

Universidad de Burgos

Facultad de Ciencias

Área de Tecnología de los Alimentos

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos



# **Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de compuestos a base de platino y paladio**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Dirigido y tutorizado por

Ana María Díez Maté y Beatriz Melero Gil

Memoria presentada por

Verónica Romero Agud

Marzo, 2018



## AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DE TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN: Ciencia y Tecnología de los Alimentos

CURSO: 2017 - 2018

Dña. Ana María Diez Maté y Beatriz Melero Gil informan de que la alumna Dña. Verónica Romero Agud ha realizado el trabajo "Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de compuestos a base de platino y paladio", bajo su tutela, y considera que la memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO \*

(\*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 19 de Marzo de 2018

Fdo.: Ana María Diez Maté y Beatriz Melero Gil

## ARCHIVO DE LA MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Verónica Romero Agud, Ana María Diez Maté y Beatriz Melero Gil, autora y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto

Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 19 de Marzo de 2018

Fdo.: Verónica Romero Agud

Fdo.: Ana María Diez Maté

Fdo.: Beatriz Melero Gil



## Índice

<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>3</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Estudio de la actividad antimicrobiana</b>	<b>4</b>
<b>3.2 Estudio de la concentración mínima inhibitoria</b>	<b>7</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>7</b>
<b>5. Discusión de los resultados</b>	<b>15</b>
<b>6. Conclusions</b>	<b>18</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>19</b>



## 1. Introduction

Food safety has been a major concern to consumers, including the food industry and regulatory authorities. The widespread knowledge on quality food information have persisted consumers for safer and higher quality food products [1].

Health risks associated with microbial contamination continues to be one of the main public and governmental concerns as to food consumption and food packaging. Despite the evident progress in health risk assessment throughout manufacture, transport and commercialization of food products, the incidence of foodborne illnesses in developed countries has not waned in the last decades [2]. In the United States, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* appear as the main causes of food poisoning with around 76 million cases estimated annually [3]. In addition, human norovirus and *Salmonella* have been listed in the top 5 highest-ranking pathogens with respect to the total cost of foodborne illness in the United States [4].

In 2016, in the European Union (EU), a total of 4,786 food-borne outbreaks, including waterborne outbreaks, were reported. *Salmonella* was the most commonly detected causative agent – with one out of six outbreaks due to *S. Enteritidis* – followed by other bacteria, bacterial toxins and viruses. *Salmonella* in eggs continued to represent the highest risk agent/food combination. Campylobacteriosis was the most commonly reported zoonosis, as it had been since 2005, representing almost 70 % of all the reported cases, and the increasing EU trend for confirmed human cases since 2008 stabilised during 2012–2016. In food, the occurrence of *Campylobacter* remained highly associated with broiler meat. The decreasing EU trend for confirmed human salmonellosis cases since 2008 ended during 2012–2016, and the proportion of human *S. Enteritidis* cases increased. The number of human listeriosis confirmed cases increased in 2016, 2,536 confirmed invasive human cases, despite the fact that *Listeria* seldom exceeds the EU food safety limit in ready-to-eat foods. There has been a statistically significant increasing trend of confirmed listeriosis cases in the EU/EEA (European Economic Area) during the overall period 2008–2016. There have been 6,861 confirmed cases of yersiniosis in 2016, making it the third most commonly reported zoonosis in the EU. In 2016 6,378 confirmed cases of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections were reported in the EU which was an 8.3% increase compared with 2015 [5].

The most common foodborne pathogens are: *Bacillus cereus*, a thermophilic bacteria, is associated with cooked rice, cakes and pasta. *Campylobacter jejuni* is found in raw or undercooked meat, *Clostridium botulinum* in preserved food, *Escherichia coli* in fresh food, milk or meat. *Staphylococcus aureus* is connected with high protein food like cooked ham, *Listeria monocytogenes* in ready to eat products, *Salmonella* spp. mainly in eggs, *Shigella sonnei* mostly associated with water-borne outbreaks, and *Yersinia enterocolitica* that can be found in raw food and contaminated cooked food [6].

One explanation for the high incidence of food-borne illness in developed countries may be the current growing consumer demands for minimally processed ‘fresh’ food products, which may allow proliferation and persistence of pathogenic organisms. Therefore, alternative technologies such as lower thermal or high hydrostatic pressure, or other treatments combined with or without the assistance of milder thermal treatments are being considered. The reduction of conventional aggressive thermal treatments could, however, result in inefficient elimination

of pathogens. Moreover, even if foodborne pathogens are totally eliminated by efficient thermal treatments, microbial recontamination of the food surface could take place during post-processing steps. As a result of the above, a reduction of food shelf-life and the risk of foodborne illnesses are consequently increasing. In this context, combination of new hurdle technologies with antimicrobial packaging can result in shelf-life extension and foods with improved quality and safety characteristics [7].

Another problem caused by microbial contamination is food spoilage, any sensory change which the consumer may consider to be unacceptable. Spoiled foods may be safe to eat (they may not cause illness because there are no pathogens or a toxin present) but changes in texture, smell, taste, or appearance cause them to be rejected. Spoilage microbes are often common inhabitants of soil, water, intestinal tracts of animals and may be dispersed through the air and water and by the activities of small animals, particularly insects. *Clostridium* spp. causes putrefaction of canned products, early blowing of cheese and butyric acid production in canned vegetables and fruits. Lactic acid bacteria (LAB) are a group of grampositive bacteria including species of *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella viridescens*. Some of which are useful in producing fermented foods such as yogurt and pickles. However, under low oxygen, low temperature and acidic conditions, these bacteria become the predominant spoilage organisms on a variety of foods. Undesirable changes caused by LAB include greening of meat and gas formation in cheese, pickles and canned or packaged meat and vegetables. Off-flavors described as mousy, cheesy, malty, acidic, buttery or liver-like may be detected in wine, meats, milk or juices spoiled by these bacteria. LAB may also produce large amounts of an exopolysaccharide that causes slime on meats and ropy spoilage in some beverages. *Brochothrix thermosphacta* is associated with spoilage of chilled, high protein foods such as meat, fish and dairy products. They may not be the predominant spoilage organisms but contribute to the breakdown of food components and may produce off-odors [8].

