una ausencia de inhibición del crecimiento bacteriano en todos los pocillos tanto de los complejos de Zn (CI, CII, CIII y CVI) como de Pd (CV). Una posible explicación de este suceso se basaría en que no hubiera sido posible alcanzar las concentraciones de Zn o de Pd lo suficientemente altas para provocar toxicidad bacteriana, ya que en ambos casos sus propiedades antimicrobianas han sido constatadas (Waldron y Robinson 2009, Athie-García et al., 2018).

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de los diferentes complejos de plata sintetizados también fueron testados. Así, las actividades de los compuestos CVI, CVII, CBI y CBII han sido notorias en las cepas Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Es importante destacar que se ha demostrado que este tipo de entidades químicas tipo complejos son estables en presencia tanto de humedad como de aire, que su liberación de la Ag puede ser prolongada y sostenida en el tiempo y que su síntesis es sencilla y eficiente, por lo que han generado un gran interés en el campo de la microbiología como posibles agentes antimicrobianos (Sari et al. 2016). Por otro lado, la acción antimicrobiana de la plata ha sido demostrada en multitud de estudios, aunque los mecanismos exactos de esta actividad no están elucidados completamente. Actualmente se conocen únicamente dos mecanismos de acción principales, por un lado, la actividad antimicrobiana por contacto directo con las bacterias y por otro, la interacción del ión Ag^+ con las proteínas y enzimas bacterianas que alteran gravemente su funcionalidad. En el primer caso, la plata se une directamente al peptidoglicano que conforma la pared celular bacteriana, provocando el daño irreversible de la misma. También, se ha demostrado una mayor actividad del ion Ag^+ frente a bacterias Gram negativas, debido principalmente a la diferencia de grosor de la pared de estas, significativamente más fina que las Gram positivas. Asimismo, se ha demostrado que el ion Ag^+ se une a los grupos carboxilo, fosfato y amino (con carga negativa) de la membrana celular por atracción electrostática, alterando la su carga y favoreciendo la penetración del metal. Una vez dentro de la bacteria, el ion Ag^+ se une a los restos de tipo tiol (-SH) de ciertas enzimas y proteínas bacterianas, alterando o desactivando su acción. Así, es capaz de desactivar la cadena de transporte de electrones mediante un proceso de fosforilación oxidativa. Otros estudios sugieren que el ión Ag^+ forma complejos con los ácidos nucleicos bacterianos, interfiriendo con los nucleótidos intercalándose entre las bases púricas y pirimidínicas interfiriendo en los procesos de división y reproducción bacteriana. Finalmente, el ion Ag^+ , como ion metálico pesado puede inducir un incremento de estrés oxidativo celular significativo. A su vez, si también ha interferido con las enzimas antioxidantes las deja indefensas frente a este proceso de estrés oxidativo (Qing et al. 2018).

Como muestran las tablas a continuación (**Tablas 13 y 14**), tanto la CMI como la CMB va aumentando en función del compuesto, siendo CVI; el más efectivo, seguido de CVII y por último CVIII.

Tabla 13: valores de CMI y CMB de los diferentes complejos de Ag para *E. coli*.

<i>E. coli</i>	CVI	CVII	CVIII
CMI	0,156 mM	0,3125 mM	1,25-2,5 mM
CMB	0,3125 mM	1,25 mM	2,5 mM

Tabla 14: valores de CMI y CMB de los diferentes complejos de Ag para *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	CVI	CVII	CVIII
CMI	0,156 mM	0,3125 mM	1,25-2,5 mM
CMB	0,625 mM	2,5 mM	2,5mM

Dado que los tres complejos son de plata y el método de síntesis es el mismo, la diferencia de actividad antimicrobiana reside en la estructura final de complejo metálico. Aunque los ensayos de los ligandos de partida mostraron que éstos no poseen actividad antimicrobiana *per se*, consideramos que la estructura que proporcionan al complejo metálico final tiene una influencia directa en la capacidad antimicrobiana de dicho complejo. Estudios realizados por Sari et al. en 2016 ya sugirieron este hecho. En nuestro caso, hemos podido constatar que cuanto más larga es la cadena alifática del aminoácido de partida, menor actividad antimicrobiana posee el complejo metálico. Una posible explicación podría ser la diferencia en el volumen estérico, ya que diversos estudios constatan que a mayor volumen estérico menor capacidad antimicrobiana del complejo (Froese et al. 2017). En nuestro caso la diferencia en el volumen estérico de los complejos no es tan diferente, y no parece que pudiera considerarse lo suficientemente significativa. Por otro lado, en el caso de los compuestos testados consideramos que esta diferencia de comportamiento tiene relación directa con la lipofilia (o hidrofobia) del compuesto. Esta propiedad de los fármacos es la responsable del control de comportamientos tan críticos como la capacidad de permeabilidad de membrana, solubilidad, volumen de distribución, estabilidad metabólica y unión de proteínas, entre otros. Por lo tanto, la lipofilia es la que le confiere una mayor afinidad por la membrana externa bacteriana de los patógenos Gram negativos y se traduce en un mayor efecto antimicrobiano contra éstos. Por tanto, el complejo CVI (sintetizado a partir de alanina), tiene una mayor actividad antimicrobiana que el CVII (derivado de valina) y éste a su vez del CVIII (sintetizado a partir de leucina) (**Figura 72**).

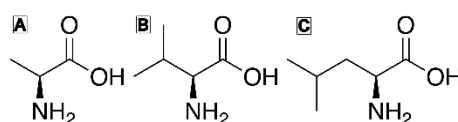


Figura 72: estructuras químicas de los aminoácidos de partida. A: alanina; B: valina ; C: leucina.

Asimismo, esto apoya la hipótesis de que estos complejos no hayan tenido ningún efecto frente a las cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus*

pseudintermedius) que hemos testado por la técnica de microdilución en caldo mostrado en la sección de resultados 6.3 del presente capítulo, ya que los microorganismos Gram positivos poseen una cubierta externa de peptidoglicano, que le confiere hidrofilia, por lo tanto sería bastante poco probable que la pudieran atravesar en condiciones normales.

