

Universidad Nacional de Rosario  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Cátedra de Química Biológica

***Efecto de compuestos redox activos sobre  
variables químicas y biológicas en sistemas  
compuestos por fluido vaginal, células vaginales  
y bacterias In Vitro***

**Tesis**

presentada para optar al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

por

Médica Veterinaria **Tamara Lis COLETTI ZABALA**

Director de Tesis: Profesor Dr. Alejandro PIDELLO

Miembros del jurado:

Dra. Adriana OMBRELLA

Dr. Alfredo RIGALLI

Dr. Danilo Germán RENZI

**Año 2019**

Agradezco al Dr. Alejandro Pidello, Profesor Titular de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario , por haberme dirigido en la realización de este trabajo de Tesis. Le agradezco profundamente su apoyo incondicional, su entusiasmo contagioso ante cada “nuevo descubrimiento” y la enorme y amable rigurosidad con que fue guiando cada etapa de mi crecimiento académico. Realmente creo haber aprendido de él mucho más que cuestiones profesionales.

Agradezco a quienes me ofrecieron su experiencia en sus áreas de conocimiento específicas, especialmente a la Dra Elda Perotti del Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, quién incansablemente respondió cada vez que se necesitó. También a la Dra. Adriana Ombrella del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Cs. Médicas de la Universidad Nacional de Rosario por asesorarme en determinados procesos metodológicos.

También agradezco a quienes colaboraron activamente en tareas experimentales, Med. Vet. María Eugenia Zerbato y las colaboradoras Mariángeles Calderón y Luciana Gattelet del Laboratorio de Química Biológica FCV UNR. Un recordatorio especial para la Dra Martina Perini del Dipartimento di Scienza del Farmaco (DSF) de la Università del Piemonte Orientale (Novara, Italia) por en el fecundo periodo experimental compartido durante la estadía que realizó en el Laboratorio.

Finalmente agradezco a mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Química Biológica FCV UNR quienes de una u otra manera me acompañaron, estimularon y en ocasiones hasta me sostuvieron durante la realización de este Trabajo de Tesis.

A mis razones de todo: mi esposo, mis hijos y mi madre.

**Efecto de compuestos redox activos sobre variables químicas y biológicas en sistemas compuestos por fluido vaginal, células vaginales y bacterias *In Vitro***

Palabras clave: química redox - fluido vaginal - bacterias vaginales - células vaginales – metronidazol - compuestos quinónicos.

**Effect of active redox compounds on chemical and biological variables in systems composed of vaginal fluid, vaginal cells and bacteria *In Vitro***

Key words: redox chemistry - vaginal fluid - vaginal bacteria - vaginal cells - metronidazole - quinonic compounds.

## Resumen

En este trabajo de Tesis se estudió la aptitud que posee un sistema biológico - el sistema vaginal- de expresar determinadas características físico-químicas y biológicas cuando constituye el escenario para el estudio de las interacciones ocurridas entre moléculas efectoras de óxido-reducción y su componente microbiano. El escenario sistema vaginal, fue recreado utilizando fluido vaginal ovino y canino, fluido vaginal sintético y células epiteliales vaginales; como componente microbiano se utilizaron *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Pseudomonas fluorescens* C7R12 y *Staphylococcus* sp. Las moléculas redox intervinientes fueron metronidazol, que actuó de ejemplo de un compuesto de naturaleza redox administrado con fines terapéuticos y quinonas, como ejemplo de compuesto redox ubicuo en el escenario estudiado.

El primer paso en este estudio consistió en reconocer el sistema a nivel “físico-químico”, jerarquizando la descripción de la talla molecular de las moléculas nativas e identificando el comportamiento en él de las moléculas efectoras elegidas como modelo. Para ello se utilizaron técnicas de fraccionamiento molecular y espectrofotometría. En segundo lugar se realizó el abordaje del estudio de las “interacciones” entre los compuestos presentes en el escenario, los efectores redox seleccionados y el componente microbiano. Para ello se utilizaron técnicas voltamperométricas y espectrofotométricas, microscopía óptica y cultivos bacterianos.

Para llevar a cabo los objetivos propuestos fue necesario realizar una etapa de validación de las técnicas. La espectrofotometría permitió establecer similitudes relacionadas a la talla molecular de los compuestos presentes entre el fluido vaginal canino y sintético, y en las técnicas voltamperométricas permitió reconocer grupos funcionales de las moléculas efectoras redox utilizadas (tanto en solventes próticos como apróticos), habilitando de esta manera su utilización en una segunda etapa.

En esta segunda etapa, los resultados experimentales demostraron la vulnerabilidad electroquímica del grupo activo del metronidazol ante la presencia de otros efectores redox o ante variaciones en los compuestos nativos presentes en el medio, esto fue así tanto en ambiente acuoso como en medio aprótico. En todos los casos la detectabilidad voltamétrica de los grupo activos de las moléculas redox activas pudo ser reconocida permitiendo relacionar variaciones en el estado ácido base, en la intensidad y en la capacidad redox con fenómenos que involucran al componente microbiano como la capacidad de adherencia bacteriana, viabilidad, replicabilidad y motilidad.

Las diferencias observadas, dependientes de las especies bacterianas y de las condiciones particulares de los sistemas estudiados, indicó cambios que pueden comprometer la eficiencia farmacológica esperada de un antibiótico de naturaleza redox como el estudiado.

## Summary

In this thesis work it was studied the aptitude of a biological system - the vaginal system - to express certain physico-chemical and biological characteristics when it constitutes a scenario for the study of the interactions between the oxide-reduction effector molecules and their microbial component. The vaginal system scenario was recreated using sheep and canine vaginal fluid, synthetic vaginal fluid and vaginal epithelial cells. As a microbial component, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Pseudomonas fluorescens* C7R12 and *Staphylococcus* sp. were used. The intervening redox molecules were metronidazole, which acted as an example of a compound of redox nature administrated for therapeutic purposes and quinones, as an example of ubiquitous redox compound in the studied scenario.

The first step in this study consisted in recognizing the system at the "physical-chemical" level, ranking the description of the molecular size of the native molecules and identifying the behavior in it of the effector molecules chosen as a model. For this, molecular fractionation and spectrophotometry techniques were used.

In the second place, the study of the "interactions" between the compounds present in the scenario, the selected redox effectors and the microbial component was made. For this, voltammetric and spectrophotometric techniques, optical microscopy and bacterial cultures were used.

To carry out the proposed objectives it was necessary to carry out a validation stage of the techniques. The spectrophotometry allowed to establish similarities related to the molecular size of the compounds present between the canine and synthetic vaginal fluid, and in the voltammetric techniques allowed to recognize functional groups of the redox effector molecules used (both in protic and aprotic solvents), thus enabling its use in a second stage.

In this second stage, the experimental results demonstrated that the electrochemical vulnerability of the active group of metronidazole to the presence of other redox effectors or to variations in the native compounds present in the medium, this was true both in aqueous environment and in aprotic medium. In all cases the voltammetric

detectability of the active groups of the active redox molecules could be recognized allowing to relate variations in the acid-base state with, in the intensity and in the redox capacity with phenomena that involve the microbial component such as bacterial adhesion capacity, viability, replicability and motility.

The observed differences, dependent on the bacterial species and the particular conditions of the studied systems, indicated changes that may compromise the expected pharmacological efficiency of a redox-type antibiotic like the one that was studied.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## CAPÍTULO I. Síntesis bibliográfica

### 1. Química redox en ambientes naturales

1.1 Las reacciones redox y su cuantificación en los ambientes naturales

1.2 Las reacciones redox y el pH

1.2.1 Relación Eh/pH

1.2.2 Las reacciones biológicas y el pH en sistemas microbianos

1.3 Ubicuidad de las reacciones redox

1.4 Condicionantes redox en el ecosistema vaginal

### 2. Las moléculas efectoras redox utilizadas en este estudio: quinonas e imidazoles

### 3. El ambiente vaginal

3.1 La comunidad microbiana en este estudio

3.1.1 Bacterias ácido-lácticas

3.1.2 *Pseudomonas* spp - *Pseudomonas fluorescens*

3.1.3 *Staphylococcus* spp

### 4. El escenario vaginal

## CAPÍTULO II. Caracterización química de los escenarios estudiados. Fraccionamiento molecular y caracterización espectrofotométrica

### 1. Caracterizaciones espectrofotométricas

1.1 Fluido vaginal

1.2 Soluciones de Hidroquinona y de Metronidazol

### 2. Determinación de la talla molecular de los componentes presentes en el fluido vaginal

### 3. Caracterización de los efectores redox utilizados

3.1 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de un transportador de electrones tipo quinónico (Hidroquinona; H<sub>2</sub>Q)

3.2 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de un reductor orgánico tipo imidazólico (Metronidazol; MTZ)

#### **4. Caracterización del fluido vaginal sintético**

4.1 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica del fluido vaginal sintético

4.2 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica del fluido vaginal sintético suplementado con hidroquinona y con metronidazol

#### **5. Caracterización de la solución fisiológica**

5.1 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica sola

5.2 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica suplementada con hidroquinona

5.3 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica suplementada con metronidazol

5.4 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica suplementada con hidroquinona y con metronidazol

#### **6. Experimentos con fluido vaginal canino suplementado con efectores redox**

6.1 Fraccionamiento de fluido vaginal suplementado con hidroquinona

6.2 Fraccionamiento de fluido vaginal suplementado con metronidazol

6.3 Fraccionamiento de fluido vaginal suplementado con hidroquinona y con metronidazol

#### **7. Valores de pH y potencial de reducción aparente (Eh) en los fluidos vaginales caninos utilizados**

#### **8. Conclusiones**

### **CAPÍTULO III. Comportamiento e interacciones redox en soluciones de H<sub>2</sub>Q, MTZ y fluido vaginal**

#### **1. Introducción**

#### **2. Quinonas y metronidazol**

2.1 Comportamiento voltamétrico del sistema hidroquinona y metronidazol

2.2 Comportamiento voltamétrico del sistema fluido vaginal canino – metronidazol en presencia de transportador de electrones (Antraquinona 2-6 disulfonato; AQDS)

- 2.3 Comportamiento voltamétrico del metronidazol en el fluido vaginal sintético
- 2.4 Efecto de algunos componentes mayores del fluido vaginal animal sobre el comportamiento voltamétrico del metronidazol
- 3. Comportamiento electroquímico del fluido vaginal**
  - 3.1 Consideraciones preliminares
  - 3.2 Caracterización voltamétrica de la fracción excluida de las muestras de los fluidos vaginales humanos “normales”
  - 3.3 Comportamiento voltamétrico del fluido vaginal canino
  - 3.4 Comportamiento voltamétrico del fluido vaginal canino suplementado con hidroquinona
- 4. Conclusiones**

## **CAPÍTULO IV. Comportamiento del componente bacteriano ante la presencia de efectores ácido –base y redox**

- 1. Sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 en medios suplementados con metronidazol y con metronidazol tratado con una solución reductora (MTZm)**
- 2. Comportamiento del sistema conformado por fluido vaginal y microorganismos frente a cambios de pH y redox**
  - 2.1 Comportamiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 en fluido vaginal sintético con diferentes concentraciones de protones suplementadas con metronidazol
  - 2.2 Comportamiento de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 en fluido vaginal sintético con diferentes concentraciones de protones suplementadas con metronidazol o metronidazol modificado
    - 2.2.1 Comportamiento del pH
    - 2.2.2 Relación del pH con la conductividad
    - 2.2.3 Relación del pH con la intensidad redox (Eh)
    - 2.2.4 Relación del pH con la Capacidad redox
    - 2.2.5 Número de bacterias
  - 2.3 Relación entre la producción de trifenil formazán (TPF) a partir de la reducción del cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) y el pH
    - 2.3.1 Comportamiento voltamétrico (VC)
    - 2.3.2 Comportamiento del pH y de la absorbancia

### **3. Efecto de la modificación del metronidazol sobre la replicabilidad de *Staphylococcus* sp. Rol del electrolito utilizado para modificar el metronidazol**

3.1 Experimentos con 1700 µg MTZ/ ml

3.2 Experimentos con 5000 µg MTZ/ ml

### **4. Adherencia y motilidad bacteriana en presencia de metronidazol y metronidazol modificado**

4.1 Experimentos realizados con células vaginales caninas

4.2 Experimentos realizados con células vaginales ovinas

4.3 Estimación de la capacidad de adhesión de *Staphylococcus* sp. mediante la determinación del porcentaje de hidrofobicidad

4.4 Estimación de la motilidad tipo *swimming* de *Pseudomonas fluorescens* C7R12

### **5. Conclusiones**

## **CAPÍTULO V. Conclusiones**

### **Anexos**

Medida del potencial redox (Modificado de la Referencia <sup>2</sup>)

Conceptos básicos sobre Voltametría Cíclica (VC)

Formulación del fluido vaginal sintético según la técnica de Owen<sup>93</sup> modificada

Curvas de absorbancia correspondientes a la elución de Azul Dextrano y Azul de Bromofenol

Referencia<sup>110</sup> Condiciones redox en el ecosistema vaginal normal humano. *Sociedad de Biología de Rosario. XI Congreso, XXVIII Reunión Anual*, 95

Referencia <sup>135</sup> *Rev. Argent. Microbiol.* (2016) 48 (4), 313 – 319

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Cada organismo viviente *per se* puede ser considerado un ecosistema incluido dentro de otro ecosistema que lo contiene, denominado ambiente. Asimismo, cada individuo está constituido por una gran cantidad de pequeños sistemas que se relacionan entre sí pero que también tienen sus requerimientos y sus propias normas. Dentro de este gran escenario donde coexisten fenómenos que se expresan en múltiples escalas, se consideró solo un sistema, el sistema vaginal, con la expectativa de poder relacionar el comportamiento del componente microbiano que lo habita y el comportamiento de su entorno.

En todos los seres vivos coexisten una enorme cantidad de factores bióticos y abióticos, capaces de interactuar entre sí mediante sus estructuras moleculares, creando constantemente compuestos diferentes, los cuáles pueden favorecer (en condiciones ideales) o también pueden lesionar (en situaciones perniciosas) la homeostasis necesaria para preservar el bienestar físico del sistema al que pertenecen.

En este trabajo de Tesis se intentó profundizar en la comprensión de las variaciones fisicoquímicas (estado redox y estado ácido-base) ocurridas al generar interacciones con moléculas efectoras redox, y su impacto sobre la homeostasis microbiana del sistema. Tales interacciones son sin duda esperables en sistemas abiertos como los naturales, no solo debido a alteraciones en los componentes nativos que los integran sino también debido, por ejemplo, a la administración de antimicrobianos (locales o sistémicos), anticonceptivos, vitaminas, etc. Frente a esas situaciones las variaciones fisicoquímicas como la concentración de protones (pH), de electrones (compuestos oxidantes o reductores), de iones en general y no solo a nivel de la cantidad sino también la disponibilidad de los mismos para intervenir en reacciones químicas, son factores muy importantes a tener en cuenta para reestablecer o mantener la salud en su acepción amplia. Asimismo es imprescindible conocer la manera en que podría verse afectada la microflora nativa tanto en número como en viabilidad o en capacidad de adherencia a las superficies, por ejemplo. Sabiendo que dichos factores pueden fluctuar dentro de un rango determinado y específico para cada sistema en estudio sin que la salud local o general se vea afectada, es necesario y es nuestro deber como biólogos determinar cuáles son los márgenes de acción/intervención que permite cada proceso. Para generar interpretaciones que

contribuyan al conocimiento de las citadas interacciones entre lo abiótico y biótico corresponde comenzar la cadena de estudios a nivel molecular. En este sentido transcurre este trabajo de Tesis, en el cuál se analizó, se trató de interpretar, qué ocurre en un sistema biológico como el ecosistema vaginal canino, el cual fue elegido como modelo de ecosistema natural, cuando se lo perturba con la introducción de moléculas efectoras redox.

El trabajo realizado se enmarca dentro de las ciencias básicas y todos los experimentos realizados se programaron con un criterio reduccionista en condiciones *In Vitro*, con el fin de poder repetir y mejor controlar los escenarios físico-químicos y sobre todo reducir al mínimo las múltiples variaciones individuales que afectarían las particulares reacciones estudiadas, y con la esperanza de que surjan de él nuevos caminos experimentales y se generen nuevas hipótesis. Por otra parte, dado que para realizar el trabajo propuesto se intentó permanentemente integrar técnicas analíticas bastante específicas de la ciencia química (fraccionamiento con tamices moleculares o técnicas voltamétricas por ejemplo) con los variables escenarios propios de las ciencias biológicas (variabilidad en composición de las muestras naturales utilizadas, comportamiento de las poblaciones microbianas), se realizaron numerosos experimentos para asegurar un buen conocimiento y el mejor control posible de los diversos escenarios experimentales que se debieron estudiar. Por esta razón los Capítulos II y III pueden aparecer excesivamente descriptivos.

En síntesis, este trabajo pretende contribuir al conocimiento: (i) del ambiente vaginal a nivel de su composición en moléculas electroactivas; (ii) de las interacciones moleculares que se producen en el fluido vaginal sintético suplementado o no con moléculas efectoras de óxido reducción; y (iii) de la capacidad de respuesta del componente bacteriano a los agentes que perturben las características redox del sistema.

Entonces, el problema en estudio se puede plantear en forma de preguntas.

*¿El ambiente vaginal saludable; puede ser caracterizado con herramientas espectrofotométricas y voltamétricas?*

*¿Cómo interaccionan entre sí determinados factores medioambientales efectores directos o indirectos de los procesos acido-base y de óxido-reducción y cómo inciden sobre la homeostasis del ecosistema observado?*

*Los fenómenos bióticos del escenario natural “sistema vaginal” ¿son afectados por la manifestación de fenómenos químicos que involucran transferencia de electrones y protones?*

Planteado el problema de esta manera, aparecen como descriptores del escenario estudiado, potencialmente perturbable por un efector redox, dos componentes mayores vinculados o vinculables a través de una dinámica bidireccional donde cada descriptor y sus modificaciones pueden ser caracterizado por alguna de sus variables intrínsecas. En este caso, el estado redox y el estado ácido-base para los *factores medioambientales* y características del componente biótico como la sobrevivencia y la adherencia (factores de virulencia) de las células bacterianas a las células del epitelio vaginal para los *fenómenos bióticos*. El esquema siguiente representa el escenario estudiado.

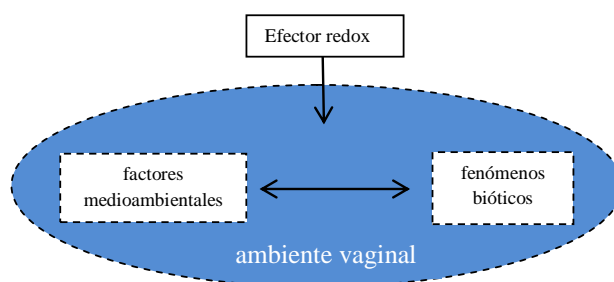


Figura 1. Esquema conceptual que informa sobre el enfoque propuesto para el estudio del sistema vaginal

### Objetivos de la Tesis

El objetivo general de este trabajo de Tesis es de profundizar el rol de efectores redox orgánicos de tipo quinónico e imidazólico: (i) sobre la talla molecular y las características espectrofotométricas y voltamétricas del fluido vaginal y (ii) sobre la expresión de factores de virulencia de microorganismos ubicuos en sistemas compuestos por fluido vaginal y células vaginales

Los objetivos parciales son:

- (i) Caracterizar la composición del fluido vaginal canino sin suplementar y suplementado con efectores redox mediante el fraccionamiento de sus componentes en función de la talla molecular;
- (ii) Analizar el comportamiento de las moléculas efectoras redox utilizadas como modelos, hidroquinona y metronidazol, en ambientes protonados y apróticos;

- (iii) Analizar el impacto de la suplementación con efectores redox sobre *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Pseudomonas fluorescens* C7R12 y *Staphylococcus* sp. en su viabilidad y en su capacidad para adherirse a células vaginales caninas suspendidas en fluido vaginal sintético.

### **Hipótesis**

La hipótesis sustantiva que se desprende del objetivo general se puede plantear en forma de pregunta:

*La presencia y la especiación de compuestos electroactivos tipo quinónicos e imidazólicos ¿Modifica la expresión de los fenómenos bióticos y abióticos en el fluido vaginal?*

Cada uno de los objetivos que integran este trabajo de Tesis se corresponde con las siguientes hipótesis de trabajo:

Referentes al primer objetivo (i)

1. El fraccionamiento molecular del fluido vaginal canino y sintético permite caracterizar el sistema estudiado en función de la talla molecular de sus componentes;
2. La presencia de los efectores redox incorporados al sistema se reconocen en el fraccionamiento por talla molecular de los componentes presentes en el fluido vaginal canino y sintético.

Referentes al segundo objetivo (ii)

1. La interacción de las moléculas efectoras redox y las modificaciones químicas que esta interacción produzca pueden ser detectadas en el sistema estudiado mediante espectrofotometría y voltametría.

Referentes al tercer objetivo (iii)

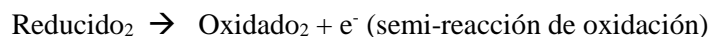
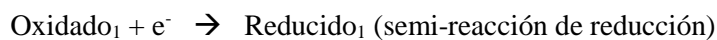
1. La suplementación con moléculas transportadoras de electrones tipo quinónicas e imidazólicas en estudios *in vitro* altera la viabilidad y la capacidad de adherencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Pseudomonas fluorescens* C7R12 y *Staphylococcus* sp. a células epiteliales vaginales.

# CAPÍTULO I. Síntesis bibliográfica

## 1. Química redox en ambientes naturales

### 1.1. Las reacciones redox y su cuantificación en los ambientes naturales

Las reacciones *redox* constituyen un tipo de reacciones químicas en las cuales ocurre una transferencia de electrones desde una especie química *dadora* hacia una especie química *aceptora*. Los electrones son partículas fundamentales que no se encuentran libres en la naturaleza, por eso, si una especie pierde electrones (denominada *agente reductor*), es porque otra especie los gana (denominada *agente oxidante*)<sup>1</sup>. Entonces, en las reacciones redox existen dos semi-reacciones acopladas: una semi-reacción de reducción (una especie gana electrones) y una semi-reacción de oxidación (una especie pierde electrones). Ejemplo:



En algunas situaciones la reducción de los compuestos también se puede definir como la ganancia de hidrógeno y/o pérdida de oxígeno y la oxidación como la pérdida de hidrógeno y/o ganancia de oxígeno. A toda semi-reacción se le puede asignar un valor que refleje la tendencia o la intensidad que tiene cada especie química para tomar o ceder electrones. Ese valor se denomina *potencial de reducción* o *potencial de oxidación*, respectivamente. Es un valor que surge de la comparación del comportamiento de una semi-reacción desconocida con una reacción conocida que se toma como patrón. Para determinarlo se puede utilizar una celda electroquímica. En su forma más elemental está formada por dos semi-celdas (o semi-pilas) que contienen un electrodo cada una inmersa en una solución salina (que contiene el mismo ión del electrodo de manera que en cada semi-celda se encuentren presentes las dos especies de la semi-reacción). Estas celdas aunque físicamente separadas están conectadas entre sí, de manera que se permita el paso de los electrones producidos por la semi-reacción redox, a través de un puente salino (solución agarizada de un electrolito como el KCl, por ejemplo) con el fin de compensar el desequilibrio de cargas que origina el proceso entre las dos semi-celdas. Cuando se cierra el circuito en uno de los electrodos las especies químicas se oxidan, pierden e-

---

<sup>1</sup> Atkins P, Jones L (2008) *Chemical Principles. The Quest for Insight*. WH Freeman and Company. New York. Fourth edition.

( $\text{Red}_1 \rightarrow \text{Ox}_1 + e^-$ ), tiene carga negativa y se denomina *ánodo*; y en el otro electrodo las especies se reducen, ganan  $e^-$  ( $\text{Ox}_2 + e^- \rightarrow \text{Red}_2$ ), tiene carga positiva y se denomina *cátodo*. El flujo de  $e^-$  que ocurre entre los dos electrodos origina una diferencia de potencial eléctrico cuyo valor es determinado mediante un voltímetro.

Se utiliza como referencia la semi-pila o la semi-reacción del hidrógeno ( $2 \text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{H}_2$ ), denominada *electrodo estándar de hidrógeno* (EEH), a la que se le asigna un valor igual a 0,00 Voltios en condiciones estándar (25°C, concentraciones de reactantes y productos igual a 1 M). Se denomina Potencial de Reducción Estándar ( $E_h^\circ$ ) de la semi-reacción analizada a la capacidad que ésta posee para ganar los  $e^-$  provenientes del EEH. Si el valor es positivo significa que los  $e^-$  fluyen desde la semi-reacción del hidrógeno hacia la del analito (el electrodo de hidrógeno actúa como ánodo, en él ocurre la oxidación y el electrodo del analito actúa como cátodo y en este ocurre la reducción) y si es negativo significa que fluyen en sentido contrario, o sea desde el analito hacia el electrodo de hidrógeno. (Ver Figura 1 y Figura 2 en el Anexo 1).

Dado que el empleo de EEH en mediciones corrientes presenta cierta complejidad, en la práctica se utilizan electrodos redox de referencia, como por ejemplo el electrodo de Calomel ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ . Cloruro de mercurio I) cuyo valor frente al EEH es conocido. En este trabajo de tesis se utiliza la expresión  $E_h$  ( $E$  aparente) para designar al valor medido utilizando un electrodo de Pt y un electrodo de Calomel como referencia. Para obtener los valores frente al electrodo estándar de Hidrógeno (EEH) se debe aplicar la siguiente expresión:  $E_{\text{EEH}} = E' + C$ , siendo  $E'$  el valor obtenido con el electrodo de Pt (en nuestro caso  $E'$  corresponde a  $E_h$ ) y  $C$  el potencial del electrodo de referencia respecto al EEH (Manual del fabricante). Por otra parte, en el mercado existen electrodos denominados combinados, en los cuales en el mismo cuerpo existe la referencia y un metal inerte (Pt u Au por ejemplo) que trasmite el comportamiento redox del analito. Entonces si se sumerge un electrodo redox en una solución o suspensión biológica (ej fluido vaginal, líquido ruminal) y si el voltímetro indica un valor numérico positivo eso indica que el sistema estudiado posee capacidad oxidante, se convierte en el cátodo, los electrones fluyen desde el electrodo de referencia hacia el analito y su potencial de reducción es mayor que la referencia. Todo lo contrario ocurre si el valor numérico es negativo. Esta técnica permite comparar los potenciales de reducción de diferentes soluciones (ej: líquido vaginal vs. líquido ruminal o vs. humor acuoso). Es decir, brinda una idea de la tendencia de cada analito para ganar o ceder electrones. También sirve para comparar el efecto al suplementar una determinada solución con diferentes efectores redox (ej: fluido

vaginal solo vs. fluido vaginal suplementado con hidroquinona vs. fluido vaginal suplementado con metronidazol). O también para monitorear el efecto que produce la acción microbiana sobre el potencial redox de los sistemas en un momento determinado (ej: determinación del Eh de un sistema antes de la incorporación de microorganismos y luego de transcurrida una hora después de la inoculación).

Si en estos ejemplos los sistemas estuvieran en equilibrio y se conociera la cantidad de especies que participan en las reacciones redox, podríamos determinar el estado de reducción real de cada uno de ellos a partir de la denominada ecuación de Nernst<sup>2</sup>:

$$E = E^{\circ} - \frac{R.T}{n.F} \ln \left[ \frac{a_{\text{Reductor}}}{a_{\text{Oxidante}}} \right]$$

Donde,

E = potencial de reducción de la reacción (Voltios)<sup>3</sup>

E° = potencial de reducción estándar de la semipila (25°C, concentración 1M) (Voltios)

R = constante de los gases 8,3 J/mol.°K = 2 cal/mol.°K = 0,002 kcal/mol.°K

T = temperatura °K

n = número de e- intercambiados en la reacción

F = constante de Faraday= 23 kcal/V.mol

a = actividad <sup>4</sup>

Sin embargo en el estudio de los sistemas naturales, donde coexisten e interactúan factores bióticos y abióticos, donde las posibilidades de ocurrencia de reacciones redox son tan abundantes, diversas y simultáneas como la cantidad de especies redox que lo integran, resulta demasiado complejo determinar el estado de reducción (E). No obstante, la información que brinda la determinación del E “aparente” o Eh (tendencia o intensidad para ganar o ceder e<sup>-</sup>, resultado del promedio de las reacciones redox de todas las especies

---

<sup>2</sup> Pidello A (2014) *Principes de chimie redox en écologie microbienne*. Éditions Quae, Collection Synthèses. Paris. ISBN: 9782759220793. 144 pp.

Como el logaritmo neperiano es igual a 2.3 multiplicado por el logaritmo decimal, la expresión de Nernst también puede escribirse:  $E = E^{\circ} - (2,3 R.T / n.F) . \log [(red) / (ox)]$ .

<sup>3</sup> Voltio (V): es la unidad derivada del Sistema Internacional para el potencial eléctrico, la fuerza electromotriz y la tensión eléctrica.

<sup>4</sup> La *actividad* es la concentración efectiva, termodinámicamente mucho más precisa que concentración molar. La actividad de una molécula o de un ión está relacionada con la concentración (mol/l) a través del coeficiente de actividad ( $\gamma$ ):  $a = \gamma . c$ . En las soluciones diluidas  $\gamma$  tiende a 1 y la concentración se vuelve casi equivalente a la actividad (Ref <sup>2</sup>).

electroactivas presentes en el analito), es un indicador de utilidad que de ser complementada con la cantidad y especie de cada par redox presente en el analito permite definir aceptablemente la denominada capacidad redox del analito.

En este punto resulta indispensable diferenciar dos términos: el “estado redox” que es definido como la condición redox general del sistema (reducido, oxidado, aeróbico, anaeróbico por ej) (determinado por la medición del E o Eh); y el “*status redox*” que hace referencia a la situación de un sistema en un momento en particular, relacionando la cantidad de compuestos electroactivos (factor de capacidad) con el potencial de reducción aparente de cada compuesto presente (factor de intensidad). Estas consideraciones se derivan del hecho que desde el punto de vista termodinámico, una reacción redox realiza un *trabajo*, y éste siempre tiene dos componentes: el componente de capacidad, que depende de la cantidad de materia y el componente de intensidad o potencial, que depende de su posición relativa frente a un estándar (en general el EEH) y que no depende de la masa. En el caso que nos ocupa el componente de intensidad redox está indicado por el valor de Eh, que indica la capacidad de ceder o aceptar  $e^-$  frente a un electrodo de referencia y que no depende de la cantidad de compuestos electroactivos presente (Pidello 2003)<sup>5</sup>.

Frente esta situación, es necesario entonces, recurrir a algún procedimiento analítico que permita cuantificar las especies electroactivas presentes en un sistema.

La capacidad redox puede determinarse de diferentes maneras. Por ejemplo, para determinar la capacidad de reducción se puede agregar una concentración conocida de oxidante y medir la cantidad residual no reducida (tiene desventajas en sistemas complejos como lo son los sistemas naturales, donde pueden existir o producirse interacciones químicas diferentes a las interacciones redox y siempre está presente el efector biótico que modifica el sistema a través de reacciones asimilativas y desasimilativas)<sup>6</sup>.

---

<sup>5</sup> Pidello A (2003) Environmental redox potential and redox capacity concepts using a simple polarographic experiment. *J. Chem. Educ.* 80 (1), 68 – 70.

<sup>6</sup> En sistemas naturales el status redox puede variar de un momento a otro. Los procesos metabólicos microbianos son en gran medida los responsables de esas variaciones. Los microorganismos pueden utilizar la energía de diversas fuentes, una de ellas pueden ser las oxidaciones químicas (organismos quimiótrofos que toman compuestos ricos en electrones (oxidables) del medio para la formación de su biomasa (reacciones de asimilación)). La energía libre ( $\Delta G_f$ ) de tales reacciones indica que pueden ser exergónicas ( $\Delta G^-$ ), en cuyo caso la oxidación de los compuestos resulta suficiente para la formación de biomasa, o puede ser endergónica ( $\Delta G^+$ ), en cuyo caso se requerirá una segunda reacción acoplada que provea la energía necesaria para la síntesis de la misma (reacciones desasimilativas, donde los productos

En estudios de ecología microbiana se destacan por su utilidad y versatilidad, las técnicas voltamétricas<sup>7</sup>. Entre ellas, la técnica denominada Voltametría de Pulsos Diferenciales (VPD) registra una corriente eléctrica producida al aplicar un potencial eléctrico, que aumenta en el sentido negativo o positivo de manera controlada a través de un electrodo y provoca la reducción o la oxidación de los compuestos electroactivos presentes en el analito. Esta corriente corresponde a una reacción de reducción u oxidación que ocurre en el analito. Ejemplo: cuando el potencial aplicado avanza en el sentido negativo y alcanza un valor de -0,6 V que es el potencial de reducción del compuesto A (A<sub>ox</sub>), el mismo gana un electrón y pasa a la forma A reducida (A<sub>red</sub>) y se produce un pico de corriente eléctrica (μA), denominado en este caso pico catódico, siendo la altura de ese pico proporcional a la concentración del compuesto A reducible. Por lo tanto esta técnica permite cuantificar las especies redox (Figura 2 y Figura 3).

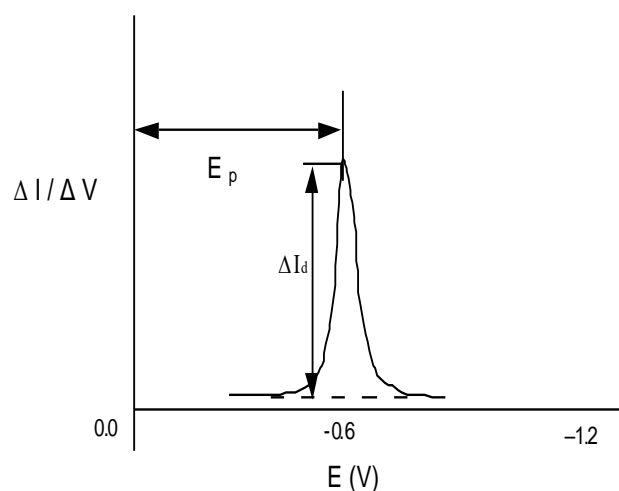


Figura 2: Voltametría de pulsos diferenciales (VPD). Se observa la reducción de especies químicas alrededor de los -0,6 Voltios (pico catódico). La altura del pico informa sobre la cantidad de especies químicas que se reducen a un potencial determinado (modificado de Pidello, 2014<sup>2</sup>, 2011<sup>40</sup>).

---

de tales reacciones se liberan al medio, como en el caso de los microorganismos que utilizan la reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y liberan N<sub>2</sub>O). Como resultado final, considerando solamente el efecto del metabolismo microbiano, vemos que el mismo puede producir un continuo cambio en el status redox del sistema.

<sup>7</sup> Referencia <sup>5</sup>.

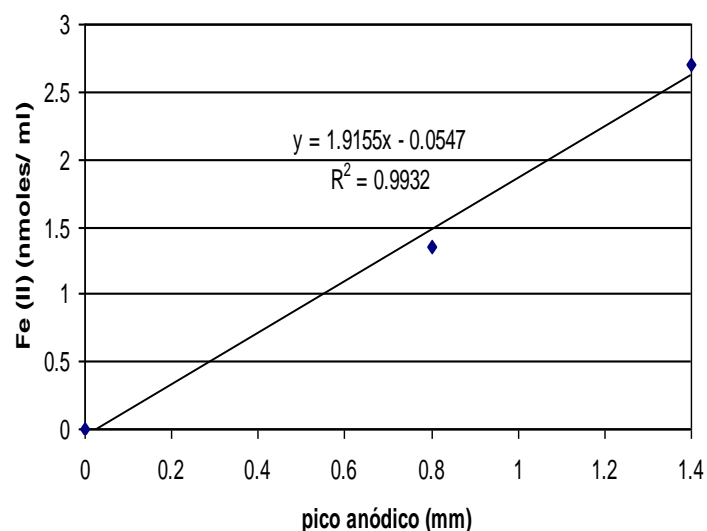
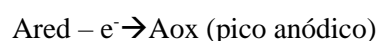
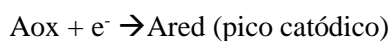


Figura 3. Un aumento de la concentración de ión  $\text{Fe}^{2+}$  en el analito es claramente detectado por la altura del pico observado en un barrido anódico (hacia potenciales positivos) correspondiente al potencial de reducción que corresponde al par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  ( $E = +0,771$ ) (Datos del Laboratorio de Química Biológica. FCV).

En la técnica denominada Voltametría Cíclica (VC)<sup>8</sup> ocurre el mismo proceso, pero en un momento dado el potencial aplicado se revierte y entonces, además del *pico catódico*, también aparece un *pico anódico* que corresponde a la reacción contraria, las reacciones que se presentan son:



El potencial (V), la altura de *los picos* ( $\mu\text{A}$ ) y la separación de *los picos* permiten caracterizar las reacciones redox que ocurren en el analito (Figura 4 y Anexo 2<sup>9</sup>)

<sup>8</sup> Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL (2018) A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 95, 197-206.

<sup>9</sup> Pidello A (2017) Measurement of the antioxidant capacity of forage using the amount of superoxide radical in ruminal fluid. *Adv. Appl. Sci. Res.*, 8 (2), 55-61.

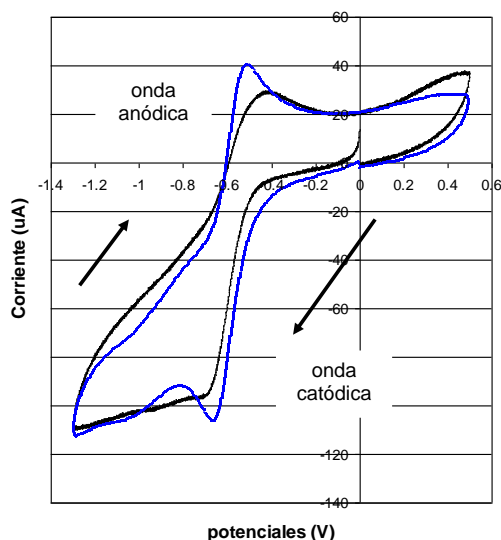


Figura 4: Voltametría Cíclica (VC). La corriente aumenta hacia los potenciales negativos (onda catódica) produciendo la reducción de las especies oxidadas (pico catódico;  $I_c$ ) y luego se invierte hacia los potenciales positivos (onda anódica) produciendo la oxidación de las especies reducidas (pico anódico;  $I_a$ ) (Pidello, 2014<sup>2</sup>).

Con la técnica de VPD se logra determinar la cantidad de compuestos electroactivos presentes en un analito. Por lo tanto a partir de los datos del E (potencial de reducción en Voltios) y de la concentración de compuestos electroactivos (la cantidad de corriente que indica la altura del pico observado en nA/mV) se puede determinar el comportamiento general del sistema a través de su status redox (status oxidante o status reductor)<sup>10</sup>.

$$\text{Status oxidante} = \sum E \text{ (mV)} \times [\text{especie oxidada; nA / mV}]$$

Donde,

E= potencial que corresponde a cada par detectado cuando se realiza el barrido voltamétrico en el sentido de los potenciales de reducción decrecientes.

nA/mV= cantidad de compuestos electroactivos determinado por voltametría.

<sup>10</sup> Pidello A (2003) desarrolló el concepto de *status redox* (status oxidante o status reductor) a partir del razonamiento utilizado por Schafer y Buettner (2001), que puede ser definido por la sumatoria de los productos de los potenciales de reducción (factor de intensidad) (E; Voltios) por la concentración de compuestos electroactivos (factor de capacidad) determinada por voltametría (VPD). Pidello A (2003) Signification écologique du potentiel redox et de la capacité redox en sédiment d'eau douce. . En Qualité et gestion des sédiments d'eau douce. Éléments physico- chimiques et biologiques. Coor. B. Montuelle. Cemagref editions. 105- 134.

Las ventajas del uso de voltimetría en ambientes naturales en general y especialmente en los estudios de ecología microbiana, son: (i) se logra definir con precisión el *status* redox asociando el potencial redox medido ( $E$  mezcla) con los componentes electroactivos realmente presentes; (ii) A través del *status* redox se puede monitorear la estabilidad temporal de un sistema en términos del tipo (factor de intensidad redox) (potencial de reducción,  $E$  aparente) y de la cantidad de compuestos electroactivos (factor de capacidad redox), y (iii) se pueden establecer relaciones de causalidad entre la cantidad de compuestos electroactivos observados en un rango determinado de potenciales y la expresión de uno o varios grupos funcionales microbianos.

En relación con (i) resulta de interés mencionar la utilidad de las curvas de intensidad potencial como descriptoras de la aparición de interacciones entre distintos compuestos electroactivos. La Figura 5, muestra comparativamente el comportamiento de mezclas acuosas sometidas a barridos de voltimetría de pulsos diferenciales (VPD). Se observa claramente que cuando una fracción de un extracto natural de suelo (f I) se mezcla con una solución de Hidroquinona ( $QH_2$ ) aparte de modificarse la cantidad total de compuestos electroactivos, también se modifica la cantidad que corresponde a distintos potenciales de reducción, lo que evidencia la neoformación de compuestos electroactivos.

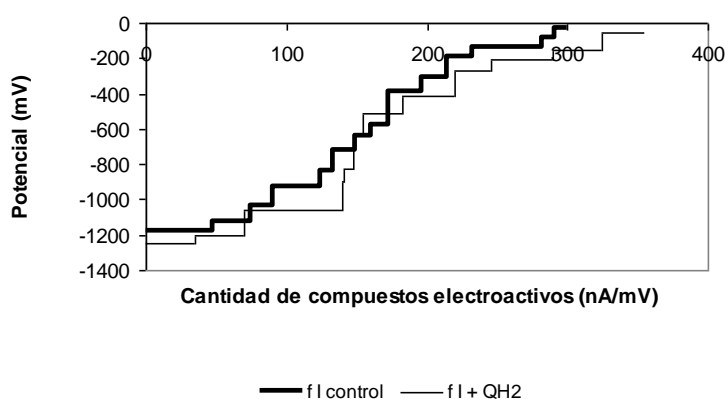


Figura 5: Barridos de voltimetría de pulsos diferenciales (VPD) en un extracto orgánico natural control (fI) y suplementado con una solución de Hidroquinona ( $QH_2$ )<sup>11</sup>.

Por lo expuesto resulta evidente que las técnicas voltamétricas constituyen una importante herramienta para la comprensión de los procesos redox y su comparación en los ambientes más diversos. Por otra parte, a través de su potencialidad para establecer la

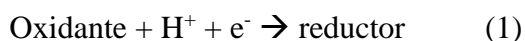
<sup>11</sup> Pidello A, Zerbato ME, Faienza H (2013) Changes in the electrochemical behavior of a redox mediator in the presence of humic fractions. *Advanced Materials Research*, 664, 245–250 ISSN 1662-8985.

especiación de los compuestos electroactivos presentes en un sistema dado constituyen una herramienta valiosa para monitorear el rango de perturbación que puede experimentar un ambiente natural por acción de efectores de origen antrópico (compuestos de uso farmacológico, por ejemplo).

## 1.2. Las reacciones redox y el pH en sistemas biológicos

### 1.2.1 Relación Eh/pH

Las variaciones en las concentraciones de especies con capacidad de actuar como agentes reductores y/u oxidantes obviamente se traducen en variaciones en el potencial de reducción del sistema. Sin embargo es necesario recordar que la actividad de los electrones (valor teórico que se expresa como  $-\log e^- = pe$ )<sup>12</sup> no es el único factor que debe ser analizado para determinar el status redox de un sistema, ya que la concentración de  $H^+$  en el medio también influye, según la siguiente reacción que representa el caso más común de las reacciones redox:



En los ambientes naturales el agua es el solvente normal, en el cual se van a desarrollar las reacciones químicas de transferencia de  $H^+$  y  $e^-$ , por lo tanto hay que tener en cuenta que la molécula de agua también tiene capacidad de actuar como efector ácido-base o redox. La estabilidad de una sustancia en el agua está determinada por su estabilidad intrínseca y por la posibilidad de que sea oxidada o reducida por ella y por el oxígeno de la atmósfera (en equilibrio con el oxígeno en la solución). En los ambientes naturales las posibilidades de transferencias de  $H^+$  y  $e^-$  entre el componente biótico y el abiótico y en el interior de cada uno de ellos son amplias y dinámicas en el tiempo. Por lo tanto, una estrategia indispensable para comparar potenciales de reducción de diferentes ambientes naturales o del mismo ambiente en diferentes momentos consiste en “anular” o “sacar del juego” el efecto de los  $H^+$ . Esto se consigue aplicando la ecuación de Nernst a la reacción (1):

---

<sup>12</sup> Aunque no existen electrones libre en la naturaleza, la “cantidad” de electrones, siguiendo el razonamiento aplicado en la teoría del pH, se puede representar por la expresión  $pe$ . A partir de la  $K$  de equilibrio, de la expresión que define la energía libre ( $\Delta G^\circ$ ) y su vinculación con  $E^\circ$  (Ref.<sup>2</sup>) surge la expresión:  $pe^\circ = Eh^\circ/0,059$ .

$$E = E^0 - (R.T / n.F) \ln [(a_{\text{Reductor}}) / (a_{\text{Oxidante}}) \cdot (H^+)]$$

Utilizando logaritmo de base 10 y ajustando los signos, queda:

$$E = E^0 + 2,3. (R.T/n.F). \log [(oxidante)/(reductor)] - 2,3.(R.T/F) \cdot \text{pH} \quad (2)$$

O sea, cuando se trabaja en condiciones estándar (1M de oxidante y de reductor y por lo tanto pH=0) según la ecuación (2) el E será igual  $E^0$ . Pero si se varía el pH manteniendo las concentraciones de Ox/Red en 1M a 20°C (273°K), por cada unidad de aumento de pH se registrará una disminución de 0,059 V de potencial. O sea a valores de pH más bajos, los potenciales teóricos serían más elevados y el sistema sería más oxidante. Esto se puede representar en la Figura 6.