Simultaneously with the rapid development of a wide range of antibacterial agents since the 1940s, bacteria have proved extremely adept at developing resistance to each new employed agent. The rapidly increasing incidence of bacterial resistance to antimicrobial agents has become a serious problem worldwide. Resistance mechanisms have been identified and described for all known antibiotics currently available for clinical use. The synthesis and evaluation of the biological activity of the new metal-based compounds is the field of growing interest. Numerous complexes based on palladium(II) and platina(IV)-ion have been synthesized and their different biological activities have been documented. The impact of different palladium and platinum complexes on the growth and metabolism of various groups of microorganisms has been studied. Garoufis et al. (2009) reviewed numerous scientific papers on anti-viral, antibacterial and antifungal activity of palladium(II) complexes with different types of ligands (sulfur and nitrogen donor ligands, Schiff base ligands and drugs as ligands) [9].

## 2. Objetivos

### **Objetivo general:**

- Estudiar el efecto antimicrobiano de distintos compuestos inorgánicos a base de platino y paladio y establecer su concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a microorganismos alterantes de alimentos y patógenos de interés alimentario.

### **Objetivos específicos:**

- Fase 1: Estudio del efecto antimicrobiano de los compuestos para seleccionar los que tienen acción inhibitoria.
- Fase 2: Determinar la concentración mínima inhibitoria de los compuestos seleccionados en la fase 1.

### 3. Material y métodos

#### 3.1 Estudio de la actividad antimicrobiana

Para la primera fase del ensayo contamos con 14 compuestos a base de paladio y platino preparados por el área de Química Inorgánica de la UBU y preparados a una concentración de 1 mg/ml en DMSO (ver tabla 1).

Tabla 1. Compuestos usados para el ensayo de actividad antimicrobiana			
NOMBRE	FÓRMULA	PESO MOLECULAR (g/mol)	SOLUBILIDAD
Lm1b	$\text{PtCl}_2(\text{PTA})_2$	580,29	Agua, DMSO
Lm4e	$\text{PtCl}_2(\text{DAPTA})_2$	724,426	Agua, DMSO
SFA 17.1	$\text{PdCl}_2(\text{PTA})_2$	491,326	Agua, DMSO
Lm8	$\text{PdCl}_2(\text{DAPTA})_2$	635,766	Agua, DMSO
SFA 04.1	$\text{Pt}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$	729,68	Agua, DMSO
SFA 19.1	$\text{Pt}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$	731,66	Agua, DMSO
Lm10	$\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$	641,036	Agua, DMSO
GAAS9-d	$\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$	643,01	Agua, DMSO
Lm6d	$\text{Pt}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$	873,68	Agua, DMSO
Lm5	$\text{Pt}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$	875,8	Agua, DMSO
Lm12	$\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$	787,156	Agua, DMSO
Lm11	$\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$	785,06	Agua, DMSO
Lm16B	$\text{Pd}(\text{C}_{26}\text{H}_{10}\text{N}_8\text{O}_6\text{P}_2\text{S}_4\text{Na}_2)\text{Cl}_2$	974,15	Agua, DMSO
Lm17-2B	$\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_3\text{S}_2\text{Na}$	241,26	Agua, DMSO
$\text{AgNO}_3$	$\text{AgNO}_3$	169,87	Agua, DMSO
PTA = $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3\text{P}$ ; DAPTA = $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$ ; DMSO = $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ; 2-mercaptopiridina = $\text{C}_5\text{H}_5\text{SN}$ ; 2-mercaptopirimidina = $\text{C}_4\text{H}_4\text{SN}_2$			

Los 4 primeros compuestos que aparecen en la tabla 1 son los precursores. Los precursores son los compuestos a partir de los que se prepararon los derivados con las piridinas. En este estudio se han incluido tanto los cuatro derivados halogenados como los mercaptanos que se han preparado a partir de ellos.

Se comprobó el efecto antimicrobiano de dichos compuestos, así como de dos controles positivos  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaClO}$  (lejía) y un control negativo con DMSO (disolvente), frente a 14 bacterias de distintas especies (ver tabla 2). Se seleccionaron dichas bacterias entre especies grampositivas y gramnegativas, alterantes y patógenas, aerobias y anaerobias (ver tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las bacterias seleccionadas				
Microorganismo	Identificación de las cepas	Gram	Respiración	Clasificación
<i>Salmonella</i>	CECT 132	Negativa	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 3241	Negativa	Aerobia	Patógeno
<i>Escherichia coli</i>	CECT 501	Negativa	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 457	Negativa	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 559	Negativa	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Campylobacter jejuni</i>	CECT 7572	Negativa	Microaerófilo	Patógeno
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376	Positiva	Anaerobio	Patógeno
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 30	Positiva	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	Positiva	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ILSI-4	Positiva	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Bacillus cereus</i>	CECT 148	Positiva	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	CECT 847	Positiva	Anaerobia facultativa	Alterante
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CECT 394	Positiva	Anaerobia facultativa	Alterante
<i>Weissella viridescens</i>	CECT 283	Positiva	Anaerobia facultativa	Alterante

CECT = colección española de cultivos; ILSI = International life Sciences Institute

Dichas bacterias forman parte de la colección del área de Tecnología de los Alimentos las cuales se encuentran congeladas a -70 °C, y conservadas en sus caldos correspondientes y un 20 % de glicerol (Fisher chemical) como crioprotector y provienen de la colección española de cultivos tipo (CECT) y del International life Sciences Institute (ILSI). Para la revivificación de las bacterias congeladas se sembraron en estría en placas Petri sobre el agar correspondiente a su crecimiento (ver tabla 3) y se incubaron durante 48 horas a la temperatura adecuada para cada una. Las bacterias ácido lácticas (*Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridescens*) fueron sembradas en agar MRS (Oxoid) *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Brochothrix thermosphacta* se sembraron en TSA (Scharlau sentmetan) + levadura 0,6% (Pronadisa). *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* en agar Nutrient (Oxoid) + sangre 0,5% desfibrinada de oveja (Thermo scientific). Además del agar sangre, estas dos bacterias precisaron de una incubación con atmosferas especiales, para *Clostridium perfringens* es necesaria una atmosfera anaerobia por lo que se introdujeron las placas en jarras de anaerobiosis con bolsas generadoras de anaerobiosis, AnaeroGen™ (AN0025, Oxoid). *Campylobacter jejuni* es un microorganismo microaerófilo cuyos requerimientos de atmósfera son 85% N<sub>2</sub>; 5% O<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>. Para ello se procedió de igual forma que con *Clostridium perfringens* pero incubando en presencia de sobres CampyGen™ (CN0025, Oxoid). El resto de

microorganismos se sembró en TSA (Scharlau sentmetan). El agar de crecimiento Muller Hinton (Scharlau sentmetan) los caldos BHI y MRS broth (Oxoid) y el caldo TSB es marca Merk.