Como hemos mencionado con anterioridad, los mecanismos exactos de la capacidad antimicrobiana de los complejos de plata no son del todo conocidos, habiéndose estudiado varias posibilidades. Nuestros estudios proponen dos mecanismos complementarios: por un lado, el daño a la membrana externa de los patógenos mediante la peroxidación de sus lípidos de membrana, y por otro lado la inducción de un proceso de estrés oxidativo en las bacterias, provocando su muerte. En el caso de los complejos de plata ensayados se pudo establecer claras diferencias. El complejo CVI, que es el que posee mayor capacidad antimicrobiana, utiliza ambos mecanismos, tanto de daño a membrana como de inducción de estrés oxidativo, en ambas cepas (*E. coli* y *P. aeruginosa*), sin embargo, el complejo CVII provoca ambos en *E. coli* pero no tiene la capacidad de dañar la membrana de *P. aeruginosa*. Estos datos vuelven a evidenciar la relación de la potencia de la actividad antimicrobiana con la lipofilia del complejo y esclarecen los mecanismos concretos de daño microbiano de estos compuestos metálicos. Este conocimiento nos ha permitido establecer una clara relación entre la estructura y la actividad antibacteriana como se ha mencionado, lo cual es muy útil para el diseño de nuevas entidades con potencial comportamiento antibacteriano en estudios futuros.

Por otro lado, los otros compuestos estudiados son los que se han denominado en esta Memoria como dicarboxilatos metálicos (de plata) CBI y CBII, que han sido preparados por primera vez y *ad hoc* para los estudios llevados a cabo encuadrados en esta Tesis Doctoral. Estos compuestos de base de imidazolio han ganado protagonismo en los últimos años, especialmente aquellos que muestran quiralidad dentro del campo de la catálisis y la implementación de reacciones varias. Anteriormente se ha mencionado que los NHCs, pueden formar complejos estables metálicos y que pueden poseer propiedades antimicrobianas. Asimismo, existen estudios recientes en la literatura que sugieren que existe una relación directa entre la quiralidad de ciertos compuestos y su actividad antimicrobiana (Guo et al 2019). Este fenómeno se ha observado en compuestos de la familia de los antibióticos o herbicidas, siendo muy importante determinar el estereoisómero activo también denominado eutómero y establecer a su vez procesos de síntesis asimétrica con total control de la quiralidad en todos los centros estereogénicos.

Así, en el presente estudio se han sintetizado *de novo* dos dicarboxilatos de Ag enantiómeros a partir del aminoácido alanina, que corresponden al CBI y el CBII indistintamente. Aunque ambos complejos presentan una notoria actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, el enantiómero CBII, sintetizado a partir de LII, presenta mucha mayor actividad antimicrobiana que CBI. Las **Tablas 15 y 16** muestran la comparativa de los valores de CMI y CMB de estos dos compuestos para ambas cepas bacterianas ensayadas.

Tabla 15: valores de CMI y CMB de los dicarboxilatos para *E. coli*.

<i>E. coli</i>	CBI	CBII
CMI	0,156 mM	0,078 mM
CMB	0,625 mM	0,156 mM

Tabla 16: valores de CMI y CMB de los dicarboxilatos para *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	CBI	CBII
CMI	0,156 mM	0,078 mM
CMB	0,3125 mM	0,156 mM

Por tanto, podemos establecer que el eutómero es el complejo CBII. Ya que siendo cantidad de Ag de ambos compuestos idéntica y su estructura química análoga, la diferencia de actividad es debida a la diferente disposición espacial de la molécula (una es la imagen especular de la otra). Hemos de descartar que, aunque existen estudios que mencionan la posible relación, no hemos encontrado una evidencia concreta de la relación directa entre la estereoisomería de este tipo de compuestos y su actividad antimicrobiana. Asimismo, hemos podido determinar sus mecanismos de acción frente a los patógenos mediante la determinación tanto de las actividades enzimáticas como de las TBARs. Ambos compuestos inducen un proceso de estrés oxidativo bacteriano, más marcado en *E. coli* que en *P. aeruginosa*, sin embargo, únicamente el compuesto CBII, provoca daño a la membrana bacteriana por peroxidación de sus lípidos. Este hecho apoya su mayor eficacia, habiéndose obtenido valores más bajos de CMI y CMB para los patógenos del compuesto CBII, con respecto a su enantiómero. Junto a esto y como se deduce de la microscopía electrónica de barrido, ambos compuestos parecen afectar a la pared bacteriana, dando lugar a células deformadas debido al daño en la pared.

Por otro lado, el nitrato de plata (AgNO_3) es el compuesto de Ag de referencia en clínica por sus propiedades antimicrobianas, por ello decidimos realizar los estudios necesarios que compararan nuestros complejos de plata CVI, CVII; CBI y CBII con él, para así establecer la correspondiente sensibilidad de las cepas Gram negativas estudiadas para poder así establecer una comparativa. La **Tabla 17** refleja los valores de CMI y CMB obtenidos.

Tabla 17: valores de CMI y CMB del AgNO_3 para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

AgNO_3	CMI	CMB
<i>E. coli</i>	0,118 mM	0,236 mM
<i>P. aeruginosa</i>	0,177 mM	0,236 mM

Con respecto a los complejos CVI posee una CMI menor para *P. aeruginosa*, por lo que posee mayor eficacia frente a esta cepa en concreto. Asimismo, en el caso de los dicarboxilatos pudimos observar que mientras que el compuesto CBI posee una CMI menor para *P. aeruginosa* con respecto al AgNO_3 , su enantiómero CBII manifiesta valores de CMI y CMB significativamente menores tanto para *E. coli* como para *P. aeruginosa* en comparación con el AgNO_3 .

Es importante destacar que, aunque en el caso de los complejos de Ag únicamente el complejo CVI mejora en algún aspecto al AgNO_3 , continúan siendo una alternativa válida como posibles antimicrobianos frente a los patógenos Gram negativos testados, puesto que se ha constatado su efectividad. Asimismo, al no considerarse como antibióticos “clásicos”, su estructura química y mecanismos de acción son novedosos para los microorganismos, siendo mucho menos probable el desarrollo de resistencias por parte de estos. Esto mismo es aplicable en el caso de los dicarboxilatos de plata, destacando que son compuestos de nueva síntesis nunca descritos y que además el compuesto CBII supone una mejora muy significativa en la eficacia antimicrobiana con respecto al AgNO_3 .