En los ambientes naturales como una cavidad corporal, el suelo o un curso de agua, las condiciones están lejos de corresponder a las condiciones estándar. Por lo tanto, para poder comparar diferentes potenciales de reducción medidos (denominados potenciales de reducción aparentes,  $E'$  o Eh), sin la interferencia del efecto de los  $H^+$ , es

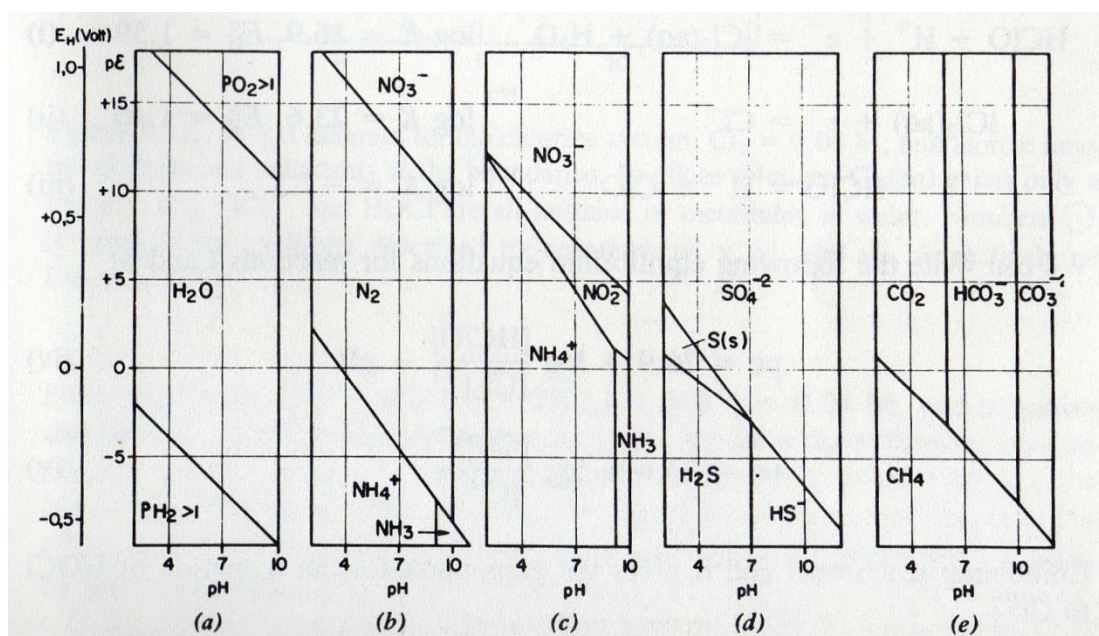


Figura 6. Diagrama Eh – pH para elementos con importancia biológica (25°C). (a) Las líneas de arriba y abajo representan el equilibrio en la oxidación ( $\rightarrow O_2$ ) y la reducción ( $\rightarrow H_2$ ) del  $H_2O$  respectivamente; (b) representa el sistema nitrógeno considerando los estados de oxidación(-III), estado elemental y (V); (c) representa las formas inorgánicas del nitrógeno considerando inerte el estado elemental; (d) representa las especies del Azufre; (e) representa el sistema Carbono, sin considerar la termodinámicamente posible existencia del C elemental (Tomado de Stumm y Morgan, 1996)<sup>13</sup>. En la figura aparece asimismo el valor

<sup>13</sup> Stumm W, Morgan JJ (1996) *Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. NY. Third Edition. 461.

de  $p_e$  ( $-\log e^-$ ) que se relaciona con el Eh a través de la expresión:  $p_e = Eh / 0.059 \text{ V}$ , que permite asociar el potencial de reducción (variable de intensidad) con la cantidad de electrones.

necesario ubicarlos en un valor de pH teórico donde la concentración de  $H^+$  sea igual a la de  $OH^-$  (pH neutro=7). De lo expuesto resulta la siguiente fórmula, deducida de la ecuación (2):

$$Eh_7 = Eh - 0,059 \cdot (7 - pH)^{14}$$

Donde:

Eh = potencial aparente (Eh medido); y

$$0,059 = 2,3 \cdot (R.T/n.F)$$

El valor 7 es el valor de pH en el cuál las concentraciones de  $H^+$  y de  $OH^-$  son iguales (neutralidad), y pH es el valor de pH medido.

## 1.2 .2 Las reacciones redox y el pH en los sistemas microbianos

Como se deriva de lo dicho anteriormente, en los ecosistemas naturales la actividad metabólica bacteriana afecta y es afectada por las condiciones redox de los mismos.

Como ejemplo del primer caso, la actividad de las bacterias aeróbicas promueve el consumo intenso de oxígeno y de sustancias reductoras, hasta un punto en el cual si se agotan los nutrientes y el aporte de oxígeno es insuficiente, comenzarán a proliferar otras especies bacterianas que puedan utilizar un aceptor de electrones con potencial más bajo que el oxígeno. Sin embargo, las comunidades microbianas transferirán los electrones provenientes de la oxidación del carbono reducido siempre al aceptor que les permita obtener la mayor ganancia energética del proceso, o sea, al de mayor potencial de reducción (en la biosfera terrestre el aceptor mayoritario es el oxígeno)<sup>15</sup>.

En el segundo caso, las condiciones redox del sistema pueden modificar la disponibilidad de micronutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano, como el Fe, S, N, C y P. Por ejemplo, a valores de potenciales elevados (ambientes oxidantes) hierro y manganeso existen en forma trivalente y tetravalente respectivamente ( $Fe^{3+}$ ;  $Mn^{4+}$ ). Estas

---

<sup>14</sup> Glinski J, Stepmiewski W (1985) *Soil Aeration and its role for Plants*. CRS Press.

<sup>15</sup> Atlas RM, Bartha R (1993) *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Redwood City: The Benjamin Cummings Publishing.

formas ionizadas son insolubles y no accesibles para el consumo microbiano. En cambio, las formas bivalentes de estos metales ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) se generan a potenciales bajos (ambientes reductores), son solubles en agua y fáciles de incorporar por los microorganismos. La determinación del valor del potencial redox (Eh) de un ambiente permite estimar qué aceptor inorgánico de electrones es potencialmente utilizable por la comunidad microbiana en un momento determinado, y deducir qué grupo de bacterias puede presentar un metabolismo más activo. Las bacterias anaerobias estrictas se desarrollarán a potenciales negativos, las aerobias estrictas lo harán a potenciales positivos, mientras que las facultativas podrán sobrevivir en un amplio rango de potenciales pudiendo utilizar el  $\text{O}_2$  como aceptor de electrones si se encuentra presente o algún otro aceptor con un potencial menos positivo en su ausencia o incluso algunas realizarán reacciones de fermentación (que generan compuestos carbonados parcialmente oxidados)<sup>16</sup>.

En función de la discusión que se planteó en el ítem anterior, resulta evidente que la cantidad de  $\text{H}^+$  en un sistema microbiano resulta un *factor de proximidad* en relación con el status redox del mismo, tanto en el caso en que la actividad metabólica bacteriana sea un efector físico-químico a través de reacciones desasimilativas por ejemplo (el cuerpo bacteriano excreta productos metabólicos) (Ref <sup>6</sup>), como en el caso en que la actividad metabólica de las células microbianas sea afectada por las condiciones físico-químicas del ambiente.

### 1.3 Ubicuidad de las reacciones redox

En todos los sistemas naturales y en todos los organismos vivientes ocurren reacciones redox. Como venimos diciendo en párrafos precedentes, en los seres vivos esto se observa tanto a nivel intra como extracelular. Y en líneas generales en el primer caso podemos mencionar a los procesos oxidativos relacionados a la respiración celular, o también a los procesos reductivos relacionados con la fotosíntesis. En ellos la concentración y la disponibilidad de moléculas orgánicas, como glúcidos, e inorgánicas, como oxígeno o dióxido de carbono, conducirán la dirección de los procesos redox. Sin embargo, en el segundo caso, si ampliamos la mirada hacia los ecosistemas naturales como por ejemplo un sistema edáfico o una cavidad corporal (como la oral, digestiva o

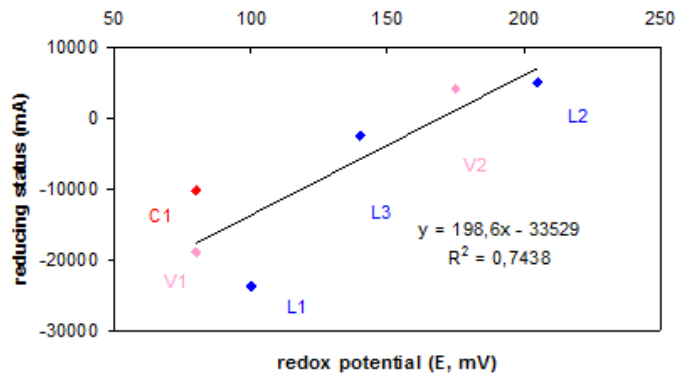
---

<sup>16</sup> Lynch JM, Poole NJ (1979) *Microbial ecology: A conceptual approach*. John Wiley & Sons, New York.

vaginal), en ellos, la acción metabólica de los microorganismos que los habitan son probablemente la variable más importante que influye sobre las interacciones redox con el ambiente mediante alguno de los siguientes mecanismos: (i) tomando  $e^-$  de compuestos químicos para obtener (o liberar) energía; y (ii) incorporando  $e^-$  en una pluralidad de compuestos químicos, con lo que entre otras cosas, diversifican cuali y cuantitativamente la oferta de sustratos bioenergéticos utilizables por el componente microbiano del ambiente.

En otras palabras, los microorganismos influyen a través de sus rápidas variaciones a nivel del componente numérico (cantidad de microorganismos) y funcional (lo que hacen) sobre el conjunto de circunstancias y condiciones que regulan el estado redox, (disponibilidad de electrones en un sistema dado). Modifican la diversidad (factor de intensidad redox), y/o modifican la cantidad de compuestos electroactivos (factor de capacidad redox) o sea son capaces de modificar el *status* redox ( $Status\ redox = \sum E.$  [especie redox])<sup>10</sup>. Si bien estas interacciones son complejas, estas variables aparecen en los estudios de ecología microbiana como muy aptas para contribuir a la caracterización de los ecosistemas microbianos naturales. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 7, donde se presenta la relación entre las variables de capacidad (*status* reductor; mA) y de intensidad (potencial redox; mV) en presencia de distintos tipos de microorganismos, habitantes ubicuos en el ecosistema vaginal humano.

Los resultados muestran que independientemente de que existan diferencias en el componente numérico (la concentración microbiana no era la misma) y funcional microbiano (los microorganismos predominantes poseían patrones metabólicos diferentes, por consiguiente debían influir sobre el ambiente de manera diferente) los fenómenos redox en el sistema estudiado presentaron una vinculación lineal cuando se analizaron en términos de factor de intensidad (E) y de capacidad (cantidad de compuestos electroactivos). Por otro lado, estos resultados sugieren que el impacto de la actividad microbiana sobre los fenómenos redox en este sistema se debería analizar en términos del componente de intensidad y de capacidad, ya que como se muestra en la Figura (B), los valores promedios que sugieren que los fluidos descritos como normales (*Lactobacillus*) presentaron menores valores de E y de *status* reductor, en potenciales altos no reflejan adecuadamente las diferencias ni la complejidad de los sistemas que surge al considerar las muestras individuales (Figura 7 A). Este abordaje que jerarquiza un estudio simultáneo de la intensidad y la capacidad redox no es el más común en los estudios de ecología microbiana<sup>5</sup>.



(A)

Microorganismo predominante	Cuadro clínico	n	E <sup>2</sup> (mV)	Status reductor <sup>1</sup>	
				rango de E	de E
<i>Gardnerella</i>	Vaginosis	3	+170 c	0 a +800 mV	0 a -900 mV
	Bacteriana			+4993 c <sup>3</sup>	-8391 c
<i>Cándida Albicans</i>	Candidiasis	3	+220 b	+5623 b	-3969 b
<i>Lactobacillus</i> spp	Normal	2	+125 a	+3589 a	-5021 a

$$^1 \text{ Status reductor} = \sum_{i=1}^{n(\text{par})} E_i (\text{mV}) \times (\text{nA/mV})_i; ^2 \text{ Los valores de E (mV) corresponden}$$

a la medida en SF; <sup>3</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas

respecto al cuadro clínico normal ( $p < 0,05$ ).

(B)

Figura 7. En (A) se presenta el comportamiento observado en diferentes muestras de fluido vaginal humano. El status reductor presentó una relación lineal con el potencial redox (E) independientemente del hecho dichos fluidos se encuentren colonizados por *Lactobacillus* spp (L), *Candida* spp (C) y *Gardnerella vaginalis* (V). En (B) se presentan los valores promedios observados, los cuales sugieren que los fluidos descritos como normales (*Lactobacillus*) presentaron menores valores de E y de status reductor en potenciales altos (Ombrella A; Ruiz Abad I; Coletti-Zaballa T; Pidello A, 2007, datos no publicados).

Por otra parte, las superficies corporales animales se encuentran colonizadas por bacterias que en condiciones ideales tienen función protectora a través de la formación de *biofilms*. Estos, así como son influidos por factores provenientes del huésped o del medioambiente en el que se encuentran, también son efectores de ciertos cambios en el medio en el que se encuentran, entre ellos el estado redox.

Por lo expuesto, la comprensión de las reacciones redox es indispensable para la protección del bienestar físico, condición *sine qua non* en organismos saludables<sup>17</sup> (tanto

<sup>17</sup> Definición de *salud* según la Organización Mundial de la Salud: Estado de completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. La cita procede del Preámbulo

de los organismos vivos como de los ecosistemas que conforman su hábitat) como así también para el desarrollo de estrategias terapéuticas cuando se requiera recuperarlo.

#### 1.4 Condicionantes redox en el ecosistema vaginal

En este trabajo de tesis se realizaron experimentos para caracterizar el comportamiento de la solución acuosa conformada por los componentes presentes en el fluido vaginal a través del estudio de algunos parámetros bioquímicos que son condicionantes de proximidad del estado redox: (i) homogeneidad en la distribución de tallas moleculares de los compuestos presentes (fraccionamiento con Sephadex G25® y absorbancia a 200 nm); (ii) concentración en componentes electroactivos (CCE) (voltametría de pulsos diferenciales, VPD); y (iii) capacidad como ecosistema redox.

## **2. Las moléculas efectoras redox utilizadas en este estudio: quinonas e imidazoles**

Las *moléculas quinónicas* son químicamente ciclohexanodionas, compuestos orgánicos cíclicos que contienen en un anillo bencénico dos grupos carbonilos. Pertenecen a un grupo ubicuo de moléculas que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, animal, en el suelo y también en el aire debido a la combustión incompleta de combustibles fósiles y/o formados por conversión fotoquímica atmosférica. Intervienen en cadenas de transportadores de electrones que tienen importantes roles en los organismos vivientes, como por ejemplo la fotosíntesis y la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Mayoritariamente se trata de benzoquinonas, naftoquinonas y antraquinonas. Actualmente, este tipo de moléculas están siendo ampliamente estudiadas por sus propiedades antiinflamatorias, antibacteriales, antifúngicas, antiprotozoarias y principalmente antitumorales (Shang Airborne quinones). En el origen de estas capacidades se encuentra su aptitud para actuar reversiblemente en los procesos redox. Al-Maki *et al.* (2014)<sup>18</sup> demostraron la capacidad de una quinona (timoquinona) de disminuir el efecto tóxico de un agente antitumoral al

---

de la Constitución de la Organización Mundial de la Salud que entró en vigor en 1948 y no ha sido modificada desde entonces.

<sup>18</sup> Al-Malki AL, Sayed BMC (2014) Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa-  $\beta$ . *Complementary and Alternative Medicine*, 14:282. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/282>

ser administrado conjuntamente con ella. Asimismo Shang *et al.* (2014)<sup>19</sup> reportaron que el efecto tóxico de quinonas transportadas vía atmosfera disminuía en presencia de un antioxidante involucrado en la síntesis de glutatión, sugiriendo que las especies reactivas del oxígeno (ROS) juegan un rol importante en los efectos de las quinonas.

En este trabajo de tesis, se seleccionó una molécula quinónica: la *p*-benzoquinona (Q) (en su forma reducida Hidroquinona, QH<sub>2</sub>). Las ecuaciones de reducción de las formas quinónicas Q y AQDS<sup>2-</sup> (correspondiente a la Antraquinona 2,6 disulfonato) se presenta en la Figura 8. En la misma se observa claramente que las quinonas en solución forman varias especies químicas y la especiación está conducida por los cambios en el estado ácido-base y el estado redox<sup>207</sup>. En relación con estos fenómenos, como lo dijimos anteriormente, las técnicas voltamétricas se presentan como herramientas óptimas, por su versatilidad y simpleza, para identificar especies redox en soluciones complejas como los líquidos biológicos. La Figura 9, esquematiza el comportamiento de una solución de AQDS en un solvente aprótico (DMSO) y muestra la formación del producto de su reducción depositado en el ánodo de Pt.

---

<sup>19</sup> Shang Y, Zhang L, Jiang Y, Li Y, Lu P (2014) Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: The role of reactive oxygen species. *Chemosphere*. (100), 42–49.

<sup>20</sup> Referencia <sup>11</sup>

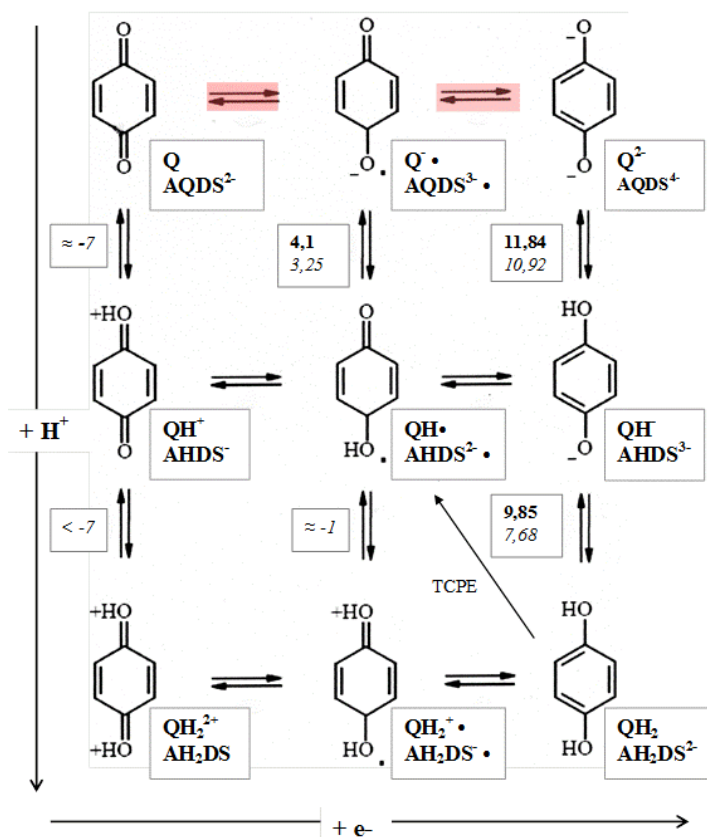


Figura 8. Especiación redox de las moléculas quinónicas. Las quinonas en solución pueden formar varias especies químicas y la especiación está conducida por los cambios en el estado ácido-base (pH, eje de ordenada) y el estado redox (cantidad de  $e^-$  disponible, eje de absisa). Se presenta como modelo la Benzoquinona (Q) (fórmula estructural) y la Antraquinona 2,6 disulfonato (AQDS<sup>2-</sup>) y la reducción se realiza de a un electrón (Modificado de Rosso, 2004<sup>21</sup>; Pidello, 2014<sup>2</sup>). Aparecen en rojo la secuencia de especies cuando las modificaciones involucran un solo  $e^-$  y los  $H^+$  no intervienen.

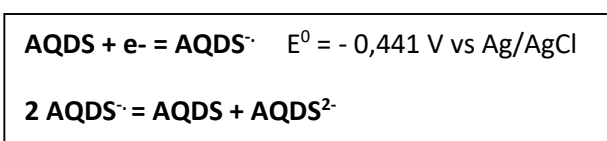


Figura 9. En un solvente aprótico el AQDS acepta un electrón y forma un radical ión que corresponde a la semiquinona ( $E^0 = -0,441 \text{ V}$ ). La semiquinona es efímera y se dimeriza como indica la reacción. El proceso se visualiza claramente (coloración roja) en un barrido voltamétrico cuando el electrodo de Pt funciona como un ánodo y se utiliza un electrodo de carbono vítreo como electrodo de trabajo (Foto de Archivo del Laboratorio de Química Biológica, FCV UNR).

<sup>21</sup> Rosso KM, Smith DMAM, Wang Z, Ainsworth CC, Fredrickson JK (2004) Self-Exchange Electron Transfer Kinetics and Reduction Potentials for Anthraquinone Disulfonate. *J. Phys. Chem.*, 108 (16), 3292–3303.

En relación con la Figura 8, importa destacar el hecho que las especies correspondientes a diferentes situaciones ácido-base y redox que se observan, pueden aparecer fácilmente en los escenarios biológicos como lo muestra el esquema propuesto por diversos autores para explicar la relación entre la especiación de la quinona y la concentración de anión superóxido, poderoso y ubicuo<sup>9</sup> efector redox en los sistemas aeróbicos (Figura 10).

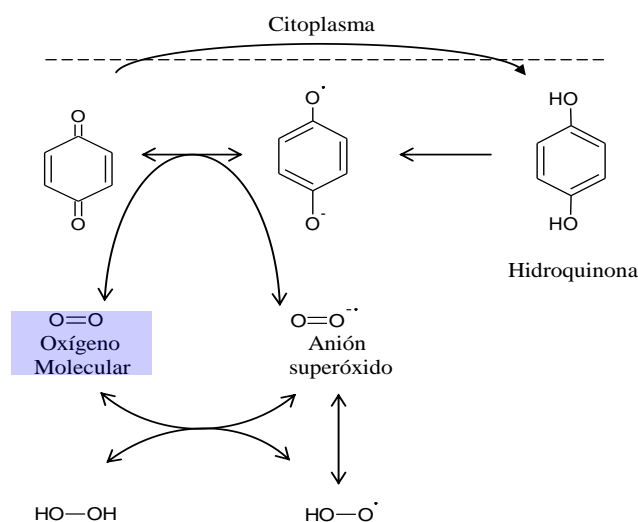


Figura 10. Modelo del ciclo redox extracelular aeróbico de la Hidroquinona (Modificado de Gómez-Toribio et al, 2009<sup>22</sup>; Szewzyk and Shink, 1989<sup>23</sup>).

El barrido en VC de H<sub>2</sub>Q en medio acuoso no tamponado (Figura 11) presenta dos picos en la onda anódica que corresponden a la pérdida de e<sup>-</sup> (A2 y A1; reacción de oxidación) y dos picos en la onda catódica que se corresponden a la ganancia de dos electrones (C1 y C2; reacción de reducción).

<sup>22</sup> Gómez-Toribio V, García-Martín AB, Martínez NJ, Martínez AT, Guillén F (2009) Induction of Extracellular Hydroxyl Radical Production by White-Rot Fungi through Quinone Redox Cycling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (12), 3944-3953.

<sup>23</sup> Szewzyk U, Schink B (1989) Degradation of hydroquinone, gentisate, and benzoate by a fermenting bacterium in pure or defined mixed culture. *Archives of microbiology*, 151 (6), 541-545.

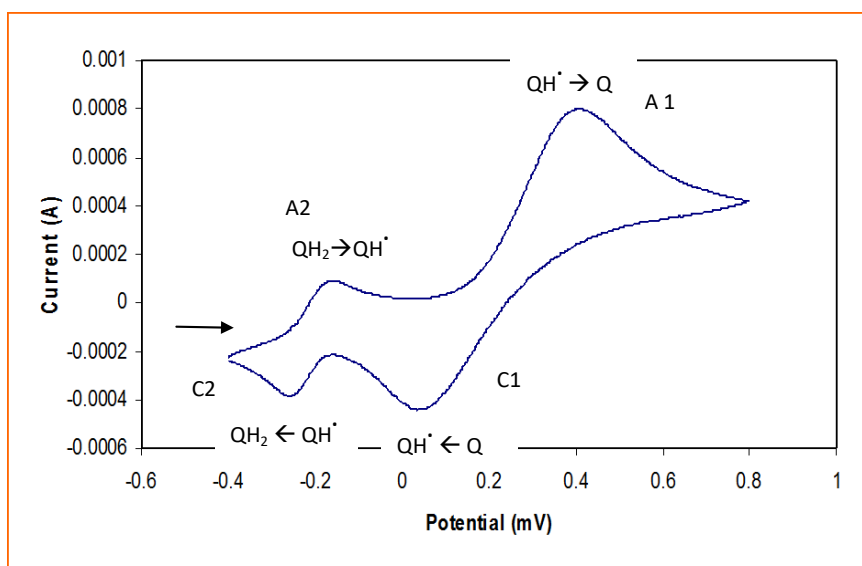


Figura 11. Comportamiento de una solución de hidroquinona ( $H_2Q$ ) en medio acuoso no tamponado. El analito contenía 200  $\mu l$   $H_2Q$ ; 4300  $\mu l$   $H_2O$  destilada libre de  $O_2$  y 400  $\mu l$   $KCl$  2M como electrolito soporte. Los voltanogramas se iniciaron en dirección de los potenciales positivos a -0,4V hasta +0,8V con una velocidad de escaneo de 10 mV/s. La flecha indica el sentido del barrido voltamétrico (Datos del Laboratorio de Química Biológica. FCV)<sup>24</sup>.

El 1-( $\beta$ - hidroxietil)-2- metil-5- nitroimidazol (Metronidazol; MTZ) (Figura 12 y Figura 13) (y los compuestos relacionados estructuralmente con el 5-nitroimidazol) (Upcroft *et al.* 2006)<sup>25</sup> es un antibiótico que tiene un espectro de actividad amplio. Fue demostrado que la eficacia de los compuestos 5-metroimidazol depende de su grado de reducción<sup>26</sup>. Si los nitro-imidazol derivativos son solo parcialmente reducidos, el potencial de reducción es mayor y la eficacia del compuesto es menor (Castelli *et al.* 2000<sup>27</sup>; Simoes *et al.* 2001<sup>28</sup>)

<sup>24</sup> Coletti Zabala T, Zerbato ME, Ombrella A, Ruiz Abad I, Bernardi S, Pidello A (2009) Condicionantes redox en el ecosistema vaginal canino. *XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario*. Rosario 3 y 4 de diciembre de 2009.

<sup>25</sup> Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P (2006) *Antimicrob. Agents Chemother*, 50 (1), 344-347.

<sup>26</sup> Ang CW, Angie M, Jarrad AM, Matthew A, Cooper MA, Blaskovich MAT (2017) Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *J. Med. Chem.*, 60 (18), 7636–7657.

<sup>27</sup> Castelli M, Malagoli M, Lupo L, Roffia S, Paolucci F, Cermelli A, Zanca A, Baggio G (2000) Cytotoxicity and probable mechanism of action of sulphimidazole. *J.Antimicrob.Chemother.* 46, 541–550.

<sup>28</sup> Simoes J, Aroutcheva A, Shott S, Faro S (2001) Effect of metronidazole on the growth of vaginal lactobacilli in vitro. *Infect Dis Obstet Gynecol.*, 9, 41-45.

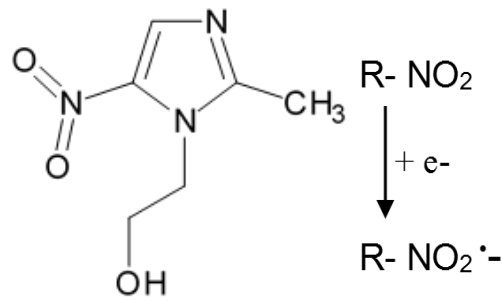


Figura 12. Reducción de 1-(β- hidroxietil)-2- metil-5- nitroimidazol (Metronidazol)

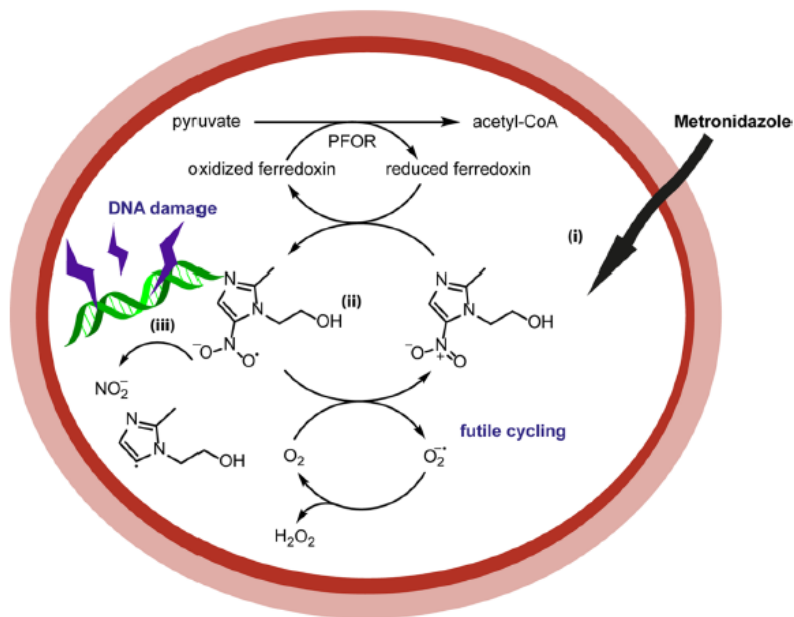


Figura 13. Mecanismo del MTZ que involucra la bio reducción del grupo nitro por la ferredoxina para producir especies reactivas de radicales los cuales producen lesiones en el ADN y conducen a la muerte celular (Tomado de Ang CW et al., 2017<sup>26</sup>).

demonstraron que el crecimiento de *Lactobacillus* sp en presencia de MTZ depende de la concentración del antibiótico. Concentraciones entre 128 y 256 µg/ml estimulan el crecimiento bacteriano mientras que no hubo diferencias significativas a 512 µg/ml o menores a 64 µg/ml. Concentraciones elevadas de MTZ entre 1000 y 4000 µg/ml, inhiben parcialmente el crecimiento de *Lactobacillus* spp. y mayores o iguales a 5000 µg/ml lo suprimen completamente.

El MTZ además de ser una molécula efectora redox, es un análogo estructural de la acil-homoserina lactona (acil-HSL), molécula señalizadora de *quorum sensing*<sup>29</sup> en

<sup>29</sup> ver Referencia <sup>33</sup>

bacterias Gram negativas. Ha sido reportada su capacidad para disminuir la expresión de factores de virulencia en bacterias como *P. aeruginosa*<sup>30</sup>.

Si bien el medio ambiente vaginal humano es un ecosistema que ha sido y continúa siendo muy estudiado (sobre todo a nivel microbiológico, donde la bibliografía disponible es amplia), no ocurre lo mismo con el medioambiente vaginal canino u ovino, donde la información es escasa o está direccionada hacia el estudio de patologías específicas que afectan el sistema reproductor.

Como dijimos en la Introducción, en este trabajo se utilizaron sistemas *in vitro*, con el propósito de estudiar luego de la incorporación de moléculas redox activas, tanto las modificaciones estructurales que podrían producirse sobre compuestos químicos nativos<sup>31</sup>, como así también las modificaciones sobre el componente biótico del sistema (en términos del componente numérico y del componente funcional). Ambas modificaciones pueden: (i) comprometer la eficiencia de moléculas introducidas como agentes terapéuticos frente a un determinado agente microbiano patógeno; y (ii) modificar la estructura (componente numérico) y el componente funcional de la población nativa propia del ambiente sano.

Por lo expresado precedentemente, resulta evidente que el eje que jerarquizamos como motor de estas modificaciones, potencialmente generadas por la incorporación de moléculas redox activas (QH<sub>2</sub> y MTZ) en el fluido vaginal sintético, es el ambiente físico-químico en general y el comportamiento redox y acido-base en particular. Estos fenómenos pueden potencialmente afectar características de los microorganismos muy importantes para la ecología microbiana, como lo son el quimiotactismo, la replicabilidad, o a la capacidad de expresión génica<sup>15 16</sup>, entre otras.

### 3. El ambiente vaginal

#### 3.1 La comunidad microbiana en este estudio

La cavidad vaginal de los mamíferos en condiciones normales está colonizada por una flora bacteriana beneficiosa que tiene función protectora sobre el tracto

---

<sup>30</sup> Abbas Hisham A (2015) Inhibition of Virulence os *Pseudomonas aeruginosa*: A Novel Role of Metronidazole Against Aerobic Bacteria. *Research J. Pharm. And Tech.* 8(12), 1640-1644.

<sup>31</sup> Coletti Zabala T, Zerbato M, Calderón M, Faienza H, Pidello A (2011) Efecto de un mediador redox sobre el comportamiento electroquímico del sistema metronidazol- fluido vaginal canino. *Jornada de Investigadores Jóvenes en Ciencias Veterinarias. UBA*, Buenos Aires 16 y 17 de junio de 2011. Distinción obtenida: **Mejor trabajo** Área Clínica y Cirugía de Pequeños y Grandes Animales.

genitourinario. Es capaz de interferir con otros microorganismos potencialmente patógenos, ya sea, compitiendo con ellos por los nutrientes o interfiriendo con la adhesión a receptores epiteliales, entre otros mecanismos<sup>32</sup>.

La supervivencia y el éxito reproductivo de las bacterias en muchos sistemas requieren la colonización de superficies y/o integración en la comunidad que conforma un *biofilm* (Lawrence et al 1995)<sup>33</sup>. Los *biofilms* están estructurados principalmente por grandes colonias de bacterias sésiles incrustadas en una matriz polimérica extracelular o glicocálix. Estos se crean cuando las bacterias libres flotantes perciben una superficie, se adhieren a ella y, a continuación, elaboran señales químicas para coordinar diferenciación y formación de estructura, incluyendo el desarrollo de una cubierta polisacárida protectora<sup>34</sup>. La capacidad de formar *biofilm* no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y, en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, independientemente de la especie, puede existir dentro de *biofilms* adheridas a superficies en una interfase sólido/líquida. Esta adhesión a una superficie húmeda, ya sea inerte o viviente, es de carácter irreversible, o sea, el *biofilm* no logra ser removido mediante lavado suave<sup>35</sup>. Su formación y estructura dependen de las características del substrato al cual se une y a otros aspectos del medio ambiente. Así, los *biofilms* en una superficie mucosa son fisiológicamente diferentes de aquellos formados en superficies inertes. Se ha acuñado el término “*biofilm* de mucosa” para describir aquellos que son característicos en mucosas. Estos, aunque estrechamente relacionados con los encontrados en superficies inertes, no son idénticos en cuanto a su expresión génica ni en la naturaleza de sus microambientes. Los *biofilms* de mucosas son modulados por la respuesta inflamatoria del huésped y, además, por proteínas y células del huésped que contribuyen a su composición. Como es ampliamente conocido, la formación de *biofilms* ocurre en diferentes etapas. La primera de ellas consiste en el acondicionamiento de la superficie, etapa en la cual los factores

---

<sup>32</sup> Reid, G (1999) The scientific basis for probiotic strains of *lactobacillus*. Minireview *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3763.

<sup>33</sup> Lawrence JR, Korber DR, Wolfaardt GM, Caldwell DE. (1995) Behavioral strategies of surface-colonizing bacteria. En Gwynfryn Jones, J (ed). *Microbial Ecology*, volume 14. NY: Plenum Press. 1-75.

<sup>34</sup> Scott C, Manning SC (2003). Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J* 82 (suppl): 18-20.

<sup>35</sup> Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 8 (9), 81-90.

físico-químicos del medio son determinantes, es decir, pH, oxígeno disuelto, *status* redox, también temperatura, carga superficial, etc. La segunda etapa consiste en la adhesión propiamente dicha, compuesta por una etapa reversible, donde siguen siendo claves las interacciones físico-químicas como las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas y una etapa de adhesión irreversible (*Quórum sensing*)<sup>36</sup> donde entran en juego las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedador, entre otros. Esta etapa es considerada un momento crítico en la colonización de los ambientes, debido a la existencia de complejas interacciones físico-químicas que tienen lugar en un organismo vivo, a las características propias de cada microorganismo, a la naturaleza de las superficies en estudio y a las características del ambiente en que se desarrolla el fenómeno<sup>37</sup>. La tercer etapa consiste en el proceso de maduración del *biofilm*, en ella ocurre la proliferación bacteriana, el aumento en la complejidad del *biofilm*, el ordenamiento según la posibilidad de cada especie de utilizar oxígeno, etc. La cuarta etapa corresponde al desprendimiento de células, como lo ejemplifica la Figura 14. Diversos estudios indican que a la base de este fenómeno existen mecanismos de oxidación complejos que involucran a los grupos tiol, como el glutatión y glutatión di sulfuro, a través de los cuales la molécula de acil-HSL crea condiciones redox particulares dentro del *biofilm*<sup>38 39</sup>.

---

<sup>36</sup> *Quorum sensing* es un sistema de comunicación intercelular regulado genéticamente. Consiste en la producción y liberación de moléculas señalizadores auto inductoras que aumentan su concentración en función del aumento de la densidad poblacional. Informan a la comunidad bacteriana que se ha alcanzado una masa poblacional adecuada para comenzar a expresar factores de virulencia. (Parsek, M, Greenberg EP. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13 (1), 27-33.

<sup>37</sup> An Y H F R J (Ed.) (2000) Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. Handbook of bacterial adhesion. Principles, mechanisms and applications. , Springer, New York.

<sup>38</sup> MacLehose HG, Gilbert P, Allison DG (2004) Biofilms, homoserine lactones and biocide susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 180 – 184.

<sup>39</sup> Shepherd JA, Waigh RD, Gilbert P (1988) Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1-3 diol (Bronopol). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32 (11), 1693–1698.

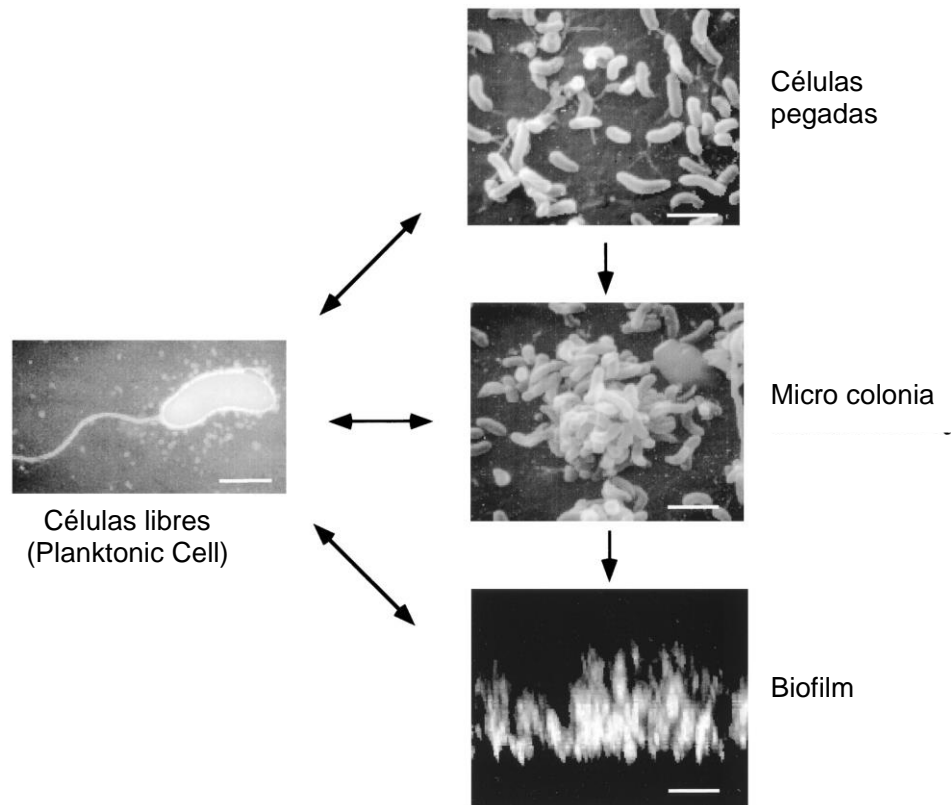


Figura 14. Estudio microscópico de las etapas de formación de un biofilm por *V. cholerae*. Las células libres son visualizadas por microscopía de transmisión de electrones (barra = 1 µm); las células adheridas y las micro colonias fueron visualizadas por microscopía de barrido (barra = 2 µm) y la imagen del biofilm corresponde a una sección vertical de 20 µm de espesor obtenida con microscopía confocal laser (barra = 10 µm) (Adaptado de Watnick y Kolter (2000) con el permiso de American Society for Microbiology para Pidello, 2011<sup>40</sup>).

En relación a este trabajo de Tesis y como se mencionó anteriormente (Capítulo I.2) la molécula de MTZ es un análogo estructural de la acil-homoserina lactona (acil-HSL) por lo cual a través de este hecho podría incidir significativamente en estos procesos.

### 3.1.1 Bacterias ácido-lácticas

*Lactobacillus* sp. pertenece a un grupo de bacterias Gram positivas con bajo contenido de C+G, que integra la familia Lactobacillaceae. Está integrado por más de 40 especies de bacilos Gram positivos, cuya morfología varía desde cocobacilos a bacilos largos y a veces curvos dependiendo de la edad del cultivo, composición del medio y tensión de oxígeno. No forman esporos, son inmóviles, anaerobios, microaerófilos o

<sup>40</sup> Pidello A (2011) *Ecología Microbiana. Química Redox*. Corpus, 144 p. ISBN 978-950-9030-91-6.

aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativos, carecen de citocromos, no reducen nitratos a nitritos. Sus requerimientos nutricionales son complejos y generalmente son característicos de cada especie o cepa: necesitan glúcidos (como fuente de energía y carbono), nucleótidos, ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas, etc. El metabolismo es fermentativo: son productores de ácido láctico. Se pueden clasificar en dos grupos: 1- homofermentativos: cuando la degradación de hexosas produce ácido láctico, caso de *L. acidophilus*; y 2- heterofermentativos, cuando producen ácido láctico, CO<sub>2</sub> y etanol o ácido acético<sup>41 42 43</sup>.

Algunos géneros pueden crecer a valores de pH tan bajos como 3,2 y otras a valores tan altos como 9,6 aunque la mayoría crece a pH entre 4 y 4,5. Esta característica les permite colonizar medioambientes donde otras bacterias no sobreviven<sup>42</sup>. Por lo tanto, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como del tracto digestivo y vagina de mamíferos<sup>44,45</sup>, considerándose bacterias benéficas. Existen algunas descripciones de casos de septicemias, abscesos y endocarditis asociadas a algunas especies de *Lactobacillus* en humanos, pero en general se las considera no patógenas<sup>28</sup>. La presencia de ácido láctico reduce el pH, previniendo o al menos retrasando, el crecimiento de otros microorganismos, excepto el de otras bacterias lácticas y levaduras. La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las bacterias lácticas reduce el pH del ambiente con un efecto inhibitorio de bacterias Gram positivas y negativas. En este sentido la forma no disociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana, donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente;

---

<sup>41</sup>Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria. A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28 (4), 281-370.