Tabla 3. Resumen materiales y preparación de microorganismos

Microorganismo	Agar: Ensayo	Caldo o/n	Agar: Crecimiento	Temperatura incubación (°C)	Tiempo incubación (h)	8 log UFC/ml (DO 610 nm)
<i>Salmonella</i>	Muller Hinton	TSB	TSA	37	24	0,2
<i>Pseudomonas putida</i>	Muller Hinton	TSB	TSA	30	24	0,2
<i>Escherichia coli</i>	Muller Hinton	BHI	TSA	37	24	0,2
<i>Shigella sonnei</i>	Muller Hinton	TSB	TSA	37	24	0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Muller Hinton	TSB	TSA	37	24	0,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	Muller Hinton	BHI	TSA	37	24	0,5
<i>Listeria innocua</i>	Muller Hinton	BHI	TSA+levadura 0,6%	37	24	0,125
<i>Listeria monocytogenes</i>	Muller Hinton	BHI	TSA+levadura 0,6%	37	24	0,125
<i>Bacillus cereus</i>	Muller Hinton	BHI	TSA	30	24	0,7
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Muller Hinton	TSB+levadura 0,6%	TSA+levadura 0,6%	26	24	0,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MRS	MRS broth	MRS	30	24	0,3
<i>Weissella viridescens</i>	MRS	MRS broth	MRS	30	24	0,3
<i>Campylobacter jejuni</i>	Nutrien+sangre 0,5%	BHI	Nutrien+sangre 0,5%	42	24	-
<i>Clostridium perfringens</i>	Nutrien+sangre 0,5%	BHI	Nutrien+sangre 0,5%	37	24	0,2

DO = Densidad óptica. (-) *Campylobacter jejuni* no se puede ajustar la densidad óptica debido a que este microorganismo no produce turbidez durante su crecimiento en caldo.

Tras 48 horas en incubación cada una a su temperatura requerida (ver tabla 3) se seleccionó una colonia típica y se traspasó a un caldo de crecimiento que se incubó durante 24 horas para obtener un inóculo en condiciones óptimas.

A continuación, fue necesario ajustar la densidad óptica del caldo de cultivo incubado tras 24 horas para que al sembrarlo en placa se obtengan siempre 8 log UFC/ml para todas las bacterias. Para ello se mide la turbidez del inóculo en un espectrofotómetro (modelo U-1900 Hitachi, Japan) a una longitud de onda de 610 nm y a continuación se realiza la dilución con el caldo de cultivo usado para el crecimiento correspondiente hasta la densidad óptica ajustada para cada especie bacteriana (ver tabla 3). Para *Campylobacter jejuni* no se puede ajustar la densidad óptica debido a que este microorganismo no produce turbidez durante su crecimiento en caldo. Después de varios ensayos se tiene el conocimiento de que después de 24 horas en caldo la población bacteriana es de 8 log UFC/ml.

Tras realizar la dilución para ajustar la concentración de los inóculos a 8 log UFC/ml, se sembraron 250 microlitros de cada cultivo por extensión con la ayuda de un asa Drigalsky en las placas Petri de 150 mm con el agar correspondiente. Se dejaron secar durante 15 minutos.

Una vez secas las placas, se usó el método estándar de difusión en pocillos de agar para la determinación de la eficacia antibacteriana [1]. Se procedió a realizar unos pocillos con la parte posterior de una pipeta de cristal esterilizada en estufa Pasteur. En cada pocillo se introdujeron 40 microlitros de los compuestos a estudiar a base de platino y paladio con el fin de ver su posible efecto inhibitorio (ver tabla 1).

Las placas se incubaron durante 24 horas cada una a su temperatura requerida (ver tabla 3), y con las condiciones de atmosfera requeridas. Pasado este tiempo se procedió a la medida del halo de inhibición (cm).

El proceso descrito se realizó por triplicado.

### 3.2 Estudio de la concentración mínima inhibitoria

Para esta segunda fase del estudio se procedió de igual manera al de la primera pero solo se realizó con los compuestos que se comprobaron eficaces contra la mayoría microorganismos a la concentración de 1 mg/ml en DMSO. Para hallar la concentración mínima inhibitoria se realizaron 5 diluciones 1:2 a partir de la solución original de 1 mg/ml de cada compuesto hasta llegar a la dilución 0,03125 mg/ml. Para ello se usaron eppendorf de 1,5 ml que se rellenaron con 500 microlitros de DMSO (disolvente) y 500 microlitros de la dilución anterior del compuesto. También se realizó la CMI de los controles DMSO y AgNO<sub>3</sub>. El DMSO al ser el control negativo solo se realizó con la concentración de 1 mg/ml sin diluir. Para el AgNO<sub>3</sub> se realizaron 8 diluciones 1:2 a partir de la solución original de 1 mg/ml con agua como solvente hasta llegar a la concentración 0,00391 mg/ml. Se usó el método estándar de difusión en pocillos de agar para la determinación de la CMI [1]. Para ello se procedió de igual manera que en el apartado 3.1, se realizaron pocillos en las placas de agar con una pipeta de cristal esterilizada en estufa Pasteur y se introdujeron en los pocillos 40 microlitros de las diluciones correspondientes, así como de la concentración original de 1 mg/ml.

Se repitió el proceso 3 veces para hallar la concentración mínima inhibitoria. Se determinó que el CMI fuera la concentración más baja que mostrara un resultado positivo en las 3 réplicas. Las bacterias fueron seleccionadas en función del diámetro de la zona de inhibición, se consideró [10]:

- Diámetro de la zona de inhibición > 1,9 cm – actividad antimicrobiana fuerte
- Diámetro de la zona de inhibición 1,3-1,9 cm – actividad antimicrobiana media
- Diámetro de la zona de inhibición < 1,3 cm – actividad antimicrobiana débil

## 4. Resultados

Los resultados obtenidos del ensayo de actividad antimicrobiana se encuentran recogidos en las tablas 4, 5 y 6, donde se pueden observar el diámetro de los halos de inhibición obtenidos en centímetros. Destacados se encuentran los valores que dieron una inhibición positiva en las tres réplicas.