Una vez constatadas las propiedades antimicrobianas de todos los compuestos se testó su capacidad de inhibición del biofilm. Destacaremos que se trata de uno de los factores de virulencia más relevantes para los patógenos y además está demostrado que las infecciones crónicas relacionadas con biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas con tratamientos antibióticos y producen graves episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido (Lasa et al 2005). Los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido referenciados en la sección 5.3.7, muestran que todos los compuestos de Ag ensayados, tanto los derivados de NHCs como los dicarboxilatos, inhiben por completo la formación del biofilm bacteriano. Asimismo, hemos de destacar que tanto el complejo CVI como los dicarboxilatos han mostrado tener la capacidad de inhibir la formación del biofilm antes de alcanzar la CMI, lo que es un gran valor añadido puesto que favorece en gran medida la eficacia de los compuestos.

En la siguiente **Figura 73**, se muestra, a modo de resumen, los hallazgos de este capítulo de la presente Memoria, en el que se propone un modelo de la actuación de estos complejos de plata como antimicrobianos para bacterias Gram negativas apoyado por los datos experimentales que hemos comentado.

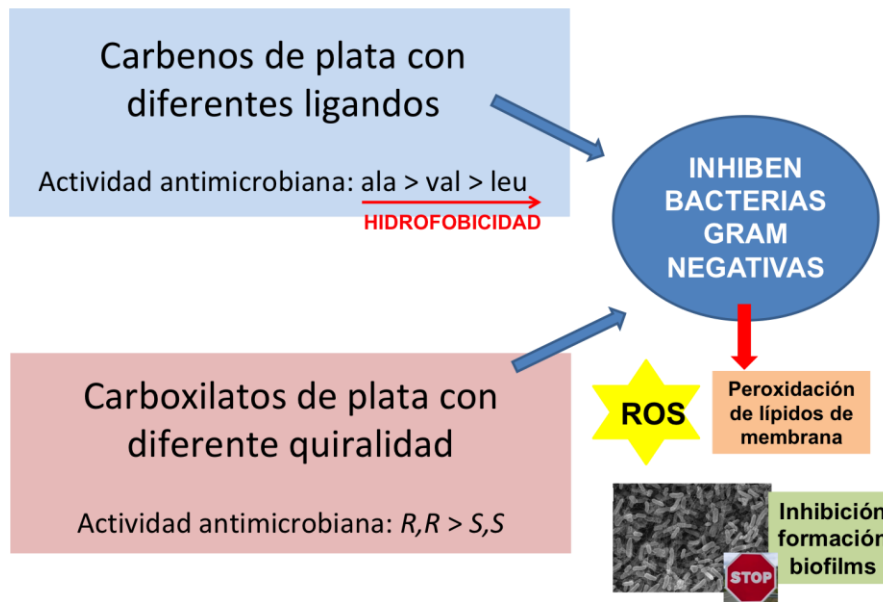


Figura 73: esquema del modelo de actuación de los complejos NHC y carboxilatos de Ag.

En resumen, se han obtenido unos resultados prometedores, manifestando que las entidades químicas aquí estudiadas constituyen una alternativa a la antibioterapia convencional, que son viables y que merecen seguir siendo estudiadas. Asimismo, hemos de destacar que estos complejos han demostrado su eficacia frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, dos de los patógenos Gram negativos responsables de un gran porcentaje de las infecciones nosocomiales tanto en medicina humana como veterinaria con gran impacto en infecciones en clínica y de difícil curación.

7. Conclusiones

En base a los objetivos propuestos podemos concluir:

1. Se han determinado los límites de toxicidad bacteriana por parte de los disolventes orgánicos tanto en cepas Gram positivas como Gram negativas, sentando las bases para los ensayos de toxicidad bacteriana de complejos hidrofóbicos.
2. Se ha llevado a cabo con éxito la síntesis de los dicarboxilatos de Zn CI, CII, CIII y CIV, así como los complejos metal-carbeno de Ag CVI, CVII y CVIII. Asimismo, se han sintetizado *de novo* de tres nuevos compuestos: complejo de carbeno-Pd, CV y los dicarboxilatos de Ag CBI y CBII. Se ha llevado a cabo su caracterización, así como los que ya habían sido descritos en la literatura, en la escala sintética apropiada para llevar a cabo los ensayos biológicos pertinentes.
3. Los estudios de sensibilidad han constatado una notoria capacidad antimicrobiana contra las cepas patógenas Gram negativas *Escherichia Coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por parte tanto de los carbenos de plata como de los dicarboxilatos de Ag, así como su efecto sobre la formación del biofilm bacteriano, importante factor de virulencia.
4. Se han determinado los mecanismos de acción de estos complejos sobre las bacterias, provocando por un lado el daño a la membrana bacteriana mediante la peroxidación de los lípidos de la misma y por otro lado la inducción de estrés oxidativo bacteriano.
5. Finalmente, dentro de los complejos metal-carbeno ensayados (Pd: CV y Ag: CVI, CVII, CVIII), mientras que el primero (CV) no poseía actividad antimicrobiana alguna, para los complejos de Ag CVI, CVII y CVIII hemos podido establecer una relación directa entre la estructura química de los complejos y la capacidad antimicrobiana frente a los microorganismos Gram negativos *E. coli* y *P. aeruginosa*: cuanto más lipófilo es el complejo menor capacidad antimicrobiana posee. En cuanto a los dicarboxilatos sintetizados (Zn: CI, CII, CIII y CIV y Ag: CBI y CBII), mientras que los complejos de Zn no mostraron capacidad antimicrobiana, los complejos de Ag CBI y CBII mostraron notoria actividad frente a las cepas Gram negativas de *E. coli* y *P. aeruginosa* testadas. Asimismo, se ha descrito por primera vez la relación entre la estereoisomería de estos compuestos carboxilato-Ag CBI y CBII y su acción antimicrobiana, siendo más marcada para CBII, considerándose el eutómero.