<sup>42</sup> Vázquez MS, Suárez MH, Zapata BS (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.*, 36 (1), 64-71.

<sup>43</sup> Vadillo S, Píriz S, Mateos E (2002) *Manual de Microbiología Veterinaria*. Mc Graw Hill/Interamericana de España, S.A.U. ©

<sup>44</sup> Torres MR (2002) Flora intestinal, probióticos y salud. Segunda edición, Formas finas (ed). Guadalajara, Jal.

<sup>45</sup> Azadnia P, Zamani NH, Shah Ahmad Ghasemi, Khalegh Babaki A, Karimi Jashni M, Taarof N (2011) Isolation and identification of thermophilic Lactobacilic from traditional yoghurts of tribes of Kaserum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (6), 774-776.

de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular<sup>43</sup>. Cuando el oxígeno está presente, pueden producir peróxido de hidrogeno, el cual genera radicales hidroxilo que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos<sup>46</sup>. Las bacteriocinas también son productos de las bacterias lácticas, son moléculas que tienen estructura tipo péptido o proteína biológicamente activas, las cuales presentan acción bactericida sobre receptores específicos de las células; además la composición química de estas sustancias es muy variada y su modo de acción específico<sup>43</sup>. Las bacteriocinas han sido intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* spp., entre otras <sup>43 47</sup>.

En investigaciones realizadas en la especie canina, cepas de *Lactobacillus* han sido aisladas en la gran mayoría de los cultivos realizados<sup>48 49</sup>. En un estudio realizado por Delucchi *et al.* (2008)<sup>49</sup>, las bacterias ácido-lácticas fueron recuperadas de las vaginas de perras sanas y enfermas, incluyendo animales tratados con antibióticos, sugiriendo que en la vagina canina *Lactobacillus* spp. es una población estable bajo variadas condiciones.

Como las propiedades de adhesión de las bacterias ácido-lácticas son difíciles de estudiar *in vivo*, se han descrito diferentes modelos *in vitro*, aunque en ninguno, a nuestro conocimiento, se utilizaron células epiteliales vaginales caninas. Los más utilizados son los que se basan en el mucus intestinal, aislado de tejidos intestinales de receptores

---

<sup>46</sup> Ouwehand AC (1998) Antimicrobial components from acid lactic bacteria. En *Lactic acid bacteria Microbiology and functional aspects*. (S. Salminen y A Von Wright, eds) 2° edición pp 139-160. Marcel Dekker Inc. New York, USA.

<sup>47</sup> Holo H, Jeknic Z, Daeschel M, Stevanovic S, Nes LF (2001) PlactaricinW from *Lactobacillus plantarum* belong to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147, 643-651.

<sup>48</sup> Noguchi Kazuhiro, Tsukumi Kiyoshi, Urano Toru (2003) Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Conventionally Reared Mice, Rats, Hamster, Rabbits, and Dog. *Comparative Medicine*, 53 (4), 404-412.

<sup>49</sup> Delucchi L, Fraga m, Perelmuter K, Cidade E, Zunino P (2008) Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of *in vitro* probiotic activity of selected isolates. *Can. Vet. J.*, 49(10), 991-994.

humanos<sup>50 51</sup> o de efluentes de ileostomías<sup>52</sup> o métodos basados en células por cultivo de tejidos<sup>53</sup>. En un trabajo realizado por Spencer et al<sup>54</sup> se demostró que cepas específicas de *Lactobacillus* inhiben la adhesión de *Escherichia coli* a células entéricas porcinas. En el trabajo realizado por Chan et al (1985)<sup>55</sup> se demostró que *Lactobacillus* sp. inhibía la adherencia de uropatógenos a células epiteliales urogenitales en condiciones *In Vitro*.

En el ecosistema vaginal humano, el género *Lactobacillus* es un importante productor de *biofilm*<sup>56</sup> y se considera predominante<sup>57</sup>. Dicho ecosistema saludable, se caracteriza por garantizar condiciones ácidas (pH < 4,5) y un potencial de reducción que oscila entre +320 y +130 mV. Sin embargo, en ciertas patologías como la vaginosis bacteriana, donde la población bacteriana es modificada en favor de anaeróbicos facultativos o estrictos como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., entre otros, el Eh puede descender significativamente<sup>58</sup>, hasta valores de -250 mV. Estos datos ponen en

---

<sup>50</sup> Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkkio S, Salmien S (2001) Assessment of adhesion properties of novel probiotic strain to human intestinal mucus. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 119.

<sup>51</sup> Versterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand A (2004) Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Reserch in Microbiology*, 156, 238-244.

<sup>52</sup> Tuomola E, Ouwehand A, Salminen S (1999) The effect of probiotic bacteria on the adhesión of phatogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26, 137-142.

<sup>53</sup> Gopal P, Prasad J, Smart H (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacteriumlactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Microbiol.*, 6, 207.

<sup>54</sup> Spencer RJ, Chesson A (1994) The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J. Appl. Bacteriol.*, 77(2), 15-20.

<sup>55</sup> Chan R C Y, Reid G, Irvin R T, Bruce A W, Costerton J W (1985) Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect. Immun.*, 47, 84-88.

<sup>56</sup> Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, Bruce A (2003) Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35 (2), 131-134.

<sup>57</sup> van de Wijgert JHHM, Mason PR, Gwanzura L (2000) Intravaginal practices, vaginal flora disturbances, and acquisition of sexually transmitted diseases in zimbabwean women. *The Journal of Infectious Diseases*, 181 (2), 587-594.

<sup>58</sup> Holmes KK, Chen KC, Lipinski CM, Eschenbahe DA (1985). Vaginal redox potential in bacterial vaginosis (nonspecific vaginitis). *J Infect Dis.*, 152 (2), 379-382.

evidencia la fuerte vinculación entre el estado redox de un ambiente y su población microbiana.

### 3.1.2 *Pseudomonas* spp. *P. fluorescens*

*Pseudomonas* es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, móviles, Gram negativos, oxidasa positivo. Son aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Tiene capacidad de habitar distintos ambientes<sup>43</sup>. *P. fluorescens* es una especie naturalmente resistente a un amplio espectro de antibióticos y desinfectantes, encontrándose comúnmente en centros de salud como contaminante de soluciones de lavado e incluso en material inyectable<sup>59</sup>. Posee un largo genoma con una gran cantidad de genes regulatorios que le confiere un elevado potencial para adaptarse al medioambiente<sup>60</sup>. Es considerada bacteria psicotrópica, sin embargo, se ha encontrado a temperatura corporal, fue aislada de vías respiratorias<sup>61</sup>, tracto urinario<sup>62</sup> y sangre<sup>63</sup> de pacientes inmunocomprometidos y previamente sanos, demostrando su capacidad de vencer el sistema inmune. *P. fluorescens* puede unirse a la membrana citoplasmática de neuronas y células de la glía<sup>64</sup> y sintetizar y liberar enzimas

---

<sup>59</sup> Whyte A, Lafong C, Malone J, Golda B (1999) Contaminated lithium heparin bottles as a source of pseudobacteremia. *J. Hosp. Infect.*, 42, 342-343.

<sup>60</sup> Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146, 2345-2350.

<sup>61</sup> Bernstein DI, Lummus ZL, Santilli G, Siskosky J, Bernstein IL (1995) Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols. *Chest.*, 108 (3), 636-641.

<sup>62</sup> Kaushal ML, Grover PS, Gupta ML (1998) Non-fermenters in urinary tract infection. *J Assoc. Physicians*, 46 (9), 798-800.

<sup>63</sup> Hsueh P, Teng L, Pan H, Chen Y, Sun C, Ho S, Luh K (1998) Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J Clin Microbiol.*, 36, 2914-2917.

<sup>64</sup> Picot L, Abdelmoula SM, Merieau A, Leroux P, Cazin L, Orange N, Feuilloley MG (2001) *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes Infect*, 3 (12), 985-995.

extracelulares potencialmente virulentas<sup>65 66 67 68 69 70 71</sup>. Rossignol (2008)<sup>72</sup> demostró la capacidad de una cepa de *P. fluorescens* de generar moléculas con un alto potencial de hemólisis y citotoxicidad incluso a temperatura corporal. Ha sido ampliamente estudiada por su capacidad para promover el crecimiento de plantas (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*; PGPR)<sup>73 74</sup>.

Estudios realizados en el laboratorio de Química Biológica (Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario) utilizando *P. fluorescens* como bacteria modelo mostraron que este microorganismo ubicuo, con probadas aptitudes como efector redox, disminuía la capacidad oxidante de agregados minerales naturales. Este hecho, que sugiere como mecanismo un aumento en la cantidad de electrones disponibles, es

---

<sup>65</sup> Hellio FC, Orange N, Guespin-Michel JF (1993) Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MF0, in the presence of various inducers. *Res. Microbiol.*, 144 (8), 617-625.

<sup>66</sup> Dieckelmann M, Johnson LA, Beacham IR (1998) The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.*, 85 (3), 527-536.

<sup>67</sup> Preuss I, Kaiser I, Gehring U (2001) Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Eur. J. Biochem.*, 268 (19), 5081-5091.

<sup>68</sup> Ivanov A, Titball RW, Kostadinova S (1996) Characterisation of a phospholipase C produced by *Pseudomonas fluorescens*. *New Microbiol.*, 19 (2), 113-121.

<sup>69</sup> Sacherer P, Defago G, Haas D (1994) Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gac A* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.*, 116 (2), 155-160.

<sup>70</sup> Crevel I, U S, Carne A, Katan M (1994) Purification and properties of zinc-metallophospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*. *Eur. J. Biochem.*, 224 (3), 845-852.

<sup>71</sup> Doi O, Nojima S (1971) Phospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 248 (2), 234-244.

<sup>72</sup> Rossignol G (2008) Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiology* 8,189 doi:10.1186 / 1471-2180-8-189.

<sup>73</sup> Lemanceau P (1992) Effets bénéfiques de Rhizobactéries sur plantes: exemple des *Pseudomonas* spp *fluorescens*. *Agronomie*. 12, 413-437.

<sup>74</sup> Lemanceau P, Berta G, Escande A, Favelukes G, Arias A, Pidello A (2002). *Reduction of the chemical inputs in a vegetable crop by the use of beneficial rhizospheric microorganisms*. INCO-DC. Contrat number: ERBIC18CT970180. Office For Official Publications of the European Communities.Brussels.

coincidente con los valores inferiores de potencial de reducción observados en los agregados inoculados<sup>75 76</sup>.

Se reconocen especies de *Pseudomonas* como habitantes normales de la cavidad vaginal canina<sup>77, 78</sup> siendo patógenos oportunistas, participando en patologías tales como el complejo hiperplasia endometrial quística-piómetra<sup>78 79 80 81</sup>.

### 3.1.3 *Staphylococcus* spp.

*Staphylococcus* es un género de bacterias Gram positivas, aeróbicas. Es un habitante normal de las cavidades vaginales canina y ovina, sin embargo es

---

<sup>75</sup> Amichetti ML, Coletti-Zabala T, Pidello A (2005) Impacto de un inóculo de *Pseudomonas fluorescens* cepa C7R12 sobre agregados arcillo-húmicos naturales. *XI Jornadas Argentinas de Microbiología // Jornadas de Microbiología e Infectología del Sur Argentino*. Bahía Blanca 1-3 de junio de 2005.

<sup>76</sup> Pidello A, Jocteur-Monrozier L (2006) Inoculation of the redox effector *Pseudomonas fluorescens* C7R12 affects soil redox status at the aggregate scale. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 1396-1402.

<sup>77</sup> Purswell BJ. (1995) Vaginal Disorders. En: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. WB Saunders. Philadelphia. 1642-1648.

<sup>78</sup> Hedlund, C. (1999) Piómetra. En: Fossum, T. *Cirugía en pequeños animales*. Inter-médica, Buenos Aires. República Argentina 588-593.

<sup>79</sup> El ciclo ovárico de las perras se divide en cuatro fases: (a) Proestro: es el período de hiperactividad folicular, generalmente se define que comienza cuando aparece el sangrado vaginal y termina cuando la hembra permite el apareamiento. Se producen rápidos cambios que aumentan el espesor de la mucosa vaginal en respuesta a la secreción folicular de estrógenos. Las células más alejadas del suministro sanguíneo y más cercanas al lumen, mueren y se queratinizan; (b) estro: es el período durante el cual se puede producir el apareamiento; (c) diestro: período que sigue a la cópula, se asocia con la actividad del cuerpo lúteo; y (d) anestro: es el intervalo de tiempo transcurrido entre el final de la fase luteal (progesterona; diestro) y el comienzo de la siguiente fase folicular (proestro).

<sup>80</sup> Bjurström L, Linde-Forsberg C (1992) Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *Am J Vet Res* 53(5), 665-9.

<sup>81</sup> Purswell BJ. (1995) Vaginal Disorders. En: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. WB Saunders. Philadelphia. 1642-1648.

considerado patógeno oportunista. Se aisló de secreción uterina de perras con piómetra.<sup>82 83 84 85 86</sup>.

### 3.2 El escenario vaginal

Anatómicamente la vagina es un tubo muscular que se extiende desde el cuello del útero hasta el vestíbulo. Por todo lo largo de la vagina se extienden pliegues mucoso-submucosos planos y longitudinales. Histológicamente la pared vaginal tiene tres capas: túnica mucosa-submucosa, túnica muscular y túnica adventicia o serosa. La mucosa vaginal sustenta principalmente un epitelio escamoso estratificado que incrementa su grosor durante el proestro y el estro<sup>87</sup>. Fisiológicamente es uno de los órganos que responde a los cambios hormonales impuestos por el ciclo estral. Una de las respuestas a esos cambios consiste en variaciones cíclicas en la altura y estructura del epitelio. El conocimiento de las modificaciones celulares mediante el método del frotis vaginal es usado universalmente para estimar el momento del estro y obtener cruzamientos exitosos en esa especie<sup>88</sup>. En las ovejas, si bien a nuestro saber la citología vaginal no se utiliza de

---

<sup>82</sup> Pinchetti M, Crossley R., Maier L. (2011). Flora bacteriana y sensibilidad microbiana de cepas aisladas a partir de úteros de perras con piometra. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12 (9), 1-6.

<sup>83</sup> Manes J, Ungerfeld R (2015) Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones en ambiente vaginal y su relación con la fertilidad. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 39 (1), 104-108.

<sup>84</sup> Manes J, Fiorentino MA, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R, Sanchez E, Paolicchi F (2010) Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Ruminant Research* 94, 201–204

<sup>85</sup> Cortés-López NG, Abad-Zavaleta J, Bravo-Delgado HR, Meza-Villalvazo VM, Sachman-Ruiz B, García Arellano C, del Moral Ventura ST (2013) Efecto del acetato de fluorogestona en la microbiota vaginal de borregas pelibuey en la cuenca del Papaloapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 16, 309 - 314

<sup>86</sup> Pinchetti, M., & Crossley, R., & Maier, L. (2011). Flora bacteriana y sensibilidad microbiana de cepas aisladas a partir de úteros de perras con piometra. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12 (9), 1-6.

<sup>87</sup> Tovar Muñoz MA, Hernández Vásquez A (1985). Histología y morfometría del epitelio vaginal ovino en el diagnóstico de la gestación. *Rev. Fac. Med. Vet y de Zoot.* (38), 1.

<sup>88</sup> Reddy KSC, Raju KGS, Rao KS, Rao KBR (2011) Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in btches. *Iraqi J. Vet. Sci.* 25, 51-54.

rutina para decidir el momento del servicio, también se reconocen cambios histológicos en el epitelio vaginal similares a los descriptos<sup>79 89</sup>.

Las células epiteliales vaginales se clasifican en cuatro tipos; parabasales, intermedias, superficiales y anucleadas<sup>90</sup>. Las secreciones del tracto genital femenino mantienen la humedad del epitelio vaginal. El fluido vaginal está compuesto por transudado plasmático, secreciones glandulares vestibulares, mucus cervical, secreciones endometriales, además de urea y células epiteliales. La gran cantidad de moco vaginal que aparece durante el estro se origina principalmente en el cuello. Las características y composición de este fluido determinan en gran medida las interacciones entre la microbiota nativa y las especies patógenas.

---

<sup>89</sup> Clemente Ovando N, Orihuela Trujillo A, Flores Pérez FI, Aguirre Flores V (2013) Citología y Análisis Morfométrico de las Células del Epitelio Vaginal Durante el Ciclo Estral en Ovejas de Pelo (*Ovis aries*) *Int. J. Morphol.*, 31(3), 888-893.

<sup>90</sup> (i) Células parabasales: son las células más pequeñas y sanas. Son redondas o ligeramente ovaladas y tienen un núcleo vesiculado grande y cantidades de citoplasma relativamente pequeñas. Esta célula se desprende de la capa de células germinales cercana a los vasos sanguíneos y predomina en el anestro y principios del proestro.

(ii) Células intermedias: Es una célula que varía de tamaño, desde apenas más grandes que las parabasales hasta el doble de su tamaño. Tienen márgenes lisos, irregulares, ovales a redondeados, y un núcleo vesiculado y más pequeño que el de las células parabasales. La presencia de esta célula indica la etapa anterior a su transformación a superficial, predomina a la mitad del proestro.

(iii) Células superficiales: Son células muertas que recubren el lumen vaginal de las perras en estro. Son las más grandes que se observan en la citología vaginal. Sus márgenes son agudos, planos y angulosos; tienen núcleos pequeños, picnóticos y decoloridos o no los tienen. Es característica del final del proestro y todo el estro, que es cuando la vagina se encuentra bajo la influencia del pico estrogénico.

(iv) Células anucleadas: Son grandes, muertas e irregulares sin núcleo representan el final de un proceso iniciado con las células redondas parabasales sanas.

(Tomado de: Dieter Dellman H (1994) *Histología Veterinaria*. Acribia. Isbn: 8420007552).

## **CAPÍTULO II. Caracterización química de los escenarios estudiados. Fraccionamiento molecular y caracterización espectrofotométrica**

Dada su versatilidad, reproductibilidad y en función de su relativa simpleza, en esta etapa del trabajo se jerarquizó el fraccionamiento con tamices moleculares y la espectrofotometría UV-visible, como herramientas analíticas. Los grupos de átomos que dan origen a la absorción en el UV cercano o UV de cuarzo (190-380 nm), se conocen como grupos cromóforos. La mayoría de los grupos insaturados y heteroatómicos que tienen pares de electrones no compartidos, son cromóforos potenciales y estos grupos son la base de la elucidación de grupos estructurales en las moléculas activas en el UV cercano<sup>91</sup>.

Se obtuvieron muestras de fluido vaginal canino (FVC) mediante la introducción de un hisopo estéril en la parte caudal de la cavidad vaginal, introduciéndolo posteriormente en 4 ml de solución fisiológica estéril. Las muestras se trasladaron refrigeradas al laboratorio en un lapso máximo de una hora, se agitaron en Vortex y se filtraron (Millipore®; 0,2 micras). En los casos en que se utilizó fluido vaginal sintético (FVS), el mismo se preparó según la formulación de Owen<sup>92</sup> modificada (Anexo 3)<sup>93</sup>

La caracterización por talla molecular se inició con la elución de las muestras de FVS o FVC a través de una matriz de gel Sephadex G 25® (Pharmacia®). Mediante un colector de fracciones (Roucaire, Retriever II) se recuperaron hasta 26 fracciones (2,8 ml cada una) a las cuáles se les midió la absorbancia a 200 nm (Hitachi-U 1500). La calibración del gel se realizó utilizando Azul Dextrano (PM: 2.106 Da; CAS No115-39-9) y Azul de Bromofenol (PM: 669.97 Da; CAS N° 87915-38-6) según la técnica de Cooper (1984)<sup>94,95</sup> (Anexo 4). La velocidad de flujo lineal fue 109,74 cm/h. La

---

<sup>91</sup> Skoog DA, Leary JJ, Holler FJ (1998) *Principios de análisis instrumental*, 5° ed.; Ed. McGraw-Hill.

<sup>92</sup> Owen DH, Katz DF (1999) A vaginal fluid simulant. *Contraception*, 59, 91-95.

<sup>93</sup> Juárez Tomás MS, Nader-Macías ME (2007) Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 732-739.

<sup>94</sup> Cooper G (1984), *Instrumentos y Técnicas de Bioquímica*, Reverté, Barcelona.

<sup>95</sup> Pidello A, Amichetti ML, Coletti-Zabala T, Menendez LT, Perotti EBR (2008) Characterization of electrochemical properties in fractions of different molecular size taken from natural soil organic matter of argentine humid pampa. *J Argent. Chem.Soc.*, 95, (1-2), 10-19.

temperatura de trabajo fue 20° C. El volumen de exclusión 15 ml y el volumen total de la columna 25 ml.

En el caso que el estudio tuviera como objetivo detectar la señal propia de un compuesto en el fluido vaginal, 0,4 ml del fluido correspondiente fue suplementado con una solución acuosa del mismo. Para los controles se reemplazaron tanto la solución redox como las suspensiones de fluido vaginal por solución fisiológica. Se midió el pH de cada muestra utilizando un pH-metro Altronix ® modelo TXP. Los valores que se presentan fueron medidos frente al electrodo estándar de Calomel (E´) con un potenciómetro Orion research modelo 407A (Para obtener los valores frente al electrodo estándar de Hidrógeno (Eh) se debe aplicar la siguiente expresión  $Eh (mV) = E' + 241 mV$ ).

## **1. Caracterizaciones espectrofotométricas**

Para definir el valor óptimo de lectura en las mediciones espectrofotométricas, el paso inicial fue realizar un barrido espectral para cada una de las sustancias incluidas en nuestro estudio. Se registró la absorbancia de la muestra a distintas longitudes de onda para elegir aquella en la cual la absorbancia fuera máxima. En todos los casos el eluyente y el solvente para la preparación de las soluciones fue agua destilada, realizando la corrección a cero.

### **1.1 Fluido vaginal**

El resultado del barrido espectral con suspensiones de FVC en solución fisiológica permitió determinar la presencia de compuestos insaturados cuya absorbancia fue máxima a 200 nm.

### **1.2 Soluciones de hidroquinona y de metronidazol**

Ambas soluciones, por separado, fueron sometidas a un barrido espectral para determinar si se presentaba una señal detectable a 200 nm. El barrido espectral de una solución de hidroquinona (H<sub>2</sub>Q) 0,01M indicó que la absorbancia también era máxima a 200 nm de longitud de onda. Se decidió modificar el pH de la alícuota que presentaba la mayor señal<sup>95</sup> y volver a hacer un barrido espectral para asegurar la invariabilidad del resultado. En todos los casos la absorbancia fue mayor a 200 nm (Figura 1). Lo mismo ocurrió en el caso de la solución 0,3 M de metronidazol (MTZ), aunque los valores de

absorbancia fueron siempre más bajos (Figura 2). En función de estos resultados, todas las lecturas se realizaron a 200 nm de longitud de onda.

## 2. Determinación de la talla molecular de los componentes presentes en el fluido vaginal canino

En la Figura 3, se observa que en todas las muestras se presenta un grupo de moléculas de bajo peso molecular (similar a la talla molecular del Azul de Bromofenol;

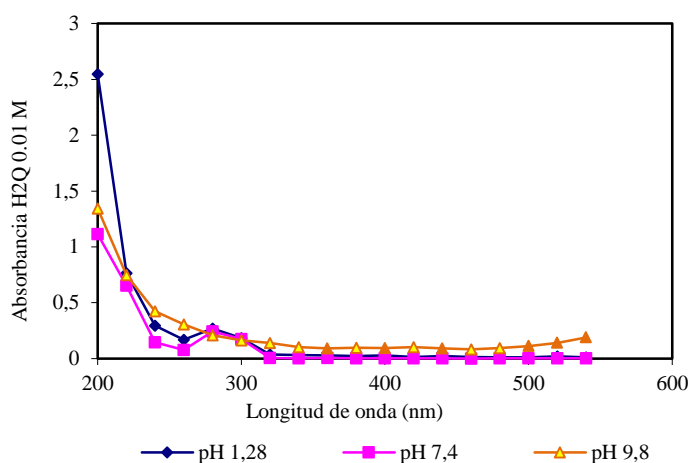


Figura 1. Barrido espectral de H<sub>2</sub>Q 0,01 M

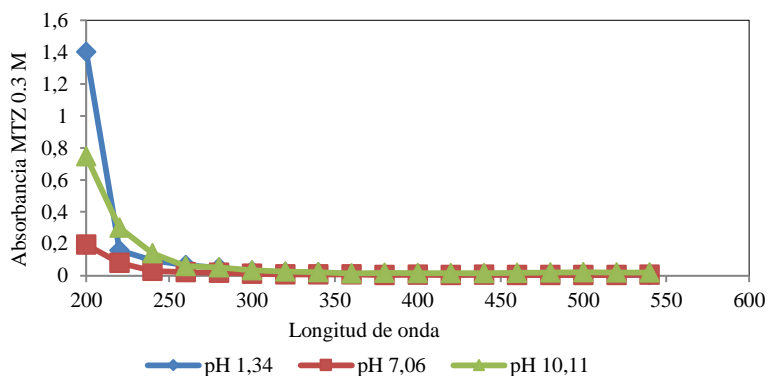


Figura 2. Barrido espectral de MTZ 0,3 M.

699 daltons) y un grupo de compuestos insaturados que corresponden a la fracción excluida cuando se utiliza Sephadex G25© como tamiz molecular (Ver Anexo 4)<sup>96</sup>. Sin

<sup>96</sup> El volumen vacío ( $V_0$ ) que corresponde a la elución de la fracción excluida fue determinado utilizando Azul dextrano (MW: 2.106) (Farmacia®) En nuestras condiciones experimentales, se consideró que la fracción excluida está contenida en los primeros 15 ml eluidos en una columna de vidrio de 25 cm de

embargo, no todas las muestras presentan la misma concentración de dichos compuestos, variabilidad esperable para muestras biológicas obtenidas de diferentes animales.

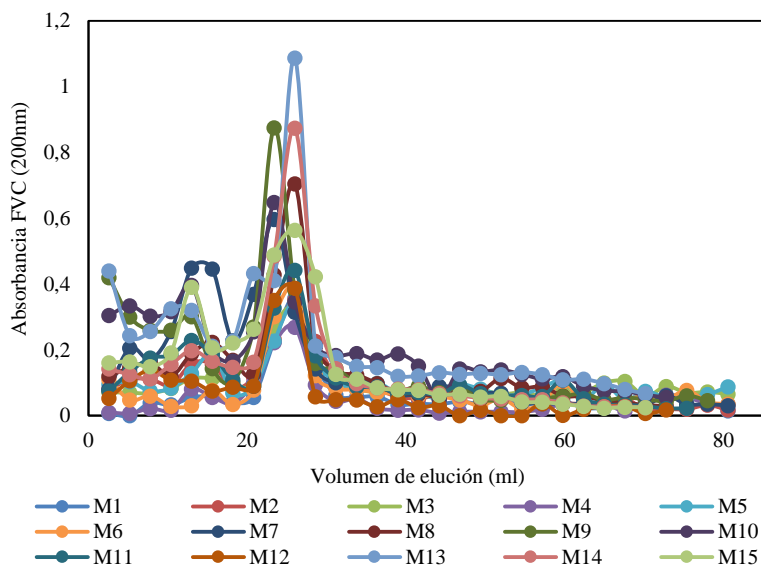
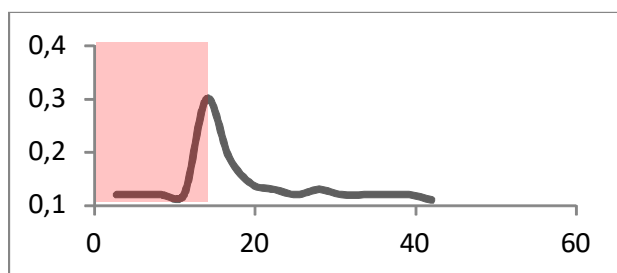


Figura 3. Comportamiento espectrofotométrico de las diferentes muestras de fluido vaginal canino filtradas en gel Sephadex G 25®.

### 3. Caracterización de las soluciones de los efectores redox utilizados

#### 3.1 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de un transportador de electrones tipo quinónico (Hidroquinona; H<sub>2</sub>Q)

longitud y 1 cm de diámetro rellena con Sephadex G25 (el eje de la X indica volumen eluido; el eje de la Y indica absorbancia) (La fracción excluida aparece sombreada en figura).



Para corroborar la presencia de la señal espectrofotométrica típica de la molécula de H<sub>2</sub>Q en las condiciones de nuestro estudio (Zerbatto 2008)<sup>97 98</sup> 0,1 ml 0,01M de H<sub>2</sub>Q fueron eluidos en gel Sephadex G25, y se determinó la absorbancia de las fracciones recolectadas a 200 nm. En la Figura 4, puede observarse el pico característico de absorbancia entre los 30 y 40 ml.

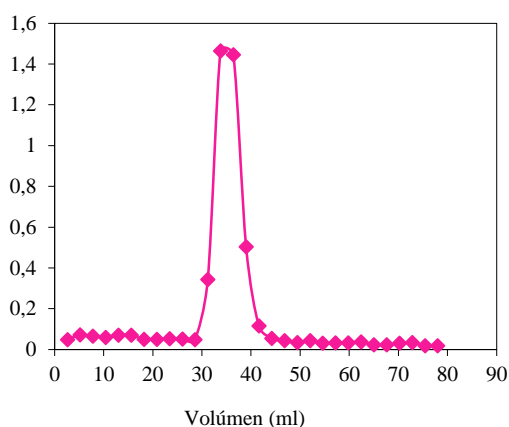


Figura 4. Comportamiento espectrofotométrico de H<sub>2</sub>Q eluida en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

### 3.2 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de un reductor orgánico tipo imidazólico (Metronidazol; MTZ)

La señal espectrofotométrica del MTZ 0,14 mM en las condiciones estudiadas es de baja intensidad. No obstante en el barrido espectral, se determinó que la mayor absorbancia aparece a los 200 nm. El pico característico aparece entre los 20 y 30 ml. Se realizó una prueba aumentando la cantidad (ml) de MTZ, para asegurar la exactitud de la señal y detectar el umbral de detección en las muestras estudiadas. En la Figura 5, se presenta la absorbancia de 0,1ml y 0,4 ml de MTZ 0,14 M eluidos en la columna con Sephadex G 25.

<sup>97</sup> Zerbatto ME (2008) Impacto de reductores inorgánicos y orgánicos sobre la talla de moléculas húmicas. *Informe Final. Beca de Investigación Científica para Estudiantes*. FCV UNR. 6 pp.

<sup>98</sup> Zerbatto ME, Pidello A (2008) Efecto de la interacción entre la antraquinona disulfonato (AQDS) y las sustancias húmicas. *Sociedad de Biología de Rosario. XXVIII Reunión Anual*.

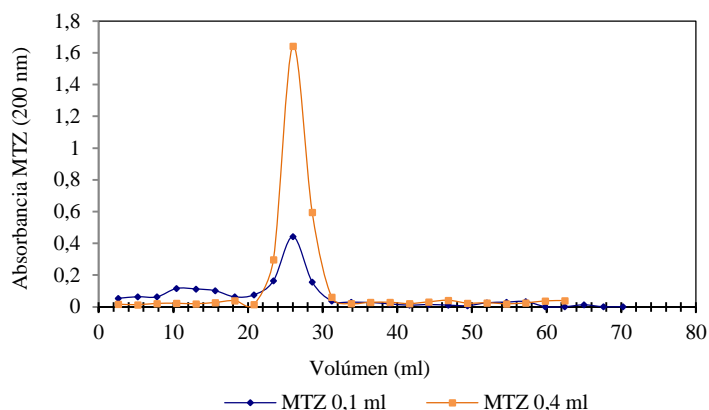


Figura 5. Señales comparativas de la absorbanza de dos volúmenes diferentes de MTZ 0,14 M (eluyente, agua destilada).

#### 4. Caracterización del fluido vaginal sintético

##### 4.1 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica del fluido vaginal sintético

Se preparó fluido vaginal sintético (FVS) modificando la técnica de Owen<sup>99</sup> (Ver Anexo 3). La solución se esterilizó en autoclave. Se eluyeron 0,4 ml de ésta solución para caracterizar su comportamiento espectrofotométrico. Como se observa en la Figura 6, la fracción más importante eluye entre 20 y 30 ml y posee un comportamiento similar al observado en el FVC. Sin embargo, a diferencia de este la fracción excluida no se diferencia claramente.

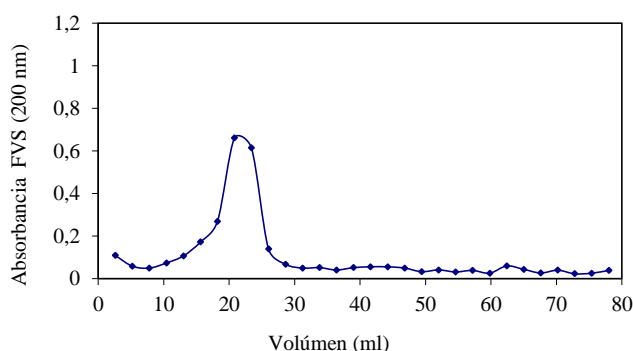


Figura 6. Comportamiento espectrofotométrico del FVS eluido en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

<sup>99</sup> Referencia <sup>92</sup>

## 4.2 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica del fluido vaginal sintético FVS suplementado con hidroquinona y con metronidazol

Se trabajó con dos soluciones, en una 0,4 ml de FVS se suplementó con 0,1 ml de MTZ (0,1 M), y en la otra la misma cantidad de fluido vaginal se suplementó con 0,1 ml de H<sub>2</sub>Q (0,01 M). Como se observa en la Figura 7, en la solución suplementada con MTZ la absorbancia de la fracción excluida en el FVS aumenta. En el caso de la suplementación con H<sub>2</sub>Q además de la fracción excluida aparece la señal típica de éste compuesto, sin embargo lo hace con un valor de absorbancia menor respecto a la señal observada en solución fisiológica (Figura 9). La señal de la fracción excluida del FVS está desplazada hacia la derecha. Esta última observación podría estar indicando alguna interacción entre los componentes de ambas soluciones.

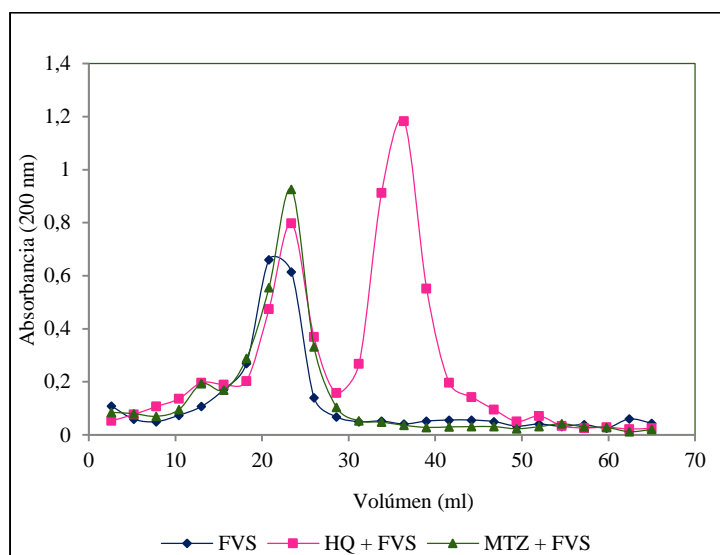


Figura 7. Efecto del aporte de H<sub>2</sub>Q y de MTZ sobre el FVS eluidos en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

## 5. Caracterización de la solución fisiológica

### 5.1 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica sola

Debido a que la solución de ClNa (0,9%; solución fisiológica estéril) es la utilizada para la dilución de todas las muestras es necesario conocer su absorbancia en las condiciones estudiadas. Se registró una absorbancia de 0,26 entre los 20 y los 30 ml. Como dijimos anteriormente, este valor es menor que el que presenta el FVS en el mismo volumen de elución, por lo tanto no fue de interés en este trabajo (Figura 8). Sin embargo

el fenómeno debería ser profundizado, no se descarta que esté originado por trazas de compuestos moleculares residuales originados durante la silanización de la columna.

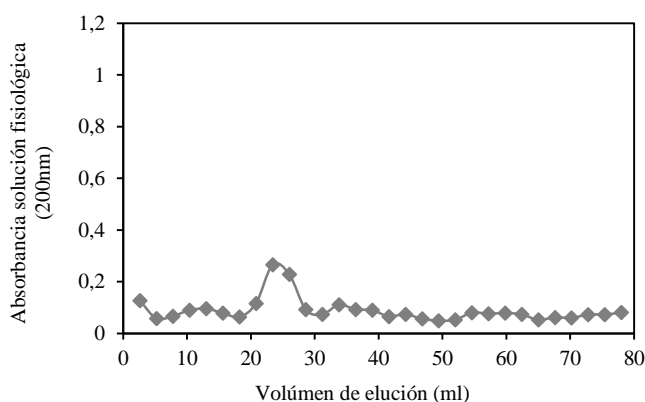


Figura 8. Caracterización espectrofotométrica de solución fisiológica eluida en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

## 5.2 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica suplementada con H<sub>2</sub>Q

Se analizó la existencia de interacción entre la solución fisiológica y la solución de H<sub>2</sub>Q, previo a la incorporación de fluidos vaginales. Se agregaron 0,1 ml del reductor orgánico a 0,4 ml de solución fisiológica. Como puede observarse en la Figura 9, cada compuesto conserva su valor de absorbanza característico.

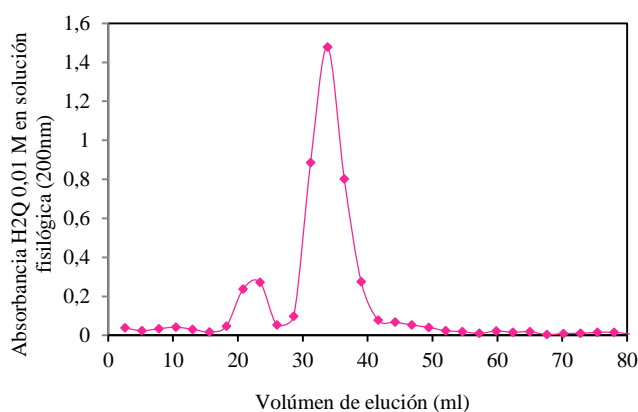


Figura 9. Comportamiento espectrofotométrico de la H<sub>2</sub>Q 0,01 M (0,1ml) diluida en solución fisiológica (0,4 ml) eluidas en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

### 5.3 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica suplementada con MTZ

La señal correspondiente a la solución fisiológica sola se desplaza hacia la izquierda (zona correspondiente a la fracción excluida). La señal correspondiente al MTZ también se desplaza levemente hacia la izquierda. Este resultado sugiere que como resultado de la mezcla se produjo un aumento de la talla molecular de los compuestos presentes en esta solución (Figura 10).

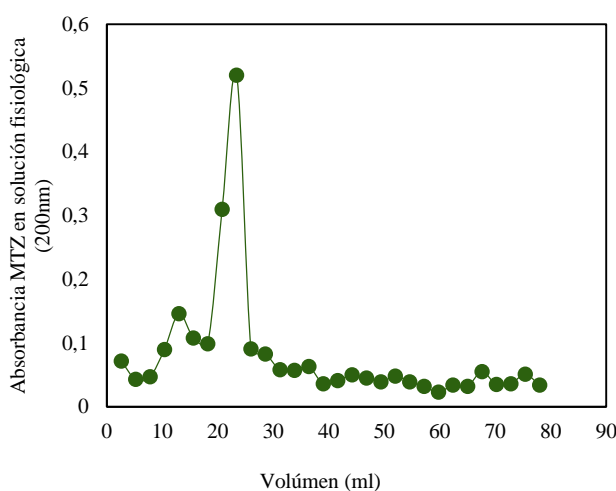


Figura 10. Comportamiento espectrofotométrico de MTZ 0.14 mM (0,1ml) en solución fisiológica (0,4 ml) eluidos en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

### 5.4 Fraccionamiento y caracterización espectrofotométrica de la solución fisiológica suplementada con hidroquinona y con metronidazol

Como puede observarse en la Figura 11, al eluir esta solución se ven dos señales bien definidas, una correspondiente al MTZ (que eluye entre 20 y 30 ml) y la otra correspondiente a la H<sub>2</sub>Q (que eluye entre 30 y 40 ml). Este resultado sugiere que el pico que eluye primero corresponde al MTZ y a la fracción que se detecta en la solución fisiológica sola (Figura 5 y 8) y no es posible diferenciar ambas señales como ocurre en la curva de elución que muestra la Figura 10.

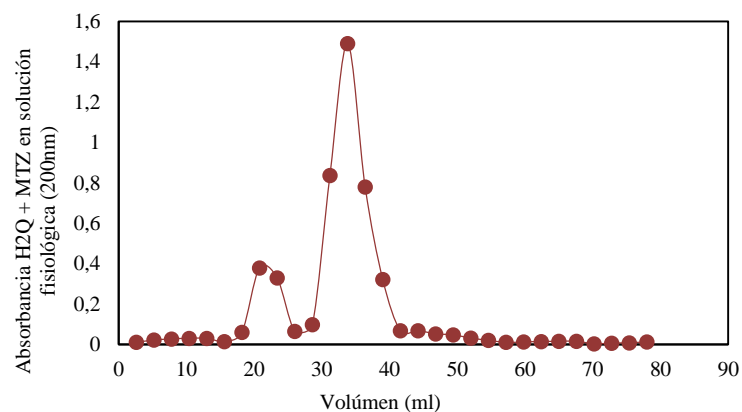


Figura 11. Comportamiento espectrofotométrico de H<sub>2</sub>Q 0,01 M (0,1 ml) + MTZ 0,14 mM (0,1ml) diluidos en solución fisiológica (0,4 ml) eluidos en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

## 6. Experimentos con fluido vaginal canino suplementado con los efectores redox

### 6.1 Fraccionamiento de fluido vaginal suplementado con hidroquinona

Tal como ocurre en las muestras con fluido vaginal sintético (Figura 7), en las muestras de fluido vaginal canino con H<sub>2</sub>Q, la señal de éste reductor aparece claramente en la fracción que eluye entre 30 y 40 ml. Esta señal fluctúa en intensidad, lo que sugiere que en este sistema se pueden producir interacciones relativamente fuertes entre la H<sub>2</sub>Q y los componentes naturales del FVC.

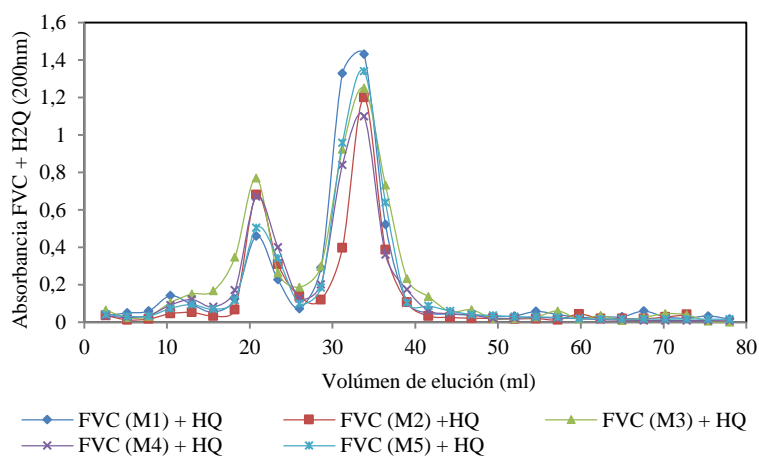


Figura 12. Comportamiento espectrofotométrico de diferentes muestras de fluido vaginal canino suplementadas con H<sub>2</sub>Q, eluidos en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

## 6.2 Fraccionamiento de fluido vaginal suplementado con metronidazol

Las señales espectrofotométricas del FVC y del MTZ se evidencian en el mismo volumen de elución. Este hecho también se observó utilizando FVS (Figura 7).

Cuando se adicionan 0,1 ml del antibiótico a la solución de fluido vaginal se observa un aumento de la absorbancia en la mezcla.