Los 4 primeros compuestos Lm1b ( $\text{PtCl}_2(\text{PTA})_2$ ); Lm4e ( $\text{PtCl}_2(\text{DAPTA})_2$ ); SFA 17.1 ( $\text{PdCl}_2(\text{PTA})_2$ ) y Lm8 ( $\text{PdCl}_2(\text{DAPTA})_2$ ) pertenecientes a los precursores, no muestran ninguna actividad relevante antimicrobiana.

En las bacterias gramnegativas estudiadas no se observó inhibición en ninguna de las réplicas por parte de ninguno de los compuestos. En el caso de *Campylobacter jejuni*, bacteria gramnegativa, hubo inhibición en solo una de las tres réplicas. *Clostridium perfringens*, bacteria grampositiva anaerobia, dio resultados similares a los de *Campylobacter jejuni*, observándose inhibición solo en una de las tres réplicas. Se observó un efecto inhibitorio de los compuestos más efectivo en las bacterias grampositivas, donde se obtuvieron halos con tamaños mayores a 1 centímetro y resultados positivos en las tres réplicas con algunos de los compuestos.

En los compuestos LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ), LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ), LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) y GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) se obtienen los halos más grandes y resultados positivos de inhibición en las tres réplicas con más frecuencia que en el resto de compuestos frente a las bacterias grampositivas. Sin embargo, cabe destacar que el compuesto LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ), solo presentó actividad inhibitoria en 2 de las 3 réplicas para *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*.

Se usaron  $\text{AgNO}_3$  (plata) y  $\text{NaClO}$  (lejía) como controles positivos de inhibición y DMSO como control negativo para mostrar que no es el disolvente el agente con efecto inhibitorio. Según los resultados obtenidos, se confirma que el DMSO no presenta efecto inhibitorio frente a las bacterias estudiadas, sin embargo, los controles positivos, ambos presentan actividad frente a las mismas bacterias, pero tiene más efecto la lejía. Cabe destacar que *Campylobacter jejuni* es resistente a dichos controles para la concentración de 1 mg/ml.

Tras la primera fase de estudio se seleccionan los compuestos LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ), LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ), LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) y GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) para determinar su concentración mínima inhibitoria son frente a las bacterias grampositivas aerobias (se excluye a *Clostridium perfringens*). Como se puede observar en las tablas 4, 5 y 6 y se ha comentado anteriormente estos compuestos fueron los más efectivos para seguir con el estudio.

Tabla 4. Resultados del diámetros de los halos de inhibición en cm para gramnegativas						
Extractos	Microorganismos					
1 mg/ml	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
Lm1c	x	x	x	x	x	x
Lm4e	x	x	x	x	x	x
SFA 17.1	x	x	x	x	x	x
Lm8	x	x	x	x	x	x
Lm3c	x	x	x	x	x	x
SFA 19.1	x	x	x	x	x	x
Lm10	x	x	x	x	x	x
GAAS9-D	x	x	x	x	x	x
Lm6d	x	x	x	x	x	x
Lm5	x	x	x	x	x	x
Lm12	x	x	x	x	x	x
Lm11	x	x	x	x	x	x
Lm16b	x	x	x	x	x	x
Lm17-2b	x	x	x	x	x	x
AgNO3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,4	1,0 ± 0,1	x
DMSO	x	x	x	x	x	x
NaClO	1,4 ± 0,1	1,6 ± 1,2	1,8 ± 0,7	1,5 ± 0,6	3,1 ± 0,6	x

El ensayo se realizó por triplicado, en la tabla se muestran los valores medios con su desviación estándar. La x representa la ausencia de inhibición. El tamaño del pocillo es de 0,5 cm.

Tabla 5. Resultados del diámetros de los halos de inhibición en cm para grampositivas patógenas					
Extractos	Microorganismos				
1 mg/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Lm1c	x	x	x	x	x
Lm4e	x	x	x	x	x
SFA 17.1	x	x	x	x	x
Lm8	x	x	x	x	x
Lm3c	0,9 ± 0,8	0,7 ± 0,6	0,6 ± 0,7	0,8 ± 0,1	x
SFA 19.1	1,1 ± 0,3	x	x	x	x
Lm10	1,1 ± 0,9	1,2 ± 0,3	x	0,7 ± 0,7	x
GAAS9-D	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,9 ± 0,3	1,1 ± 0,0	x
Lm6d	1,3 ± 0,2	x	x	1,0 ± 0,1	x
Lm5	x	x	x	x	x
Lm12	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,1	x
Lm11	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,6	0,6 ± 0,8	0,6 ± 0,6	x
Lm16b	x	x	x	x	x
Lm17-2b	x	x	x	x	x
AgNO3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2
DMSO	x	x	x	x	x
NaClO	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	2,6 ± 1,3	1,5 ± 0,6

El ensayo se realizó por triplicado, en la tabla se muestran los valores medios con su desviación estándar. La x representa la ausencia de inhibición. El tamaño del pocillo es de 0,5 cm. Los recuadros señalados son los que mostraron un resultado positivo en los 3 ensayos realizados. En el caso de *Listeria monocytogenes* ocurrió una contaminación en uno de los ensayos, los valores obtenidos corresponden a dos

Tabla 6. Resultados del diámetros de los halos de inhibición en cm para grampositivas alterantes.			
Extractos	Microorganismos		
	<i>Brochothrix thermosphact</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Weissella viridescens</i>
Lm1c	x	0,6 ± 0,6	x
Lm4e	x	x	x
SFA 17.1	x	1,0 ± 0,1	x
Lm8	x	x	x
Lm3c	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,7	0,6 ± 0,6
SFA 19.1	x	1,5 ± 0,2	x
Lm10	1,3 ± 0,2	1,2 ± 1,0	1,3 ± 0,2
GAAS9-D	1,4 ± 0,3	2,1 ± 0,0	1,6 ± 0,1
Lm6d	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,1	x
Lm5	x	x	x
Lm12	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1
Lm11	x	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Lm16b	x	x	x
Lm17-2b	x	x	x
AgNO3	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,0
DMSO	x	x	x
NaClO	2,6 ± 1,3	3,3 ± 0,3	3,0 ± 0,1
El ensayo se realizó por triplicado, en la tabla se muestran los valores medios con su desviación estándar. La x representa la ausencia de inhibición. El tamaño del pocillo es de 0,5 cm. Los recuadros señalados son los que mostraron un resultado positivo en los 3 ensayos			

Un resumen de todos los resultados de la segunda fase del estudio se recoge en la tabla 7. Se muestran los valores medios del diámetro de los halos de inhibición en centímetros tras realizar las 3 réplicas y su desviación estándar. Los cuadros marcados se corresponden a lo que se ha considerado la concentración mínima inhibitoria tras dar resultado positivo en los 3 ensayos.