8. Referencias

1. Afessa, B., Shorr, AF., Anzueto, AR., Craven, DE., Schinner, R., Kollef, H. (2010) Association between a silver-coated endotracheal tube and reduced mortality in patients with ventilator -associated pneumonia. *Chest* 137, 1015–1021.
2. Ahtie-García, M., Piñón-Castillo, HA., Muñoz-Castellanos, LN., Ulloa-Ogaz, AL., Martínez-Valera, PI., Quintero-Ramos, A. et al. (2018). Cell Wall damage and oxidative stress in *Candida albicans* ATCC10231 and *Aspergillus niger* caused by palladium nanoparticles. *Toxicology in vitro*. 42. 111-120.doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.006> .
3. Alexander, J. W. (2009). History of the medical use of silver. *Surgical Infections* 10, 289–292. doi: 10.1089/sur.2008.9941
4. Álvarez, C. Á., & Durán, J. J. T. (2002). Influencia del enantiomorfismo en la solubilidad y velocidad de disolución de distintos fármacos racémicos (Tesis doctoral). Madrid: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
5. Andreini, C., Bertini, I., Rosato, A. (2004). A hint to search for metalloproteins in gene banks. *Bioinformatics* 20, 1373–1380. doi: 10.1093/bioinformatics/bth095
6. Barkay, T., Miller, S. M. & Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*. 27, 355–384. doi:10.1016/S0168-6445(03)00046-9
7. Borkow, G., Gabbay, J. (2009). Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. *Current Chemical Biology* 3, 272–278. doi: 10.2174/2212796810903030272
8. Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7(72), 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.39.
9. Caballero, P., Colodrero, R., Conejo, MM., Pastora, A., Álvarez, E., Montilla, F., Carrasco, CJ., I. Nicasio, AI., Galindo, A. (2020). Homochiral imidazolium-based dicarboxylate compounds: Structure and solution behaviour. *Inorganica Chimica Acta* 513, 119923. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119923>
10. Carrasco, C., Montilla, F., Galindo, A. (2018). Molybdenum-Catalyzed Enantioselective Sulfoxidation Controlled by a Nonclassical Hydrogen Bond between Coordinated Chiral Imidazolium-Based Dicarboxylate and Peroxido Ligands. *Molecules* 23, 1595. doi:10.3390/molecules23071595.
11. Colak, AT., Oztopcu-Vatan, P., Colak, F., Akduman, D., Kabadere, S., Uyar, R. (2013) Syntheses, characterization, antimicrobial and cytotoxic activities of pyridine-2,5-dicarboxylate complexes with 1,10-phenanthroline. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 27: 4, 295-301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.04.005>.
12. Conejero, S. (2009). Carbenos estables con estructura electrónica de tipo singlete: una nueva y excepcional familia de ligandos. *Anales de Química. Real Sociedad Española de Química*. 105(1), 25–32
13. De Melo Carvalho, A. C. L., de Sousa Fonseca, T., de Mattos, M. C., Ferreira de Oliveira, M. C., Gomes de Lemos, T. L., Molinari, F., Romano, D., Serra, I. (2015). Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates.

14. Documentación Límites Exposición Profesional (DLEP) de Diclorometano. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo 2011.
15. Documentación Límites Exposición Profesional (DLEP) de Dimetilsulfóxido. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo 2011.
16. Documentación Límites Exposición Profesional (DLEP) de N,N-dimetilformamida. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo 2011.
17. Documentación Límites Exposición Profesional (DLEP) de Tert-Butil-Metil-Éter. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo 2011.
18. Documentación Límites Exposición Profesional (DLEP) de Tetrahidrofurano. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo 2011.
19. Ehrlich, P., Bertheim, A. (1912). Über das salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-dioxyarsenobenzol und seine nächsten Verwandten. *Berichte Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 45, 756–766.
20. Frazer, A. D., Edin, M.B. (1930). Tellurium in the treatment of syphilis. *Lancet* 216,133–134 (1930).
21. Frei, A., Zuegg, J., Elliott, AG., Baker, M., Braese, S., Brown, C. et al. (2020). *Chemical Science*. 11, 2627–2639. doi: 10.1039/c9sc06460e.
22. Froese, RDJ., Lombardi, C., Pompeo, M., Rucker, RP., Organ, MG. (2017). Designing Pd–N-Heterocyclic Carbene Complexes for High Reactivity and Selectivity for Cross-Coupling Applications. *Accounts of Chemical Research*. 50, 9, 2244–2253.
23. Gordon, O. et al. (2010). Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54, 4208–4218. doi: 10.1128/AAC.01830-09
24. Guo, J., Qian, Y., Sun, B., Sun, Z., Chen, Z., Mao, H., Wang, B., Jiangsu, F.Y. (2019). Key Antibacterial Amino Acid-Based Poly(ionic liquid) Membranes: Effects of Chirality, Chemical Bonding Type, and Application for MRSA Skin Infections. *American Chemistry Society: Applied Bio Materials*. 2, 4418–4426. doi: 10.1021/acsabm.9b00619
25. Harrison, J. J., Ceri, H., Stremick, C., Turner, R. J. (2004). Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology* 6, 1220–1227. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00656.x
26. Hindi KM, Siciliano TJ, Durmus S, Panzner MJ, Medvetz DA, Reddy DV, et al.(2008). Synthesis, Stability, and Antimicrobial Studies of Electronically Tuned Silver Acetate N-Heterocyclic Carbenes. *Journal of Medicinal Chemistry* 27;51(6):1577-83. doi: 10.1021/jm0708679.
27. Hodges, N. D. C. (1889). The value of mercuric chloride as a disinfectant. *Science* 13, 62–64 . doi: 10.1126/science.ns-13.312.62
28. Hohle, T. H., Franck, W. L., Stacey, G., O'Brian, M. R. (2011) Bacterial outer membrane channel for divalent metal ion acquisition. *Proceedings of Natural Academy Sciences. USA* 108,15390–15395. doi: 10.1073/pnas.1110137108.
29. Hong, R., Kang, T. Y., Michels, C. A., Gadura, N. (2012). Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1776–1784. doi: 10.1128/AEM.07068-11.