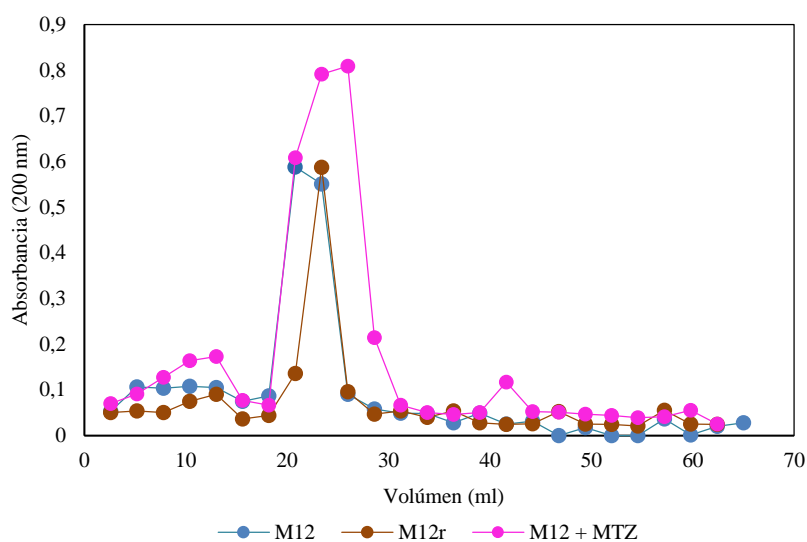


Figura 13. Comportamiento espectrofotométrico de una solución de fluido vaginal canino por duplicado (M12 y M12r) y de la misma solución con el agregado de MTZ (M12 + MTZ) eluidos en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

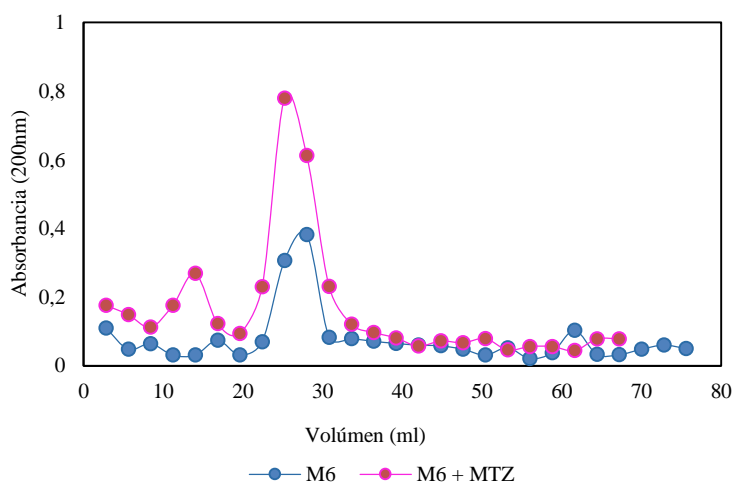


Figura 14. Comportamiento espectrofotométrico de una solución de fluido vaginal canino (M6) y de la misma solución con el agregado de MTZ (M6 + MTZ) eluidos en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

### 6.3 Fraccionamiento de fluido vaginal canino suplementado con hidroquinona y con metronidazol

Cuando se adicionan ambos efectores al mismo tiempo la señal espectrofotométrica de los componentes presentes en el fluido vaginal muestra claramente la presencia del MTZ y de la H<sub>2</sub>Q (Figura 15). No obstante la señal se comporta de diferentes maneras según la muestra estudiada. En algunas muestras aumenta la cantidad de compuestos insaturados de la fracción que eluye entre 20 y 30 ml (característica del FVC) y en otras la disminuye. La fracción correspondiente a la H<sub>2</sub>Q siempre fue igual o menor que el control (H<sub>2</sub>Q sola, Figura 4).

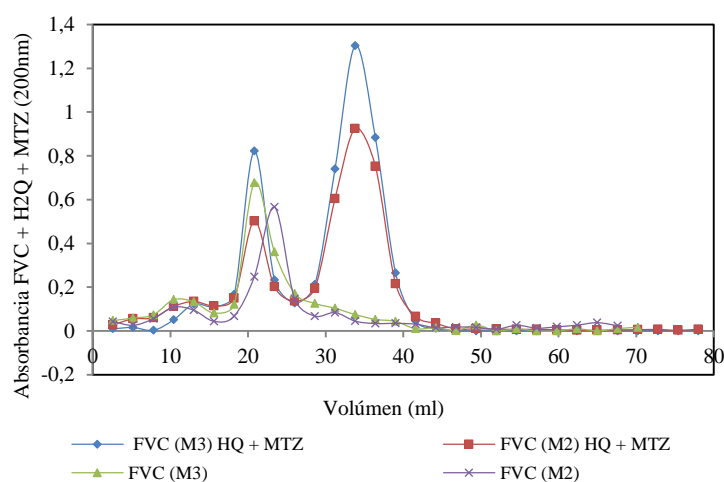


Figura 15. Comportamiento espectrofotométrico de fluido vaginal canino suplementado con H<sub>2</sub>Q + MTZ eluidos en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

## 7. Valores de pH y potencial de reducción aparente (Eh) en los fluidos vaginales caninos utilizados

Complementariamente al análisis espectrofotométrico y para contribuir al conocimiento de las variables que influyen sobre el establecimiento del *status* redox en los fluidos vaginales caninos, a cada muestra tomada se le midió el pH y el Eh. Los datos informados por Delucchi *et al.* (2008)<sup>100</sup>, indican que el pH vaginal promedio en la

<sup>100</sup> Delucchi L, Fraga m, Perelmuter K, Cidade E, Zunino P (2008) Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *Can.Vet. J.*, 49 (10), 991-994.

especie canina es 6 -7,5. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo dieron un promedio de 6 (n=18).

El potencial de reducción aparente promedio para las muestras de fluido vaginal canino estudiadas fue de 127 mV (n=18). Debe destacarse el hecho que en la bibliografía no hemos encontrado valores de esta variable en relación con las especies estudiadas.

## 8. Conclusiones

En la etapa del trabajo se determinó que la longitud de onda adecuada para la lectura de absorbancias en los fluidos vaginales suplementados y sin suplementar pertenece al rango UV y es de 200 nm. Aplicando la técnica de fraccionamiento en gel Sephadex G25 se logró caracterizar el fluido vaginal canino (FVC) y sintético (FVS) según su talla molecular de sus componentes normales y reconocer en ellos la presencia de las moléculas efectoras redox jerarquizadas utilizadas en este trabajo de Tesis. En las eluciones de FVC se observó la presencia de dos fracciones correspondientes a moléculas de similar peso molecular que eluyen juntas: la primera (F I) de mayor peso molecular, aparece entre los 10 y los 20 ml, y la segunda (F II) de menor peso molecular entre los 20 y los 30 ml. En la Figuras 16 y 17 se presenta un promedio de los resultados obtenidos con fluido vaginal proveniente de 15 perras sanas.

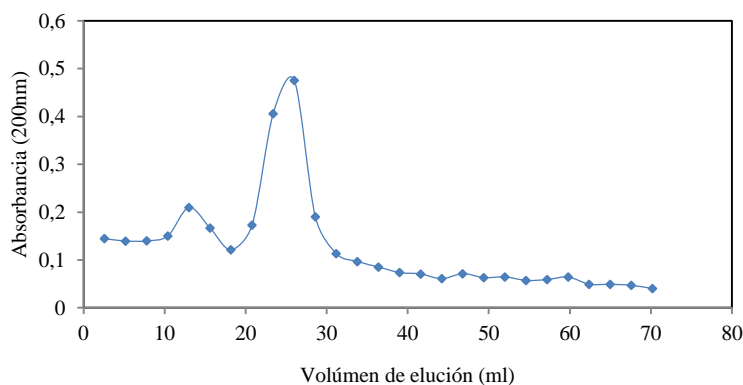


Figura 16: Absorbancia promedio de las muestras de fluido vaginal canino estudiadas (n=15). eluidas en gel Sephadex G 25® (eluyente, agua destilada).

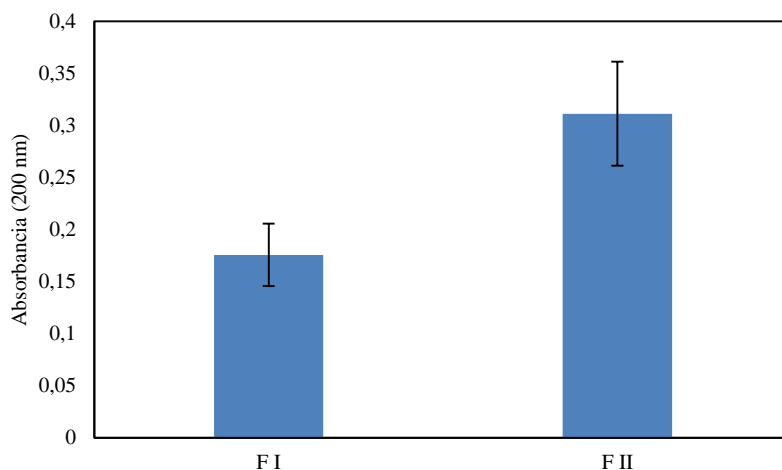


Figura 17: La *fracción I* (F I) corresponde a un promedio de valores de absorbancia de compuestos que eluyen entre los 1,4 y 15,6 ml y la *fracción II* (F II) corresponde al promedio de los compuestos que eluyen entre 20,8 y 28,6 ml al realizar un fraccionamiento con gel Sephadex G25 (n=15).

Una consideración importante en relación con los resultados presentados en este capítulo, es que el FVS estudiado por nosotros (Anexo 3) presenta una gran similitud con el FVC a nivel de la talla molecular de sus componentes. Este hecho tuvo una significativa importancia en nuestro estudio, ya que facilitó la realización y repetición de los experimentos eliminando una variable potencialmente importante, como lo es la variabilidad natural normal en el FVC.

En el estudio de los efectores redox hidroquinona (H<sub>2</sub>Q) y metronidazol (MTZ) se observó que en las condiciones estudiadas las moléculas de H<sub>2</sub>Q (0,01 M) presentan una señal de absorbancia muy bien definida a 200 nm, la cual aparece entre los 30 y 40 ml, con un valor de absorbancia próximo a 1,4 cuando eluye sola.

Las moléculas de MTZ (0,14 mM) eluyen entre los 20 y los 30 ml. En este caso no se observó una señal tan clara con las cantidades utilizadas en este trabajo (0,1 ml), sin embargo cuando se aumentaron los volúmenes eluidos para verificar los resultados (hasta 0,4 ml), se observó un aumento proporcional en la absorbancia (Figura 5).

Cuando se suplementó un sistema compuesto por FVC con MTZ, se observó que aumentaba de manera significativa ( $P < 0,05$ ) la cantidad de compuestos insaturados, traduciéndose esto posiblemente en un aumento en la cantidad de compuestos oxidables. En el caso de la suplementación con H<sub>2</sub>Q 0,01 M se observa que las dos fracciones caracterizadas en los fluidos vaginales se desplazan hacia la derecha en el fraccionamiento molecular. Esto señala la ocurrencia de interacciones entre los

compuestos presentes en las muestras y la molécula de H<sub>2</sub>Q que conducen a la formación de nuevos compuestos insaturados y de diferente talla molecular.

En síntesis, el procedimiento descrito para caracterizar los cambios en un sistema complejo como el escenario “ambiente vaginal” perturbado por la introducción de efectores redox (H<sub>2</sub>Q y MTZ), permitió detectar claramente la presencia de estos efectores. También permitió detectar que en algunos casos, en las soluciones estudiadas, aparecen diferencias que solo pueden ser explicadas a través de la existencia de interacciones relativamente fuertes entre las moléculas que se incorporaron y los componentes de las diferentes soluciones. Este fenómeno modificaría la talla molecular característica que presentan los compuestos incorporados cuando eluyen solos en el mismo tamiz molecular (Sephadex G25©). Este hecho, sugiere que si en el sistema vaginal tal como lo consideramos, es decir una suspensión compleja donde existen distintos tipos de equilibrios químicos, se introduce la misma molécula exógena a fuerte carácter redox (un antibiótico, por ejemplo) existen grandes posibilidades que se produzcan fenómenos que conduzcan a la neoformación de compuestos. Esta interpretación pone en evidencia la necesidad de complementar esta técnica de fraccionamiento molecular y caracterización espectrofotométrica, que permitió detectar cambios estructurales, con otras que informen de las propiedades de los compuestos neoformados, especialmente a nivel del comportamiento redox y ácido-base.

# **CAPÍTULO III. Comportamiento e interacciones redox en soluciones de hidroquinona, metronidazol y fluido vaginal**

## **1. Introducción**

En esta parte del estudio se trató de obtener información sobre el sistema vaginal considerado como un escenario natural redox. Sin embargo interpreto que el resultado obtenido constituye un modelo de estrategia analítica que puede ser útil para la comprensión tanto de los mecanismos de acción de agentes farmacológicos de naturaleza redox que se utilizan con propósitos terapéuticos en otras cavidades del cuerpo animal como también otros fenómenos vinculados con las interacciones redox que se presentan en otros sistemas que se estudian en Laboratorio de Química Biológica-FCV. UNR (aditivos empleados en alimentación animal, por ejemplo <sup>9</sup>).

El software utilizado para los estudios voltamétricos fue TraceMaster 5 (Radiometer Analytical). Los gráficos presentados son el resultado de al menos cinco muestras por tratamiento (hasta la obtención de un ciclo reproducible) y de al menos tres repeticiones sobre las cinco muestras (el promedio de las tres repeticiones se obtiene con el software mencionado).

## **2. Quinonas y metronidazol**

### **2.1 Comportamiento voltamétrico del sistema hidroquina-metronidazol**

En estudios previos realizados en el laboratorio mediante barridos de voltametría cíclica<sup>101</sup>, se caracterizó el cambio electroquímico que se producía en soluciones acuosas no tamponadas que contenían hidroquinona (H<sub>2</sub>Q) (utilizada como ejemplo prototípico de un sistema redox orgánico) y una preparación comercial de metronidazol (MTZ) (comprimidos vaginales; Metronidazol base 500 mg).

A partir de estos comprimidos se preparó una suspensión que contenía en la fase acuosa una concentración igual a 0,058 M del antibiótico, la cual presentaba una conductividad de 577  $\mu$ S, un pH=6,7 y un potencial de reducción aparente Eh= +175 mV. Quinientos microlitros de esta solución se llevó a una concentración final de  $4 \cdot 10^{-3}$  M con

---

<sup>101</sup> Pidello A, Ombrella A, Ruiz Abad I, Faienza H (2010) Estudio voltamétrico del sistema metronidazol-hidroquinona. *XXX Reunión Anual. Sociedad de Biología de Rosario*, 28.

agua destilada desoxigenada o con una solución acuosa  $7 \cdot 10^{-4}$  M de H<sub>2</sub>Q e introducida en una microcelda voltamétrica con tres electrodos (carbono vítreo como electrodo de trabajo; calomel (SCE) y Pt). Los experimentos se realizaron en ausencia de O<sub>2</sub> después de purgar el sistema con N<sub>2</sub> de alta pureza. En todos los casos se utilizó KCl 0,04 M como electrolito soporte. Todos los potenciales se midieron frente al SCE. Los voltanogramas se iniciaron en dirección negativa a +0,700 V con una velocidad de escaneo de 0,025 V/s (Figura 1). La H<sub>2</sub>Q sola presentó un único pico en la onda catódica (C<sub>1</sub>; +0,086 V), mientras que en la onda anódica se presentaron los dos picos que corresponden a su oxidación en dos etapas de un electrón cada una (-0,103 V y +0,275 V), característica de su comportamiento en sistemas acuosos no tamponados. El MTZ presentó un único pico de reducción (-1,034 V) y el correspondiente pico de oxidación (-0,758V). El potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) es un valor característico de cada par redox (teóricamente próximo al valor del E° del par) y corresponde a la semi-suma del valor en voltios del pico que aparece en la onda catódica (E<sub>c</sub>) y del pico correspondiente en la onda anódica (E<sub>a</sub>) (ver Anexo 2 y Ref.<sup>8, 2</sup>). En el caso de la Figura 1,  $E_{1/2} = -0,89$  V y se corresponde con los valores que se observan en la bibliografía. Por otra parte, si un proceso es electroquímicamente reversible la separación entre los picos ( $\Delta E_p$ ) está definida por la expresión  $\Delta E_p = (E_c - E_a) = 2,3 \cdot (R \cdot T) / (n \cdot F) = 0,059/n$ <sup>8,2</sup>, siendo n el número de e<sup>-</sup> intercambiados en la reacción. En la práctica ese valor es difícil de alcanzar y el  $\Delta E_p > 0,059/n$ . En la situación estudiada fue significativamente mayor ( $\Delta E_p = 0,276$ ), lo cual indica que la transferencia de electrones se presenta como irreversible.

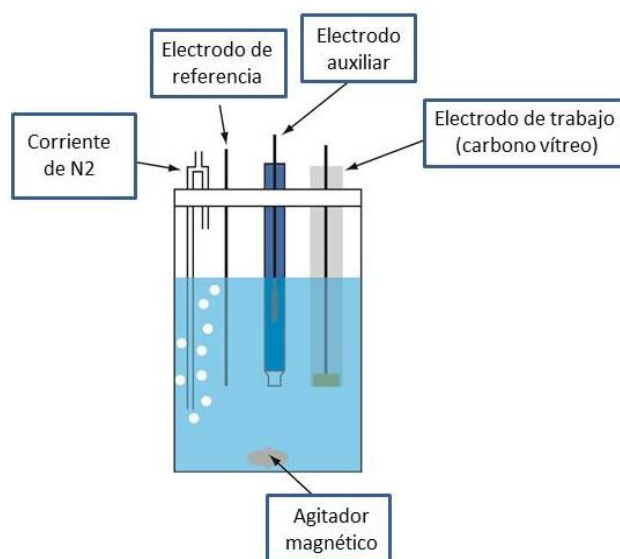
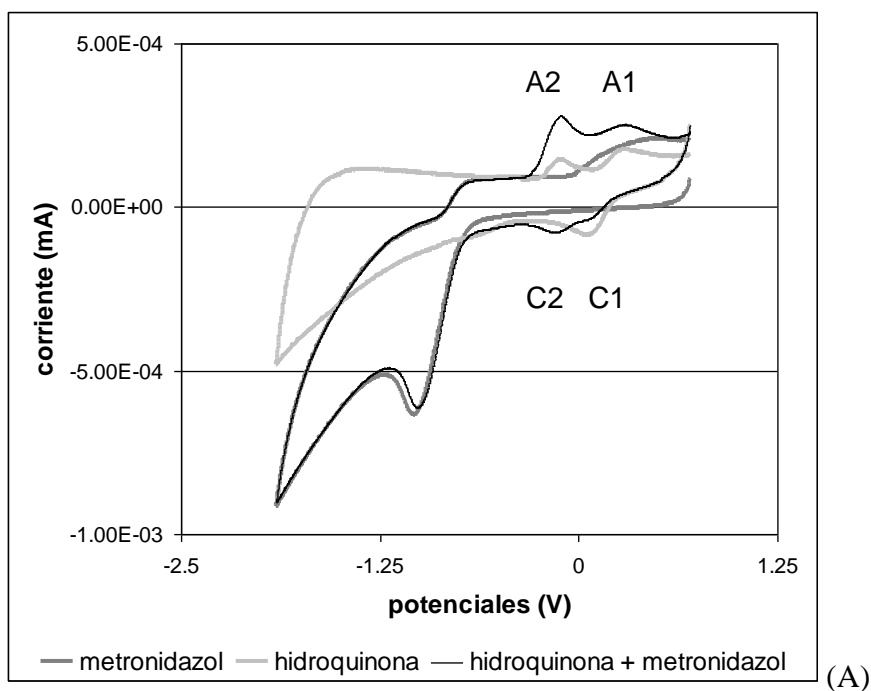


Figura 1: (A) Barrido en voltametría cíclica de las soluciones de MTZ, H<sub>2</sub>Q y la mezcla H<sub>2</sub>Q y MTZ. Solvente: H<sub>2</sub>O destilada libre de O<sub>2</sub>. En todos los casos las condiciones experimentales fueron: E<sub>h</sub> inicial = +700 mV; E<sub>h</sub> final = -1900 mV; duración del escalón: 0,04 s; amplitud del escalón: 1 mV. Electrolito soporte: KCl 0,04 M; T = 20 ± 1°C. (B) Esquema de la celda voltamétrica utilizada en este trabajo de Tesis (POL 150, Radiometer Analytical, Fr). Electrodo de trabajo: carbono vítreo.

Cuando los dos compuestos fueron mezclados, mientras el MTZ no modificó su comportamiento electroactivo, la H<sub>2</sub>Q aumentó la intensidad de los dos picos anódicos

(A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) y presentó dos señales correspondientes a los picos catódicos complementarios (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>). Los resultados indican que el MTZ aumentó la capacidad redox del sistema en valores de potenciales de reducción aparentes propios del par quinona/hidroquinona, es decir bastante más desplazados hacia los valores positivos. Estos resultados indicaron que el impacto de este hecho a nivel de la población microbiana enfrentada con el MTZ debía ser investigada.

## 2.2 Comportamiento voltamétrico del sistema fluido vaginal canino-metronidazol en presencia de un transportador de electrones (Antraquinona 2-6 disulfonato; AQDS)

El resultado descrito en el ítem anterior muestra claramente la posibilidad de que en numerosos sistemas naturales (el ambiente vaginal entre ellos), existan interacciones multilaterales entre moléculas con fuerte carácter redox y que los compuestos implicados modifiquen su especiación y por esta vía su funcionalidad metabólica. En el caso de un antibiótico redox como el MTZ, este tipo de fenómenos podría afectar su eficiencia frente a los agentes patógenos.

En esta parte del estudio se formuló la siguiente pregunta: ¿Las fracciones acuosas que contienen MTZ y componentes normales del FVC presentan un patrón electroquímico característico cuando se enfrentan con un compuesto referente como transportador de electrones (*electron shuttle*)? Para cumplir con este objetivo, se realizaron fraccionamientos de suspensiones obtenidas a partir de hisopados vaginales de hembras caninas a los cuales se les adicionó MTZ (0,06 M) para determinar el patrón de elución. Se recuperaron 30 fracciones (2,8 ml) a las cuáles se les midió la absorbancia a 200 nm (Hitachi-U 1500). Los eluidos acuosos no tamponados que contenían MTZ (fracción que eluye entre 20 y 30 ml; como puede observarse en las Figuras 5, 13 y 14 Capítulo II; Figura al pie de página), suplementados y sin suplementar con Antraquinona 2,6 disulfonato (AQDS; E<sub>AQDS<sup>2-</sup>/AH<sub>2</sub>DS<sub>4</sub><sup>-</sup></sub> = -0,298 V) (Ver Capítulo I. 2) como modelo de compuesto transportador de electrones<sup>102</sup>, fueron sometidos a barridos de voltametría cíclica (VC) y de pulsos diferenciales (VPD). Los experimentos se realizaron en ausencia de O<sub>2</sub> después de purgar el sistema con N<sub>2</sub> de alta pureza. En todos los casos se utilizó

---

<sup>102</sup> Rerefencia 11.

KCl 0,04 M como electrolito soporte. Todos los potenciales se midieron frente al electrodo de calomel.

En todos los casos se observó una señal neta en la absorbancia de las fracciones que eluyen entre 20 y 30 ml. Esa señal corresponde a componentes desconocidos presentes en el fluido vaginal y a la molécula de MTZ. El barrido voltamétrico de la muestra compuesta formada por la totalidad de las fracciones que eluyen entre 20 y 30 ml indica que su concentración en compuestos electroactivos sigue una relación lineal altamente significativa al agregar volúmenes crecientes de una solución de MTZ (0,06 M) (Figura 2).

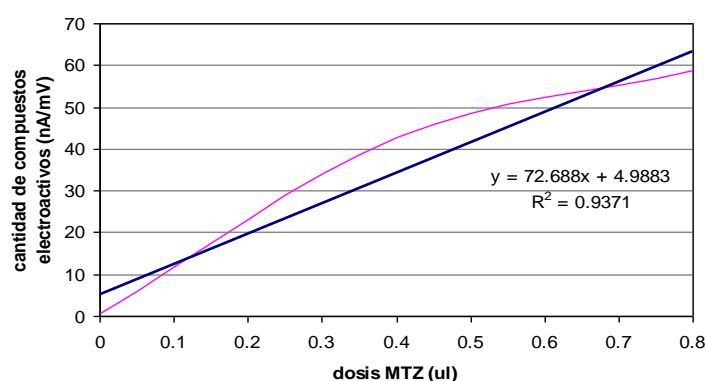


Figura 2. Relación observada entre la concentración de compuestos electroactivos y la dosis creciente de MTZ (0,06 M) incorporada en las soluciones de FVC (n=6).

Los voltanogramas VC (Figura 3 A) y VPD (Figura 3 B) indican que el fluido vaginal + MTZ presenta un único pico en la onda catódica y que el mismo es aumentado con el aporte de AQDS. El barrido VPD en el sentido de los potenciales negativos indica que el aumento experimentado por la señal correspondiente al MTZ + AQDS es de alrededor del 25 %. Los resultados sugieren que en presencia de un transportador de electrones como el AQDS, la cantidad de especie oxidada del MTZ está aumentada por lo cual su capacidad antibiótica debería estar aumentada. Dicho de otra manera, y avanzando sobre el posible mecanismo implicado en el fenómeno observado, se podría decir que una molécula como el AQDS es capaz de reducirse y oxidarse frente a una pluralidad de oxidantes y reductores en función de sus posibilidades de especiación según las condiciones del medio y de un amplio rango de valores de Eh bajos (asociados a esos equilibrios de especiación; ver Capítulo I, 2). En razón de esta capacidad podría proteger al grupo funcional del MTZ (el grupo nitro) frente a los potenciales efectores redox

(reductores) que se encuentren en el sistema. Esta podría ser la razón que explica que la señal voltamétrica catódica se presente aumentada.

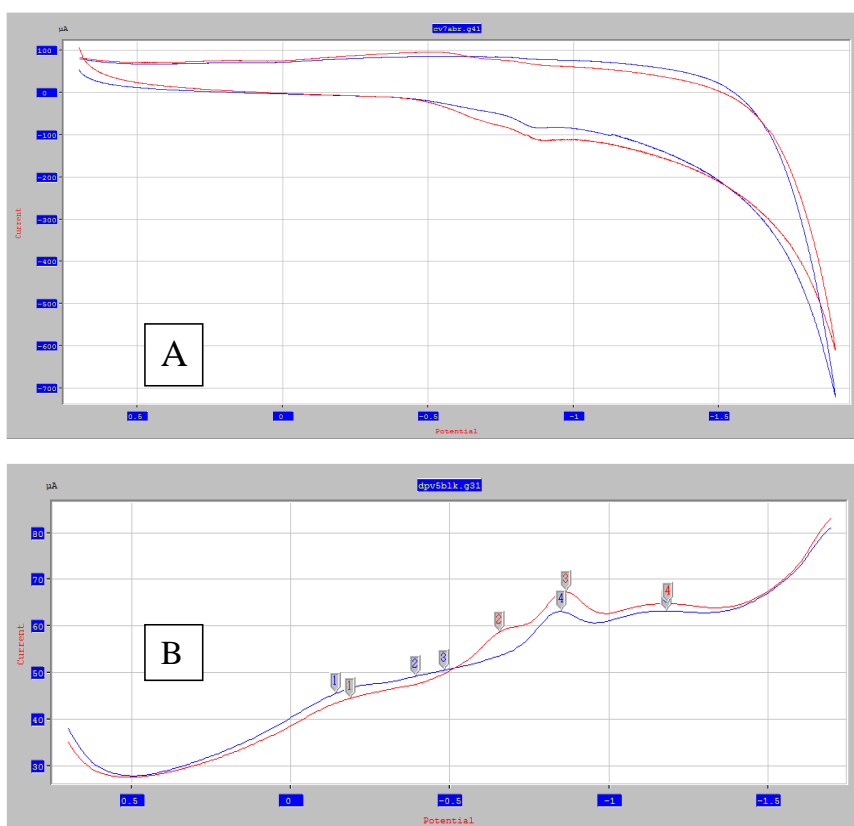


Figura 3. Ejemplo de voltanogramas experimentales. La Figura (A) muestra voltanogramas cíclicos y la Figura (B) muestra voltanogramas VPD de las mezclas soluciones acuosas de MTZ (0,06 M) suplementadas con lavados vaginales caninos. Solvente: H<sub>2</sub>O destilada libre de O<sub>2</sub>. Rango de barrido en el sentido de los potenciales negativos: +0,6 a -1,9 V. Curva azul: MTZ; curva roja: MTZ + AQDS. Los números en forma de flecha en la Figura B, indican la presencia de MTZ (flecha 3 roja y flecha 4 azul). Las otras flechas indican la presencia de otras especies redox activas que se reducen cuando el barrido voltamétrico de estas soluciones se realiza en el sentido de los potenciales negativos.

### 2.3 Comportamiento voltamétrico del MTZ en el FVS

Como dijimos anteriormente, el mecanismo de la acción biológica del MTZ es dependiente del proceso de reducción del grupo nitro que posee la molécula, que involucra 6 electrones hasta su completa reducción a la amina correspondiente ( $R-NO_2 + 6e^- + 6H^+ \leftrightarrow R-NH_2 + 2 H_2O$ ). Este proceso ocurre por etapas, según la disponibilidad de electrones y de protones en el medio y también, como todos los equilibrios redox, es afectado por la naturaleza del solvente y la cantidad de compuestos redox presentes. Este hecho fue observado a nivel voltamétrico en los experimentos descritos en los ítems anteriores cuando la molécula de H<sub>2</sub>Q o de AQDS estaba presente en el analito. Esos

resultados sugieren que es importante conocer las interacciones del MTZ con otras moléculas redox potencialmente presentes en el ecosistema vaginal y que serían capaces de alterar el grado de reducción del compuesto y de esta manera su acción frente a los microorganismos.

En el laboratorio de Química Biológica FCV UNR, Zerbato y Pidello<sup>103</sup> estudiaron el comportamiento voltamétrico (VC) de la mezcla de FVS + MTZ (0,017 µg/ml)<sup>104</sup> definido como tratamiento control (TC) y de la misma mezcla suplementada con FeCl<sub>3</sub> (TFe) o ácido ascórbico (TAsc), como modelos de compuestos redox potencialmente presentes en el fluido vaginal.

El estudio mostró que en los tratamientos TFe y TAsc se produjo una disminución en el pico catódico que corresponde al MTZ (Figuras 4A y 4B), lo que sugiere que existió una interacción entre el MTZ y los efectores redox que disminuyó la cantidad del antibiótico susceptible de ser reducida.

Una interpretación posible de este fenómeno sería que, en los dos casos, se trata de compuestos con potenciales de reducción superiores a los del MTZ, y aunque este compuesto se adicione en su forma oxidada en la solución existe un equilibrio complejo MTZ<sub>ox</sub> / MTZ<sub>red</sub> con formas intermediarias de especies reducidas. La presencia de compuestos que se comporten como oxidantes frente al MTZ (Fe<sup>3+</sup> y ácido ascórbico) podría disminuir la concentración de los intermediarios reducidos (regida en esta situación por la constante de equilibrio de la reacción y no por el E° de la reacción), con lo cual se disminuiría la señal electroquímica que muestra el MTZ en ausencia de estos compuestos<sup>105</sup>.

---

<sup>103</sup> Zerbato ME, Pidello A (2013) Eficiencia del Metronidazol en fluido vaginal sintético en presencia de efectores de óxido-reducción. *Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Facultad Cs. Veterinarias. UNR; XXXIII Reunión Anual, SBR.*

<sup>104</sup> Fue demostrado que el efecto de MTZ frente a *Lactobacillus* spp depende de las concentraciones en las cuales es utilizado (Simoes et al, 2001)<sup>27</sup>; en concentraciones superiores de 1000 µg/ml inhibe el crecimiento, entre 128 y 256 µg/ml lo estimula y en concentraciones menores resultaría inocuo. La concentración de 0,017 µg/ml fue elegida para asegurar que la dosis utilizada de MTZ resultaba inocua.

<sup>105</sup>  $R-NO_2 + e^- \rightarrow R-NO_2^-$  (La reacción ocurre a un potencial E<sub>c</sub>; E<sub>c</sub> es el pico catódico detectado por voltametría)

$2 R-NO_2^- + 2 H^+ \rightarrow R-NO_2 + R-NO + H_2O$  (La constante *k* indica la estabilidad de los productos de la reducción)

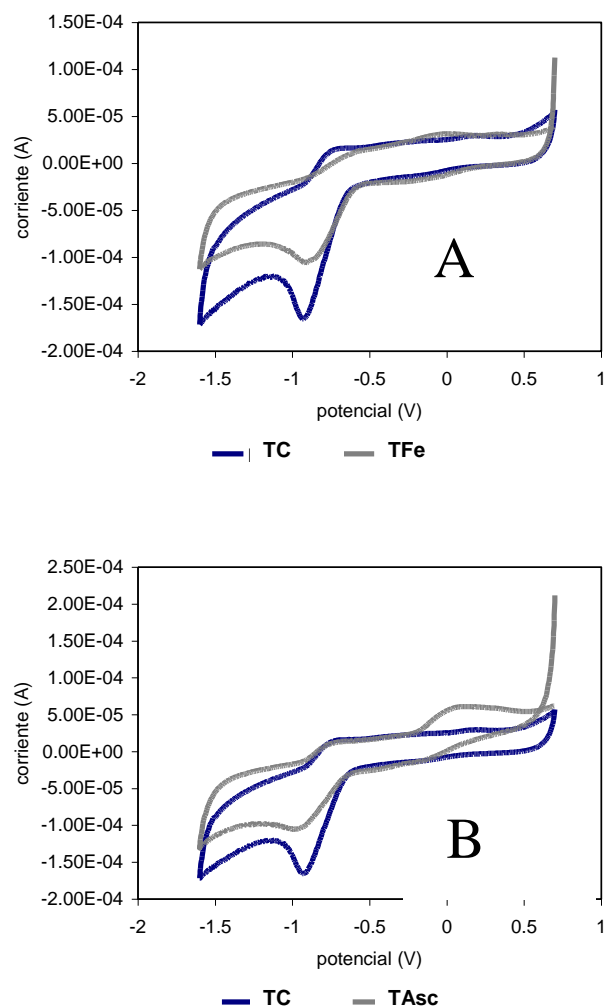


Figura 4. Efecto del MTZ en presencia de Fe (A) y de ácido Ascórbico (B) en medio acuoso (Ver texto). TC: tratamiento control. Rango explorado: +700 / -1600 mV. Duración escalón: 1s; Amplitud del escalón: 5 mV.

#### 2.4 Efecto de algunos componentes mayores del fluido vaginal sobre el comportamiento voltamétrico del metronidazol<sup>106</sup>

En función de los resultados presentados precedentemente, se planteó el estudio del efecto de algunas moléculas ubicuas en el fluido vaginal que pueden considerarse

---

Maya JD, Bollo S, Nuñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, Périé J, Chauvière G (2003) Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. *Biochem Pharmacol.* 15, 65 (6), 999-1006.

<sup>106</sup> Coletti Zabala T, Zerbato E, Pidello A (2014) Efecto de algunos componentes mayores del fluido vaginal animal sobre el comportamiento electroquímico del Metronidazol. *XXXIV Reunión Anual SBR.*

efectores redox potenciales. Estos compuestos, en función de las condiciones físico-químicas del ambiente extracelular, podrían producir una modificación total o parcial del grupo nitro (cambio del potencial de reducción por cambio en la especiación del grupo funcional, por ejemplo) el cual ingresaría a la célula microbiana habiendo perdido su capacidad específica.

En una primera parte, en este trabajo se estudió el comportamiento voltamétrico del MTZ en una mezcla acetonitrilo y agua (AN / H<sub>2</sub>O; 3:2) suplementada con urea (U; 2 mM), glucosa (Glu; 0,5 mM), ácido láctico (AL; 2 mM) o protones (HCl; 4 mM), que son componentes mayores del fluido vaginal animal. En estas condiciones la reducción del MTZ (1 mM) en AN / H<sub>2</sub>O presenta un solo pico catódico<sup>107</sup> (E<sub>c</sub>= -1,022 V) y ningún pico anódico. El aporte de Glu, H<sup>+</sup> y especialmente el AL modificó el E<sub>c</sub>, desplazándolo significativamente hacia valores menos negativos (-0,969, -0,719 y -0,651 V respectivamente). Salvo en el tratamiento suplementado con H<sup>+</sup>, los valores de intensidad del pico catódico (I<sub>c</sub>) fueron significativamente diferentes respecto al tratamiento control (p<0,05) (Figura 5).

En una segunda parte, en función de los resultados obtenidos en la primer parte, el efecto de AL sobre el comportamiento electroquímico del MTZ fue estudiado en FVS a diferentes valores de pH. En estos experimentos, el pH apareció relacionado tanto con los valores de E<sub>c</sub> (r = 0,97) como de I<sub>c</sub> (r = 0,97) (Figura 6).

En FVS a los dos valores de pH estudiados (6,5 y 8,1) el MTZ presentó valores similares de E<sub>c</sub> (-0,787 y -0,803V respectivamente) mientras que los valores de I<sub>c</sub> fueron significativamente mayores a pH= 8,1. La incorporación de AL (25 mM) provocó un desplazamiento de los E<sub>c</sub> hacia un valor menos negativo que en ambos casos fue igual a -0,680 V (Figura 7).

Estos resultados muestran la importancia de dos fenómenos importantes, por un lado que el solvente FV puede afectar el estado de reducción de la molécula de MTZ por cambios en su estado ácido base; y por otro lado que aún en estas situaciones el grupo nitro del MTZ sigue reconociéndose en los estudios voltamétricos. Por lo tanto, en condiciones *in vitro* este modelo aparece adaptado al estudio del ecosistema vaginal.

---

<sup>107</sup> Ver Capítulo I, 1, Figura 4.

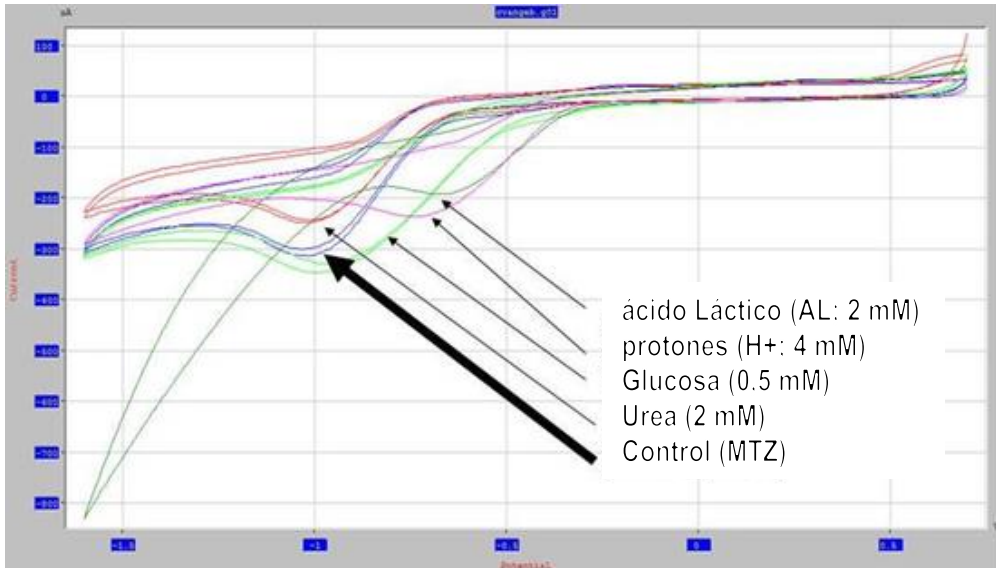


Figura 5. Ejemplo de voltanogramas experimentales que muestran el efecto de algunos componentes mayores del Fluido vaginal sobre la señal electroquímica del MTZ en AN / H<sub>2</sub>O (3:2). Rango de barrido: +700 /-1600 mV. Número de ciclos: 2. Duración del escalón: 1s. Amplitud del escalón: 5 mV.

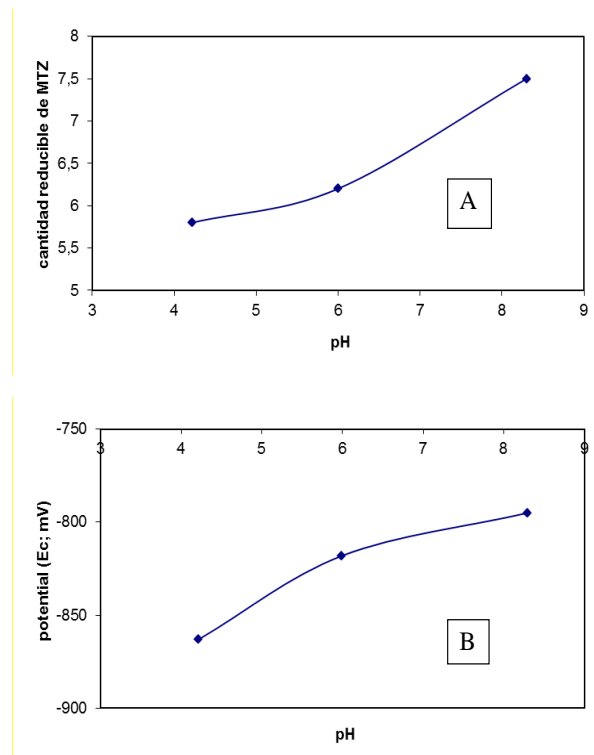


Figura 6. (A) Relación de  $I_c$  (nA/mV; cantidad de MTZ) con el pH; y (B) Relación de  $E_c$  (mV; voltaje donde aparece el pico característico del MTZ) con el pH.

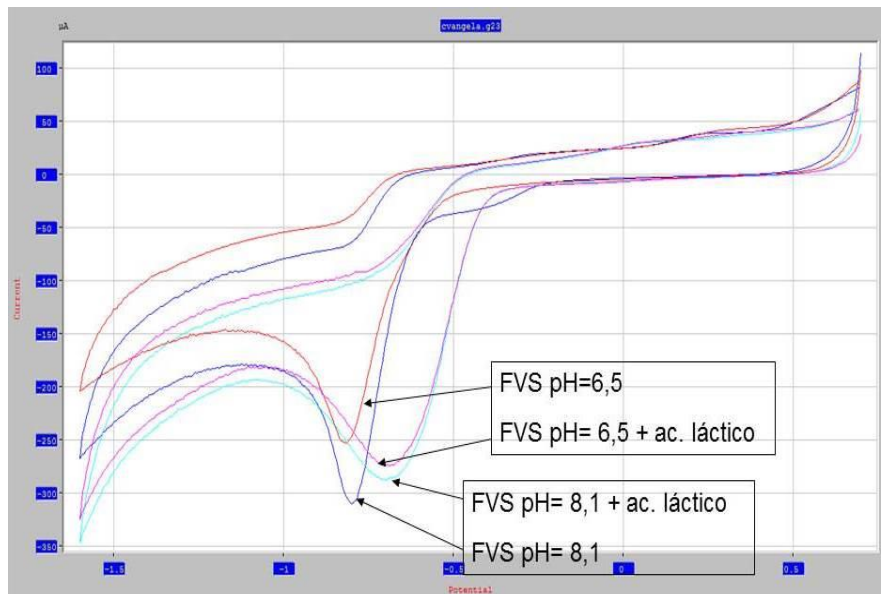


Figura 7. Ejemplo de voltanogramas experimentales que muestran el efecto del pH sobre la señal electroquímica del MTZ en FVS a pH=6,5 y pH=8,1 sin y con agregado de ácido Láctico (AL; 2 mM). Rango de barrido: +700 / -1600 mV. Número de ciclos: 1. Duración del escalón: 1s. Amplitud del escalón: 5 mV.

### 3. Comportamiento electroquímico del fluido vaginal

#### 3.1 Consideraciones preliminares

He considerado que los resultados preliminares que obtuvimos en el Laboratorio de Química Biológica-FCV. UNR que condujeron a definir las etapas iniciales de mi trabajo de tesis, se incluyeran en esta memoria a pesar de que fueron centrados en el comportamiento de fluidos vaginales humanos<sup>108</sup>.

El ecosistema vaginal humano presenta una densa microflora y en mujeres en edad fértil *Lactobacillus* spp. es predominante<sup>109</sup>. En vaginosis bacteriana la estructura de la población es modificada y presenta un reducido número de lactobacilos y un aumento de otras especies anaeróbicas facultativas, lo que genera el descenso en los valores del potencial redox (E). En la vulvovaginitis candidiásica, se conserva el contenido bacteriano habitual y aparecen distintos grados de reacción inflamatoria. Los organismos causantes de la misma pertenecen a *Cándida* spp.

<sup>108</sup> 1MED172. *Estado redox en el ecosistema vaginal*. Director: A Pidello. Facultad de Ciencias Médicas. UNR (Res. CS. 4338/2006).

<sup>109</sup> Quentin R (2006) *Écologie bacterienne vaginale: nature, exploration et prise en charge des déséquilibres*. En *Extrait des mises à jour en Gynécologie et Obstétrique*. Tome XXX. Paris.