En la tabla 8 se muestran los resultados del estudio de concentración mínima inhibitoria del control positivo, nitrato de plata, tras 4 réplicas y su desviación estándar

En la discusión de los resultados se comentan en profundidad los datos obtenidos.

Tabla 7. Resultados del diámetro de los halos en cm. Estudio de la concentración mínima inhibitoria.

Extractos	Microorganismos						
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Weissella viridescens</i>
LM10 1 mg/ml	1,3±0,2	1,2±0,1	1,4±0,1	0,8±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,5±0,2
LM10 0,5 mg/ml	x	x	1,1±0,2	x	1,1±0,0	1,2±0,1	1,0±0,1
LM10 0,25 mg/ml	x	x	x	x	x	0,7±0,6	1,2±0,6
LM10 0,125 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM10 0,0625 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM10 0,03125 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM11 1 mg/ml	1,1±0,0	x	x	x	x	1,9±0,5	0,8±0,7
LM11 0,5 mg/ml	x	x	x	x	x	1,3±0,3	x
LM11 0,25 mg/ml	x	x	x	x	x	1,1±0,4	x
LM11 0,125 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM11 0,0625 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM11 0,03125 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM12 1 mg/ml	1,4±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	0,6±0,6	1,2±0,1	1,5±0,3	1,3±0,1
LM12 0,5 mg/ml	0,7±0,6	0,6±0,6	0,6±0,6	x	x	1,3±0,0	1,0±0,1
LM12 0,25 mg/ml	0,6±0,5	x	x	x	x	1,0±0,1	x
LM12 0,125 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM12 0,0625 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
LM12 0,03125 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x
GAAS9-D 1 mg/ml	1,8±0,1	1,8±0,1	1,8±0,1	1,1±0,3	1,4±0,1	1,7±0,2	1,8±0,1
GAAS9-D 0,5 mg/ml	1,2±0,3	1,5±0,0	1,4±0,2	0,8±0,1	0,7±0,6	1,5±0,3	1,5±0,0
GAAS9-D 0,25 mg/ml	x	0,7±0,6	0,9±0,8	x	x	1,4±0,3	1,2±0,3
GAAS9-D 0,125 mg/ml	x	x	x	x	x	1,1±0,3	1,0±0,2
GAAS9-D 0,0625 mg/ml	x	x	x	x	x	0,6±0,5	x
GAAS9-D 0,03125 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x

El ensayo se realizó por triplicado, en la tabla se muestran los valores medios con su desviación estándar. La x representa la ausencia de inhibición. El tamaño del pocillo es de 0,5 cm. Los recuadros señalados son los que mostraron un resultado positivo en los 3 ensayos realizados y se corresponden con la concentración mínima inhibitoria.

Tabla 8. Resultados del diámetro de los halos en cm. Estudio de la concentración mínima inhibitoria.

CONTROLES	MICROORGANISMOS						
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Weissella viridescens</i>
AgNO3 1 mg/ml	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2
AgNO3 0,5 mg/ml	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
AgNO3 0,25 mg/ml	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
AgNO3 0,125 mg/ml	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,5	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
AgNO3 0,0625 mg/ml	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,4
AgNO3 0,03125 mg/ml	0,5 ± 0,6	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,7	0,9 ± 0,1	x	x	x
*AgNO3 0,015625 mg/ml	0,8 ± 0,0	x	x	0,7 ± 0,0	x	x	x
*AgNO3 0,00781 mg/ml		x	x	x	x		
*AgNO3 0,00391 mg/ml		x	x	x	x		
DMSO 1 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x

El ensayo se realizó por cuadruplicado, en la tabla se muestran los valores medios con su desviación estándar. La x representa la ausencia de inhibición. El tamaño del pocillo es de 0,5 cm. Los recuadros señalados son los que mostraron un resultado positivo en los 3 ensayos realizados y se corresponden con la concentración mínima inhibitoria. Los recuadros en gris muestran ensayos que no se realizaron. El asterisco indica que estos ensayos solo se realizaron por duplicado.

En la tabla 9 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias para *Staphylococcus aureus* para cada compuesto. La concentración más efectiva para inhibir el crecimiento se corresponde con 0,5 mg/ml del compuesto GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ). Para el resto de compuestos la concentración mínima inhibitoria se corresponde con 1 mg/ml.

Compuesto	Concentración	Diámetro del halo en cm (tamaño pocillo 0,5 cm)
LM10	1 mg/ml	1,3±0,2
LM11	1 mg/ml	1,1±0,0
LM12	1 mg/ml	1,4±0,1
GAAS9-d	0,5 mg/ml	1,2±0,3

En la tabla 10 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias para *Listeria innocua* para cada compuesto. La concentración más efectiva para inhibir el crecimiento se corresponde con 0,5 mg/ml del compuesto GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ). El compuesto LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ) no tiene efecto inhibitorio para esta especie microbiana y las dos que se explican a continuación, esto podría confirmar su falta de efecto antimicrobiano. Para el resto de compuestos la concentración mínima inhibitoria se corresponde con 1 mg/ml.

Compuesto	Concentración	Diámetro del halo en cm (tamaño pocillo 0,5 cm)
LM10	1 mg/ml	1,2±0,1
LM11	1 mg/ml	x
LM12	1 mg/ml	1,2±0,1
GAAS9-d	0,5 mg/ml	1,5±0,0

En la tabla 11 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias para *Listeria monocytogenes* para cada compuesto. La concentración más efectiva para inhibir el crecimiento se corresponde con 0,5 mg/ml de los compuestos LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ) y GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ). El compuesto LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ) no tiene efecto inhibitorio tal como se ha explicado anteriormente. Para el resto de compuestos la concentración mínima inhibitoria se corresponde con 1 mg/ml.