30. Jahier-Diallo, C.; Morin, M. S. T.; Queval, P.; Rouen, M.; Artur, I.; Querard, P.; Toupet, L.; Crévisy, C.; Baslé, O.; Mauduit, M. (2015). Multicomponent Synthesis of Chiral Bidentate Unsymmetrical Unsaturated N-Heterocyclic Carbenes: Copper-Catalyzed Asymmetric C–C Bond Formation *Chemistry - A European Journal*. 21 (3), 993–997. doi: <https://doi.org/10.1002/chem.201405765>.
31. Kascatan-Nebioglu, A., Panzner, MJ., Tessier, CA., Cannonb, CL., Youngs, WJ. (2007). N-Heterocyclic carbene–silver complexes: A new class of antibiotics. *Coordination Chemistry Reviews* 251, 884–895. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.019
32. Keyes, E. L. (1920). The treatment of gonorrhoea of the male urethra. *JAMA* 75, 1325–1329. doi:10.1001/jama.1920.02620460023008.
33. Kü hl, O., Millinghaus, S., Wehage, P. (2010). Functionalised, chiral imidazolium compounds from proteinogenic amino acids. *Central European Journal of Chemistry* 8, 1223–1226.
34. Lasa, I., del Pozo J. L., Penadés J. R., Leiva J. (2005). Bacterial biofilms and infection. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28, 2.
35. Linley, E., Denyer, S. P., Mc Donnell, G., Simons, C., Maillard, J. Y. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67,1589–1596.
36. Lopez, M. L., Garcia -Gimenez, E., Aguilera, V. M., Alcaraz, A. (2010). Critical assessment of OmpF channel selectivity: merging information from different experimental protocols. *Journal of Physics: Condensed Matter* 22, 454106. doi: 10.1088/0953-8984/22/45/454106.
37. Macomber, L., Rensing, C. & Imlay, J. A. (2007). Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 189, 1616–1626. doi:10.1128/JB.01357-06.
38. Melaiye, A., Simons, RS., Milsted, A., Pignitore, F., Wesdemiotis, C., Tessier, CA., Youngs, W.J. (2004). Formation of water-soluble pincer silver(I)-carbene complexes: a novel antimicrobial agent. *Journal of Medicinal Chemistry* 47 ,973. doi: 10.1021/jm030262m
39. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. MIC testing. (2012). 32, 2. Recuperado de: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-determinacion-de-la-sensibilidad-metodo-de-dilucion-2012.pdf>
40. Morgan, M., El-Sonbati, AZ., El-Mogazy, MA. (2018). *Applied Organometallic Chemistry*. 32:e4264. doi: <https://doi.org/10.1002/aoc.4264>
41. Nicasio, AI., Montilla, F., Álvarez, E., Colodrero, RP., Galindo, A. (2017). Synthesis and structural characterization of homochiral 2D coordination polymers of zinc and copper with conformationally flexible ditopic imidazolium-based dicarboxylate ligands. *Dalton Transactions*, 46, 271. doi: 10.1039/c6dt03712g
42. Nies, DH. (1999). Microbial heavy-metal resistance *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 730–750. doi: <https://doi.org/10.1007/s002530051457>.
43. O’Toole, GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE* 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>, doi:10.3791/2437.
44. Ong, K.S., Cheow, Y.L., Lee, S.M. (2017). The role of reactive oxygen species in the antimicrobial activity of pyochelin. *Journal of Advanced Research*, 8(4), 393–398. doi: 10.1016/j.jare.2017.05.007.

45. Patil S, Deally A, Gleeson B, Müller-Bunz H, Paradisi F, Tacke M.(2011). Novel benzyl-substituted N-heterocyclic carbene-silver acetate complexes: synthesis, cytotoxicity and antibacterial studies. *Metallomics*.3(1):74-88. doi: 10.1039/c0mt00034e.
46. Pereira, J. (1836). *Materia medica, or pharmacology, and general therapeutics. London Medical Gazette* 18, 305–314.
47. Pereira, Y., Lagniel, G., Godat, E., Baudouin-Cornu, P., Junot, C., Labarre, J. (2008). Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicological Sciences*. 106,400–412. doi: 10.1093/toxsci/kfn193.
48. Pivovarov, Arkady S.; Calahorro, Fernando; Walker, Robert J. (2018). «Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors» [La bomba sodio-potasio y los receptores de membrana de neurotransmisores] *Mc viscent* 19 (1): doi:10.1007/s10158-018-0221-7.
49. Qing, Y., Cheng, L., Li, R.,Liu, G.,Zhang,Y.,Tang, X, Wang, J., Liu, H., Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International Journal of Nanomedicine*. 5;13:3311-3327. doi: 10.2147/IJN.S165125.
50. Radošević, K., Čanak I., Panić M., Markov, K., Bubalo, C., Frece, J., Gaurina V., Ivana, S., Redovniković, R. (2018). Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>
51. Ramesh, G., Daravath, S., Ganji, N., Rambabu, A., Venkateswarlu, K., Shivaraj.(2020). *Journal of Molecular Structure* 1202, 127338. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127338>
52. Saranya, J., Suyambulingam JK., Subramanian C., Abdelkader Z., Kulkarni K., Kandikonda L., Bhamidipati R. (2020). *Arabian Journal for Science and Engineering* 45:4683–4695. doi: <https://doi.org/10.1007/s13369-020-04416-7>.
53. Schaefer, J. K. & Morel, F. M. M. (2009). High methylation rates of mercury bound to cysteine by *Geobacter sulfurreducens*. *Nature Geoscience*. 2, 123–126.
54. Sarı, Y., Akkoç, S., Gök, Y., Sifniotis, V., Özdemir, I., Günal, G., Kayser, V. (2016). Benzimidazolium-based novel silver N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, characterisation and in vitro antimicrobial activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31:6, 1527-1530, doi: 10.3109/14756366.2016.1156102.
55. Schue, M., Dover, L. G., Besra, G. S., Parkhill, J., Brown, N. L. (2009). Sequence and analysis of a plasmid-encoded mercury resistance operon from *Mycobacterium marinum* identifies MerH, a new mercuric ion transporter. *J. Bacteriol.* 191, 439–444. doi: 10.1128/JB.01063-08.
56. Sevgi, F., Bagkesici, U., Kursunli, AN., Guler, E. (2018). Fe (III), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of schiff bases based- on glycine and phenylalanine: Synthesis, magnetic/thermal properties and antimicrobial activity. *Journal of Molecular Structure* 1154 256e260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.10.052> .
57. Silver, S., Phung le, T., Silver, G. (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology an Biotechnology* 33, 627–634. doi: 10.1007/s10295-006-0139-7

58. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82. 291-295. doi: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.
59. Sims, J. M. (1852). On the treatment of vesicovaginal fistula. *American Journal of Medical Science* 45, 59–82. doi: 10.1007/BF01901610
60. Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2003). Free radical- mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–218. 10.1007/s00726-003-0011-2
61. Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797–821. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.004053.
62. Tarrieu, R.; Dumas, A.; Thongpaen, J.; Vives, T.; Roisnel, T.; Dorcet, V.; Crévisy, C.; Baslé, O.; Mauduit, M. (2017). *Journal of Organic Chemistry* 82 (4), 1880–1887.
63. Thongpaen, J.; Schmid, T. E.; Toupet, L.; Dorcet, V.; Mauduit, M.; Baslé, O. (2018). Directed *ortho* C–H borylation catalyzed using Cp*Rh(iii)–NHC complexes. *Chemical Communications*. 54 (59), 8202–8205.
64. Thornton, L., Dixit, V., Assad, L., Ribeiro, TP., Queiroz D., Casey, A. et al. (2016). Water-soluble and photo-stable silver(I) dicarboxylate complexes containing 1,10-phenanthroline ligands: Antimicrobial and anticancer chemotherapeutic potential, DNA interactions and antioxidant activity. *Journal of Inorganic Chemistry*. 159, 120-132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.024>.
65. Videla, LA; Fernandez V. (1988.) Biochemical aspects of cellular oxidative stress *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* 21(1):85-92. PMID: 2484970.
66. Vinagreiro CS, Lopes R, Royo B, Da Silva GJ, Pereira MM.(2020) Synthesis of Iron(II)-N-Heterocyclic Carbene Complexes: Paving the Way for a New Class of Antibiotics. *Molecules*. 24;25(12):2917. doi: 10.3390/molecules25122917.
67. Waldron, K.J., Robinson, N. J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Reviews Microbiology*. 7, 25–35. doi: 10.1038/nrmicro2057
68. Warnes, S. L. & Keevil, C. W. (2011). Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6049–6059. doi: 10.1128/AEM.00597-11
69. Warnes, S. L., Caves, V., Keevil, C. W. (2012). Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environmental Microbiology* 14, 1730–1743. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02677.x

9. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales de la presente Tesis Doctoral se enumeran a continuación:

1. El análisis y estudio de los datos de multirresistencia bacteriana han permitido aplicar con éxito, por primera vez en Medicina Veterinaria, un modelo matemático predictivo, en concreto el modelo SIRI, que proporciona la posibilidad de instaurar un tratamiento empírico ante este tipo de infecciones con una probabilidad de éxito superior al 90%, suponiendo una herramienta de gran utilidad y aplicabilidad, extrapolable a otro tipo de microorganismos. La implementación de este tipo de modelos basados en los datos epidemiológicos son una pieza clave para la prevención, control y manejo de patologías infecciosas y que pueden suponer el salvar numerosas vidas y un ahorro de costes en gasto de salud pública muy significativo.
2. Se ha realizado con éxito la síntesis, caracterización y valoración de entidades químicas no catalogadas como antimicrobianos, como alternativa a la antibioterapia convencional basándonos en antecedentes de este tipo de compuestos y su potencial acción en combinación con metales. Hemos podido constatar que los procesos de síntesis han sido eficientes y que los resultados de la caracterización de los compuestos que habían sido previamente descritos concuerdan con la bibliografía publicada al respecto. En aquellos que han sido sintetizados *de novo*, se han obtenido buenos rendimientos y compuestos estables. Asimismo, la evaluación de propiedades antimicrobianas de múltiples compuestos se han basado en la realización de estudios de sensibilidad mediante protocolos estandarizados de carácter cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo, que nos han permitido constatar las propiedades antimicrobianas de algunos de los compuestos ensayados tanto en determinadas cepas Gram positivas como Gram negativas de gran relevancia clínica, mediante la obtención de resultados fiables, comparándose también con otras entidades ya establecidas, demostrando su eficacia y aplicabilidad. Por tanto, tanto 1,4-AF como 4,4'-AD poseen características antimicrobianas frente a microorganismos Gram positivos, concretamente *S. aureus* y *S. pseudintermedius*, siendo más significativamente más notorias en el caso de 4,4'-ADF. Por otro lado, dentro de los complejos metal-carbeno ensayados (Pd: CV y Ag: CVI, CVII y CVIII) pudimos determinar que mientras los primeros no poseían actividad antimicrobiana alguna, los complejos de plata CVI, CVII, CVIII sí, habiendo una relación entre la lipofilia del complejo y su actividad. Cuanto más lipófilo es, se ha observado un descenso en la actividad antimicrobiana. Asimismo, se han testado

dicarboxilatos metálicos de Zn y Ag. Mientras que los primeros carecían de actividad antimicrobiana, los complejos enantiómeros de plata CBI y CBII han mostrado una notoria actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram negativos, en concreto *E. coli* y *P. aeruginosa*, más marcada en CBII, considerándose el eutómero, constatando así una relación ente la esteroisomería y la actividad antimicrobiana. Dado que el mecanismo de resistencia antimicrobiana es adaptativo y es resultado del enfrentamiento o exposición repetida de los microorganismos a los antimicrobianos, el uso de estas entidades químicas no convencionales permitirá evadir estos mecanismos de resistencia y obtener una respuesta eficaz.