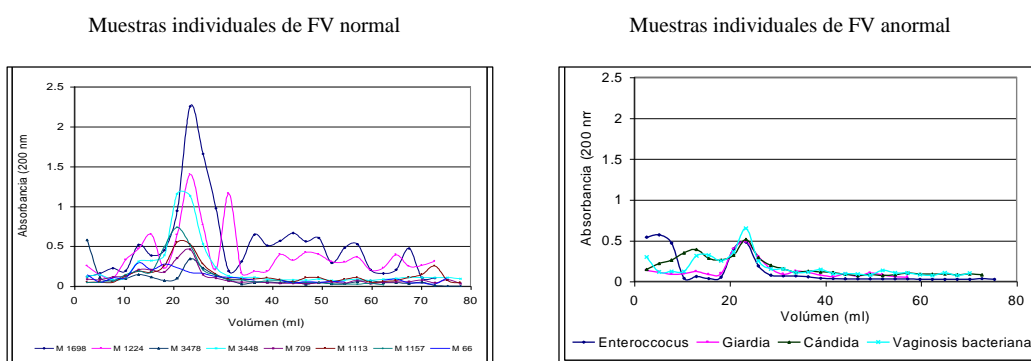
En estos trabajos se planteó el estudio en términos de talla molecular y de carácter electroactivo de los compuestos químicos que componen el fluido vaginal humano en presencia y en ausencia de síntomas clínicos de vaginosis y vaginitis<sup>110</sup>.

En el curso de los experimentos espectrofotométricos realizados se puso en evidencia que mientras que en el fluido vaginal normal (se retuvieron como muestras normales las que presentaron predominio neto de *Lactobacillus* spp.) se observaba un claro comportamiento a nivel de su concentración en compuestos detectables en el rango del espectro UV (200 nm), en las muestras que correspondían a ambientes colonizados por patógenos (*Gardnerella*, *Cándida*) estas señales eran más débiles (Figuras al pie de página)<sup>111</sup>. En el momento en que se realizó el estudio no fue posible disponer de un número suficiente de muestras “patológicas” como para intentar la explicación de estos resultados. Por esta razón, a pesar del interés que presenta el fenómeno observado para la ecología microbiana de las cavidades del cuerpo animal, el trabajo continuó centrado en la profundización del comportamiento de los fluidos vaginales normales. Las observaciones realizadas, que se detallan seguidamente, fueron de gran utilidad para programar muchas de las tareas experimentales que se realizaron en el marco de mi trabajo de Tesis.

<sup>110</sup> Se utilizaron muestras de secreciones de fondo de saco vaginal que se tomaron en mujeres de edad reproductiva no gestantes, sin tratamientos antimicrobianos locales y/o sistémicos durante el mes previo al muestreo y abstinencia sexual de 72 h (Dra. A. Ombrella; Hospital del Centenario, UNR). Para realizar el estudio microbiológico se tomaron muestras de flujo vaginal con hisopos estériles de algodón y se realizó la recuperación por cultivo de los microorganismos presentes (Ver Anexo 5).

Coletti Zabala T, Ombrella A, Ruiz Abad I, Dogali C, Pidello A (2008) Condiciones redox en el ecosistema vaginal normal humano. *Sociedad de Biología de Rosario. XI Congreso, XXVIII Reunión Anual.*

<sup>111</sup> Barridos espectrofotométricos de muestras de fluido vaginal humano



### 3.2 Caracterización voltamétrica de la fracción excluida de las muestras de los fluidos vaginales humanos “normales”

En síntesis, en este trabajo planteó un estudio exploratorio que tuvo como objetivo definir una estrategia para vincular la talla molecular y comportamiento redox de los compuestos químicos presentes en el ecosistema vaginal. Distintos hechos jerarquizaron este abordaje: (i) el fluido vaginal (FV) contiene una gran diversidad de compuestos de diferente talla molecular potencialmente redox activos, tanto orgánicos como inorgánicos; y (ii) la bibliografía indica que en el FV fueron identificadas muchas proteínas redox activas que participan en los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.

Las fracciones que presentaron mayor absorbancia (mayor concentración de compuestos insaturados) (fracción excluida de la Figura Referencia <sup>113</sup>) fueron estudiadas a través de VPD con el objetivo de determinar la concentración de compuestos electroactivos en distintos valores de potenciales. El rango de potenciales analizados se ubicó entre +300 a -1200 mV.

La Figura 8, resume los resultados obtenidos: las muestras de fluido vaginal que presentaron mayores absorbancias a 200 nm (M1698) poseían una menor cantidad de compuestos electroactivos (CCE) en relación a las muestras que presentaron menor absorbancia (M3478). El coeficiente de correlación presentó un valor igual a -0,74 (Figura 9). Debe destacarse el hecho que la relación entre ambas variables, como lo muestra la Figura 10, se presentó con mayor claridad en el rango comprendido entre -500 y -800 mV ( $r = -0,94$ ).

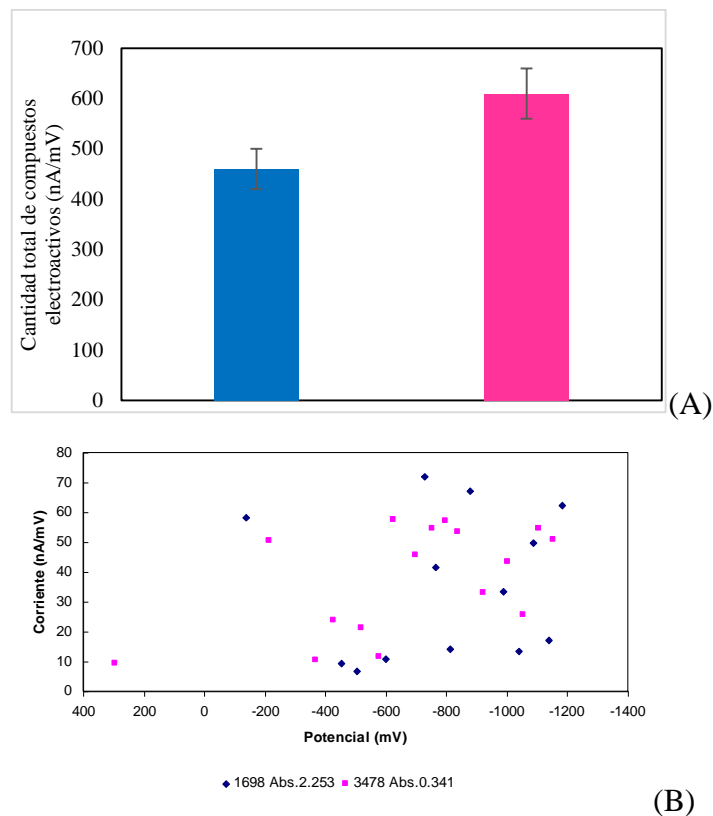


Figura 8. (A) Cantidad de compuestos electroactivos totales en las muestras 1698 y 3478 (Figura Referencia <sup>113</sup>), que presentaron valores contrastados de absorbancia (200 nm). Las columnas representan el promedio de tres repeticiones, las barras sobre ellas los errores estándar. (B) Distribución en las mismas muestras de los compuestos electroactivos según el rango los potenciales de reducción cubiertos por los barridos realizados con la técnica de voltimetría de pulsos diferenciales (VPD).

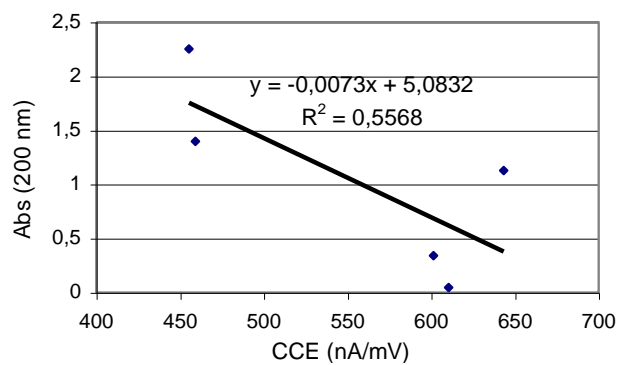


Figura 9. Relación entre la absorbancia y la cantidad total de compuestos electroactivos en las fracciones excluidas al eluir los fluidos vaginales normales con Sephadex G25©.

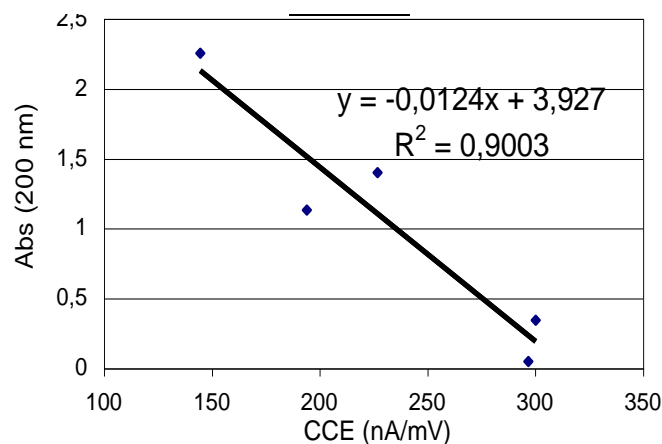


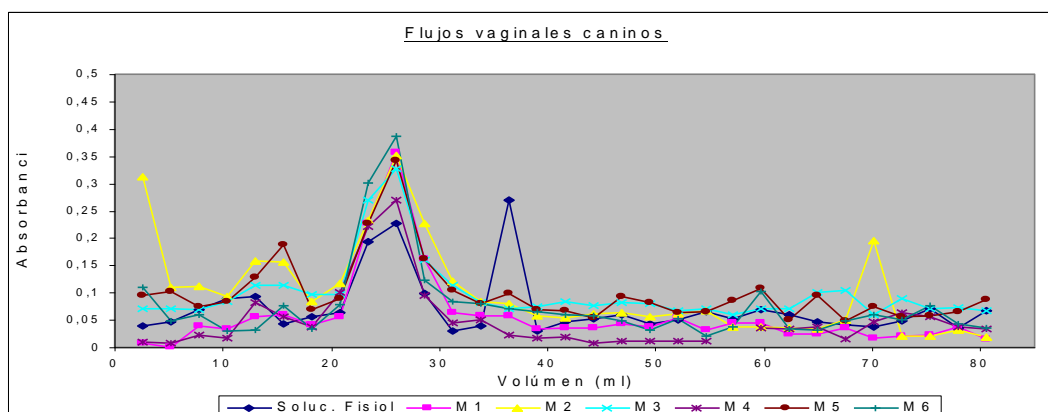
Figura 10. Relación entre la absorbancia y la cantidad total de compuestos electroactivos en el rango de potenciales comprendido entre -500 y -800 mV, en las fracciones excluidas al eluir los fluidos vaginales normales con Sephadex G25©.

La contribución de este trabajo preliminar al conocimiento de sistema estudiado, puede resumirse como sigue: (i) se puso en evidencia la existencia en fluidos vaginales normales de compuestos insaturados de elevada talla molecular en concentraciones variables; y (ii) se puso en evidencia que en esa fracción de los fluidos vaginales normales, existe una reserva reductora formada por compuestos redox que poseen potenciales de reducción ubicados entre -500 a -800 mV <sup>110 112</sup>.

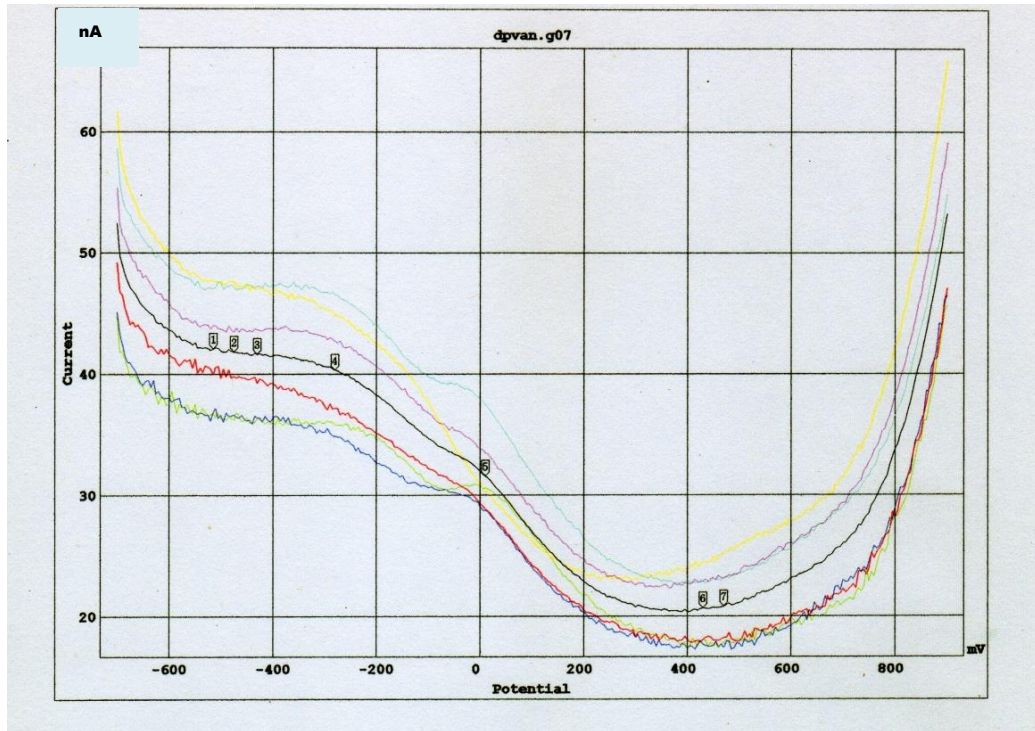
### 3.3 Comportamiento voltamétrico del fluido vaginal canino<sup>113</sup>

<sup>112</sup> Ombrella A, Ruiz Abad I, Coletti-Zabala T, Dogali C, Pidello A (2007) Cambios en el estado redox del fluido vaginal ante la infección microbiana: propuesta metodológica. *VII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. FCV. UNR. 128-129. Sociedad de Biología de Rosario. X Congreso, XXVII Reunión Anual. 177.*

<sup>113</sup>

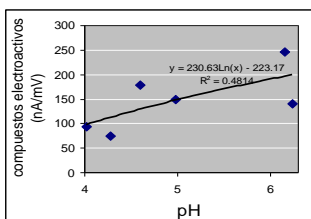


Para caracterizar electroquímicamente el fluido vaginal canino se utilizaron muestras de secreciones de fondo de saco vaginal que se tomaron en perras en edad reproductiva, no gestantes, sin tratamientos antimicrobianos locales y/o sistémicos. Los barridos voltamétricos (rango explorado: -400 a +800 mV) se realizaron en soluciones acuosas no tamponadas. La mayor reserva de compuestos reductores (64.3%) se presentó en valores de potenciales comprendidos entre -280 y +10 mV (Figura 11).



(A)

Los valores de absorbancia no fueron significativamente diferentes ni entre las muestras ni entre las diferentes fracciones, correspondiendo en todos los casos los mayores valores a la fracción excluida. Los barridos se corresponden con los presentados en el Capítulo II, Figura 3. Como indica la figura siguiente, la CCE fue diferente entre las muestras (CV= 38%) ( $R^2= 0,48$ ,  $r$  por debajo de 0,7 indica que la relación no reviste interés en el estudio de mi sistema)6.



Peak n	Element	E.entered	E.found	Slope
1	Unknown		-515 mV	4.713 nA/mV
2	Unknown		-475 mV	3.207 nA/mV
3	Unknown		-430 mV	4.140 nA/mV
4	Unknown		-280 mV	20.291 nA/mV
5	Unknown		10 mV	17.568 nA/mV
6	Unknown		430 mV	4.126 nA/mV
7	Unknown		470 mV	4.967 nA/mV

(B)

Figura 11. Ejemplo de voltanogramas experimentales que muestran: (A) Voltanograma VPD de muestras de fluido vaginal canino (n= 6). La línea negra corresponde al valor promedio de las muestras analizadas. Los números indican la presencia de compuestos electroactivos; (B) En la tabla se detallan los parámetros electroquímicos característicos de esos compuestos. “E found” corresponde a los valores de potencial redox (factor de Intensidad redox) donde se registró la presencia de compuestos electroactivos; “Slope” en el software utilizado (TraceMaster 5, Radiometer Analytical) informa sobre la concentración del compuesto electroactivo detectado (factor de Capacidad redox). El analito contenía: 1300 µl FV canino; 400 µl KCl 2M; µl 3700 H<sub>2</sub>O destilada libre de O<sub>2</sub>. El barrido voltamétrico se realizó entre -700 y +900 mV. Duración del escalón del impulso: 0,1 s. Amplitud del escalón 5 mV. Duración del pulso: 40 ms. Amplitud del pulso: 25 mV.

### 3.4 Comportamiento electroquímico del fluido vaginal canino suplementado con H<sub>2</sub>Q

La presencia de H<sub>2</sub>Q (Figura 12) se detectó claramente a través de los dos valores de potenciales que corresponden a los picos anódicos observados en los voltamogramas cíclicos de una solución acuosa no tamponada de H<sub>2</sub>Q (el valor de pH del analito fue de 5,0) los cuáles reflejan su oxidación a semiquinona (HQ<sup>-</sup>) y quinona (Q) (ver Capítulo I, Figura 11).

El aporte de H<sub>2</sub>Q aumentó alrededor de 3 veces la concentración de compuestos electroactivos (CCE) de la solución de FV canino en el rango de potenciales estudiados (comprendidos entre -700 y -100 mV; Cuadro en la Figura 13). Este resultado indica que independientemente de la heterogeneidad de las muestras estudiadas, la presencia de un reductor orgánico fuerte ( $E^0_{Q/H_2Q} = -0,699$  V) altera la capacidad reductora del fluido vaginal canino en un rango amplio de potenciales de reducción alejados de los potenciales de reducción formales de las especies quinónicas presentes en el analito (HQ<sup>-</sup> y Q; Eh entre 50 y 300 mV) (Capítulo I, Figura 11).

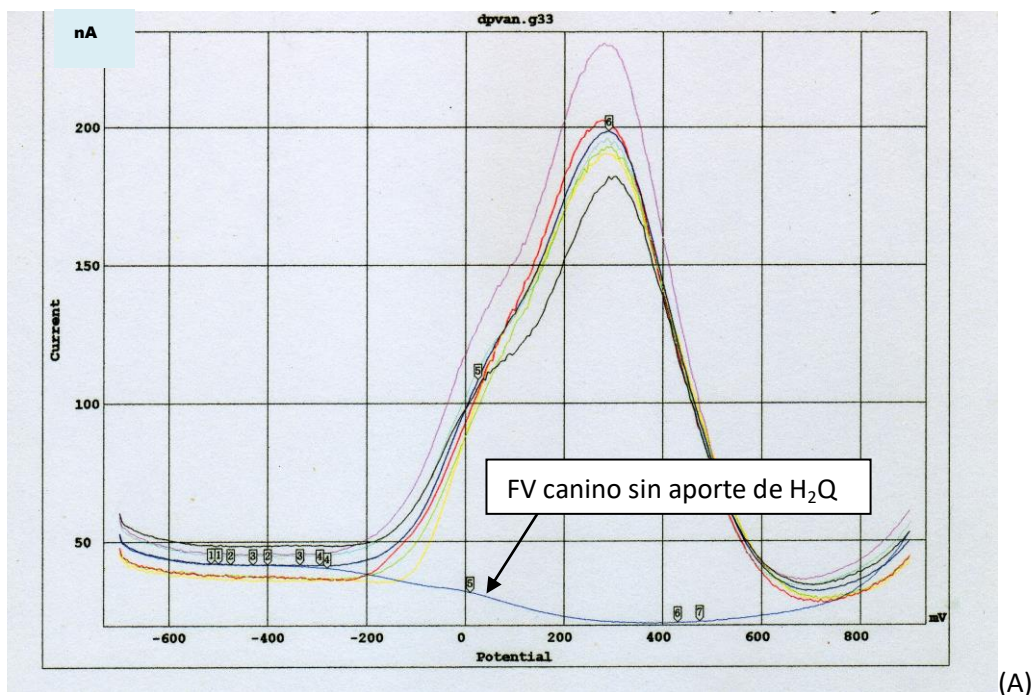


Figura 12. (A) Ejemplo de voltanogramas experimentales (VPD) que muestran el comportamiento de muestras de fluido vaginal canino suplementado con H<sub>2</sub>Q (n= 6). Los números indican la presencia de compuestos electroactivos (valores promedios). En la Figura se incluye la curva correspondiente al comportamiento del FV canino sin aporte de H<sub>2</sub>Q (Figura 11).

Peak n	Element	E.entered	E.found	Slope
1	Unknown		-500 mV	4.417 nA/mV
2	Unknown		-400 mV	1.841 nA/mV
3	Unknown		-335 mV	3.636 nA/mV
4	Unknown		-295 mV	3.459 nA/mV
5	Unknown		25 mV	89.428 nA/mV
6	Unknown		290 mV	0.607 $\mu$ A/mV

Figura 12 (B) (Continuación). En la tabla se detallan los parámetros electroquímicos característicos de esos compuestos. El analito contenía: 1300  $\mu$ l FV canino; 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>Q 0,1M; 400  $\mu$ l KCl 2M;  $\mu$ l 3700 H<sub>2</sub>O destilada libre de O<sub>2</sub>. Las características del barrido son idénticas a las descritas en la Figura 11.

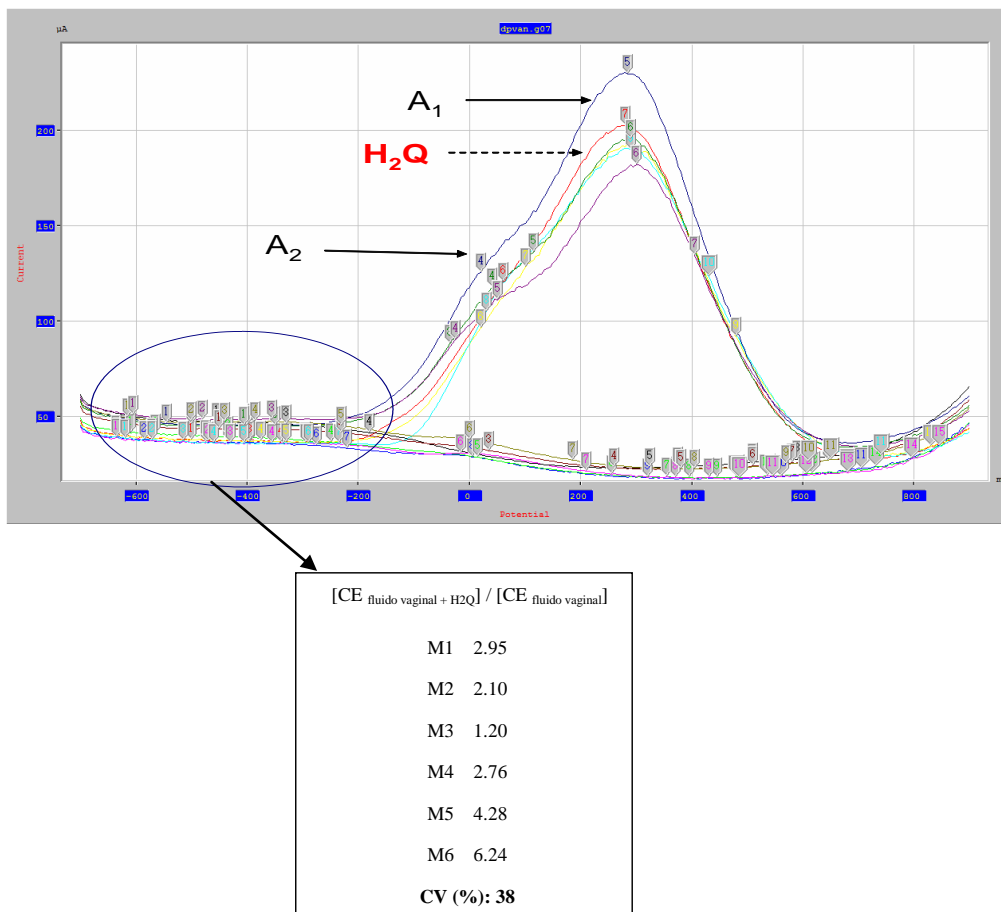


Figura 13. Efecto del aporte de H<sub>2</sub>Q sobre la concentración de compuestos electroactivos [CE] en el rango de potenciales de reducción entre -700 y +100 mV. A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> corresponden a los picos de anódicos en el barrido voltamétrico de la H<sub>2</sub>Q (Capítulo I, Figura 11).

#### 4. Conclusiones

El objetivo de este capítulo fue desarrollar un modelo de estrategia analítica que permita comprender tanto los mecanismos de acción de fármacos redox en cavidades corporales como en otros sistemas vinculados con interacciones redox. En esta etapa del trabajo se determinó el comportamiento voltamétrico de la mezcla de MTZ con dos modelos de transportadores de electrones.

El primer paso fue reconocer los efectores redox elegidos como modelo a través de la técnica electroquímica utilizada en solución acuosa. Se detectó una señal correspondiente a la reducción del MTZ (-1,034 V) y su respectiva señal de oxidación (-0,758V). También se identificaron las señales de reducción (+0,086V) y de oxidación (-0,103 y +0,275V) de la H<sub>2</sub>Q. Siguiendo el objetivo general de estudiar el comportamiento de un fármaco redox frente a un transportador de electrones, se mezclaron ambas

soluciones. Así se observó que la señal electroquímica del MTZ no resultó modificada, en cambio, en la señal de la H<sub>2</sub>Q se detectó un aumento en la intensidad de sus picos anódicos y la aparición de un segundo pico catódico.

Para intentar explicar estos resultados podemos considerar, no solo el potencial de reducción de la H<sub>2</sub>Q y del MTZ sino también el correspondiente al solvente H<sub>2</sub>O. La H<sub>2</sub>Q (E<sub>h</sub>= +0,086 V) pudo haber sido reducida por los electrones provenientes del H<sub>2</sub>O ( $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$ ; el H<sub>2</sub>O actúa como reductor; el valor de E<sub>h</sub> en nuestro caso es igual a -0,40V), sin que se observe ningún efecto sobre la molécula del MTZ (E°= -0,89V). A partir de este análisis se podría suponer que la molécula de H<sub>2</sub>Q actuaría como protectora del grupo nitro del MTZ, resguardándolo de posibles reducciones extracelulares causadas por la presencia del solvente H<sub>2</sub>O en los ambientes en que debe actuar. Por otra parte, tal como se describió en el Capítulo II, se observó que la señal espectrofotométrica de la molécula de H<sub>2</sub>Q en FV experimentaba una disminución en el rango UV, lo que teóricamente indica una disminución en la cantidad de compuestos insaturados y por ende una modificación en el poder reductor del sistema. En esta parte del trabajo confirmaría el hecho de que la H<sub>2</sub>Q se comportaría como la probable aceptora de electrones, resguardando al MTZ de una potencial reducción extracelular. Otra explicación posible sería que el grupo -OH del MTZ actuara como reductor sobre la molécula de H<sub>2</sub>Q, situación que no sería detectada en el barrido voltamétrico que registra en el rango estudiado el potencial electroquímico que corresponde la reducción del grupo -NO<sub>2</sub>. Por lo tanto, no debería observarse ninguna modificación en el pico catódico correspondiente al MTZ.

En otra parte del trabajo descrito en este Capítulo, se trató de determinar si las fracciones acuosas que contenían MTZ y componentes normales del FV canino (FVC) presentaban un patrón electroquímico característico cuando se enfrentaban a un transportador de electrones. En esas condiciones se detectó un aumento de la cantidad de MTZ oxidado. En FVC la molécula de MTZ se oxida estando en presencia de AQDS (E°= 0,561V). Además, en FVC se observó un aumento de la concentración de compuestos electroactivos totales, o sea se produciría una neoformación de especies redox activas.

La suplementación de MTZ con FeCl<sub>3</sub> y con ácido ascórbico produjo una disminución en la intensidad del pico catódico, lo cual significaría una disminución de la cantidad de MTZ oxidado. Este punto cobra importancia teniendo en cuenta que el ácido

ascórbico (vitamina C) es frecuentemente hallado en nutracéuticos<sup>114</sup> como antioxidante y que también se presenta en forma de tabletas vaginales (Prevegine®, Vagivit®) para disminuir el pH en cuadros de vaginosis bacteriana, por ejemplo.

En experimentos realizados con MTZ en un solvente aprótico se determinó que aún la variación en la presencia de componentes normales del FVS puede modificar el comportamiento electroquímico de la molécula de MTZ. Tanto la presencia de glucosa, como de H<sup>+</sup> y de ácido láctico desplazaron el pico de la onda catódica hacia valores menos negativos. Además, se observó que la suplementación con ácido láctico en soluciones de FVS con MTZ con diferente pH permitía visualizar la relación del pH tanto con la Ec como con la Ic de MTZ. Los resultados sugieren que: (i) el FVS puede afectar la cantidad de MTZ susceptible de reducirse y modificar su potencial de reducción a través de modificaciones del estado ácido-base (aumento de la concentración de AL, por ejemplo); y (ii) el grupo nitro del MTZ, responsable de la actividad antibiótica del MTZ no resultó ni enmascarado ni transformado por las modificaciones realizadas en la composición del FVS. Por lo expuesto, puede considerarse que el sistema FVS-MTZ tal como lo describimos, resulta apto como modelo de estudio de nuestro sistema.

En el caso del análisis voltamétrico de los fluidos vaginales caninos se determinó que la mayor reserva de compuestos reductores se presenta en valores de potenciales bastante más positivos (-280 y +20 mV) que en los fluidos vaginales humanos (-500 y -800mV). Esto pone en duda la capacidad del MTZ de actuar con la misma eficacia en ambos sistemas vaginales.

En el caso del análisis voltamétrico de los fluidos vaginales caninos suplementados con H<sub>2</sub>Q, se detectaron dos picos anódicos (oxidación de la H<sub>2</sub>Q) y se observó un aumento de compuestos electroactivos en el rango de los potenciales menos positivos (-700 y +100 mV). Este resultado es sumamente importante para interpretar la significación y la potencialidad como efectores redox de compuestos ubicuos como las quinonas.

En síntesis, los resultados presentados en este Capítulo confirman la vulnerabilidad electroactiva de la molécula de MTZ. Por otra parte, lo observado sugiere

---

<sup>114</sup> Término definido en 1989 por Stephen L. De Felice, fundador y presidente de Foundation of Innovation Medicine: Alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades.

posibles mecanismos de reacción que deberían ser considerados cuando el antibiótico se utiliza con propósitos terapéuticos.

## **CAPÍTULO IV. Comportamiento del componente bacteriano ante la presencia de efectores ácido –base y redox**

En este capítulo se intentó relacionar las interacciones y modificaciones redox y ácido-base que se pueden presentar en el escenario vaginal utilizado en este estudio (y que fueron descritas y analizadas en el Capítulo III) con diferentes variables relacionadas con la capacidad de desarrollo bacteriano.

En este capítulo predominan situaciones que tuvieron al MTZ como protagonista. Como dijimos anteriormente, el MTZ es un antibiótico que cumple su acción bactericida cuando su grupo nitro es reducido intracelularmente desestabilizando el ADN microbiano (Capítulo I. 2. Figura 12 y Figura 13). Diversos autores trabajaron sobre el efecto de MTZ sobre bacterias que no son su objetivo terapéutico. Por ejemplo, Simoes *et al.*<sup>28</sup> demostraron que el crecimiento de *Lactobacillus* sp. en presencia de MTZ es dosis dependiente, siendo completamente inhibido a concentraciones mayores o iguales a 5000 µg/ml. Abbas *et al.*<sup>30</sup> demostraron que la motilidad de *Pseudomonas aeruginosa* disminuye en presencia de MTZ a una concentración subterapéutica respecto a la utilizada en presentaciones farmacéuticas para uso tópico o local. Por su parte, Castelli *et al.*<sup>27</sup> demostraron que si el grupo activo nitro se reduce completamente antes de estar en contacto con las células bacterianas resultaría inactivo y no se comportaría como agente antimicrobiano. Es sabido que cuando ciertas patologías son producidas por bacterias anaerobias, la utilización de MTZ es una posibilidad terapéutica. Sin embargo, es necesario explorar como influye este antibiótico en su carácter de efector redox sobre otros actores del ecosistema vaginal. Por lo expuesto, se decidió trabajar con bacterias benéficas y con bacterias patógenas o patógenas oportunistas propias del ecosistema vaginal.

En estos experimentos, tanto cuando se utilizó MTZ o metronidazol modificado (MTZm), el antibiótico se empleó a una concentración de 1700 ó 5000 µg/ml, dosis que corresponderían a concentraciones subterapéuticas. Sin embargo, estas concentraciones serían parcialmente inhibitorias del crecimiento de algunas bacterias, por ejemplo en el caso de *Lactobacillus* spp.<sup>28</sup>

En los experimentos descritos en este capítulo, se utilizaron tres especies bacterianas; *L. acidophilus* ATCC 314, *P. fluorescens* C7R12 y *Stafilococcus* sp.<sup>115</sup> (Ver Capítulo I, 3.1).

Los resultados se analizaron utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism 6.0.

### **1. Sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 en medios suplementados con metronidazol y con metronidazol tratado con una solución reductora<sup>116</sup>.**

En esta parte del trabajo los objetivos fueron: (i) Comparar el efecto sobre la replicabilidad de *L. acidophilus* ATCC 314 en un tratamiento control, en un tratamiento suplementado con metronidazol (MTZ) y en un tratamiento suplementado con metronidazol modificado (MTZm); y (ii) Comparar el efecto post tratamiento sobre la capacidad de las bacterias para formar colonias en agar MRS.

---

<sup>115</sup> La metodología utilizada para la preparación de los inóculos fue la siguiente:

***L. acidophilus* ATCC 314:** Las bacterias utilizadas fueron mantenidas en suspensión con leche descremada a -20° C hasta su uso, fueron activadas en caldo LAPT modificado (proteasa peptona 2%; extracto de levadura 1%; glucosa 1%; Twen 80 0,1%; pH 6,5) a 37° C por 24 h con dos repiques cada 12 h. Las bacterias fueron centrifugadas a 3500 g por 15 minutos a temperatura ambiente. El sedimento fue lavado dos veces con solución fisiológica estéril y resuspendido hasta obtener la concentración necesaria.

***P. fluorescens* C7R12:** Esta cepa fue provista por P. Lemanceau (INRA Dijon, Francia). Las bacterias utilizadas fueron mantenidas en suspensión con glicerol al 50 % a -20° C hasta su uso, fueron activadas en caldo Tripteína suplementado con rifampicina a 25-30 °C por 18 h y repicadas en caldo Tripteína por 18 h más. Las bacterias fueron centrifugadas a 3500 g por 15 minutos. El sedimento fue lavado dos veces y resuspendido con solución fisiológica estéril. Se realizaron las diluciones necesarias.

***Stafilococcus* sp.:** La bacteria utilizada fue *Staphylococcus* sp. (Cepa de la colección del Laboratorio de Química Biológica. FCV. UNR), mantenida en suspensión con leche descremada a -20°C hasta su uso. Las bacterias se activaron en caldo LAPT (Peptona de carne 1,5 %; Extracto de levadura 1%; Glucosa 1%; Tripteína de soya 1%; Tween 80 0,1%) a 37 °C por 24 hs con dos repiques cada 12 hs. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm y se lavaron con solución fisiológica dos veces. El sedimento resultante de la última centrifugación se resuspendió en caldo MRS.

<sup>116</sup> La molécula de Metronidazol (MTZ) fue expuesta a la acción de un reductor inorgánico fuerte, Zinc metálico que en presencia de etanol y CINH<sub>4</sub>, reduce el grupo nitro, según la metodología descrita por Shriener et al (1966). La solución se pasó por rotavapor y se llevó a volumen con H<sub>2</sub>O destilada libre de O<sub>2</sub>. En pruebas iniciales se utilizó una resina de canje iónico (Dowex©) para eliminar eventuales residuos de CINH<sub>4</sub> en la solución final. El compuesto resultante se denominó Metronidazol modificado (MTZm) (Shriener RL, Fuson RC, Curtin DY (1966) *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. Limusa-Wiley. 192–193).

Se partió de las siguientes hipótesis: (i) la replicabilidad de las bacterias sería menor si son incubadas con MTZ que si son incubadas con MTZm y en ambos casos la replicabilidad sería menor respecto al tratamiento control; y (ii) la capacidad de las bacterias para formar colonias sería menor si previamente a ser sembradas en placas, son incubadas con MTZ solo o con MTZm.

Para esta parte del trabajo se realizaron incubaciones bacterianas en caldo MRS sin suplementar (Tratamiento control), suplementado (5000 µg/ml) con MTZ y con MTZm. Para cada uno de los tratamientos se sembró 1 ml de *L. acidophilus* (reactivados según se describió en la Referencia<sup>115</sup>) en 50 ml finales de caldo MRS. La concentración final de bacterias en cada tratamiento fue de  $1,8 \times 10^7$  bacterias/ml. Las mismas se incubaron 24 hs a 37°C. Luego de ese tiempo se determinó la cantidad de bacterias en cada tratamiento (cámara de Thoma). Para estudiar el efecto sobre la cultivabilidad de las bacterias, se sembraron 100 µl de cada tratamiento en placas de Petri con MRS. Se trabajó por triplicado. Se incubaron 48 hs a 37°C en anaerobiosis. Los resultados (unidades formadoras de colonias; u.f.c) se analizaron estadísticamente con análisis de la variancia y el test de comparaciones múltiples LSD.

Los resultados obtenidos en relación al primer objetivo parcial, luego del período de incubación en caldo fueron los siguientes:

- Tratamiento control:  $1,6 \times 10^9$  bacterias/ml.
- Tratamiento MTZm:  $1 \times 10^8$  bacterias/ml.
- Tratamiento MTZ:  $4,6 \times 10^7$  bacterias/ml.

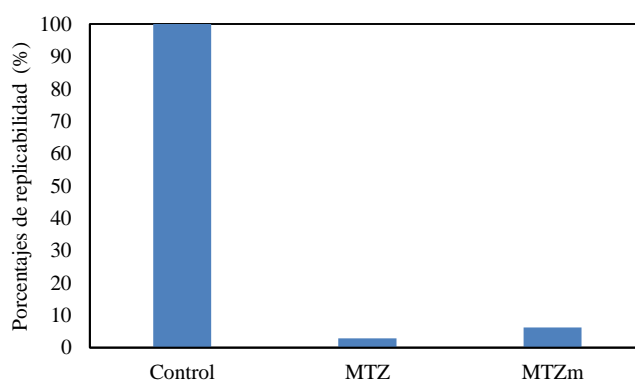


Figura 1: Porcentaje de replicabilidad de *L. acidophilus* ATCC 314 luego de aplicar los diferentes tratamientos.

En relación al segundo objetivo parcial, luego del período de incubación en agar, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Colonias provenientes del tratamiento control:  $3 \times 10^4$  colonias/ml.
- Colonias provenientes del tratamiento MTZm:  $1,2 \times 10^4$  colonias/ml.
- Colonias provenientes del tratamiento MTZ:  $0,8 \times 10^4$  colonias/ml.

Los resultados mostraron que la suplementación del medio con el antibiótico (modificado o no) disminuye la viabilidad bacteriana ( $p < 0,05$ ).

El cultivo de bacterias en placas se condice con los resultados previos. El número de colonias formadas en las placas con MTZm fue 38% superior respecto a la de MTZ, siendo este resultado el reflejo de la mayor capacidad de sobrevivencia de las bacterias luego de ser expuestas al antibiótico reducido químicamente (Figura 2). A partir de este resultado se puede inferir nuevamente que la fisiología bacteriana fue afectada de manera diferente.

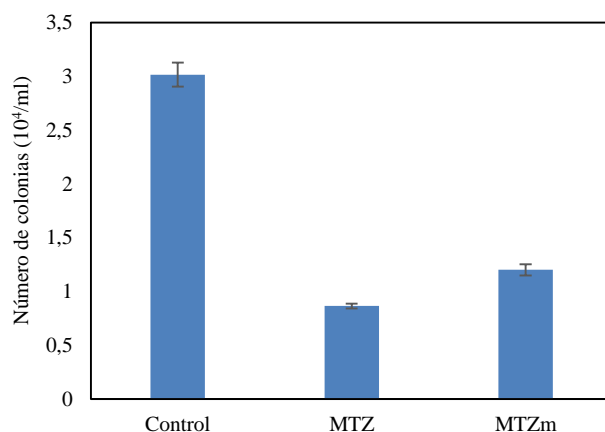


Figura 2: Efecto del MTZ y MTZm sobre el número de u.f.c de *L acidophilus* ATCC 314 en MRS agar.

En síntesis, en las condiciones de nuestro trabajo observamos: (i) que con un aporte de  $5000 \mu\text{g/ml}$  de MTZ el crecimiento de *L acidophilus* ATCC 314 no era completamente inhibido, observándose una inhibición del 72% respecto al control; y (ii) que si el MTZ se trataba previamente con un reductor inorgánico (Zn metálico en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) la inhibición era del 60% (Coletti Zabala y Pidello, 2015; Figura 2<sup>117</sup>). Estos resultados sugieren que las variaciones observadas en el efecto inhibitorio podrían estar asociadas con cambios en especiación de la molécula de MTZ o con

<sup>117</sup> Coletti Zabala T, Pidello A (2015) Efecto del Metronidazol químicamente modificado sobre la capacidad de sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314. XVI Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Facultad de Cs. Veterinarias. UNR.

cambios en su grupo funcional activo (el grupo nitro), tal como sugerían los resultados descriptos en los ítems anteriores (Capítulo III).

Con el objetivo de profundizar estos aspectos desde el punto de vista electroquímico se realizaron barridos de voltametría cíclica (VC) de soluciones de MTZ y MTZm (1,71  $\mu\text{g/ml}$ ). El solvente fue acetonitrilo puro (AN) o una mezcla  $\text{H}_2\text{O} / \text{AN}$  (40/60; v/v)<sup>118</sup>. Los barridos se iniciaron en un potencial de +700 mV en el sentido de la reducción (onda catódica). La onda anódica (oxidación) se inició a -1400 o -1600 mV. Las velocidades de barrido fueron de 5 mV/s o 25 mV/s respectivamente.

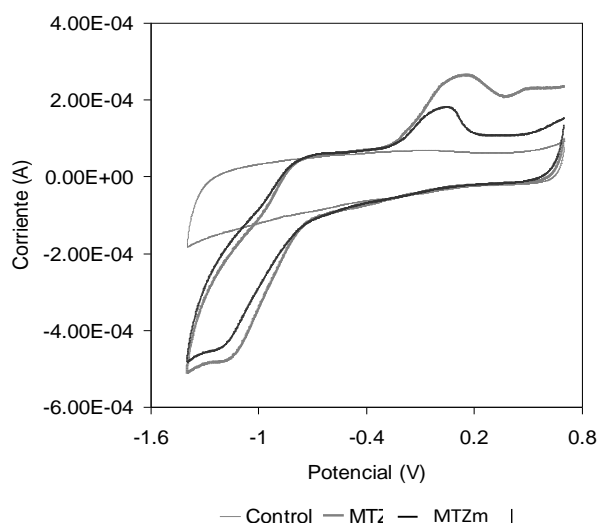


Figura 3. Barridos en VC de las soluciones con MTZ y MTZm en AN. Rango del barrido: +700 / -1400 mV. La velocidad de barrido fue de 5 mV/s.

La Figura 3 muestra que las soluciones con MTZ y MTZm presentaron un pico catódico en un potencial alrededor de -1,2 V. El pico de corriente correspondiente a la solución con MTZm fue menor, lo que sugiere que existió una menor concentración de compuestos reductibles. En la región anódica (oxidación) se observan dos picos: uno a un potencial alrededor de -0,8 V que no presenta diferencia entre las soluciones MTZ y MTZm, y otro en valores mucho más positivos (alrededor de +0,1V) que fue menor con la solución de MTZm respecto a la solución de MTZ. Dado que los potenciales de los imidazoles en general se encuentran en la zona de potenciales más negativos (alrededor

<sup>118</sup> El AN es un solvente aprótico. Se utilizaron estas dos soluciones con el propósito de determinar la incidencia que podía tener en el registro voltamétrico la variabilidad normal que presenta el FV a nivel de la concentración en compuestos potencialmente dadores de  $\text{H}^+$  (el  $\text{H}_2\text{O}$ , por ejemplo).

de -0,5V) (Wardman, 1989)<sup>119</sup>, el pico observado a +0,08 V no puede corresponder a la oxidación de la forma reducida del MTZ, aunque probablemente indica la presencia de un compuesto electroactivo derivado de éste, por lo cual la señal constituye una variable importante para la caracterización electroquímica del sistema estudiado. La Figura 4, que muestra el resultado de un experimento complementario también utilizando AN como solvente, donde se observa la linealidad que existe entre la intensidad ( $\mu\text{A}$ ) del pico anódico observado en +0,08 V y la concentración agregada de MTZ, apoya esta interpretación.