<i>monocytogenes</i>		
Compuesto	Concentración	Diámetro del halo en cm (tamaño pocillo 0,5 cm)
LM10	0,5 mg/ml	1,1±0,2
LM11	1 mg/ml	x
LM12	1 mg/ml	1,3±0,1
GAAS9-d	0,5 mg/ml	1,4±0,2

En la tabla 12 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias para *Bacillus cereus* para cada compuesto. La concentración más baja efectiva para inhibir el crecimiento se corresponde una vez más a la del compuesto GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) con una concentración de 0,5 mg/ml. Los compuestos LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ) y LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) no tienen efecto inhibitorio, sin embargo, en el primer ensayo LM12 mostro ser efectivo contra *Bacillus cereus* en las tres réplicas. Para LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ) la concentración mínima inhibitoria se corresponde con 1 mg/ml.

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria para <i>Bacillus cereus</i>		
Compuesto	Concentración	Diámetro del halo en cm (tamaño pocillo 0,5 cm)
LM10	1 mg/ml	0,8±0,1
LM11	1 mg/ml	x
LM12	1 mg/ml	x
GAAS9-d	0,5 mg/ml	0,8±0,1

En la tabla 13 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias para *Leuconostoc mesenteroides* para cada compuesto. La concentración más efectiva para inhibir el crecimiento se corresponde con 0,125 mg/ml del compuesto GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) una vez más. Para los compuestos LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ) y LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) la concentración más baja con efecto inhibitorio es de 0,25 mg/ml, mientras que para LM10 es de 0,5 mg/ml.

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
Compuesto	Concentración	Diámetro del halo en cm (tamaño pocillo 0,5 cm)
LM10	0,5 mg/ml	1,2±0,1
LM11	0,25 mg/ml	1,1±0,4
LM12	0,25 mg/ml	1,0±0,1
GAAS9-d	0,125 mg/ml	1,1±0,3

En la tabla 14 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias para *Weisella viridescens* para cada compuesto. Como en los casos anteriores la concentración más efectiva para inhibir el crecimiento se corresponde con 0,125 mg/ml del compuesto GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ). Para el compuesto LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ) la concentración más baja con efecto inhibitorio es de 0,25 mg/ml, para LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) es de 0,5 mg/ml.

LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ) no mostró efecto inhibitorio en este estudio lo cual es contrario a lo mostrado en el estudio de la inhibición inicial. Esto pudo ser debido a una mala preparación del compuesto o una pérdida de efecto por parte de alguno de sus componentes.

Compuesto	Concentración	Diámetro del halo en cm (tamaño pocillo 0,5 cm)
LM10	0,25 mg/ml	1,2±0,6
LM11	1 mg/ml	x
LM12	0,5 mg/ml	1,0±0,1
GAAS9-d	0,125 mg/ml	1,0±0,2

En la tabla 15 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias para *Brothothix thermosphacta* para cada compuesto. La concentración más baja efectiva para inhibir el crecimiento se corresponde con 0,5 mg/ml del compuesto LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ), a diferencia de los casos anteriores donde GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) mostraba ser el más efectivo. El compuesto LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ) no presenta efecto inhibitorio. Para el resto de compuestos la concentración mínima inhibitoria se corresponde con 1 mg/ml.

Compuesto	Concentración	Diámetro del halo en cm (tamaño pocillo 0,5 cm)
LM10	0,5 mg/ml	1,1±0,0
LM11	1 mg/ml	x
LM12	1 mg/ml	1,2±0,1
GAAS9-d	1 mg/ml	1,4±0,1

En la tabla 16 se muestra la concentración mínima necesaria para obtener una actividad antimicrobiana media (halo mayor de 1,3 cm). En la tabla se observa, excepto para *Staphylococcus aureus*, que la CMI de los compuestos estudiados es menor que la del  $\text{AgNO}_3$ , para obtener un efecto inhibitorio medio, destacando el GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) y el LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ) como los compuestos que inhiben a la mayor parte de estos microorganismos a una concentración más baja.

Tabla 16. Concentración mínima necesaria para obtener una actividad antimicrobiana media (halos > 1,3 cm)					
	LM10	LM11	LM12	GAAS9-D	AgNO <sub>3</sub>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 mg/ml	>1mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	0,5mg/ml
<i>Listeria innocua</i>	>1mg/ml	>1mg/ml	>1mg/ml	0,5mg/ml	>1mg/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 mg/ml	>1mg/ml	1 mg/ml	0,5mg/ml	>1mg/ml
<i>Bacillus cereus</i>	>1mg/ml	>1mg/ml	>1mg/ml	>1mg/ml	>1mg/ml
<i>Brochothix thermosphacta</i>	1 mg/ml	>1mg/ml	>1mg/ml	1 mg/ml	>1mg/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1 mg/ml	0,5mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	>1mg/ml
<i>Weissella viridescens</i>	1 mg/ml	>1mg/ml	1 mg/ml	0,5mg/ml	>1mg/ml

## 5. Discusión de los resultados

En la primera fase de estudio contábamos con algunos compuestos a base de platino y otros a base de paladio, los cuales enfrentamos a distintas especies de bacterias entre ellas grampositivas, gramnegativas, patógenas, alterantes, aerobias y anaerobias. La plata se ha usado como agente antimicrobiano desde la antigüedad. La lejía es un conocido desinfectante, el cloro tiene un alto poder microbiano y es eficaz contra grampositivas y negativas.

Tras obtener los resultados mostrados en la tabla 4, 5 y 6 se puede concluir que los compuestos no son efectivos frente a las bacterias gramnegativas, ni frente a *Clostridium perfringens* (grampositiva anaerobia).

Las bacterias gramnegativas son más resistentes a los biocidas que las bacterias grampositivas no esporuladas. Entre las bacterias gramnegativas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus spp.* son las más resistentes a estos agentes. La membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* es la responsable de su elevada resistencia con diferencias en su composición de lipopolisacáridos, así como en el contenido de cationes. El elevado contenido en Mg<sup>2+</sup> provoca una fuerte unión entre los lipopolisacáridos que unido al pequeño tamaño de sus porinas no permite la difusión a través de la membrana. *Burkholderia cepacia* posee un elevado contenido en arabinosa que junto a los fosfatos de sus lipopolisacáridos disminuye la afinidad de la membrana externa por la polimixina y por otras moléculas policatiónicas. En contraste, *Pseudomonas stutzeri* es muy sensible a muchos biocidas lo que implica que tales agentes tienen poca dificultad en atravesar su membrana externa. Estos datos han permitido conocer que no son las diferencias en la composición de la membrana externa de estas bacterias el mecanismo implicado en su resistencia, sino los cambios en la disposición estructural de la envoltura celular y que la membrana interna no juega ningún papel en dicha resistencia [11].