3. El diseño de una aplicación terapéutica tópica utilizando un material compuesto ha sido exitosa, permitiendo una opción completamente biocompatible, económica y efectiva frente al género *Staphylococcus*. Dado que estos microorganismos son responsables de gran parte de infecciones cutáneas tanto en personas como en animales, especialmente la especie canina, y además tienen gran capacidad de generar resistencias, ofrecemos una opción terapéutica eficaz. Estos estudios muestran que los compuestos ensayados, especialmente el 4,4'-azodifenol podría ser buena alternativa a la antibioterapia convencional para evitar la aparición de multirresistencias en infecciones por bacterias Gram positivas.
4. La evaluación de la toxicidad bacteriana de ciertos disolventes orgánicos necesarios en los procesos de estudio de estos compuestos ha sido clave para el desarrollo de los experimentos, no habiendo constancia en la bibliografía actual. Por tanto, se ha podido determinar que los microorganismos Gram positivos toleran mejor el TBME y el DMSO, mientras que los Gram negativos lo hacen con DMF y DMSO. Se ha podido constatar que a concentraciones superiores a 1:100 los efectos tóxicos de todos los disolventes son marcados, por lo que se recomienda utilizarlos por debajo de 1:100, siendo ideal utilizarlos a 1:10.
5. Se ha podido dilucidar los diferentes mecanismos de acción de los complejos a nivel microbiano, proporcionando un conocimiento más profundo que ha permitido establecer tanto las características de utilización idóneas de estos compuestos así como los microorganismos contra los que son eficaces de manera específica. Por tanto, los mecanismos de acción hallados han sido, por un lado la peroxidación de los lípidos de la membrana bacteriana mediante la cuantificación del indicador MDA, provocando la pérdida de viabilidad celular y, por tanto, la muerte del microorganismo, y por otro lado la inducción de un proceso de estrés oxidativo en las bacterias por un descenso en la actividad de las enzimas antioxidantes bacterianas, traduciéndose en un daño oxidativo en las

mismas y pérdida de viabilidad. Se ha podido observar que aquellos compuestos con mayor actividad antimicrobiana suelen mostrar ambos mecanismos de acción, mientras que los que poseen menor actividad suelen inducir únicamente uno de ellos. Por tanto, se ha observado que los compuestos 1,4-AF y 4,4'-ADF producen un notorio daño a membrana en Gram positivos, mientras que no producen gran estrés oxidativo. En el caso de los complejos metal-carbeno CVI y CVII producen ambos mecanismos, especialmente la peroxidación de lípidos de membrana. Por otro lado, mientras que el dicarboxilato CBI sí que induce estrés oxidativo, no produce peroxidación de lípidos de membrana, el complejo CBII (determinado como el eutómero) es capaz e inducir ambos mecanismos, volviendo a constatar una relación directa entre la esteroisomería y la actividad antimicrobiana de estos complejos.

6. Finalmente, se ha podido constatar mediante las técnicas de George O'Toole y por SEM, la acción de estos complejos frente a la formación del biofilm. El biofilm es un factor de virulencia clave en patógenos que favorece la resistencia a los antibióticos y la cronificación de las infecciones. Por tanto, el efecto de los compuestos frente a este factor de virulencia supone un hallazgo clave y de gran valía para la aplicabilidad de los mismos. Por tanto, hemos podido comprobar que, en el caso de bacterias Gram positivas, el azocompuesto 4,4'-ADF posee una notoria capacidad contra la formación del biofilm, sobre todo a CMB. Asimismo, para los microorganismos Gram negativos ensayados, los complejos metal-carbeno-Ag CVI y CVII así como los dicarboxilatos CBI y CBII se ha podido observar que ya a CMI poseen una gran capacidad de inhibición de este importante factor de virulencia.

10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DEL PERÍODO DE REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

PUBLICACIONES

Dynamics and numerical simulations to predict empirical antibiotic treatment of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection. López-de-la-Cruz, Javier; Pérez-Aranda, María; Alcudia, Ana; Begines, Belén; Caraballo, Tomás; Pajuelo, Eloísa; Ginel, Pedro J.; *Communication in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 91 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2020.105418>

Environmental Impact of Nanoparticles' Application as an Emerging Technology: A Review. Guillermo Martínez , Manuel Merinero , María Pérez-Aranda , Eva María Pérez-Soriano , Tamara Ortiz , Belén Begines , and Ana Alcudia. *Materials* 2021, 14, 166. doi : <https://doi.org/10.3390/ma14010166>

Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. Belén Begines , Tamara Ortiz, María Pérez-Aranda, Guillermo Martínez, Manuel Merinero, Federico Argüelles-Arias, Ana Alcudia. *Nanomaterials* 2020, 10, 1403; doi:10.3390/nano10071403 (ISSN 2079-4991).

Balance between professional and personal life for women at University. B. Begines, R. Aguilera, M. Pérez-Aranda, C. Rangel, G. Martínez, E. Rodríguez, O. Calvo, R. Recio, E. Benito, V. Valdivia, I. Molina, A. Alcudia, M. Bueno. *Proceedings of ICERI 2018 Conference 12th-14th November 2018, Seville, Spain.* ISBN: 978-84-09-05948-5

Tools for teachers to improve productivity.

R. Aguilera, B. Begines, C. Rangel, M. Pérez-Aranda, G. Martínez, O. Calvillo, E. Rodríguez, E. Benito, V. Valdivia, R. Recio, I. Molina, A. Alcudia, M. Bueno. *Proceedings of ICERI2018 Conference 12th-14th November 2018, Seville, Spain.* ISBN: 978-84-09-05948-5

CAPÍTULOS DE LIBRO

Innovative compounds to battle multiresistance to antibiotics: use of PVA tannic acid nano-particles to inhibit *Saphylococcus pseudintermedius* growth. En: "La investigación de hoy, el futuro de mañana." Editorial Área de Innovación y Desarrollo, S.L. Abril 2020. doi: <https://doi.org/10.17993/IngyTec.2020.61>

Looking for new compounds to battle antibiotic resistance: optimization of organic solvents. En: "La investigación de hoy, el futuro de mañana." Editorial Área de Innovación y Desarrollo, S.L. Abril 2020. doi: <https://doi.org/10.17993/IngyTec.2020.61>

COMUNICACIONES ORALES Y PÓSTERS EN CONGRESOS

"Propiedades antimicrobianas y efectos sobre la formación de biofilm de azocompuestos". María Pérez-Aranda Redondo, Guillermo Martínez Muñoz, Manuel Merinero de los Santos, Belén Begines Ruiz, Ignacio D. Rodríguez Llorente, Eloísa Pajuelo Domínguez, Yadir Torres Hernández, Ana Alcudia Cruz. Póster en VII Jornadas de Investigación, Desarrollo e Innovación. 4 Noviembre 2020. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

"Carbenos metálicos: propiedades antimicrobianas y contra la formación de biofilm de azocompuestos". María Pérez-Aranda Redondo, Guillermo Martínez Muñoz, Adrián Sánchez Hernández, Belén Begines Ruiz, Ignacio D. Rodríguez Llorente, Eloísa Pajuelo Domínguez, Francisco Montilla Ramos, Ana Alcudia Cruz. Póster en VII Jornadas de Investigación, Desarrollo e Innovación. 4 Noviembre 2020. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