Por otra parte, como indica la Figura 5, la diferencia en el comportamiento electroquímico entre las soluciones MTZ y MTZm se magnifica cuando se aumenta la proporción de  $\text{H}_2\text{O}$  en el solvente, lo que sugiere la existencia de una fuerte incidencia de los solventes y/o compuestos próticos sobre el comportamiento electroquímico del MTZ. En estos voltanogramas se mantiene el pico catódico pero desaparece el pico anódico en los valores positivos de potencial. En la solución con MTZm aparece un nuevo pico anódico que refleja la presencia de un compuesto electroactivo neoformado. Los resultados que se presentan indican que las diferencias a nivel del efecto inhibitorio observadas entre las soluciones MTZ y MTZm frente a *L. acidophilus* ATCC 314 podrían estar relacionadas con las marcadas diferencias que presentan ambos compuestos a nivel electroquímico.

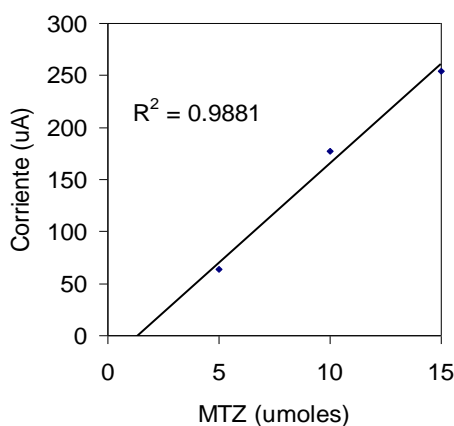


Figura 4. Relación entre la intensidad ( $\mu\text{A}$ ) del pico anódico en 0,08 V y la concentración de MTZ ( $\mu\text{moles}$ ) en AN. (5  $\mu\text{moles/ml}$  equivalen a 857,6  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{moles/ml}$  equivalen a 1715,2  $\mu\text{g/ml}$ )

<sup>119</sup> Wardman, P (1989) Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 18 (4), 1637-1755.

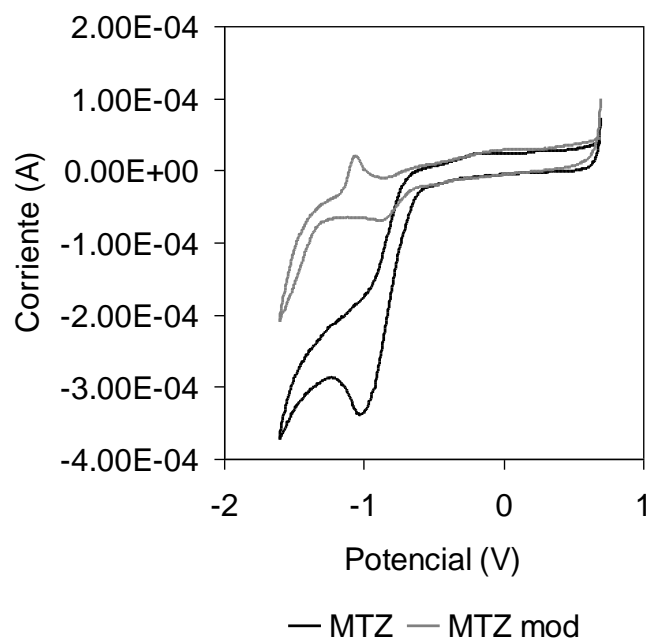


Figura 5. Barridos en VC de las soluciones de MTZ y MTZm en una mezcla H<sub>2</sub>O / AN. Rango del barrido: +0,7 / -1,6 V. La velocidad de barrido fue de 0,025 V/s.

## 2. Comportamiento del sistema conformado por fluido vaginal y microorganismos frente a cambios de pH y redox

### 2.1 Comportamiento de *L. acidophilus* ATCC 314 en fluido vaginal sintético con diferentes concentraciones de protones suplementadas con metronidazol

Esta parte del trabajo tuvo por objetivo analizar el impacto de la variación en el estado ácido-base de un sistema *in vitro* compuesto por fluido vaginal sintético (FVS) y MTZ (5000 µg/ml) en la sobrevivencia de *L. acidophilus* ATCC 314.

Para llevar a cabo este objetivo se preparó FVS estéril según la fórmula de Owen y Katz (1999) modificada<sup>120</sup> y soluciones de KOH 2 M y ácido láctico 0,5 M para alcalinizar o acidificar el medio de cultivo. Los valores de pH resultantes en las soluciones de FVS fueron: 4, 5, 6, 7 y 8. Cada tratamiento contenía 1 ml de suspensión bacteriana, 6,2 ml de FVS y 2,8 ml de MTZ. La concentración final de bacterias fue  $1 \times 10^7$  bacterias/ml (volumen total 10 ml). Las soluciones se incubaron 24 h a 37 °C y luego se centrifugaron; el sedimento se re suspendió en caldo MRS y se incubó por 72 h. Simultáneamente se sembraron 100 µl de la suspensión en placas con agar MRS para

<sup>120</sup> Ver ANEXO 3.

determinar la viabilidad de las bacterias sometidas a los tratamientos. El sobrenadante se destinó a estudios voltamétricos.

Al finalizar el experimento el promedio del número de bacterias contabilizado en cámara de Thoma se muestra en la Figura 6 y la cantidad de colonias contadas en las placas de Petri se muestran en la Figura 7 (n= 3).

Mediante el análisis de regresión polinomial se determinó que hay relación entre la replicabilidad bacteriana y el pH ( $R^2= 0,9$ ) y también entre la viabilidad y el pH de *L acidophilus* ATCC 314, medida como UFC/ml post incubación con MTZ ( $R^2= 0,885$ ). Además se determinó que la viabilidad de la cepa disminuye significativamente a pH 4 y pH 8 respecto de los demás tratamientos ( $p<0,05$ ).

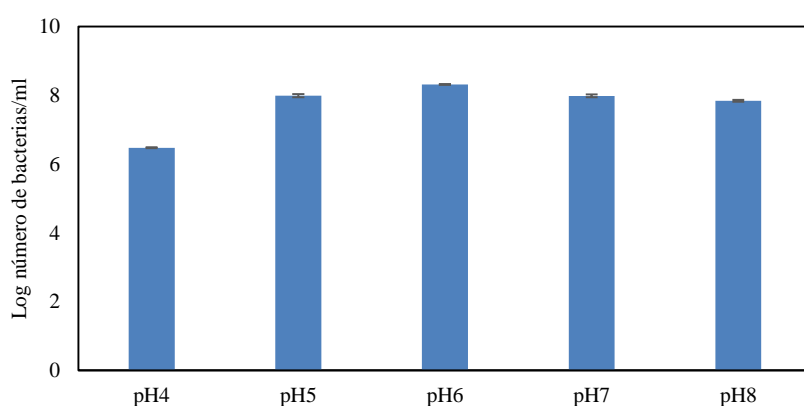


Figura 6: Número de bacterias en caldo MRS (log/ml) luego de cada tratamiento.

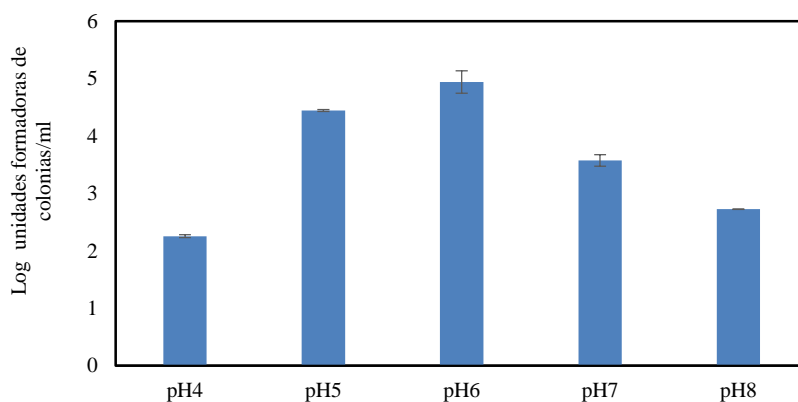


Figura 7: Cantidad de unidades formadoras de colonias (log UFC/ml) luego de cada tratamiento. Las barras sobre las columnas corresponden a los errores estándar de las medias.

La Figura 8 informa sobre el comportamiento electroquímico de las muestras correspondientes a los distintos tratamientos. Los barridos indican que solo los pH extremos dentro del rango analizado modificaron la intensidad correspondientes a la señal típica del MTZ (pH= 4 y pH= 8). Entre estos valores la señal no fue afectada, lo que

sugiere que en el caso de *Lactobacillus* en las condiciones próximas a la neutralidad la concentración de MTZ no es modificada por el pH.

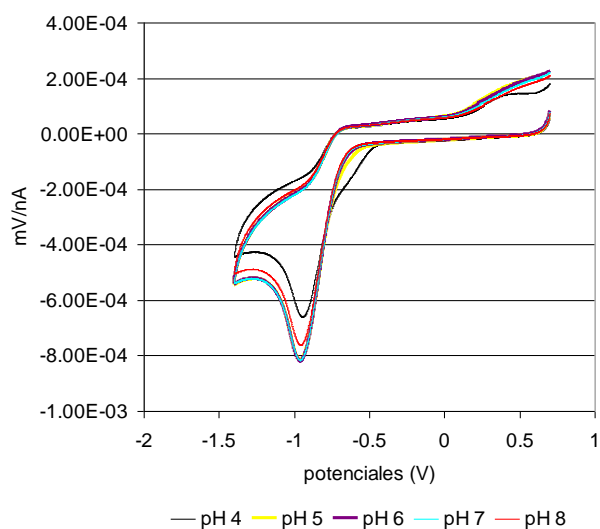


Figura 8. Barridos voltamétricos (VC) realizados sobre los sobrenadantes de suspensiones que contenían FVS, suspensión bacteriana y MTZ a diferentes valores de pH. Rango explorado: +700 / -1400 mV. Duración del escalón: 0,04 s. Amplitud del escalón: 1 mV.

## 2.2 Comportamiento de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 en fluido vaginal sintético con diferentes concentraciones de protones suplementadas con metronidazol o metronidazol modificado

Este experimento fue definido, en función de los objetivos generales de este trabajo de Tesis, para cuantificar los cambios iniciales en las variables ácido-base y redox en las soluciones de FVS cuando estas eran suplementadas con MTZ o MTZm. Esta información permitiría definir con mayor rigor los escenarios de partida que encontraba la bacteria introducida en términos de concentración de  $H^+$  y  $e^-$  y especialmente comparar su comportamiento en términos de replicabilidad. Se utilizó como microorganismo modelo otro habitante ubicuo y patógeno oportunista del sistema vaginal, como lo es *Pseudomonas* spp.<sup>76 77 121</sup>

Para llevar a cabo ese objetivo se preparó FVS estéril según misma metodología descrita en el ítem anterior. Los valores de pH resultantes en las soluciones de trabajo

<sup>121</sup> Como dijimos precedentemente, frente a este microorganismo aeróbico la acción del MTZ comprometería la comunicación entre células por ser un análogo estructural de la acil homoserina lactona (acil-HSL), molécula señalizadora de *quorum sensing* (Abbas, 2015)<sup>30</sup>, es decir el efecto antibiótico se aparta del mecanismo descrito en el Capítulo I (Figura13).

fueron: 4, 5, 6, 7 y 8. Se prepararon suspensiones conteniendo 1 ml de la suspensión bacteriana ( $10^7$  células/ml), 6,2 ml de FVS (cada uno a diferente valor de pH) y 2,8 ml de MTZ. El mismo protocolo se siguió para los ensayos con MTZm. Los experimentos se realizaron con un aporte de antibiótico (MTZ o MTZm) igual a 1700  $\mu\text{g/ml}$ .

Luego de ajustar el pH a los valores indicados, los sistemas se incubaron durante 3 h<sup>122</sup>. Luego de ese período se determinó el número de bacterias y se tomaron alícuotas de las soluciones, las cuales fueron centrifugadas (3000g) y en el sobrenadante se midió pH, conductividad, Eh y se realizaron barridos voltamétricos (VC y VPD).

El comportamiento del componente numérico de la población bacteriana de *P. fluorescens* en estos distintos escenarios fue determinado de la manera siguiente. Los sedimentos fueron resuspendidos en caldo tripteína<sup>115</sup> e incubados durante 18 h en estufa de cultivo a 25 °C. Al final de la incubación se determinó el número de bacterias por conteo en cámara de Thoma.

### 2.2.1 Comportamiento del pH

Los valores de pH presentaron una marcada disminución en los tratamientos que iniciaron con pH 7 y pH 8 (Figura 9). Considerando que las reacciones desasimilativas<sup>6</sup> de *P. fluorescens* conducen la producción de ácidos orgánicos como cítrico, oxálico y glucónico, que se caracterizan por presentar valores bajos de pKa<sup>123</sup>, su presencia podría asociarse con un potencial efecto buffer en valores de pH próximos a los originales cuando éstos fueron relativamente bajos (en nuestro caso en el rango de 4-6) y explicarían el descenso observado respecto a los valores iniciales cuando éstos se situaron entre 6 y 8. El descenso observado fue mayor en el tratamiento suplementado con MTZ que en el tratamiento suplementado con MTZm.

---

<sup>122</sup> Se disminuyó el tiempo de incubación (respecto a *L. acidophilus*) debido al rápido crecimiento de este microorganismo, detectado en experiencias previas.

<sup>123</sup> Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D (2010) Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica organicacids produced by phosphate solubilizing rhizobacteria: a critical review. *Terra Latinoamericana*, 28 (1), 61-70

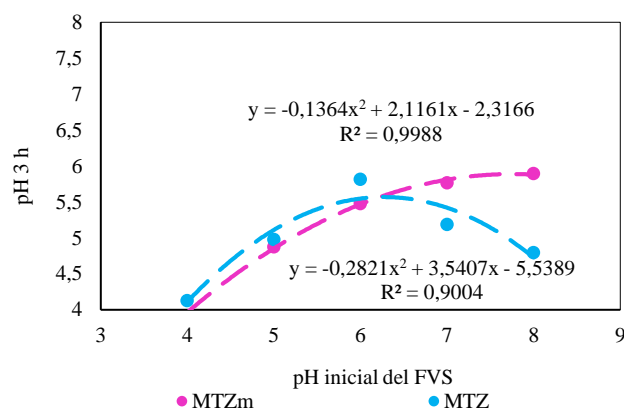


Figura 9: Variación de los valores de pH iniciales de los sistemas estudiados luego de la incubación en estufa a 25 °C durante 3 h.

### 2.2.2 Relación del pH con la conductividad

Los valores de conductividad no presentaron grandes diferencias dentro de cada tratamiento ( $R^2_{MTZ} = 0,003$  y  $R^2_{MTZm} = 0,02$ ). Estos valores fueron mayores en los tratamientos con MTZm respecto a MTZ (Figura 10).

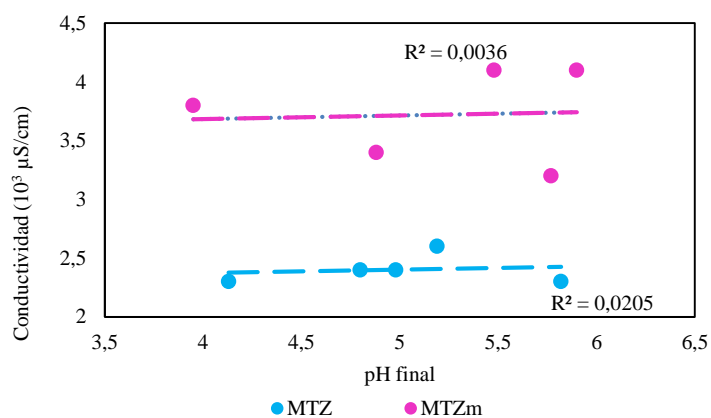


Figura 10: Relación entre la conductividad y el pH.

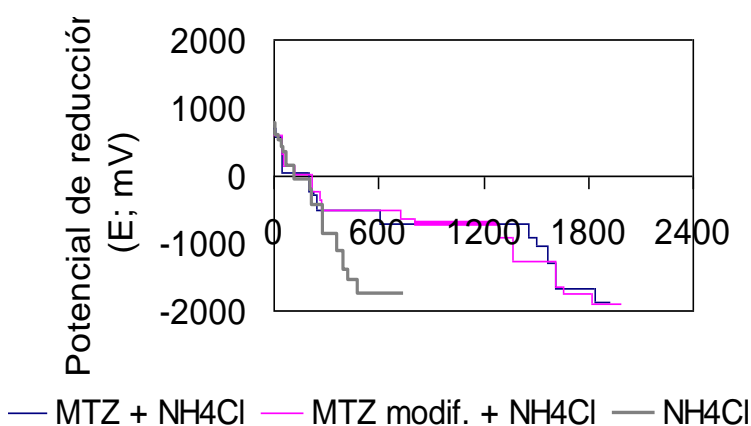
Esta mayor conductividad observada en los tratamientos con MTZm es previsible si recordamos que con el procedimiento empleado para su preparación se podría inducir cambios redox en el sistema (el FV es un sistema químicamente complejo) por la presencia de  $NH_4Cl$  (utilizado como catalizador en la reacción de reducción del grupo

NO<sub>2</sub>) como lo sugirió Pidello (2017) estudiando el comportamiento del MTZm en medio acuoso<sup>124</sup>.

### 2.2.3 Relación del pH con la intensidad redox

La medida de la intensidad redox (Eh) en cada sistema indica: (i) el potencial medido (E aparente o Eh) y pH presentó una relación inversa (como corresponde en función de la relación teórica de Nernst; Capítulo I, 1.2.1), la cual en esta situación está representada por una curva polinómica en el caso de MTZ ( $R^2= 0,72$ ) (Figura 11, E aparente o Eh) y lineal en el caso de MTZm ( $R^2= 0,95$ ) (Figura 12, E aparente o Eh); y (ii) cuando no se considera la influencia de los protones (Eh<sub>7</sub>)<sup>125</sup>, el potencial redox no varía en función del pH ( $R^2= 0.25$  y  $R^2= 0.0045$  para el MTZ y MTZm respectivamente) (Figura 11 y Figura 12). Por otra parte, los valores de Eh<sub>7</sub> fueron menores que los Eh medidos tanto para el tratamiento con MTZ como con MTZm.

<sup>124</sup> Pidello (2017) estudió el comportamiento en medio acuoso del MTZ (0,05 M) y MTZm (0,05 M) en presencia de ClNH<sub>4</sub> (0,09 M). La Figura muestra que en estas condiciones, el MTZm también presenta una señal menor que el MTZ y que este hecho coincidió con un aumento de compuestos electroactivos en bajos potenciales de reducción (< -1500 mV). Dado que en esos experimentos, los valores de conductividad no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos, el aumento que se observa en la Figura 10 estaría originado por cambios en la especiación redox y no en la composición iónica del sistema (Pidello A. Curvas acumulativas Concentración/Potencial. Estudio de la modificación redox del grupo activo del Metronidazol A. XVII Jornadas Divulgación Técnico- Científicas FCV, 2017).



<sup>125</sup> Eh<sub>7</sub>= Eh' - 0,059. (7 - pH) (Capítulo I. 1.2.1).

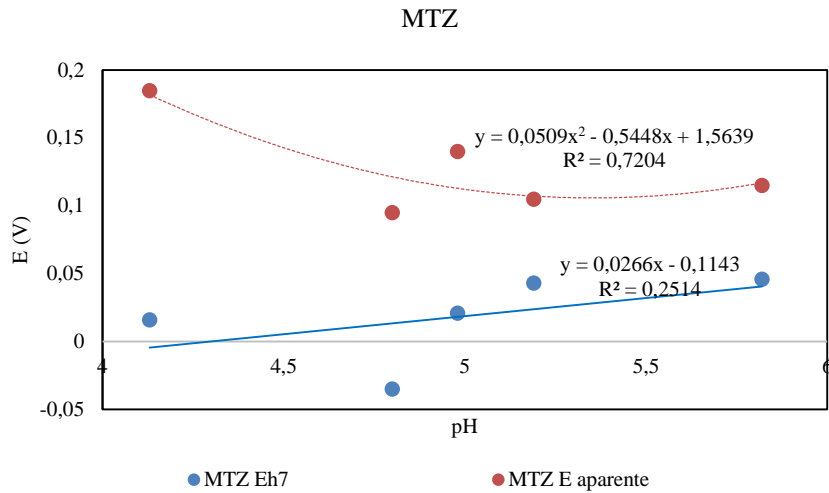


Figura 11: Relación entre la variación del pH y el potencial redox de los sistemas bacterianos suplementados con MTZ (1700 µg/ml).

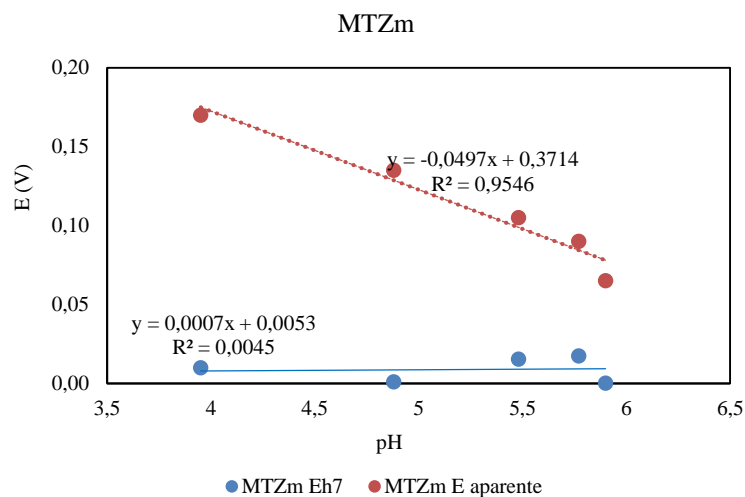


Figura 12: Relación entre la variación del pH y el potencial redox de los sistemas bacterianos suplementados con MTZm (1700 µg/ml).

#### 2.2.4 Relación del pH con la Capacidad redox

La determinación de la concentración de compuestos electroactivos en el rango de potenciales del MTZ ( $-890 \pm 50$  mV) en función del pH final, sugiere que en condiciones de pH más bajos la concentración de MTZ sería menor (Figura 13). El mismo aporte de MTZ o de MTZm (1700 µg/ml) no produjo el mismo efecto en los mayores valores de pH observados, donde el aporte de MTZ aparece asociado a concentraciones mayores de MTZ en el analito respecto al aporte de MTZm (Figura 13). Si consideramos los puntos

que corresponden al comportamiento de los tratamientos que tenían valores iniciales de pH iguales a 6 y 7 que aparecen diferentes entre el tratamiento con MTZ y MTZm, vemos que la diferencia desaparece cuando se utiliza el cociente **[MTZ] / [electroactivos totales]**. Este cociente representa la cantidad de MTZ o MTZm detectada sobre el total de compuestos electroactivos detectados en el analito. Si se observan los cocientes para estos valores de pH, vemos que si bien los valores de los mismos no difieren entre ellos, en el tratamiento con MTZ la concentración de MTZ y la concentración de compuestos electroactivos totales es mayor que en el tratamiento con MTZm (datos correspondientes a las Figuras 13 y 14).

La Figura 14 muestra que el cociente menor aparece en los valores menores de pH. Sin embargo, a diferencia de lo que muestra la Figura 13, ambos tratamientos presentaron el mismo comportamiento en todo el rango de pH observado (en el tratamiento con MTZm existió una mayor vinculación entre los fenómenos con un valor de  $R^2$  igual a 0,9) (Figura 14).

Considerando el comportamiento de la CCE totales en función de los potenciales corregidos a pH 7 ( $E_{h7}$ ), se observa que en el tratamiento suplementado con MTZ la CCE aumenta en valores de potenciales más positivos. En el tratamiento suplementado con MTZm este efecto no fue observado (Figura 15).

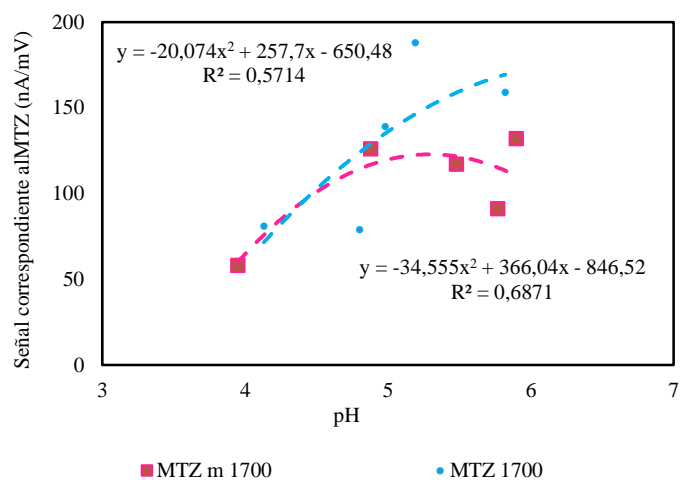


Figura 13: Determinación de la relación entre la concentración de compuestos electroactivos presentes dentro del rango de potenciales de reducción del MTZ ( $-890 \pm 50$  mV) y el pH. Los números 6, 7 y 8 corresponden a los tratamientos que tenían valores iniciales de pH igual a 6, 7 y 8.

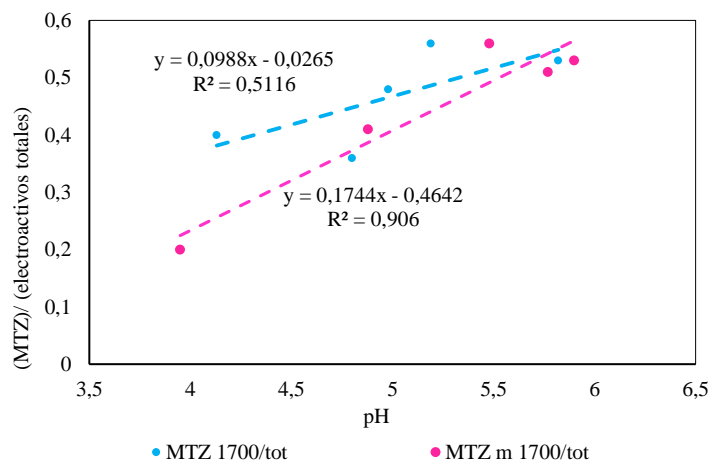


Figura 14: Valores del cociente  $[MTZ] / [electroactivos\ totales]$  en relación con el pH.

Cuando los valores obtenidos se ajustan a un valor de pH igual a 7 ( $Eh_7$ ), situación en la cual se elimina la eventual influencia de la concentración de  $H^+$ , la concentración total de compuestos electroactivos en el caso de suplementar con MTZ aumenta a mayores valores de Eh (ambientes más oxidantes) (Figura 15). En el caso de la suplementación con MTZm, los valores de concentración de los compuestos electroactivos se encuentran localizados dentro de un rango de potenciales bastante próximos y la relación positiva y lineal con el aumento del Eh no existe. Esta situación, entonces, es diferente a la que se observa al suplementar con MTZ (Figura 15). Este resultado indica, en coincidencia con observaciones precedentes, que la presencia de MTZ y MTZm pueden ser asociadas a escenarios y situaciones redox diferentes.

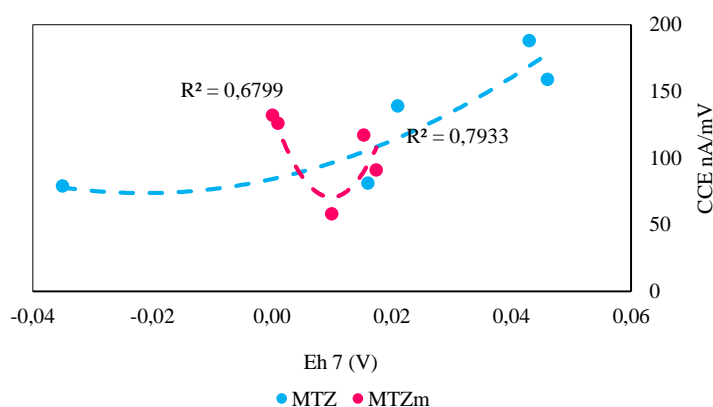


Figura 15: Relación entre la concentración total de compuestos electroactivos y el potencial redox a pH=7 ( $Eh_7$ ).

### 2.2.5 Número de bacterias

Luego de 3 h de incubación, la replicabilidad bacteriana (número de bacterias/ml) no fue significativamente diferente entre el tratamiento con MTZ y con MTZm (ANOVA) (Datos no presentados).

Luego de 18 h de incubación, el mayor número de bacterias dentro del tratamiento con MTZ se observó en el tratamiento a pH= 7 y dentro del tratamiento con MTZm a pH= 6. En el tratamiento con MTZm respecto a MTZ, el número de bacterias fue significativamente mayor en los valores de pH iguales a 4, 5 y 6 ( $p < 0,05$ ). En los valores de pH iguales a 7 y 8 no se observaron diferencias entre los tratamientos (Figura 16).

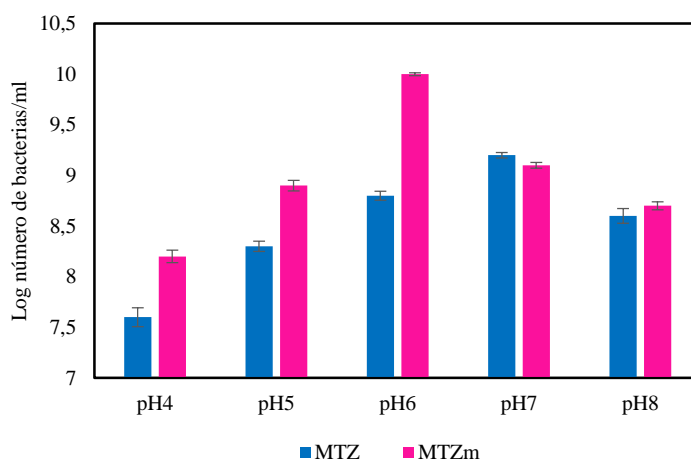


Figura 16: Diferencia en la capacidad de replicarse de *P. fluorescens* C7R12 en FVS suplementado con MTZ o MTZm a distintos valores de pH inicial. Las barras sobre las columnas indican el error estándar de las medias. A pH 4, 5 y 6 la replicabilidad en los tratamientos con MTZm fueron significativamente mayores que con MTZ (test ANOVA comparaciones múltiples de Sidak,  $p < 0,05$ )

La Figura 17-A, que muestra la concentración de MTZ detectada por VPD (señal en el rango de potenciales de  $-890 \pm 50$  mV) en relación con el número de bacterias, sugiere para el tratamiento con MTZ una marcada relación lineal en los tratamientos a pH= 4 hasta pH= 7. Dado que la concentración a pH= 8 se aparta claramente de este comportamiento (ver Figura 13) el valor de  $R^2$  no refleja esa relación lineal (sin considerar este valor,  $R^2$  resulta igual a 0,98).

La Figura 17-B muestra que en el tratamiento con MTZm la situación presenta mayor complejidad. Lo primero que debe destacarse es que la relación entre la concentración de MTZ detectada (en todo el rango de pH) y el número de bacterias

presenta una relación lineal menos clara que en el caso del MTZ. Considerando que la Figura 15 indica que los valores de concentración de los compuestos electroactivos en el tratamiento MTZm, se encuentran localizados dentro de un rango de potenciales ( $E_{h7} \pm 0,01V$ ) bastante próximos y la Figura 17-B muestra que la pendiente es menor, los resultados observados sugieren que con el agregado de MTZm se diluye el efecto que impone el antibiótico generando diversos escenarios redox. En esta situación el número de bacterias no se puede vincular claramente con el *status* redox\_ (marcado por la presencia de MTZ) y la relación entre ambas variables se vuelve no clara.

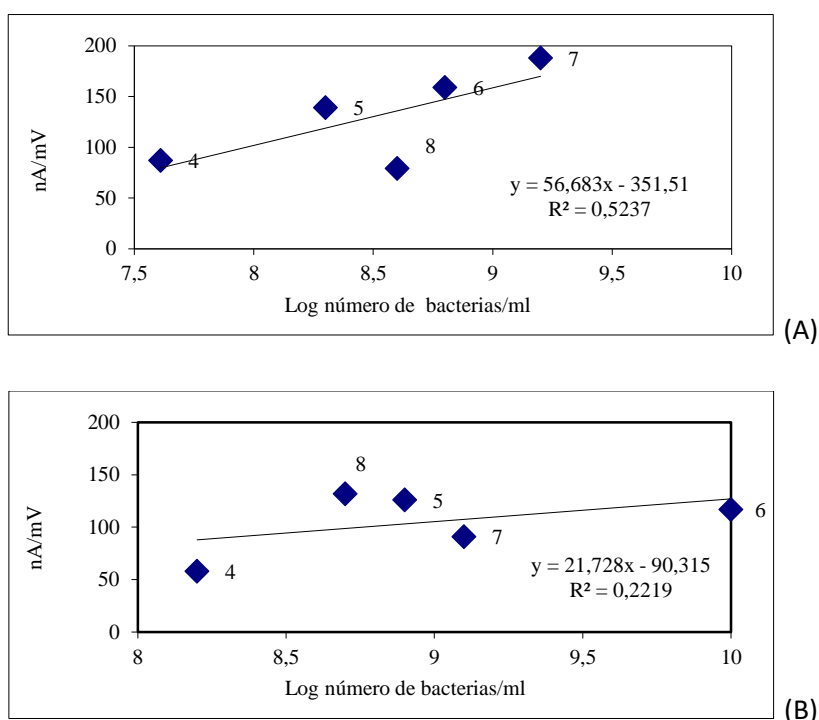


Figura 17: Comportamiento del número bacterias y la cantidad de MTZ detectada por VPD ( $-890 \pm 50$  mV) al suplementar el FVS con MTZ (A) o con MTZm (B).

En el párrafo siguiente, con el objetivo de contribuir a explicar las diferencias halladas en la capacidad de replicación bacteriana en valores de pH entre 4 y 6, se analizó (i) la relación Eh-pH dentro de este rango; y (ii) la replicabilidad bacteriana observada en valores de pH entre 4 y 6 y su relación con el  $E_{h7}$ .

En relación con el primer ítem los resultados muestran que la relación entre el potencial medido (E aparente o Eh) y pH tiene pendiente negativa, vinculándose de manera lineal y con mayor ajuste que el observado en todo el rango de pH estudiado (Figuras 11 y 12) tanto en el caso del aporte de MTZ ( $R^2 = 0,99$ ) como de MTZm ( $R^2 =$

0.97). Debe destacarse el hecho de que las pendientes de las rectas de regresión son idénticas en los dos casos (Figura 18). Por otra parte, cuando no se considera la influencia de los protones ( $Eh_7$ ), a diferencia de lo que muestra la Figura 11, la pendiente de la curva de regresión disminuye aunque el ajuste de la curva con el aporte de MTZ aparece superior ( $R^2=0,87$ ).

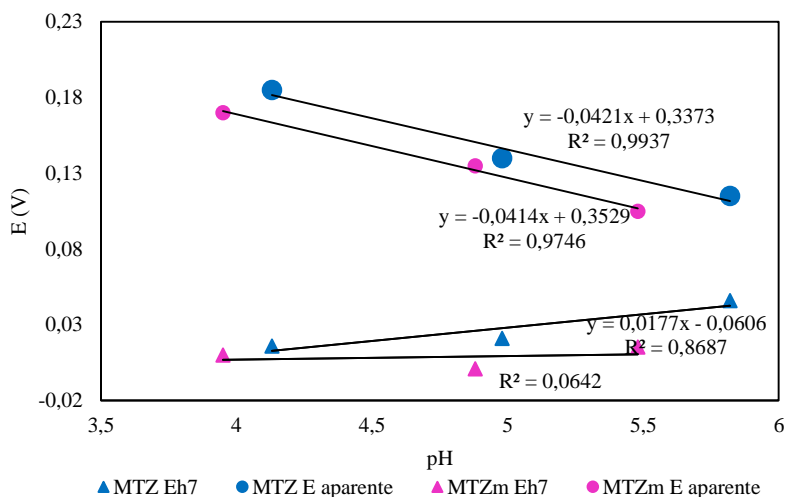


Figura 18: Relación entre la variación del pH y el potencial redox de los sistemas bacterianos suplementados con MTZ y MTZm (1700  $\mu\text{g/ml}$ ) que presentaron diferencias entre  $\text{pH}=4$  y  $\text{pH}=6$ , luego de 3 h de incubación.

En relación al segundo ítem, la Figura 19 sugiere que la menor replicabilidad bacteriana observada en los tratamientos con MTZ a  $\text{pH} 4$ ,  $\text{pH} 5$  y  $\text{pH} 6$  (Figura 16) podría estar vinculada al equilibrio redox (transferencia de electrones) y no al equilibrio ácido-base (transferencia de protones) de esos sistemas. El comportamiento es diferente para el tratamiento con MTZm, donde la relación entre el número de bacterias no aparece significativamente asociado con el valor de  $Eh_7$  (los valores de  $R^2$  para la relación entre el número de bacterias y el valor de  $Eh_7$  fueron de 0,80 y 0,23 respectivamente).

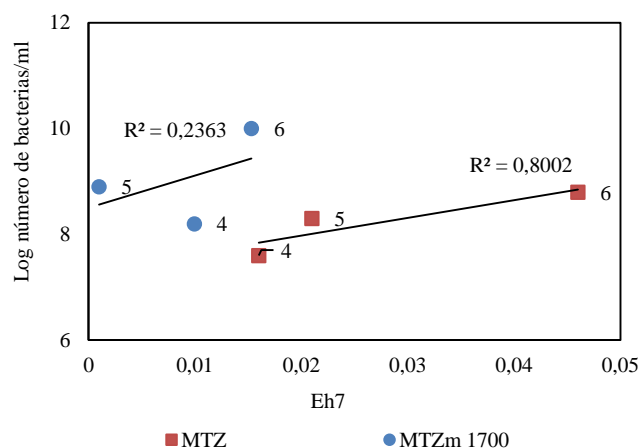
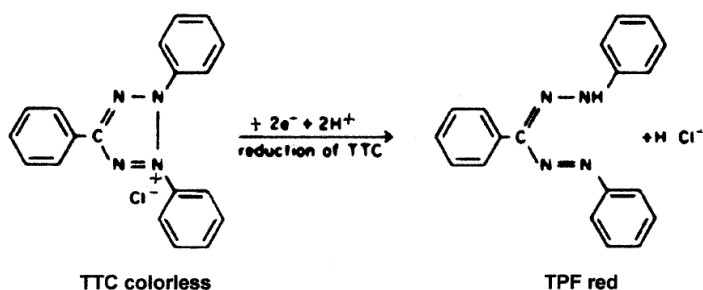


Figura 19: Relación entre el número de bacterias después de 3 h de tratamiento con MTZ y el potencial de reducción a pH 7. Los números en itálica indican el correspondiente valor de pH inicial impuesto al sistema.

### 2.3 Relación entre la producción de trifeníl formazán a partir de la reducción del cloruro de trifeníl tetrazolio<sup>126</sup> y el pH<sup>127</sup>

En esta parte del trabajo se determinó la influencia en las variaciones de pH sobre el componente microbiano a través de la cuantificación de su actividad metabólica, específicamente de la actividad de la enzima deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la oxidación de diferentes sustratos mediante la deshidrogenación de los mismos. La técnica de reducción del cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC) y su cuantificación

<sup>126</sup> La Figura muestra la estructura y la reacción de reducción del cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC) en presencia de protones. El trifeníl formazán (TPF) producido por el metabolismo bacteriano puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una determinada longitud de onda visible (alrededor de 500 nm) (Referencia<sup>15</sup>)



<sup>127</sup> Perini M, Zerbato ME, Coletti Zabala T, Perotti EB, Pidello A (2015) Relación entre las variaciones de pH y la reducción del trifeníl tetrazolio cloruro (TTC) en fluido vaginal sintético inoculado con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314. XXXV Reunión Anual SBR.

espectrofotométrica permite estimar la actividad enzimática e indirectamente el metabolismo bacteriano.

Como describimos en el Capítulo precedente (III, 3), el fluido vaginal constituye la fase dispersante que aloja una gran diversidad de compuestos potencialmente redox activos además de proteínas involucradas frente al estrés oxidativo, sugiriendo que en el ambiente vaginal la transferencia de  $H^+$  y  $e^-$  juegan un papel importante en la bioquímica de este sistema.

El objetivo general de esta parte del trabajo de Tesis fue estudiar el comportamiento del sistema conformado por fluido vaginal y microorganismos frente a variaciones en el estado ácido-base, que desde un punto de vista teórico es una variable íntimamente ligada al estado redox (ver Capítulo I.1.2).

Para cumplir con este objetivo, estudiamos la relación entre la producción de trifeníl formazán (TPF) a partir de la reducción del TTC y el pH en un sistema microbiológico que puede ser definido como modelo de sistema vaginal normal, compuesto por FVS y *L. acidophilus* ATCC 314. En el estudio se utilizó VC y espectrofotometría.

Los objetivos parciales fueron: (i) determinar si las variaciones de pH del FVS por el agregado de ácido láctico (componente normal del fluido vaginal) modifican la capacidad de reducción del TTC en presencia y en ausencia de *L. acidophilus* mediante espectrofotometría; (ii) determinar modificaciones en relación con la actividad microbiana en FVS a diferentes valores de pH a través de la señal voltamétrica del TTC , y (iii) determinar si el tiempo de incubación produce modificaciones en los valores de pH y en la reducción del TTC en el FVS solo e inoculado con *L. acidophilus*.

Para cumplir el primer objetivo se prepararon suspensiones de FVS, ácido láctico (0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 y 1 M), *L. acidophilus* y TTC. También se prepararon soluciones controles reemplazando las bacterias por igual cantidad de agua destilada estéril. Todas las muestras se incubaron 1 hora en baño maría a 37°C en oscuridad (n= 3 por tratamiento). Posteriormente se realizó una extracción con acetona y se midió absorbancia a 485 nm (Hitachi U 1500).

En ausencia de bacterias no se encontró relación entre reducción del TTC y diferentes valores de pH ( $R^2= 0,1$ , datos no presentados). Este hecho sugiere que *L. acidophilus* afecta los procesos de transferencia de  $H^+$  y  $e^-$ , los cuales afectaron la reducción del TTC. La situación podría explicarse si se considera la  $K_{eq}$  de la reacción

tal como está planteada en la referencia<sup>126</sup>. Una disminución de H<sup>+</sup> debería desplazar el equilibrio hacia la izquierda<sup>1</sup>, es decir hacia el aumento de TTC.

Los resultados muestran que en los tratamientos inoculados la reducción del TTC resulta favorecida a mayores valores de pH ( $R^2= 0,65$ ) (valores de pH estudiados: 4,5; 5,1; 5,45; 6,9; 7,4) (Figura 20).

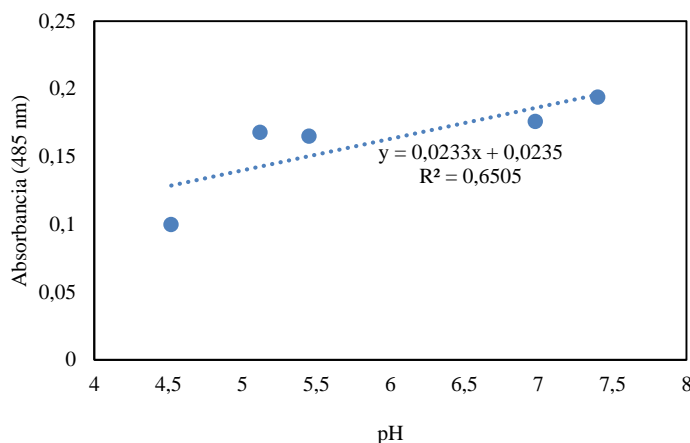


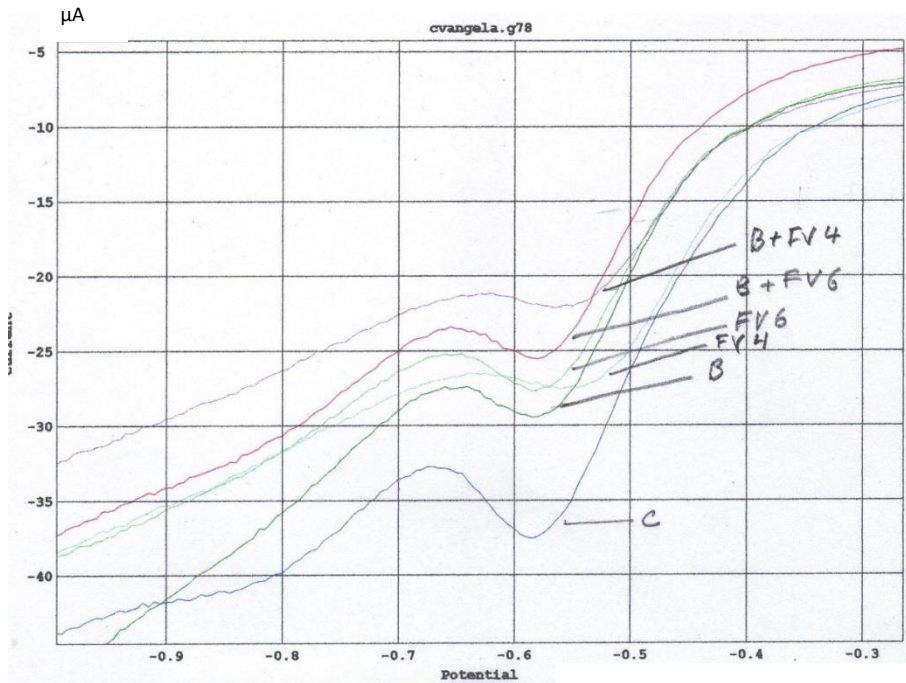
Figura 20: Relación entre la reducción del TTC y los diferentes valores de pH estudiados en presencia de *L. acidophilus* ATCC 314.