Las bacterias gramnegativas son muy resistentes frente a antibióticos y antimicrobianos. La multirresistencia representa un reto terapéutico que deja pocas posibilidades para el tratamiento de estas infecciones. Los mecanismos que utilizan las bacterias para defenderse de los antibióticos están en constante evolución, se pueden agrupar en 4 grupos [12]:

1. Modificación enzimática del antibiótico: Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad.

2. Bombas de expulsión: Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior evitando que llegue a su sitio de acción.
3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: Se ve alterada principalmente por cambios en la conformación de las porinas que lleva a no permitir el paso de los antibióticos al espacio periplásmico.
4. Alteraciones del sitio de acción: Las bacterias alteran el sitio de unión del antibiótico. Este mecanismo es más usado por las bacterias grampositivas.

Según los resultados obtenidos los compuestos más efectivos y con halos de inhibición mayores son los basados en paladio LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ), LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) y GAAS9-d( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) mientras que los compuestos con base de platino no han mostrado una gran actividad antimicrobiana.

Complejos de Pt(IV) son usados en tratamientos contra diversos cánceres (próstata, ovarios, testículos), estos complejos tienen un gran potencial anticancerígeno, pero no han sido estudiados en profundidad probablemente debido a que en la corriente sanguínea son reducidos de manera rápida a Pt(II) [13]. Hay una gran variedad de estudios sobre la actividad antimicrobiana y antifúngica de los complejos de platino, pero aplicados en bacterias alterantes de alimentos es prácticamente inexistente.

En estudios antibacterianos realizados sobre complejos de Pt(IV) [7] se obtienen resultados que muestran una baja actividad antimicrobiana y un efecto nulo contra bacterias gramnegativas, resultados que concuerdan con este estudio sobre complejos de Pt(II).

Por otro lado, el Pd(II) presenta una química de coordinación muy parecida a la del Pt(II) y algunos complejos de este metal han presentado actividad anticancerígena frente a líneas tumorales resistentes al cisplatino (medicamento a base de platino usado en quimioterapia), lo que ha promovido estudios biológicos del Pd(II). Tanto Pd(II) como Pt(II) son ácidos blandos y forman enlaces fuertes con átomos de nitrógeno o azufre (bases blandas). En general, el uso de Pd(II) y sus complejos en medicina es limitado porque experimentan intercambio de ligando  $10^5$  más rápido que los correspondientes de Pt(II). La aplicación médica más importante es la del isótopo radioactivo  $^{103}\text{Pd}$  para el tratamiento de cáncer de próstata, sin embargo, complejos de Pd(II) con átomos donores N, S fueron sugeridos por Das y Livingstone como agentes antitumorales más eficaces que otros metales, ya que poseen la labilidad adecuada para interactuar con el ADN. Los ligandos con átomos donores de N y S más utilizados para sintetizar complejos de Pd(II) con actividad antitumoral y antimicrobiana son las tiosemicarbazonas y ditiocarbazatos. Estos ligantes poseen propiedades antivirales, anti-malaria, antifúngica, antimicrobiana y antitumoral [14].

En este estudio se han estudiado complejos de Pd(II) y de Pt(II) con ligandos tales como 2-mercaptopirimidina ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{SN}_2$ ) y 2-mercaptopiridina ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{SN}$ ), de los cuales no hay muchos estudios sobre su uso en medicina ni en alimentos.

En estudios donde se han comparado la actividad antimicrobiana de Pd(II) y Pt(II) se han obtenido resultados que muestran que los complejos de Pd(II) son más activos frente a bacterias que los de Pt(II), coincidiendo con los obtenidos en este estudio. Los compuestos a base de Pt(II) muestran actividad antimicrobiana frente a las bacterias grampositivas al igual que los de Pd(II) pero los halos obtenidos son de menor tamaño [15].

En los pocos estudios disponibles donde se ha estudiado la actividad antimicrobiana de complejos de Pd(II) con ligandos de mercaptopiridina se han obtenido resultados positivos de

inhibición contra bacterias grampositivas y negativas. La actividad antibacteriana de estos complejos es atribuida a la alteración que provocan en la vía metabólica de replicación ADN. Además, los complejos de Pd(II) tienen la habilidad de formar enlaces de hidrógeno con los constituyentes de la célula y de la pared celular, o actuar directamente sobre la membrana, enzimas y proteínas. Los ligandos tienen la capacidad de llevar al metal hasta la diana objetivo (ADN) y permitir que interactúen con él. Los ligandos coordinados débilmente son los mejores vehículos para llevar los iones metálicos a los sistemas biológicos. La disminución de la actividad biológica de algunos complejos puede estar relacionada con que los ligandos estén fuertemente coordinados con el metal [16].

Los compuestos estudiados en este trabajo muestran mayor potencial antimicrobiano contra las bacterias alterantes estudiadas *Brochothrix thermosphacta*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridescens*, mientras que las bacterias anaerobias o microaerófilas (*C. jejuni* y *C. perfringens*) no han mostrado inhibición en el estudio. Para las bacterias patógenas estudiadas los compuestos solo han mostrado efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus*, y un efecto dudoso frente *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*.

Para la segunda fase del estudio se seleccionaron los compuestos que se consideraron ejercían el mayor efecto antimicrobiano: LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ), LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ), LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) y GAAS9-d( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ). Así como las especies bacterianas que se mostraron más sensibles a ellos: *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella viridescens* y *Brothothrix thermosphacta*.

Todos los compuestos seleccionados mostraron un halo de inhibición mayor de 1,3 cm contra alguna de las especies grampositivas del estudio, y todos fueron con base de Pd(II) y ligandos con átomos donores N y S.

De los compuestos estudiados para hallar su concentración mínima inhibitoria el que resultó menos efectivo es LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ), por el contrario, LM12 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{DAPTA})_2$ ) y GAAS9-d( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) mostraron ser efectivos contra un mayor número de las bacterias estudiadas y en concentraciones más bajas.