"Innovative compounds to battle multiresistance to antibiotics: use of PVA-Tannic acid nanoparticles to inhibit *Staphylococcus pseudintermedius*". Guillermo Martínez, María Pérez-Aranda, Manuel Merinero, Belén Begines, Tamara Ortíz, Salvadora Navarro, Raúl Aguilera- Velázquez, María Jesús Martín, Ignacio Rodríguez, Ana Paula Zaderenko, Ana Alcudia. Póster en VII Jornadas de Investigación, Desarrollo e Innovación. 4 Noviembre 2020. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

"Potencial efecto de nanopartículas y bacterias PGPR sobre la germinación y el desarrollo temprano de plantas de *Medicago sativa*". Manuel Merinero de los Santos, Guillermo Martínez Muñoz, María Pérez-Aranda Redondo, Belén Begines Ruiz, María Jesús Martín Valero, Ignacio D. Rodríguez Llorente, Eloísa Pajuelo Domínguez, Ana Alcudia Cruz. Póster en VII Jornadas de Investigación, Desarrollo e Innovación. 4 Noviembre 2020. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

"Biofortificación de *Triticum aestivum* (trigo) mediante el uso de nanopartículas poliméricas". Manuel Merinero de los Santos, Guillermo Martínez Muñoz, María Pérez-Aranda Redondo, Belén Begines Ruiz, María Jesús Martín Valero, Enrique Materos Naranjo, Ignacio D. Rodríguez Llorente, Eloísa Pajuelo Domínguez, Ana Alcudia Cruz. Póster en VII Jornadas de Investigación, Desarrollo e Innovación. 4 Noviembre 2020. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

“Use of polymeric nanoparticles as an alternative treatment of cutaneous infections caused by *Staphylococcus pseudintermedius*”. María Pérez-Aranda, Eloísa Pajuelo, Belén Begines, Ignacio Rodríguez, Manuel Merinero de los Santos, Guillermo Martínez, Ana Alcudia. Comunicación oral en VI Jornadas de Investigación y Doctorado. 26 Junio 2020. Universidad Católica de Murcia (UCAM)

“Zoonotic pathogens’ tolerance to organic solvents: defining the limits for further investigation”. María Pérez-Aranda, Eloísa Pajuelo, Belén Begines, Ignacio Rodríguez, Manuel Merinero de los Santos, Guillermo Martínez, Ana Alcudia. Póster en VI Jornadas de Investigación y Doctorado. 26 Junio 2020. Universidad Católica de Murcia (UCAM).

“Biofortification of *Medicago sativa* plants through the use of iron loaded nanoparticles”. Manuel Merinero de los Santos; Guillermo Martínez Muñoz; María Pérez-Aranda Redondo; Belén Begines Ruiz; Ana Alcudia Cruz; Eloísa Pajuelo Domínguez; Enrique Mateos Naranjo. Comunicación oral en VI Jornadas de Investigación y Doctorado. 26 Junio 2020. Universidad Católica de Murcia (UCAM).

“Potencial efecto terapéutico del extracto de *Aristolelia chilensis* en la enfermedad de Crohn”. Tamara Ortiz Cerda; Manuel Merinero de los Santos; Guillermo Martínez Muñoz; María Pérez-Aranda Redondo; Belén Begines Ruiz; Ana Alcudia Cruz; Manuel de Miguel Rodríguez. Póster en VI Jornadas de Investigación y Doctorado. 26 Junio 2020. Universidad Católica de Murcia (UCAM).

“Diseño e impresión 3D de nuevas nanopartículas de oro con matriz polimérica biodegradable para su utilización como sensores biomédicos”. Guillermo Martínez Muñoz; Ana Alcudia Cruz; María Pérez-Aranda Redondo; Manuel Merinero de los Santos; Aila Jiménez-Ruiz; Rafael Prado-Gotor; Belén Begines Ruiz. Comunicación oral en VI Jornadas de Investigación y Doctorado. 26 Junio 2020. Universidad Católica de Murcia (UCAM).

“Toxicity of organic solvents in bacteria: settling the bases for further investigation”. María Pérez-Aranda , Ana Alcudia, Belén Begines, Eloísa Pajuelo, Ignacio Rodríguez, Guillermo Martínez, M^a Jesús Martín, Salvadora Navarro, Davide Cofini, Manuel Merinero de los Santos. Comunicación oral en las II Jornadas de Jóvenes Investigadores. Cátedra Bidaforma. Foro Alianza por la Salud. Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. 16 y 17 de enero de 2020.

“Looking for new compounds to battle antibiotic resistance: optimisation of organic solvents” María Pérez-Aranda, Ana Alcudia, Belén Begines, Eloísa Pajuelo, Ignacio Rodríguez, Guillermo Martínez, M. Jesús Martín, Salvadora Navarro, Inmaculada Molina and Manuel Bueno. Póster en VI Young Researches Symposium Organised by the Spanish Society Of Medicinal Chemistry. Madrid, 21st June 2019.

“Innovative compounds to battle multiresistance to antibiotics: use of PVA-Tannic acid nano-articles to inhibit *Staphylococcus pseudintermedius* growth”. María Pérez-Aranda, Ana Alcudia, Belén Begines, Eloísa Pajuelo, Ignacio Rodríguez, Guillermo Martínez, M. Jesús Martín, Salvadora Navarro, Inmaculada Molina and Manuel Bueno. Póster en VI Young Researches Symposium Organised by the Spanish Society Of Medicinal Chemistry. Madrid, 21st June 2019.

“Uso del mindfulness como técnica de mejora del rendimiento laboral y bienestar del personal docente”. María Pérez-Aranda, Guillermo Martínez, Belén Begines, Ana Alcudia*. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Comunicación oral en VI jornadas de Innovación Docente. Facultad de Ciencias de la Educación de Sevilla. Noviembre de 2018.

OTROS

Finalista del concurso de divulgación científica para doctorandos “Tu Tesis en 3 minutos” celebrado en el Pabellón de México el día 27 de noviembre de 2020.