Para cumplir con el segundo y tercer objetivo se prepararon los siguientes tratamientos. La suspensión de *L. acidophilus* (1 ml) fue inoculada en solución acuosa (B) y en FVS a pH 6 y pH 4 (B+ FV6 y B+FV4). Los tratamientos controles fueron FVS llevado a pH 6 y pH 4 (FV6 y FV4). Todos los tratamientos recibieron 1 ml de TTC (0,1% p/v) y fueron incubados 72 h en oscuridad a 37 °C. Al finalizar la incubación, se realizaron barridos en VC de todas las muestras.

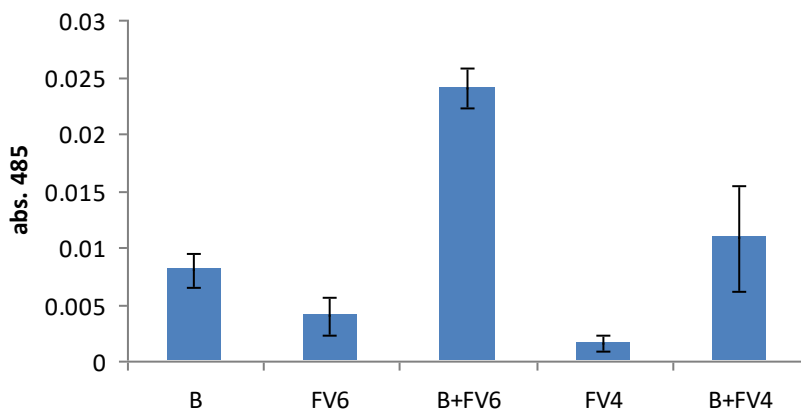
### 2.3.1 Comportamiento voltamétrico (VC)

El comportamiento de las soluciones después de 120 min de incubación, muestra claramente que la presencia *L. acidophilus* incubado en FVS (en los dos valores de pH estudiados) favorece la reducción del TTC. Mediante VC se observó que la altura de los picos de intensidad de corriente fueron menores, lo cual indica que existió una menor cantidad de TTC disponible para ser reducido respecto a bacterias en solución acuosa y al FVS sin inóculo (Figura 21 A). Estos resultados se confirman con las medidas espectrofotométricas realizadas sobre alícuotas de las mismas muestras (Figura 21 B), donde los tratamientos con FVS inoculados con bacterias presentaron la mayor absorbancia, o sea mayor cantidad de TTC reducido, sugiriendo nuevamente que la cepa

utilizada en el sistema estudiado tuvo un rol activo en las reacciones de transferencias de  $H^+$  y de  $e^-$ .



(A)



(B)

Figura 21: Comportamiento voltamétrico y espectrofotométrico de las soluciones correspondientes a los distintos tratamientos luego de 120 min de incubación. (A) Ejemplo de voltanogramas experimentales (VC) que muestran parte de las curvas catódicas donde se observa la señal correspondiente al TTC ( $-570 \pm 40$  mV). Rango de barrido:  $+700 / -1600$  mV. Número de ciclos: 1. Duración del escalón: 1s. Amplitud del escalón: 5 mV; (B) Valores de absorbancia de alíquotas de las soluciones correspondientes a las mismas muestras utilizadas para realizar los barridos en VC. (C) Control; corresponde a una solución que contiene 1 ml TTC (5mg/ml) en 20 ml de una mezcla agua /acetona (1/1); (B) *L. acidophilus* ATCC314; (FV4 y FV6) FVS a pH 4 y pH 6 respectivamente; (B + FV 4 y B + FV6) *L. acidophilus* ATCC314 en FVS a pH 4 y pH 6 respectivamente).

### 2.3.2 Comportamiento del pH y de la absorbancia

Al considerar el comportamiento del pH durante el periodo de 24 h, en general se observó que los valores dentro de cada tratamiento permanecen similares y cercanos a los valores iniciales a lo largo del período considerado. Solo a las 24 horas y en el tratamiento B aparece un valor de pH muy diferente al resto.

En relación con la absorbancia, los valores sugieren que durante el periodo estudiado se produjeron cambios importantes dentro de cada tratamiento sin que pueda descartarse la intervención de fenómenos estrictamente físico-químicos en el ambiente interno y externo de las células microbianas. Por lo expuesto los resultados obtenidos indican la necesidad de profundizar aspectos que exceden los objetivos del presente trabajo de Tesis.

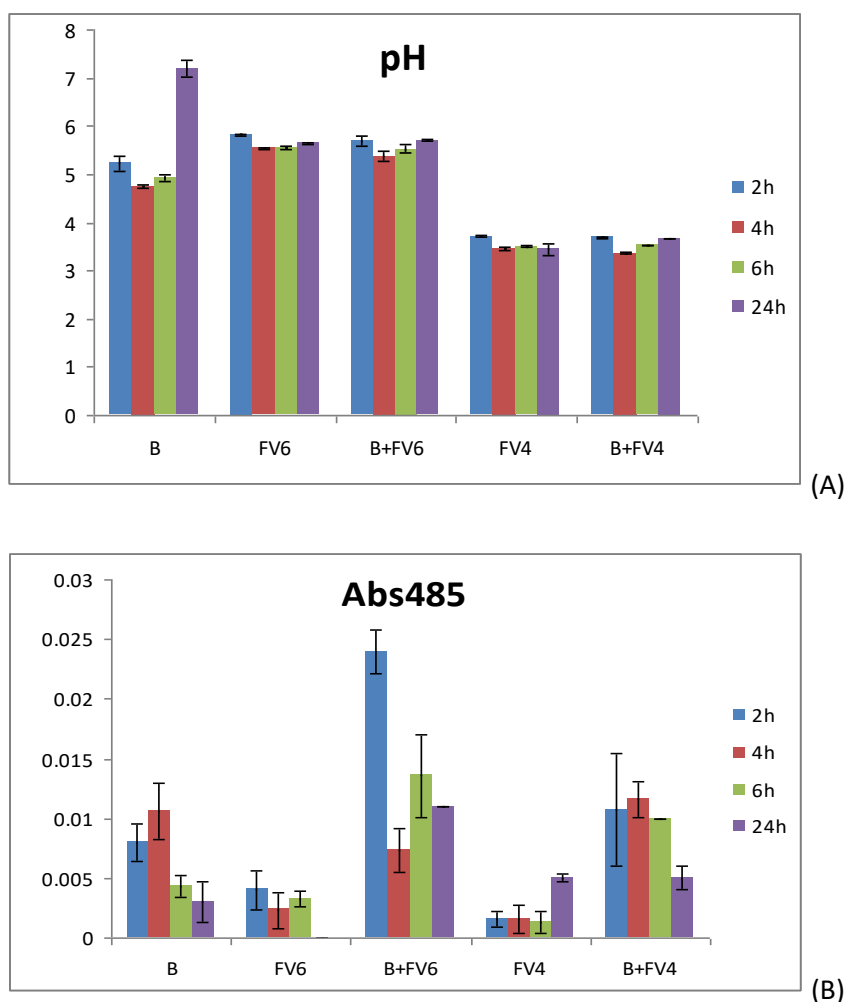


Figura 22: Evolución del pH (A) y de la absorbancia (485 nm) (B). Las columnas representan las medias y las barras sobre las columnas representan los errores estándar de las medias.

### 3. Efecto de la modificación del metronidazol sobre la replicabilidad de *Staphylococcus* sp. Rol del electrolito utilizado para modificar el metronidazol

El objetivo de esta parte del trabajo fue comparar la replicabilidad de *Staphylococcus* sp. en sistemas suplementados con MTZ y con MTZm jerarquizando la posible incidencia del  $\text{CINH}_4$ , electrolito utilizado en la producción de este último.

Considerando que MTZm en razón del procedimiento empleado para producirlo, eventualmente puede contener trazas de otros compuestos, fundamentalmente  $\text{CINH}_4$ <sup>128</sup>, se realizaron experimentos para determinar si este electrolito podía modificar por sí mismo el número de bacterias respecto del control sin suplementar. En todos los experimentos la concentración bacteriana inicial fue  $10^7$  bacterias/ml. En estos experimentos se analizó el efecto de MTZ y de MTZm sobre la replicabilidad de *Staphylococcus* sp. Los tratamientos realizados fueron:

- C1= bacterias y caldo de cultivo MRS (control)
- C2= bacterias, MTZ,  $\text{CINH}_4$  y caldo de cultivo MRS (control)
- C3= bacterias,  $\text{CINH}_4$  y caldo de cultivo MRS (control)
- TA= bacterias, MTZ y caldo de cultivo MRS (tratamiento)
- TB= bacterias, MTZm y caldo de cultivo MRS (tratamiento)

#### 3.1 Experimentos con 1700 $\mu\text{g}$ MTZ/ml

En un primer experimento se enfrentaron los tratamientos C1, C2, TA y TB. Después de 24 h de incubación el número de bacterias fue significativamente mayor en el C1 que en los tratamientos TA (MTZ) y TB (MTZm) (Figura 23). Entre C1 y C2 (MTZ +  $\text{CINH}_4$ ) no hubo diferencias significativas. Para determinar el rol de la presencia de  $\text{CINH}_4$  en estos resultados se preparó el C3 ( $\text{CINH}_4$ ). Los resultados no mostraron diferencias significativas entre C1 y C3 (Figura 24) lo que confirma que el  $\text{CINH}_4$  en las

---

<sup>128</sup> Como se dijo anteriormente (Ref. <sup>116</sup>) durante el trabajo inicial para preparar el MTZm se utilizó una resina de canje iónico (Dowex©) para eliminar eventuales residuos de  $\text{CINH}_4$  en la solución final. La comparación de las medidas de conductividad entre el MTZm luego del pasaje por la resina y el MTZ sin pasar no fue significativamente diferente, por lo cual esta etapa fue suprimida. Los valores de conductividad de las soluciones utilizadas en nuestro trabajo fueron de  $7,7 \cdot 10^3 \mu\text{S/cm}$  y  $8,2 \cdot 10^3 \mu\text{S/cm}$  para el MTZ y para el MTZm respectivamente.

condiciones de este estudio no afectaba la replicabilidad de la cepa de *Staphylococcus* utilizada.

En relación con el hecho de que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos C1 y C2, cabe mencionar que los resultados obtenidos en el Laboratorio estudiando el comportamiento voltamétrico del MTZ y MTZm en presencia de  $\text{ClNH}_4^{124}$  indicaron que la suplementación con  $\text{ClNH}_4$  aumenta la presencia de compuestos electroactivos en bajos potenciales de reducción ( $<-1500\text{mV}$ ). La presencia de estos compuestos puede haber generado una reducción del grupo activo del MTZ<sup>124</sup> y por esta vía disminuir significativamente la concentración electroactivamente efectiva de MTZ, llevando al sistema a una situación parecida a la del tratamiento C1. Esta interpretación explicaría el hecho de que con la dosis empleada de MTZ en estos experimentos ( $1700\ \mu\text{g/ml}$  MTZ) no se observaran diferencias significativas entre C1 y C2.

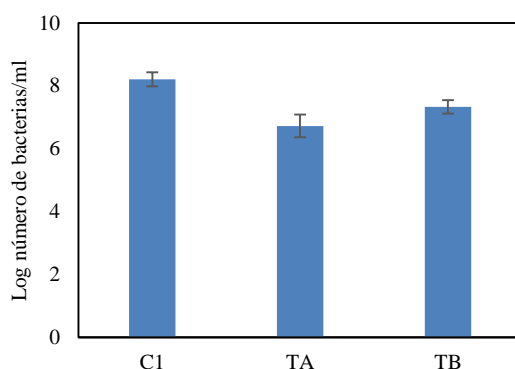


Figura 23: Efecto  $1700\ \mu\text{g/ml}$ . La figura muestra el número de bacterias en diferentes tratamientos el cual en C1 fue significativamente mayor que en TA y TB ( $p < 0,05$ , Anova y test de Tuckey).

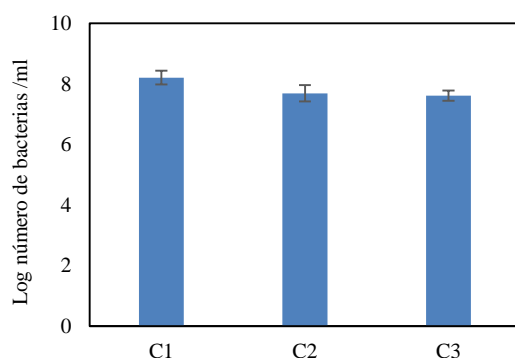


Figura 24: Efecto  $1700\ \mu\text{g/ml}$  MTZ. La Figura muestra el número de bacterias/ml entre tratamientos. La diferencia no fue significativa entre C1, C2 o C3 (Test Anova,  $p > 0,05$ ).

### 3.2 Experimentos con 5000 µg MTZ/ml

Como en el experimento precedente después de 24 h de incubación el número de bacterias fue mayor en el C1 respecto a TA ( $p= 0,006$ ). El tratamiento TB presentó mayor número de bacterias que el tratamiento TA ( $p= 0,03$ ) y entre los tratamientos C1 y TB no hubo diferencias (Figura 25).

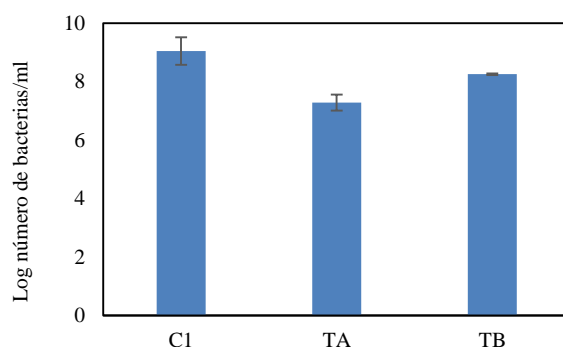


Figura 25: Efecto 5000 µg/ml MTZ. La Figura muestra el número de bacterias/ml entre tratamientos, el cual fue significativamente mayor en C1 que en TA ( $p<0,05$ ). No hubo diferencia entre C1 y TB. TB permitió mayor replicabilidad que TA ( $p<0,05$  Anova y test de Tuckey).

Los resultados indican claramente que la presencia de MTZ también disminuye la replicabilidad a 5000 µg/ml (comparar las Figuras 23 y 25). En relación con el comportamiento similar de los tratamientos C1 y TB (MTZm) (Figura 25) proponemos la interpretación siguiente. Como dijimos precedentemente, a partir de los barridos voltamétricos se determinó que en el MTZm la cantidad activa del antibiótico está disminuida y la concentración de compuestos con bajos potenciales es mayor que en MTZ (142 %). Entendemos que las consideraciones mencionadas al analizar la dosis de 1700 µg/ml (Item anterior), son igualmente válidas para estos experimentos realizados con una concentración de MTZ mayor. Por otra parte el MTZm en razón del procedimiento empleado para producirlo, eventualmente puede contener trazas de otros compuestos, fundamentalmente  $\text{CINH}_4$ <sup>124</sup>.

En estas condiciones, con un aporte de 5000 µg/ml de MTZ el comportamiento similar de los tratamientos C1 y TB (MTZm) puede explicarse por un efecto indirecto del  $\text{CINH}_4$  residual asociado al MTZm, el cual induce un aumento de los compuestos electroactivos en bajos potenciales. Estos compuestos, que estarían aumentados al utilizar una solución con mayor concentración de MTZm (5000 µg/ml en lugar de 1700 µg/ml), disminuirían la concentración de la especie activa en la solución de este tratamiento (TB).

La explicación electroquímica del efecto de un incremento de compuestos con bajos potenciales puede pensarse a partir del análisis en términos de la ecuación de Nernst (Capítulo I). Cuando en un sistema redox se incrementa significativamente la cantidad de compuestos electroactivos con potenciales de reducción alejados de su potencial aparente, el potencial del sistema se modifica acercándose a los potenciales de los compuestos que ingresaron al sistema. Este cambio genera una modificación en la relación entre la concentración de compuestos reducidos y oxidados del sistema ( $[forma\ reducida] / [forma\ oxidada]$ ). Este hecho se visualiza claramente en la Figura 26, que representa los equilibrios definidos por la ecuación de Nernst <sup>2</sup>.

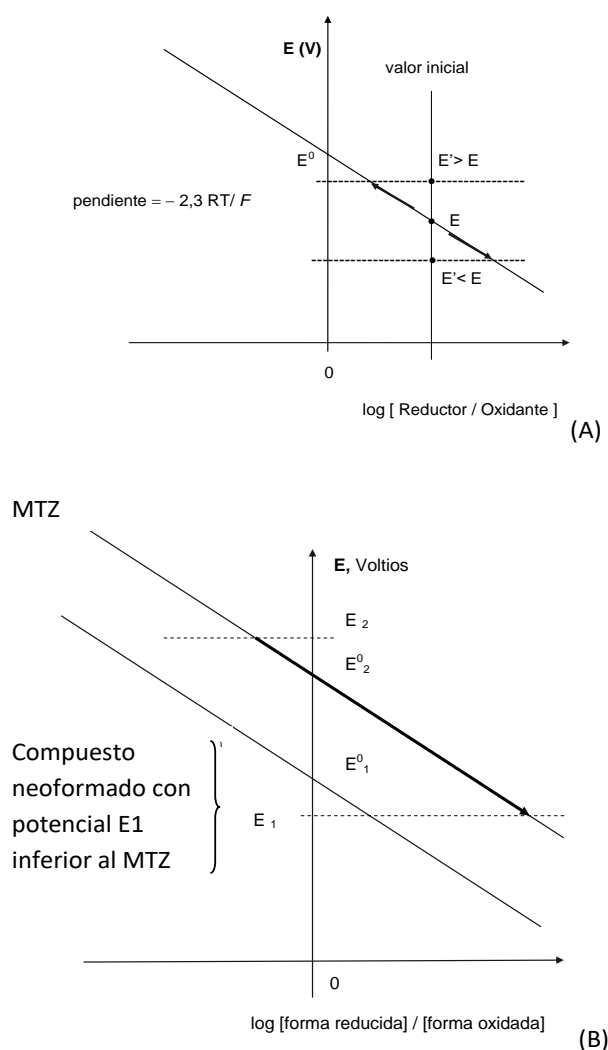


Figura 26. Equilibrio redox en función del potencial impuesto al sistema. La Figura representa la ecuación lineal definida por la relación de Nernst (Capítulo I) (A); y el equilibrio en un sistema suplementado con efectores redox con bajos potenciales ( $E_1$ ) (B). En este caso el potencial del sistema MTZ ( $E_2$ ), descende hasta alcanzar el potencial  $E_1$  lo que modifica la relación  $[forma\ reducida] / [forma\ oxidada]$ . En nuestro caso este fenómeno conduciría a un aumento del MTZ reducido (forma inactiva de antibiótico) a expensas del MTZ (Adaptado de Pidello, 2014).

En nuestro caso esta situación se amplifica al aumentar la cantidad de MTZm utilizada, lo cual explicaría el hecho que con 1700  $\mu\text{g/ml}$  los tratamientos C1 y TB tuvieron comportamientos diferentes mientras que con 5000  $\mu\text{g/ml}$  (la cantidad generada de compuestos con potenciales negativos es mayor) no existieron diferencias significativas.

Los resultados también muestran que con una concentración mayor de antibiótico, C2 presenta una densidad bacteriana significativamente menor que C1 y C3 (Figura 27). Esto demostraría el efecto inhibitor de la replicabilidad de MTZ y confirmaría que la presencia de  $\text{ClNH}_4$  no es en sí misma modificadora de la replicabilidad bacteriana. Confirmando estas hipótesis se observa que C2 no difiere significativamente de TA, (ambos tienen la misma cantidad de MTZ sin modificar) (Figura 28).

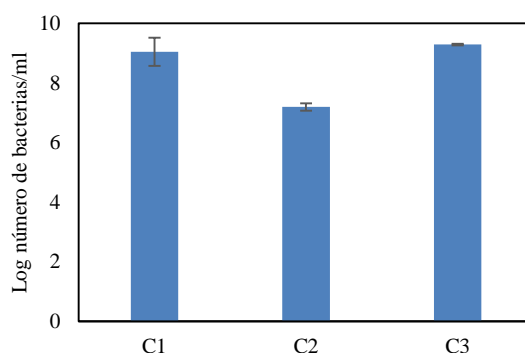


Figura 27: Efecto 5000  $\mu\text{g/ml}$  MTZ. La Figura muestra el número de bacterias/ml entre tratamientos. Los valores fueron similares entre los controles C1 y C3 y ambos valores fueron mayores que en C2 ( $p < 0,05$  Anova y test de Tuckey).

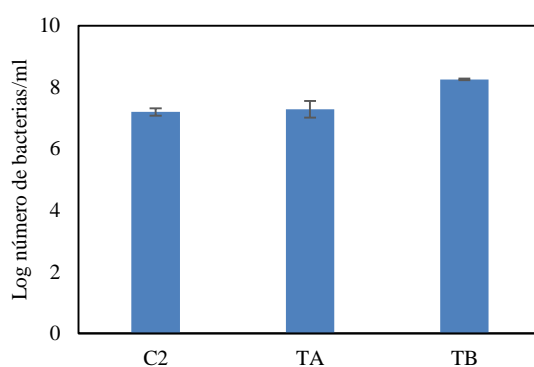


Figura 28: La Figura muestra el número de bacterias/ml entre tratamientos. No existieron diferencias significativas entre C2 y TA, pero sí entre C2 y TB ( $p < 0,05$  Anova y test de Tuckey)

#### **4. Adherencia y motilidad bacteriana en presencia de metronidazol y metronidazol modificado**

En esta parte del trabajo se pretendió responder a la siguiente pregunta: ¿La presencia de compuestos electroactivos modifica la expresión de los fenómenos bióticos en el fluido vaginal? Dentro de estos fenómenos jerarquizamos la virulencia y como mecanismo básico de la virulencia, la capacidad de adherencia a células del huésped, en nuestro caso las células epiteliales vaginales caninas y ovinas.

##### 4.1 Experimentos realizados con células vaginales caninas

Para cumplir con este objetivo se estudió del comportamiento de *L. acidophilus* ATTC 314 frente a células aisladas del epitelio vaginal canino cuando las condiciones del medio, a nivel de *status* redox, son modificadas mediante el agregado de hidroquinona (H<sub>2</sub>Q) y/o MTZ (25 µg/ml o 0,14 mM).

Seguidamente se detallan los procedimientos empleados en los experimentos realizados.

El medio de cultivo utilizado para multiplicar las bacterias fue el Medio LAPT<sup>129</sup>. El medio utilizado para mantener las células hasta su uso fue el Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle. Este es un medio pobre en nutrientes, posee la base de una solución salina tamponada e incluye algunos aminoácidos y algunas vitaminas.

Las células epiteliales vaginales (CEV) se obtuvieron de la cavidad vaginal de perras sanas (n= 11) a través de un hisopo estéril. Las muestras se colocaron en tubos con 10 ml de MEM estéril. Se realizó una agitación de 2 min con agitador Vortex, se retiró el hisopo y las CEV se mantuvieron refrigeradas hasta su uso. Previo a los ensayos, las células del medio MEM se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en solución fisiológica estéril (SFE) y se realizaron 2 lavados (1000 rpm. 10 min.) para eliminar bacterias nativas. Finalmente las células se re suspendieron en 3 ml de FVS.

Los ensayos de adherencia se realizaron luego de multiplicar las bacterias mediante el protocolo descrito anteriormente<sup>115</sup>

---

<sup>129</sup> Composición del medio LAPT: 1 % de extracto de levadura; 1% de glucosa; 2% de proteasa peptona; 0,1% de Tween 80 ®. El pH se ajustó a 6,5.

Para realizar la incubación de células vaginales con *Lactobacillus*, se enfrentaron 0,5 ml de la suspensión bacteriana con 0,5 ml de la suspensión de CEV. La mezcla se incubó en estufa 1 hora a 37 °C. Luego del tiempo de incubación los tratamientos se centrifugaron a 600 rpm, se lavaron según lo propuesto por Prats *et al.*<sup>130</sup> y se resuspendieron en SFE. Se realizaron 3 tratamientos y un control:

- 0,5 ml de suspensión bacteriana + 0,5 ml de suspensión de células (Control)
- 0,5 ml de suspensión bacteriana + 0,5 ml de suspensión de células + 0,125 ml de MTZ 0,14 mM
- 0,5 ml de suspensión bacteriana + 0,5 ml de suspensión de células + 0,125 ml de H<sub>2</sub>Q 0,01M.
- 0,5 ml de suspensión bacteriana + 0,5 ml de suspensión de células + 0,125 ml de MTZ 0,14mM + 0,125 ml de H<sub>2</sub>Q 0,01M

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de la suspensión resultante para realizar extendidos en portaobjetos, teñirlos con Tinción 15 (Biopur®) y contar células y bacterias con microscopio óptico. En cada experimento y para cada uno de los tratamientos el total de células analizadas fue de 50 células por portaobjeto.

Los resultados obtenidos correspondientes a ensayos de adherencia se analizaron según la presencia o la ausencia de bacterias adheridas a la superficie de las células epiteliales vaginales caninas, luego del período previsto de incubación en los diferentes tratamientos. Se utilizó la técnica estadística Chi cuadrado para el análisis de los datos,  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativa.

Los resultados muestran que la adhesión de *L acidophilus* ATCC 314 a CEV caninas en presencia de H<sub>2</sub>Q fue significativamente menor que los demás tratamientos (incluido el control) los cuales no difirieron significativamente entre ellos (Figura 29).

---

<sup>130</sup> Prats A, Boucourt R, Rodríguez S (2005) Metodología para la determinación de la adherencia in vitro de lactobacilos a las células intestinales de cerdos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 39 (2), 205-212.

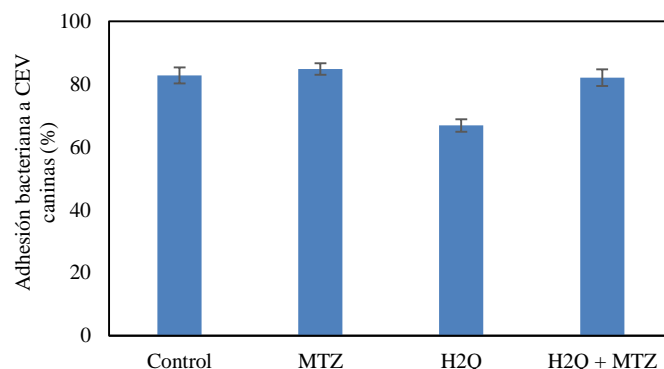


Figura 29: Representación del porcentaje de CEV caninas con bacterias adheridas correspondiente a cada tratamiento ( $p < 0,05$ ) (Test Chi cuadrado<sup>131</sup>). Las barras sobre las columnas representan los errores estándar.

#### 4.2 Experimentos realizados con células vaginales ovinas<sup>132</sup>

Se utilizó el mismo protocolo descrito para el trabajo con CEV caninas. Los resultados obtenidos correspondientes a ensayos de adherencia se analizaron según la presencia o la ausencia de bacterias adheridas a la superficie de las células epiteliales vaginales (CEV) ovinas, luego del período previsto de incubación en los diferentes tratamientos. Se utilizó la técnica estadística Chi cuadrado para el análisis de los datos,  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativa.

En esta parte del trabajo se observó que la incorporación de MTZ conjuntamente con H<sub>2</sub>Q disminuye la adherencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 a CEV ovinas respecto al Control, al tratamiento con MTZ y al tratamiento con H<sub>2</sub>Q (Figura 30). Dado que entre Control, MTZ e H<sub>2</sub>Q no hubo diferencias estadísticas, profundizamos el estudio voltamétrico de los sistemas que fueron suplementados con H<sub>2</sub>Q y con H<sub>2</sub>Q + MTZ.

<sup>131</sup> La tabla siguiente muestra los resultados de la incubación de células epiteliales caninas con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314.

	Control	H2Q	MTZ	H2Q+MTZ
Con bacterias	666	707	738	774
Sin bacterias	138	350	132	169
Total	804	1057	870	943
% de adherencia	82,8	66,9	84,8	82,1

<sup>132</sup> Coletti Zabala T, Zerbato ME, Perotti EBR, Smacchia AM, Ombrella A, Pidello A (2016) Effect of metronidazole supplemented with hydroquinone on the adhesion of *Lactobacillus acidophilus* in ovine vaginal cells. *Rev Argent Microbiol.* 48 (4) 313–319 (En el ANEXO 6 se incluye el trabajo completo).

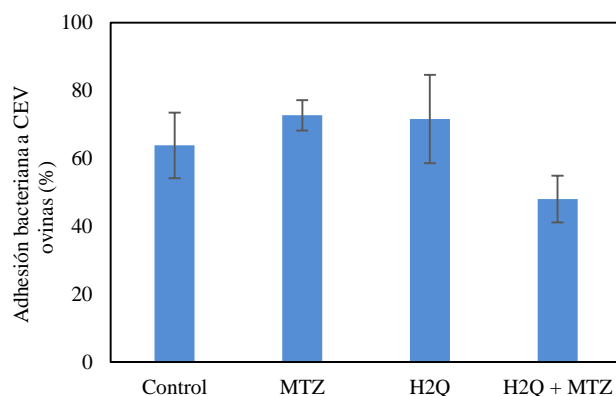


Figura 30: Representación del porcentaje de CEV ovinas con bacterias adheridas correspondiente a cada tratamiento ( $p < 0,05$ ) (Test Chi cuadrado). Las barras sobre las columnas representan los errores estándar de las medias.

Los barridos de VPD indican que estos sistemas presentaron concentraciones de compuestos electroactivos (nA / mV) de  $158,2 \pm 4,7$  y  $166,7 \pm 11,2$  respectivamente, valores que no difieren significativamente entre ellos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, analizados por rangos de potenciales de reducción, se observa que los tratamientos presentaron diferencias significativas entre ellos en varios valores de potenciales ( $p < 0,05$ ). Mientras los sistemas suplementados con H<sub>2</sub>Q sola presentaron concentraciones mayores de compuestos electroactivos en los rangos  $-0,2 / -0,4$  V y  $-0,6 / -0,8$  V, los sistemas suplementados con H<sub>2</sub>Q + MTZ presentaron concentraciones mayores en los rangos  $0,4 / 0,2$  V y  $-1,0 / -1,2$  V (Figura 31). Cuando se realizó el cálculo del *status* oxidante incluyendo solamente estos rangos de potenciales que presentaron diferencias significativas, se obtuvieron los valores de  $-40,2 \pm 1,5$  y  $-44,3 \pm 1,1$  para los tratamientos suplementados con H<sub>2</sub>Q o con H<sub>2</sub>Q + MTZ respectivamente, que presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ) (Figura 31, Figura insertada).

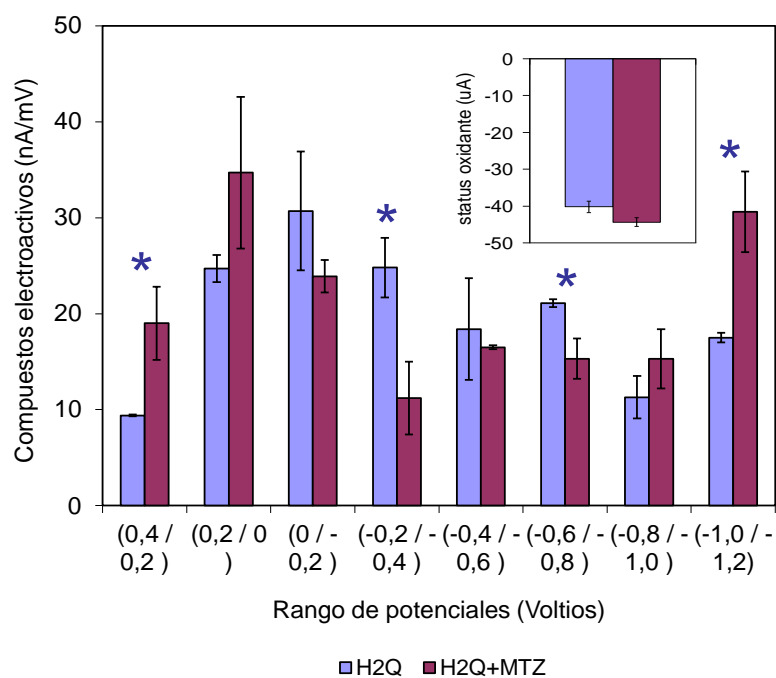


Figura 31: Cantidad de compuestos electroactivos (nA/mV) en las suspensiones formadas por CEV ovinas y células de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 suplementadas con H<sub>2</sub>Q y con H<sub>2</sub>Q+ MTZ, determinados a partir de los barridos de VPD dentro del rango de potenciales comprendidos entre +0,4 y -1,2 V. Los valores fueron agrupados por intervalos de 0,2 V. Las barras sobre las columnas indican el error estándar de las medias. El asterisco sobre las columnas indica que las diferencias a nivel de la concentración en compuestos electroactivos entre el tratamiento suplementado con H<sub>2</sub>Q y el tratamiento suplementado con H<sub>2</sub>Q + MTZ son significativas a p<0,05. En la figura insertada se muestra el valor del *status oxidante* de cada uno de los sistemas considerados.<sup>132</sup>

#### 4.3 Estimación de la capacidad de adhesión de *Staphylococcus* sp. mediante la determinación del porcentaje de hidrofobicidad

Como fue descrito anteriormente (Capítulo I, 3), el fenómeno de adhesión microbiana a las superficies puede ser dividido para su comprensión en varios pasos. Las investigaciones que se han realizado sobre los mecanismos fundamentales involucrados en el proceso de adhesión bacteriana han demostrado que tanto las interacciones electrostáticas, las interacciones de Van der Waals como las interacciones ácido-base de Lewis, impactan directamente sobre la hidrofobicidad. En la etapa de adhesión reversible es fundamental que exista una interacción hidrofóbica entre la célula bacteriana y el sustrato de contacto. Por lo tanto, la determinación de la hidrofobicidad se considera

predictiva de la capacidad de adhesión microbiana a los epitelios<sup>133</sup>. Existen varios métodos para su estimación, entre ellos la medición de absorbancia<sup>134</sup>.

En esta parte del trabajo se utilizó la técnica de Adhesión Microbiana a Solventes (MATS)<sup>135</sup> para estimar la capacidad de adhesión de *Staphylococcus* sp. expuestos a una solución con MTZ y con MTZm (1400 µg/ml). Las bacterias utilizadas fueron conservadas y reactivadas como se describió anteriormente<sup>115</sup>. El sedimento resultante de la última centrifugación se re suspendió en caldo MRS y se fraccionó en las siguientes suspensiones de trabajo, las cuales fueron incubadas 48 h a 37 °C:

- C1= MRS + bacterias
- C2= MRS + bacterias + MTZ + CINH<sub>4</sub>
- C3= MRS + bacterias + CINH<sub>4</sub>
- TA= MRS + bacterias + MTZ
- TB= MRS + bacterias + MTZm

La inclusión de los controles C2 y C3 se debe al interés de comparar (como en el ítem 3) el efecto que podría tener el CINH<sub>4</sub> sobre el MTZ sin modificar y MTZ solo, respectivamente, sobre la variable a medir. La cepa crecida se lavó con solución PUM Buffer (19,7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 7,26 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,8 g CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O (urea); 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)<sup>136</sup>. La absorbancia se llevó a entre 0,4 y 0,6 a 560 nm y se mezcló con la misma cantidad de xileno a temperatura ambiente. Después de un tiempo de separación de 60 minutos, se midió la absorbancia (A) de la fase acuosa (560nm). El porcentaje de hidrofobicidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

---

<sup>133</sup> Ref 37.

<sup>134</sup> Mozes N, Rouxhet PG (1987) Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 6, 99-112.

<sup>135</sup> Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E (1980) Adhesion of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.*, 9, 29–33.

<sup>136</sup> Rosenberg M (2006) Minireview. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol. Lett.*, 262, 129–134.

$$\% \text{ de Hidrofobicidad} = \frac{(A_{560} \text{ antes de mezclar} - A_{560} \text{ después de mezclar}) \times 100}{A_{560} \text{ antes de mezclar}}$$

Los resultados que se presentan en la Figura 32 fueron analizados estadísticamente mediante análisis de la variancia y con el test de comparaciones múltiples de Tuckey (n=6).

En la Figura 32 puede observarse que la hidrofobicidad de las membranas celulares de *Staphylococcus* sp. fue fuertemente disminuída por la presencia de MTZ, sin embargo la suplementación de CINH<sub>4</sub> con MTZ (C2) indujo el mayor porcentaje de hidrofobicidad de estos experimentos. El tratamiento con MTZm si bien presentó mayores valores que MTZ no fue significativamente diferente que el control con CINH<sub>4</sub> solo (C3).

Estos resultados sugieren que (i) tanto la presencia de MTZ como de MTZm disminuye la hidrofobicidad de *Staphylococcus* sp. (siendo mayor con MTZ) respecto al control (C1) (ii) la presencia de CINH<sub>4</sub> en soluciones conteniendo MTZ, ya sea como remanente del proceso de reducción, o directamente como suplemento, favorece las condiciones de hidrofobicidad respecto a la suplementación con MTZ solo. (iii) tal como se demostró anteriormente en este Capítulo la presencia de CINH<sub>4</sub> produce mayor cantidad de compuestos electroactivos en bajos potenciales de reducción, los cuáles, además de estimular la reducción del grupo nitro podrían estar relacionados con una mayor hidrofobicidad de las superficies bacterianas en C2 y TB respecto a TA; y (iv) la presencia de CINH<sub>4</sub> solo disminuye la hidrofobicidad respecto al C1. Este hecho vincula el problema de la hidrofobicidad con la composición iónica de los sistemas y fue ampliamente estudiado por diversos autores<sup>137</sup>. No obstante en nuestro caso este hecho excede el escenario previsto en este trabajo de tesis.

---

<sup>137</sup> Stenstrom TA (1989) Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (1), 142-147.

Krasowska A, Sigler K (2014) How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontier in Cellular and Infection Microbiology* ([www.frontiersIn.org](http://www.frontiersIn.org)) 4 (112), 1-7.

Goldberg S, Doyle RJ, Rosenberg M (1990) Mechanism of Enhancement of Microbial Cell Hydrophobicity by cationic Polymers. *Journal of Bacteriology*, 172 (10), 5650-5654.

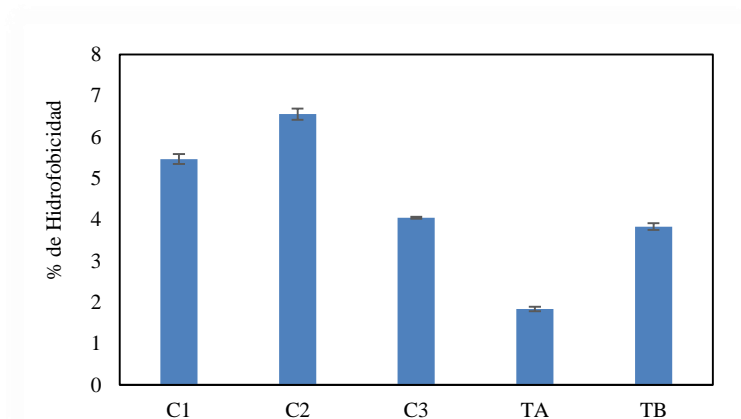


Figura 32: Determinación del % de hidrofobicidad según la técnica de Adhesión Microbiana a Solventes (MATS) en los distintos tratamientos inoculados con *Staphylococcus* sp. (n= 6).

#### 4.4 Estimación de la motilidad tipo *swimming* de *Pseudomonas fluorescens* C7R12

En el marco de este estudio nos pareció pertinente evaluar el efecto de la modificación de la molécula de MTZ sobre un factor de patogenicidad específico, la motilidad.

Las bacterias móviles Gram negativas como *Pseudomonas* spp poseen un tipo de movimiento dependiente de flagelo denominado motilidad *swimming*<sup>138</sup> el cual se refiere al movimiento que expresan en un medio líquido o de baja viscosidad (hasta 3 % P/V de agar). En este grupo de experimentos se determinó el efecto que produce la suplementación del medio de cultivo con MTZ y MTZm sobre la motilidad tipo *swimming* de *P. fluorescens* C7R12.

Para cumplir con este objetivo, se realizaron cultivos *overnight* de *P. fluorescens* C7R12 en caldo tripteína como se describió anteriormente<sup>118</sup>. Se tomó una alícuota de la suspensión (15 µl) y se inoculó en placas preparadas según el método de Rashid y Kornberg<sup>139</sup> (1% triptona, 0,5% NaCl, 0,3% agar). Los tratamientos fueron placas control,

<sup>138</sup> Henrichsen J (1972) *Bacteriol. Rev.* 36, 478–503. El movimiento bacteriano tipo *swimming* tiene lugar cuando la superficie es fluida, gruesa y los patrones micromorfológicos están desorganizados. Cuando la capa de fluido es suficientemente delgada, las bacterias se mueven de una manera coordinada conocida como *swarming* (swarm = enjambre). La motilidad *twitching* (contracción) es otra forma de translocación en una superficie sólida en la cual los patrones micromorfológicos están menos organizados que en *swarming*. Las motilidades *swimming* y *swarming* dependen de flagelos, *twitching* depende de pilis tipo IV.

<sup>139</sup>Rashid HM, Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 97(9), 4885-4890.

con MTZ y con MTZm (1700 µg/ml). Las placas se incubaron durante 18 h a 25 °C. Finalmente se midieron los halos de motilidad. Los resultados de cada uno de los tres experimentos, sometidos a análisis de la varianza, mostraron que los diámetros de los halos de motilidad son diferentes ( $p < 0,05$ ). Los mayores halos de motilidad corresponden al tratamiento Control, seguido por MTZm y finalmente MTZ. La Figura 33 muestra la diferencia en uno de los experimentos (Control  $n = 9$ , MTZm  $n = 18$ , MTZ  $n = 21$ ).

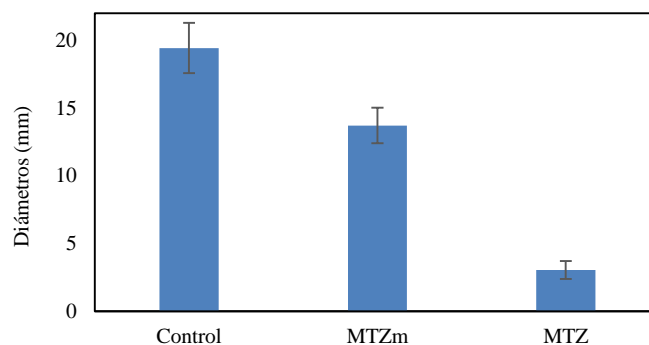


Figura 33: Diámetros de las zonas *swimming* de las colonias de *Pseudomonas fluorescens* C7R12. Las diferencias son significativas ( $p < 0,05$ ) (Test Anova y test de Tuckey).

Los resultados obtenidos concuerdan con los resultados informados por Abbas Hisham<sup>30</sup> que demostró que MTZ a una dosis sub terapéutica interfiere en la comunicación bacteriana disminuyendo su capacidad de expresar un factor de virulencia como es la motilidad de tipo *swimming*. La suplementación del medio de cultivo con MTZ (estado oxidado) disminuye la motilidad respecto al control (sin antibiótico) y también respecto al tratamiento suplementado con MTZm (parcialmente reducido) (Figura 34).