La concentración mínima inhibitoria más baja es mostrada por el compuesto GAAS9-d( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) donde llega a ser efectiva en una concentración de 0,125 mg/ml contra *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridescens* con un diámetro de halo mayor a 1 cm.

*Leuconostoc mesenteroides* es la especie que tiene las concentraciones mínimas inhibitorias más bajas para todos los compuestos, por lo tanto, se puede deducir que es la más sensible a estos.

En los resultados mostrados en la tabla 8 para la concentración mínima inhibitoria del control negativo DMSO podemos comprobar como el disolvente no tiene efecto inhibitorio alguno, por lo que el efecto de inhibición recae en los compuestos a base de paladio.

En la tabla 8 podemos ver la concentración mínima inhibitoria del  $\text{AgNO}_3$  (plata) para los microorganismos seleccionados. Se observa que la plata tiene poder inhibitorio a concentraciones menores que los compuestos seleccionados.

Los compuestos GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) y el LM10 ( $\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_4\text{SN})_2(\text{PTA})_2$ ) son susceptibles de ser utilizados para aplicaciones posteriores debido a que inhiben a la mayor parte de los microorganismos estudiados a una concentración más baja que el  $\text{AgNO}_3$ .

Para el caso de *Staphylococcus aureus* hubiera sido necesario hacer más diluciones para comprobar si realmente esa es la concentración mínima inhibitoria de la plata.

*Listeria innocua* se usa normalmente en estudios como testigo de *Listeria monocytogenes* debido a que se estima que su comportamiento es igual y que en su caso no es patógena y se puede manejar mejor en el laboratorio, ambas del mismo género. A lo largo del estudio se han obtenido resultados similares para ambas.

## 6. Conclusions

According to this study gramnegative bacteria have shown to be resistant to the compounds tested. Among the grampositive bacteria studied, the compounds have been proven to be effective.

It can be concluded that the precursors used to prepare the compounds had no effect on the bacteria, so the antimicrobial effect could be attributed to the metal used in those compounds.

The compound that showed the best antimicrobial activity against a larger number of bacteria was GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ), was the compound with the lowest minimum inhibitory concentration. Therefore, this compound can have the potential to be a good antimicrobial agent, but further studies and research about its properties and applications should be performed.

About the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) study of LM11 ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{DAPTA})_2$ ), as the results seem not to have concordance between the inhibitory and the CMI studies it would be necessary to repeat both of them to ensure the accuracy of the results. It would be interesting to repeat the minimum inhibitory concentration test and include more dilutions between the ones already done because there is a large range between the dilutions and there is information that could be missing.

Silver has a broader spectrum of action against bacteria (as it was effective against all of the species tested) and has a CMI lower than the compounds tested, but GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) has showed larger inhibition halos in those bacteria with exerted effect, so it has a higher antimicrobial effect. It would be also interesting to test the application of GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) in food and study its shelf-life comparing with the application of silver.

The future application of GAAS9-d ( $\text{Pd}(\text{C}_4\text{H}_3\text{SN}_2)_2(\text{PTA})_2$ ) compound could be performed as a biofilm or as coating in food packaging.

It is also necessary to look into the regulation of substances used in food contact materials. The European food safety authority (EFSA) provisionally accepts the use of silver in food-contact materials with a maximum of 5% silver in the form of silver zeolites or silver zirconium phosphate glasses [6]. In that sense, migration studies must be also performed to

know the amount of these compounds that could be present in the final food product as well as the study of its toxicity.

## 7. Bibliografía

1. Vivek K. Bajpai, Irfan Ahmad Rather, Rajib Majumder, Fanar Hamad Alshammari, Gyeong-Jun Nam, Yong-Ha Park. Characterization and antibacterial mode of action of lactic acid bacterium *Leuconostoc mesenteroides* HJ69 from kimchi. *Journal of food biochemistry*, vol.41, 2016.
2. Havelaar, A.H., Brul S., de Jong, A., de Jonge R., Zwietering MH., Ter Kuile BH. Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, vol.139, 2010.
3. Newell DG., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Opsteegh M., Langelaar M., Threfall J., Scheutz F., van der Giessen J., Kruse H. Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, vol.139, 2010.
4. Hoffmann S., Batz MB., Morris JG Jr. Annual cost of illness and quality adjusted life year losses in the united states due to 14 foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, vol.75, 2012.
5. EFSA, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2016. *The EFSA Journal*, 2017.
6. Arun K. Bhunia. Foodborne microbial pathogens, mechanisms and pathogenesis, pp. 4-17, 2008.
7. Martinez Abad, A. Development of silver based antimicrobial films for coating and food packaging applications, 2014.
8. Rawat, S. Food spoilage: microorganisms and their prevention. *Asian journal of plant science and research*, vol.5, 2015.

9. Ivana D. Radojević, Verica V. Glođović, Gordana P. Radić, Jelena M. Vujić, Olgica D. Stefanović, Ljiljana R. Čomić and Srećko R. Trifunovic. From synthesis to antibacterial activity of some new palladium (II) and platinum (IV) complexes. *Antimicrobial agents*, pp. 312-332, 2012.
10. Shafqat Nadeema, Muhammad Sirajuddin, Saeed Ahmad, Syed Ahmed Tirmizi, Muhammad Irshad Ali, Abdul Hameed. Synthesis, spectral characterization and in vitro antibacterial evaluation and Petra/Osiris/Molinspiration analyses of new Palladium (II) iodide complexes with thioamides. *Alexandria Journal of medicine*, vol.52, 2015.
11. Fernández, A. Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes, 2016.
12. José David Tafur, Julián Andrés Torres, María Virginia Villegas., Mecanismo de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Centro internacional de investigaciones médicas*, vol.12, 2008.
13. Mishra AK., Mishra SB., Manav N., Saluja D., Chandra R., Kaushik NK. Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic study of platinum (IV) complexes, vol.14, 2006.
14. Tamayo, L.V. Síntesis, caracterización de complejos de paladio (II) con ligantes tiosemicarbazonas, sus compuestos de inclusión en  $\beta$ -ciclodextrina con posible actividad biológica, 2011.
15. Ajibade, P.A., Omoruyi G. I. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Studies of Pd(II) and Pt(II) Complexes of Some Diaminopyrimidine Derivatives. *Bioinorganic chemistry and applications*, vol.2013, 2013.
16. Buczkowska, M.A. Synthesis, characterization, antitumor and antimicrobial activities of heterocyclic transition metal complexes, 2011.