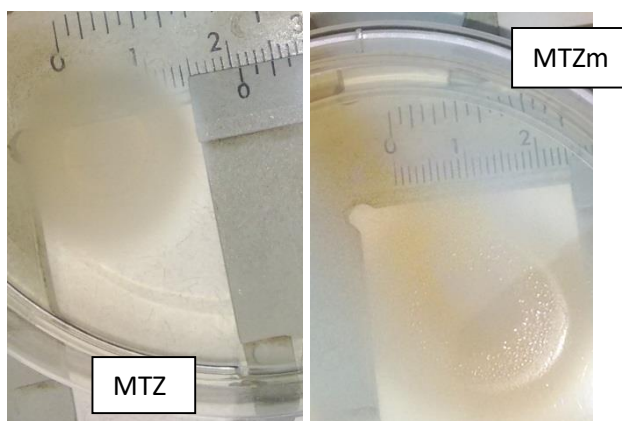


Figura 34: Diámetros de las zonas *swimming* de las colonias de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 sobre placas preparadas según el método de Rashid y Kornberg<sup>141</sup> (1% triptona, 0,5% NaCl, 0,3% agar) (Foto de T Coletti Zabala).

## 5. Conclusiones

En este capítulo se intentó relacionar las interacciones y modificaciones redox y ácido-base que se pueden presentar en el escenario vaginal utilizado en este estudio con el funcionamiento del componente numérico bacteriano. En los experimentos descritos en este capítulo, se utilizaron tres especies bacterianas; *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Pseudomonas fluorescens* C7R12 y *Staphylococcus* sp.

En una parte del trabajo se comparó el efecto de MTZ y de MTZm sobre la replicabilidad de *L. acidophilus*. Tal como se mencionó en la bibliografía, a pesar de que MTZ no es un antibiótico específico contra *Lactobacillus* spp, se sabe que puede disminuir su replicabilidad dependiendo de la concentración utilizada. En estos experimentos se trabajó con una solución de MTZ modificada (parcialmente reducida, teóricamente menos efectiva como antibiótico) y se determinó que la inhibición de la replicabilidad fue menor con MTZm que con MTZ sin modificar. Buscando las causas de esas diferencias se realizaron barridos de VC sobre las soluciones de MTZ y de MTZm utilizando como solvente acetonitrilo. En ambas soluciones se presentó un pico catódico próximo a -1,2 V; sin embargo la intensidad del mismo fue menor en MTZm, lo cual confirma la menor disponibilidad de MTZ capaz de reducirse en dicha solución. En la onda anódica se presentaron dos picos de oxidación, pero ninguno correspondiente a la reoxidación del pico catódico. La diferencia observada en el pico catódico se amplía al aumentar la cantidad de H<sub>2</sub>O en el solvente (40/60; v/v)<sup>140</sup>, demostrando una vez más, la capacidad del H<sub>2</sub>O de actuar como agente redox en el escenario de nuestro estudio (ver comportamiento redox del H<sub>2</sub>O en el Capítulo III). En este caso el aumento de la proporción de H<sub>2</sub>O produciría mayor cantidad de MTZ reducido al suplementar con MTZ respecto a la suplementación con MTZm.

Con el fin de determinar la influencia de las condiciones ácido-base en la viabilidad de *L. acidophilus* expuestos a MTZ, se realizaron experimentos a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7 y 8). Los resultados mostraron que a pH 4 y pH 8 la viabilidad

---

<sup>140</sup> El AN es un solvente aprótico. Se utilizaron estas dos soluciones con el propósito de determinar la incidencia que podía tener en el registro voltamétrico la variabilidad normal que presenta el FV a nivel de la concentración en compuestos potencialmente dadores de H<sup>+</sup> (el H<sub>2</sub>O, por ejemplo)

de *L. acidophilus* disminuye respecto de los valores intermedios de pH. En el análisis electroquímico se comprobó que a esos valores de pH, la intensidad del pico catódico observado a  $-890 \pm 50$  mV (que corresponde a la reducción del MTZ en solución acuosa) disminuyó respecto de los valores intermedios. Estos resultados sugieren que en esas condiciones hay menor disponibilidad de fármaco reductible, lo cual podría asociarse con un mayor ingreso a las células microbianas y por ende, una menor viabilidad de las mismas.

También se planteó estudiar la evolución de las variables ácido-base y redox en las soluciones de FVS cuando estas eran suplementadas con MTZ o MTZm en sistemas inoculados con *Pseudomonas fluorescens*. En el abordaje jerarquizamos un enfoque donde se vincula los cambios de pH con las otras variables físico químicas (conductividad y estado redox) y bióticas (número de bacterias). Cuando se analiza el comportamiento de incubaciones que se iniciaron a diferentes valores de pH (4 a 8), se observa una marcada disminución en los tratamientos que iniciaron con pH 7 y 8. Este comportamiento podría estar asociado con los bajos valores de  $K_a$  que poseen los ácidos orgánicos producidos por *P. fluorescens*<sup>123</sup> que podrían tamponar los sistemas en valores próximos a estos valores bajos. Obviamente esto conduciría a una disminución mayor en los valores iniciales de pH altos. Esta disminución fue mayor en el tratamiento suplementado con MTZ que en el tratamiento suplementado con MTZm (Figura 9). Este comportamiento podría estar asociado a la presencia de  $\text{CINH}_4$  residual<sup>141</sup>. Respecto a los cambios del pH en relación con la conductividad, no se observó ninguna relación entre ambas variables. El comportamiento de la conductividad mayor observada al suplementar con MTZm sería reflejo de la metodología empleada para inducir la reducción química del MTZ<sup>116</sup>. Respecto a los cambios de pH en relación con la intensidad redox (Eh), los resultados indican que entre estas variables se cumple la relación negativa planteada por la ecuación de Nernst (Capítulo I. 1.2.1). En estas condiciones, cuando se elimina el efecto pH (Eh<sub>7</sub>), se comprobó que la intensidad redox (Eh), no varía entre los tratamientos. Esto sugiere que en los sistemas que se incubaron a diferentes valores de pH no existió una

---

<sup>141</sup> Como se describió precedentemente <sup>116</sup>, en la preparación de MTZm se emplea  $\text{CINH}_4$ . Eventuales residuos de esta molécula podrían producir un efecto tampón hacia valores alcalinos, por consiguiente opuestos al efecto tampón ácido generado por la presencia de ácidos de origen bacteriano. Esto explicaría la diferencia observada en este caso entre MTZ y MTZm.

modificación significativa en el cociente [especies oxidadas] / [especies reducidas] (Figuras 11 y 12). Por otra parte, los valores de  $Eh_7$  fueron mayores en presencia de MTZ que en presencia de MTZm, lo que sugiere que habría existido una diferencia en la intensidad redox intrínseca de estos sistemas. En el estudio de los cambios de pH en relación con la capacidad redox se observó que la cantidad de compuestos electroactivos correspondientes al potencial de reducción del MTZ ( $-890 \pm 50$  mV) fue menor en los menores valores de pH (Figura 13). A medida que aumenta el pH, esta señal aumenta. Este aumento es mayor en los tratamientos suplementados con MTZ respecto a los suplementados con MTZm. En el caso de los tratamientos que tenían valores de pH iniciales de 6 y 7 esta señal aparece muy diferente entre MTZ y MTZm (en Figura 13 estos tratamientos están indicados). Dado que también es mayor la concentración de compuestos electroactivos (CCE) totales, se mantiene una relación de proporcionalidad entre la señal correspondiente a la concentración del MTZ y la CCE del sistema al suplementar con MTZ y MTZm. En otras palabras, los cocientes  $[MTZ] / [CCE]$  fueron similares en los tratamientos suplementados con MTZ o con MTZm, como indica la Figura 14. Estos resultados están en coincidencia con el análisis de las Figuras 11 y 12 realizado en el ítem anterior. Debe destacarse el hecho que utilizando el cociente, también se observó una relación lineal positiva con el pH en ambos tratamientos (como cuando en la Figura 13 consideramos la señal del MTZ sola). Cuando los valores de Eh se ajustan a un valor de pH igual a 7 ( $Eh_7$ ), la CEE en el caso del aporte de MTZ aumenta en los ambientes más oxidantes (Figura 15). Se podría decir que en las condiciones más oxidantes, el grupo  $-NO_2$  no presenta ni enmascaramiento ni bloqueo y genera la señal máxima que puede generar en función de la concentración utilizada. Esta interpretación está apoyada por las transformaciones que puede experimentar el grupo nitro en presencia de reductores, tal como fue descrito por Fossey *et al.*<sup>142</sup> En el caso del aporte de MTZm, se observó que los compuestos electroactivos se encuentran localizados dentro de un rango de potenciales bastante próximos, y la relación positiva observada con el aporte de MTZ no fue registrada. En el estudio de los cambios de pH en relación con el número de bacterias, lo observado puede resumirse como sigue. Después de 18 h de incubación el tratamiento con MTZm fue el que permitió el mayor crecimiento entre todos los tratamientos realizados donde existieron diferencias significativas. El valor máximo observado se registró a pH=6 ( $p < 0,05$ ). La concentración de MTZ detectada por VPD

---

<sup>142</sup> Fossey J, Lefort D, Sorba J (1993) Les radicaux libres en chimie organique. Masson, Paris. p.104.

(señal en el rango de potenciales de  $-890 \pm 50$  mV) en relación con el número de bacterias presenta una marcada relación lineal en los tratamientos con valores de pH inicial entre 4 y 7 ( $R^2 = 0,98$ ). En el tratamiento con MTZm no se observa una relación clara entre la señal del MTZ y el número de bacterias. Este comportamiento podría deberse a que en el tratamiento con MTZm a diferencia de lo que ocurre en el tratamiento con MTZ, la relación entre el potencial redox y la CEE (Figura 15) fue fuertemente perturbada. Al tratar de explicar las diferencias halladas en la capacidad de replicación bacteriana en valores de pH entre 4 y 6, se observó la existencia de una relación proporcional inversa entre el Eh y el pH, tanto con la suplementación con MTZ como con MTZm. Cuando se analizó el comportamiento de la replicabilidad en valores de pH entre 4 y 6 y los valores de Eh<sub>7</sub> (Figura 19), se observó que tanto en la suplementación con MTZ o con MTZm presentaron una relación lineal positiva lo que sugiere que el fenómeno debe ser asociado con equilibrios redox sin intervención de protones (pH). Estos resultados en general plantean la necesidad de tener en cuenta, especialmente en el caso que nos ocupa, que el *status* redox es un efector de proximidad a considerar cuando el tratamiento de una determinada patología tratada con MTZ fracasa.

En estudios realizados con el objetivo de cuantificar la actividad microbiana en FVS y en presencia de *Lactobacillus* se analizó la reducción del TTC<sup>126</sup> la cual se presentó aumentada al incrementarse el pH. Los sobrenadantes de suspensiones de FVS inoculados con bacterias mostraron en los barridos voltamétricos una menor cantidad de TTC disponible para ser reducido y en los barridos espectrofotométricos una mayor absorbancia (o sea mayor cantidad de TTC reducido) (Figura 21), sugiriendo que la cepa utilizada participó activamente en las reacciones que involucran H<sup>+</sup> y e<sup>-</sup>. Las medidas monitoreadas durante 24 h sugieren que esta actividad bacteriana se manifestó durante las primeras horas de la incubación (Figura 22)

En otra parte del trabajo se decidió utilizar *Staphylococcus* sp., bacteria frecuentemente aislada de la cavidad vaginal animal, la cual al igual que las otras especies utilizadas en este trabajo de Tesis, no se considera sensible al efecto del MTZ. Una vez más se comparó el efecto de MTZ y MTZm sobre la replicabilidad bacteriana, aunque en este caso se evaluó el efecto de dos concentraciones de MTZ y MTZm y también el efecto

del electrolito utilizado en la modificación del MTZ. Las suspensiones bacterianas fueron suplementadas con MTZ o MTZm a 1700 y 5000  $\mu\text{g/ml}$  (TA y TB respectivamente) y los controles consistieron en bacterias sin suplementar y suplementadas con MTZ +  $\text{CINH}_4$  y  $\text{CINH}_4$  (C1, C2 y C3 respectivamente). En los experimentos realizados con 1700  $\mu\text{g}$  MTZ/ml se observó que el número de bacterias fue significativamente mayor en el control sin suplementar que en los tratamientos con MTZ o MTZm, demostrándose un efecto inhibitorio de la replicabilidad ante la presencia del antibiótico. También se observó que la presencia de  $\text{CINH}_4$  solo no influía sobre la variable analizada. Sin embargo, en experimentos anteriores realizados en el Laboratorio de Química Biológica FCV UNR se demostró que la suplementación de sistemas conteniendo MTZ o MTZm con  $\text{CINH}_4$  aumenta la presencia de compuestos electroactivos en bajos potenciales de reducción ( $< -1500$  mV), los cuáles podrían actuar como agentes reductores del grupo nitro, provocando una disminución de la cantidad de antibiótico efectiva. Este resultado previo se confirma en el presente experimento, ya que no se registraron diferencias en la replicabilidad entre el control sin suplementar y el suplementado con MTZ +  $\text{CINH}_4$ . En los experimentos realizados con 5000  $\mu\text{g}$  MTZ/ml se observó que la replicabilidad disminuía en el tratamiento con MTZ y también en el control de MTZ +  $\text{CINH}_4$ , pero no en el tratamiento con MTZm respecto al control sin suplementar (Figura 25). De esta manera, se comprobó por una parte que la presencia de MTZ (sólo o con  $\text{CINH}_4$ ) disminuye la replicabilidad a 5000  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 28) y por otra parte se postuló que debido a que en este experimento la cantidad de MTZm fue aumentada y la concentración de compuestos con bajos potenciales es mayor que en MTZ (42 %), habría una mayor cantidad de MTZ con su grupo activo reducido, o sea inactivo, por lo tanto la situación se acercaría a la del control sin suplementar. Por otra parte se demostró que la presencia de  $\text{CINH}_4$  no influye sobre la replicabilidad (Figura 27).

En el trabajo descrito en este Capítulo también se determinó que la presencia de compuestos electroactivos modifica la capacidad de adhesión de *L. acidophilus* a las células epiteliales vaginales de diferente manera en las células de las dos especies animales utilizadas como modelos<sup>143</sup>. En la especie canina si bien el agregado de MTZ

---

<sup>143</sup> En la especie canina la población bacteriana varía en cantidad dependiendo del momento del ciclo estral. La relación aerobios/anaerobios es similar en diestro y anestro que en estro, aunque en menor cantidad. La familia Bacteroidaceae es la más frecuentemente aislada, seguida por Enterobacteriaceae, Streptococci y Lactobacilli <sup>51</sup>

solo no modifica la capacidad de adherencia, la suplementación con un agente reductor, como la hidroquinona (H<sub>2</sub>Q) que posee un posible rol protector del grupo activo nitro (Capítulo III.1) sí modifica la adherencia, disminuyéndola. Sin embargo, al combinar ambos agentes redox se observa que la capacidad de adherencia se mantiene en valores similares al control. Sin embargo el objetivo de este trabajo de Tesis es intentar ir más allá del caso concreto de la capacidad de adhesión de *Lactobacillus acidophilus* en presencia de MTZ, o sea explorar las consecuencias de incorporar un efector redox en un ambiente microbiano determinado. En ese sentido se experimentó también con células epiteliales vaginales ovinas, observándose que en este caso la suplementación conjunta de H<sub>2</sub>Q y MTZ disminuyen la capacidad de adherencia de *L. acidophilus*. Para intentar explicar estas diferencias se realizaron barridos de VPD en los sobrenadantes de H<sub>2</sub>Q y de H<sub>2</sub>Q + MTZ. El estudio voltamétrico indicó que estos sistemas no presentaron diferencias a nivel de la concentración total de compuestos electroactivos (CCE). Sin embargo, analizados por rangos, en el sistema con H<sub>2</sub>Q existió mayor CCE en los rangos -0,2 / -0,4 y -0,6 / -0,8 V y en el sistema con H<sub>2</sub>Q + MTZ en los rangos 0,4 / 0,2 V y -1,0 / -1,2 V. El *status* oxidante (Capítulo I. 1.1) en estos rangos de potenciales presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05) (Figura 31, Figura insertada). En síntesis, los estudios voltamétricos mostraron que en estos sistemas aparecieron compuestos neoformados y que hubo modificaciones en la composición electroactiva; asimismo, el *status* oxidante presentó un valor significativamente superior con respecto al tratamiento con H<sub>2</sub>Q (p<0,05). Según los potenciales de reducción (Eh; mV), la distribución de las concentraciones de compuestos electroactivos muestra que los compuestos con bajos potenciales de reducción inducen este comportamiento. Esto indicaría que la incorporación de esta mezcla al sistema vaginal aumentaría su capacidad reductora. El trabajo descrito en este ítem, muestra que el estudio del comportamiento y las fluctuaciones de los compuestos redox que componen el ambiente vaginal ovino, en términos de concentración y especies moleculares, debe ser jerarquizado para comprender

---

En la especie ovina los trabajos consultados hacen referencia a la flora bacteriana antes de la colocación de dispositivos intravaginales, representada en su mayoría por *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp y *Corinebacterium* spp. Al momento de retirar los dispositivos la especie predominante es *Escherichia coli*.

85 86

mejor las primeras etapas de la colonización de este ambiente por parte de los microorganismos.

A continuación, en el marco del estudio de la incidencia de los compuestos electroactivos en relación con otros fenómenos bióticos, también se estimó la capacidad de adherencia de *Staphylococcus* sp. a través de la técnica de adhesión microbiana a solventes (MATS)<sup>136 137</sup>. Los resultados mostraron que el porcentaje de hidrofobicidad<sup>139</sup> (pre requisito para lograr adherencia a las superficies) fue más bajo en presencia de un efector redox como el MTZ, respecto al control sin suplementar. También mostraron que si parte del MTZ se encuentra en forma reducida los porcentajes de hidrofobicidad son asimismo menores que los controles pero mayores que en los sistemas suplementados con la molécula intacta. Cabe mencionar que la presencia de  $\text{CINH}_4$  produce mayor cantidad de compuestos electroactivos en bajos potenciales de reducción en los sistemas con MTZ o MTZm, los cuáles, además de estimular la reducción del grupo nitro<sup>124</sup> podrían estar relacionados con una mayor hidrofobicidad de las superficies bacterianas en el control con MTZ+ $\text{CINH}_4$  y en el tratamiento con MTZm respecto al tratamiento con MTZ solo.

Por último se estudió la motilidad flagelar de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 mediante la medición de sus halos de motilidad en agar tipo *swimming*<sup>139</sup>. Se determinó que la expresión de dicho factor de virulencia es afectada negativamente por la presencia de MTZ respecto a un Control sin antibiótico. Asimismo se comprobó que MTZm también disminuye la capacidad de movilidad de estas bacterias respecto al Control, pero no la disminuye respecto a MTZ (Figura 31).

## CAPÍTULO V. Conclusiones

En este trabajo de Tesis se estudió un sistema –el denominado sistema vaginal– concebido como un fenómeno. Por fenómeno, consideramos un hecho que se manifiesta en la naturaleza. En el sistema estudiado, concebido como fenómeno natural, se detecta fácilmente la presencia de sub-fenómenos.

Por un lado se presenta un fenómeno que podemos denominar “físico-químico”, cuyo abordaje en nuestro caso comenzó por el inventario de los componentes moleculares del fluido vaginal en función de su talla. Este trabajo implicó la utilización de herramientas clásicas de las ciencias químicas como son los fraccionamientos moleculares con tamices moleculares y la espectrofotometría (capítulo II).

Por otro lado se presenta un fenómeno que podemos denominar “interacciones” para cuyo abordaje se planteó elaborar un listado de eventos relevantes que ocurren entre los componentes químicos característicos (capítulo III) y entre los componentes químicos y biológicos (capítulo IV). En esta parte del trabajo se jerarquizaron como técnicas analíticas nuevamente la espectrofotometría y las técnicas voltamperométricas para la parte química. Para la parte microbiológica se jerarquizaron la microscópica directa (Zeiss HBO 50 A/C Axiolab) para estudios de cuantificación y adherencia; los cultivos en placa para la determinación de viabilidad y motilidad (tipo *swimming*) y la determinación de hidrofobicidad de las superficies celulares (MATS) como indicador de adherencia.

### *El fenómeno físico-químico (Capítulo II)*

En el fluido vaginal canino (FVC) se detectaron dos fracciones de compuestos moleculares FI (mayor peso molecular) y FII (menor peso molecular) (Capítulo II; Figura 1 y 2). Asimismo se observó una gran similitud entre el FVC y el fluido vaginal sintético (FVS) a nivel de la talla molecular. En el análisis voltamétrico de los fluidos vaginales caninos se determinó que la mayor reserva reductora se encuentra en el rango comprendido entre -280 y +20 mV.

En relación a las moléculas efectoras redox jerarquizadas como modelo en este trabajo de Tesis, la Hidroquinona (H<sub>2</sub>Q) y el Metronidazol (MTZ) pudieron ser claramente identificadas cuando se incorporaron al sistema estudiado. En FVC la

suplementación con MTZ produjo un aumento de la cantidad de compuestos insaturados. La suplementación con H<sub>2</sub>Q produjo un desplazamiento de las fracciones descriptas. Estos estudios indicaron la existencia de procesos de neoformación de compuestos.

### *Las interacciones como fenómenos en escenarios químicos (Capítulo III)*

Para el estudio de las interacciones químicas se jerarquizaron dos técnicas voltamétricas, la voltametría cíclica (VC) y la voltametría de pulsos diferenciales (VPD). En solución acuosa pudieron ser claramente detectadas las señales electroquímicas de MTZ y de H<sub>2</sub>Q, cuando estas moléculas fueron incorporadas a nuestro sistema. Si ambas moléculas se encuentran juntas la señal de MTZ no se modifica mientras que la de H<sub>2</sub>Q aumenta en la intensidad de su pico catódico y muestra un segundo pico catódico. Estos hechos permiten suponer que en el sistema estudiado: (i) la molécula de H<sub>2</sub>Q podría proteger el grupo funcional -NO<sub>2</sub> del MTZ de posibles reducciones causadas por el medio acuoso; o bien, (ii) el grupo -OH del MTZ actúa como donador de electrones y reducir a la molécula de H<sub>2</sub>Q.

Al estudiar el efecto sobre el MTZ de FVC suplementado con Antraquinona 2, 6 disulfonato (AQDS), como modelo de una típica molécula transportadora de electrones (*electron shuttle*), se registró un aumento de la cantidad de MTZ oxidado y un aumento de la concentración de compuestos electroactivos (CCE) totales del sistema. Esto sugiere la neoformación de compuestos redox activos. Al suplementar con otras moléculas redox activas, ácido ascórbico y Cl<sub>3</sub>Fe, se produjo una disminución en cantidad de MTZ oxidado.

En estudios realizados con MTZ en soluciones con un solvente aprótico (Acetonitrilo; AN), donde el abastecimiento de protones al sistema está disminuido o anulado, se observó que las variaciones en la concentración de los componentes normales del FVS pueden alterar la especiación del MTZ, a través de modificaciones en el estado ácido-base, pero sin afectar su detectabilidad voltamétrica.

Se observó que el aporte de H<sub>2</sub>Q aumentó la CCE alterando la capacidad reductora del FVC en potenciales de reducción alejados de los potenciales de la H<sub>2</sub>Q (Capítulo III; Figura 13). La importancia de este resultado radica en el hecho que sugiere que un efector redox puede alterar el *status* redox del sistema estudiado, tanto a través de perturbaciones de intensidad (Eh) como de capacidad redox (cantidad de compuestos electroactivos). O

sea, el impacto de este tipo de moléculas no se limitaría (en el escenario estudiado) a perturbaciones en el potencial redox aparente del fluido vaginal a través del potenciales de reducción estándar de las quinonas incorporadas (en el caso entre 50 y 300 mV), como prevé la ecuación de Nernst. En virtud de este razonamiento, se puede esperar que la modificación de la cantidad de electrones disponibles en el sistema afecte la especiación de otras moléculas redox. En el caso que nos ocupa, un antibiótico redox como el MTZ podría ser afectado en su especiación redox y modificar su aptitud como agente farmacológico.

En general, en relación con las interacciones como fenómenos en el escenario químico considerado en nuestro estudio, podemos concluir que los resultados presentados confirman la vulnerabilidad electroactiva de la molécula de MTZ. Por otra parte, lo observado sugiere posibles mecanismos de reacción que deberían ser considerados cuando el antibiótico se utiliza con propósitos terapéuticos.

#### *Las interacciones como fenómenos en escenarios microbianos (Capítulo IV)*

El componente microbiano utilizado como modelo en este estudio estuvo representado por tres especies bacterianas: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Pseudomonas fluorescens* C7R12 y *Staphylococcus* sp.

Se comparó el efecto sobre la replicabilidad de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 de la molécula de MTZ y de una solución de MTZ reducida químicamente (MTZm) antes de ser utilizado. La Figura 1 muestra que ambos compuestos tienen un comportamiento diferente en el barrido en VC, siendo la señal típica del grupo funcional nitro ( $-890 \pm 50$  mV) significativamente menor en el MTZm respecto a MTZ.

Los resultados experimentales mostraron que MTZm resultó un inhibidor menos potente que MTZ sin modificar. En el análisis voltamétrico de las soluciones de MTZ y MTZm en solvente aprótico (AN) se presentó un pico de reducción cerca de los -1,2 V, aunque de menor intensidad en MTZm, como es esperable dado que esta solución ya está reducida. Resulta destacable el hecho de que esa diferencia se amplió al aumentar la cantidad de agua en este solvente, en favor de la reducción del MTZ sin modificar, respecto del MTZm. Esto confirmaría la hipótesis planteada en el Capítulo III, donde se postuló que esa diferencia se amplió al aumentar la cantidad de agua en este solvente, en favor de la reducción del MTZ sin modificar en ciertas situaciones que pueden presentarse en el escenario estudiado.

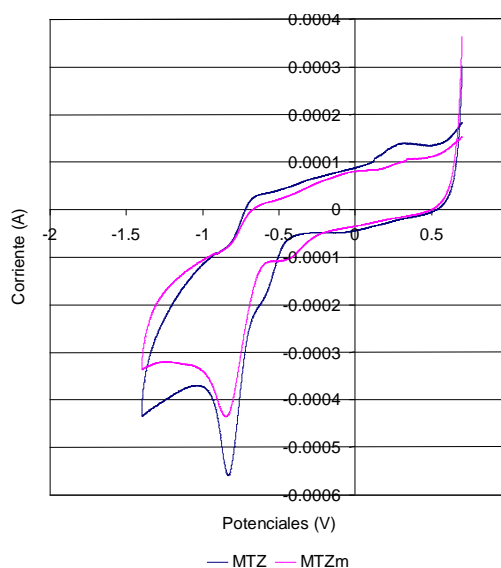


Figura 1: Barrido en VC de analitos (pH=7) que contenían 56 mM de MTZ, 4000  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 50  $\mu$ l ClK 2 M como electrolito soporte. Rango explorado: +700 / -1400 mV. Duración del escalón: 0,04 s. Amplitud del escalón: 1 mV.

En el estudio sobre el impacto de las condiciones ácido-base sobre la viabilidad bacteriana en un medio acuoso suplementado con MTZ (5000  $\mu$ g/ml), se trabajó con *L. acidophilus* ATCC 314 a pH 4, 5, 6, 7 y 8. En el rango estudiado, la disminución significativa de la viabilidad aparece con mayor claridad en el pH más bajo, al cual le corresponde el menor pico catódico observado. Considerando que la relación teórica Eh-pH es inversa (Capítulo I, 1), y en este caso no lo es, se plantea la posibilidad de que la existencia de reacciones ácido-base pudieran transformar el grupo nitro y de esa manera disminuir la cantidad detectable en los barridos de VC<sup>144</sup>.

En la determinación de la evolución de las variables ácido-base en relación con otras variables físico-químicas en medio acuoso inoculado con bacterias y suplementado con MTZ o MTZm (1700  $\mu$ g/ml), se utilizó *Pseudomonas fluorescens* C7R12. Cuando el pH se impuso inicialmente (4 a 8) se registró un marcado descenso del grado de acidez en los valores mayores de pH probablemente debido a la capacidad de producción de ácidos orgánicos de la cepa utilizada como modelo. No se observó relación entre la

<sup>144</sup> La señal en  $-890 \pm 50$  mV en nuestro sistema indica la presencia del par  $-\text{NO}_2 / -\text{NO}_2^-$ . Una disminución en la señal puede solo indicar que este grupo está menos oxidado sin que exista una disminución de la cantidad de MTZ o MTZm.

variación del pH y la conductividad. El pH y la intensidad redox se relacionaron de manera negativa, tal como describe la ecuación de Nernst. Tanto en los tratamientos con MTZ como con MTZm, cuando se eliminó el efecto  $H^+$  ( $Eh_7$ ) la intensidad redox no se modificó al variar el pH. Sin embargo la intensidad fue diferente entre MTZ y MTZm, evidenciando una diferencia de potencial intrínseca entre ambos sistemas. La cantidad de compuestos electroactivos correspondientes al potencial de reducción del MTZ disminuye al disminuir el pH. Este resultado se relaciona con lo descrito en el párrafo precedente, donde se utilizó otra bacteria y diferente concentración de MTZ (VC con *Lactobacillus*), una vez más los resultados conducen a una jerarquización de la importancia de las reacciones químicas en este sistema. Al relacionar los cambios de pH con el número de bacterias (18 h) se observó que este fue menor a pH 4, 5 y 6 en los sistemas con MTZ. Al relacionar el número de bacterias con la CCE ( $-890 \pm 50$  mV) se detectó una relación lineal positiva ( $R^2= 0,98$ ). Con MTZm no se observó esta relación. Al analizar el comportamiento en ese rango y los valores de  $Eh_7$  se puede concluir que tanto para MTZ o MTZm el fenómeno debe ser asociado con equilibrios redox y no ácido-base.

La reducción del trifenil tetrazolio (TTC) como medida de la actividad microbiana local mostró que *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 intervino activamente en reacciones que involucran  $H^+$  y  $e^-$ .

En el marco del abordaje de las interacciones en escenarios microbianos también se comparó el efecto sobre la replicabilidad de *Staphylococcus* sp. de la molécula de MTZ y de MTZm modificando la concentración del fármaco y suplementando con un electrolito en concentraciones teóricamente inocuas para la replicabilidad. Se eligió como modelo de electrolito el  $CINH_4$ , el cuál en nuestro estudio también se utiliza para modificar el MTZ en MTZm. Con una concentración de 1700  $\mu g/ml$ , la presencia del antibiótico en sus dos formas disminuyó la replicabilidad. En este caso el aporte de  $CINH_4$  solo no influyó. En cambio, a 5000  $\mu g/ml$  la presencia del MTZ disminuyó la replicabilidad. El  $CINH_4$  solo, tampoco influyó, sin embargo combinado con MTZ disminuyó la replicabilidad. Como fue demostrado en el Laboratorio<sup>124</sup>, la presencia del electrolito  $CINH_4$  en sistemas con MTZ o MTZm aumenta la CCE en bajos potenciales de reducción ( $< 1500$  mV). Esto se traduce en el aumento que se muestra en la Figura 2. Estos compuestos podrían potencialmente actuar como reductores del grupo nitro, permitiendo suponer que al aumentar la concentración, tanto de MTZ y MTZm como del

electrolito, en ambos casos aumente la cantidad de fármaco inactivo, siendo más evidente en el caso de MTZm.

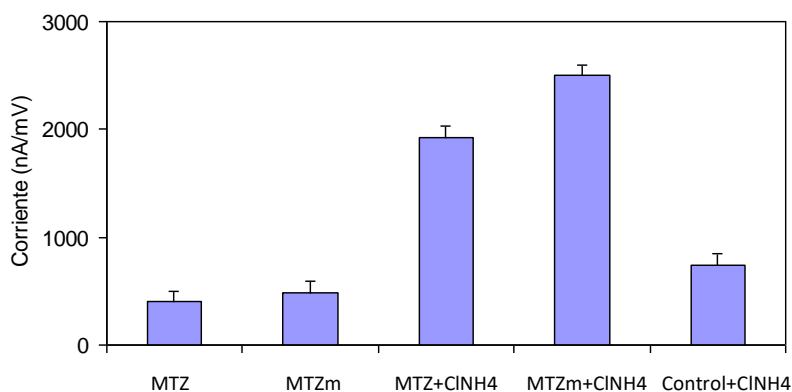


Figura 2: Valores de CCE (rango +1000 a -2000 mV) cuando las soluciones de MTZ y MTZm fueron complementadas con CINH<sub>4</sub> (ver Referencia <sup>124</sup>).

En el estudio sobre el impacto de la CCE en la expresión de determinados fenómenos bióticos se trabajó en un primer momento con la capacidad de adherencia, la cual fue estudiada por microscopía óptica y a través de la determinación de la hidrofobicidad de las superficies bacterianas (Técnica MATS<sup>145</sup>), y también se determinó la motilidad *swimming*<sup>139</sup>. Para ello se utilizaron como modelo células epiteliales vaginales de perras y de ovejas y como modelo bacteriano: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Staphylococcus* sp. y *Pseudomonas fluorescens* C7R12. Los compuestos electroactivos fueron MTZ, MTZm, H<sub>2</sub>Q y una mezcla de H<sub>2</sub>Q + MTZ. La respuesta frente a ellos fue diferente dependiendo de la especie. La capacidad de adherencia de *L. acidophilus* a células caninas en presencia de MTZ o de MTZ + H<sub>2</sub>Q se mantiene igual al control y disminuye en presencia de H<sub>2</sub>Q sola. En el caso de las células ovinas la suplementación de MTZ + H<sub>2</sub>Q disminuyó la capacidad de adherencia respecto a los demás tratamientos. Los barridos voltamétricos indicaron la neoformación de compuestos electroactivos a bajos potenciales dentro del rango estudiado (+0,4 y -1,2 V), los que estarían en el origen del aumento en estos sistemas del valor del *status* oxidante (Figura 3).

<sup>145</sup> Adhesion Microbiana a Solventes

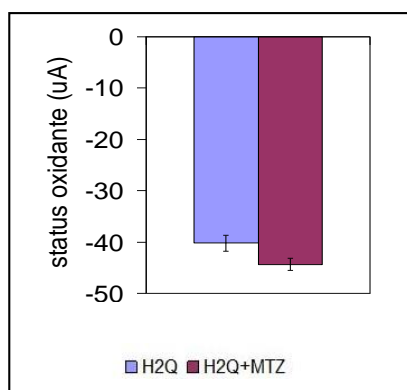


Figura 3. Valor del *status oxidante* de cada uno de los sistemas considerados. Las barras sobre las columnas indican el error estándar de las medias. Las diferencias son significativas ( $p < 0,05$ ) (Coletti Zabala et al<sup>132</sup>, Anexo 6)

Al determinar la adherencia a través del porcentaje de hidrofobicidad de las superficies celulares (MATS) con *Staphylococcus* sp. como microorganismo modelo se observó que la misma fue disminuida en presencia de MTZ y de MTZm respecto al control. Los resultados de los experimentos realizados sugieren que la presencia de compuestos con bajos potenciales podría influir en este fenómeno.

La motilidad flagelar de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 disminuyó en presencia de MTZ y de MTZm respecto al control.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis vinculan la presencia de la molécula de MTZ, tomada como modelo de un efector redox que se detecta en un momento dado con la complejidad química en general y electroactiva en particular que presenta el sistema en ese momento, y nuevamente sugieren que la molécula de un fármaco con fuerte carácter redox puede modificar y/o ser modificada según las condiciones físico-químicas del ambiente vaginal.

Como modelo conceptual, la vinculación de los fenómenos implicados en este trabajo de Tesis se puede representar como lo muestra la Figura 4, la cual plantea posibles derivaciones de interés para las prácticas terapéuticas, remarcando la importancia de conocer el estado redox del ambiente.

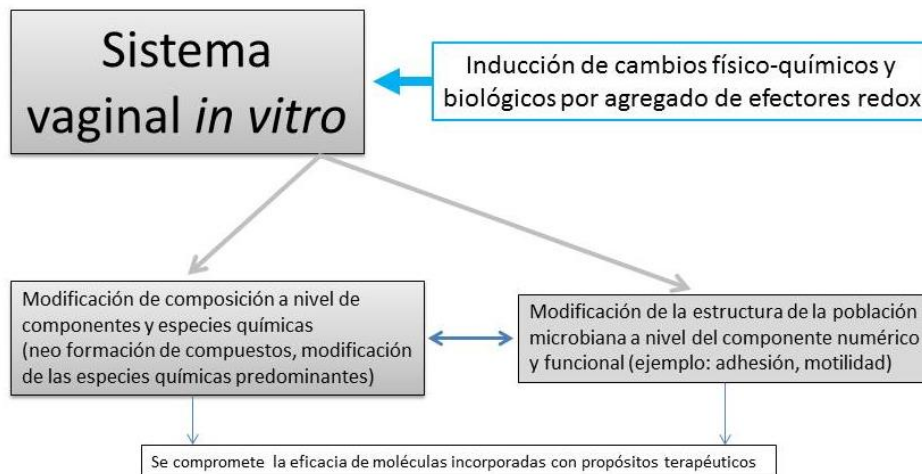


Figura 4. Modelo conceptual propuesto para vincular los resultados observados.

En forma general este trabajo muestra el interés que presentan los siguientes aspectos de este tipo de estudio: (i) la posibilidad de usar una molécula redox de una forma no tradicional en la terapia antimicrobiana; (ii) la importancia de conocer cómo el estado redox de un ambiente determinado puede influir sobre fármacos redox activos y por ende, sobre los resultados esperados; y (iii) el interés y la necesidad de seguir profundizando eventuales efectos secundarios relacionados con las diferentes especiaciones posibles de moléculas redox incorporadas en la terapéutica.

## BIBLIOGRAFIA

Abbas Hisham A (2015) Inhibition of Virulence os *Pseudomonas aeruginosa*: A Novel Role of Metronidazole Against Aerobic Bacteria. *Research J. Pharm. And Tech.* 8 (12), 1640-1644.

Al-Malki AL, Sayed BMC (2014) Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa-  $\beta$ . *Complementary and Alternative Medicine*, 14, 282.

Amichetti ML, Coletti-Zabala T, Pidello A (2005) Impacto de un inóculo de *Pseudomonas fluorescens* cepa C7R12 sobre agregados arcillo-húmicos naturales. *XI Jornadas Argentinas de Microbiología //II Jornadas de Microbiología e Infectología del Sur Argentino*.

An Y H F R J (Ed.) (2000) Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. *Handbook of bacterial adhesion. Principles, mechanisms and applications*, Springer, New York.

Ang CW, Angie M, Jarrad AM, Matthew A, Cooper MA, Blaskovich MAT (2017) Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases *J. Med. Chem.*, 60 (18), 7636–7657.

Atkins P, Jones L (2008) *Chemical Principles. The Quest for Insight*. WH Freeman and Company. New York. Fourth edition.

Atlas RM, Bartha R (1993) *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Benjamin Cummings Pub. Redwood City, Calif. 3rd ed.

Azadnia P, Zamani NH, Shah Ahmad Ghasemi, Khalegh Babaki A, Karimi Jashni M, Taarof N (2011) Isolation and identification of thermophilic Lactobacilic from traditional yoghurts of tribes of Kaserum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (6), 774-776.

Bernstein DI, Lummus ZL, Santilli G, Siskosky J, Bernstein IL (1995) Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols. *Chest.*, 108 (3), 636-641.

Bjurström L, Linde-Forsberg C (1992) Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *Am. J. Vet. Res.* 53 (5), 665-9.

Carr Fj, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria. A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4), 281-370.

Castelli M, Malagoli M, Lupo L, Roffia S, Paolucci F, Cermelli A, Zanca A, Baggio G, (2000) Cytotoxicity and probable mechanism of action of sulphimidazole. *J.Antimicrob.Chemother.*, 46, 541–550.

Chan R C Y, Reid G, Irvin R T, Bruce A W, Costerton J W (1985) Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect. Immun.*, 47, 84-8.

Clemente Ovando N, Orihuela Trujillo A, Flores Pérez FI, Aguirre Flores V (2013) Citología y Análisis Morfométrico de las Células del Epitelio Vaginal Durante el Ciclo Estral en Ovejas de Pelo (*Ovis aries*) *Int. J. Morphol.*, 31 (3), 888-893

Coletti Zabala T, Ombrella A, Ruiz Abad I, Dogali C, Pidello A (2008) Condiciones redox en el ecosistema vaginal normal humano. *Sociedad de Biología de Rosario. XI Congreso, XXVIII Reunión Anual.*

Coletti Zabala T, Zerbato E, Pidello A (2014) Efecto de algunos componentes mayores del fluido vaginal animal sobre el comportamiento electroquímico del Metronidazol. *XXXIV Reunión Anual SBR.*

Coletti Zabala T, Zerbato M, Calderón M, Faienza H, Pidello A (2011) Efecto de un mediador redox sobre el comportamiento electroquímico del sistema metronidazol- fluido vaginal canino. *Jornada de Investigadores Jóvenes en Ciencias Veterinarias. UBA.*

Coletti Zabala T, Zerbato ME, Ombrella A, Ruiz Abad I, Bernardi S, Pidello A (2009 ) Condicionantes redox en el ecosistema vaginal canino. *XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario.*

Coletti Zabala T, Zerbato ME, Perotti EBR, Smacchia AM, Ombrella A, Pidello A (2016) Effect of metronidazole supplemented with hydroquinone on the adhesión of *Lactobacillus acidophilus* in ovine vaginal cells. *Rev Argent Microbiol.* 48 (4), 313–319 (En el ANEXO 6 se incluye el trabajo completo).

Coletti Zabala, T; Pidello, A (2015) Efecto del Metronidazol químicamente modificado sobre la capacidad de sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314. *XVI Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas.* Facultad de Cs. Veterinarias. UNR.

Cooper G (1984), *Instrumentos y Técnicas de Bioquímica*, Reverté, Barcelona.

Cortés-López NG, Abad-Zavaleta J, Bravo-Delgado HR, Meza-Villalvazo VM, Sachman-Ruiz B, García Arellano C, del Moral Ventura ST (2013) Efecto del acetato de fluorogestona en la microbiota vaginal de borregas pelibuey en la cuenca del Papaloapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16, 309-314.

Crevel I, U S, Carne A, Katan M (1994) Purification and properties of zinc-metallophospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*. *Eur. J. Biochem.*, 224 (3), 845-852.

Delucchi L, Fraga M, Perelmuter K, Cidade E, Zunino P (2008) Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *Can. Vet. J.*, 49 (10), 991-994.

- Dieckelmann M, Johnson LA, Beacham IR (1998) The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.*, 85 (3), 527-536.
- Doi O, Nojima S (1971) Phospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 248 (2), 234-244.
- Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 8 (9), 881-890.
- Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL (2018) A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *J.Chem.Educ.*, 95, 197-206.
- Fossey J, Lefort D, Sorba J (1993) *Les radicaux libres en chimie organique*. Masson, Paris. p.104.
- Glinski J, Stepmiewski W (1985) *Soil Aeration and its role for Plants*. CRS Press.
- Goldberg S, Doyle RJ, Rosenberg M (1990) Mechanism of Enhancement of Microbial Cell Hydrophobicity by cationic Polymers. *Journal of Bacteriology*, 172 (10), 5650-5654.
- Gómez-Toribio V, García-Martín AB, Martínez NJ, Martínez AT, Guillén F. (2009) Induction of Extracellular Hydroxyl Radical Production by White-Rot Fungi through Quinone Redox Cycling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (12) 3944-3953.
- Gopal P, Prasad J, Smart H (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Microbiol.* 6, 207.
- Hedlund, C. (1999) Piómetra. En: Fossum, T. Cirugía en pequeños animales. Inter-médica, Buenos Aires. República Argentina 588-593.
- Hellio FC, Orange N, Guespin-Michel JF (1993) Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MF0, in the presence of various inducers. *Res. Microbiol.*, 144 (8), 617-625.
- Henrichsen J (1972) *Bacteriol. Rev.* 36, 478-503.
- Holmes KK, Chen KC, Lipinski CM, Eschenbahr DA (1985). Vaginal redox potential in bacterial vaginosis (nonspecific vaginitis). *J Infect Dis.*, 152 (2), 379-382.
- Holo H, Jeknic Z, Daeschel M, Stevanovic S, Nes LF (2001) PlactaricinW from *Lactobacillus plantarum* belong to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology.*, 147, 643-651.
- Hsueh P, Teng L, Pan H, Chen Y, Sun C, Ho S, Luh K (1998) Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2914-2917.

- Ivanov A, Titball RW, Kostadinova S (1996) Characterisation of a phospholipase C produced by *Pseudomonas fluorescens*. *New Microbiol.*, 19 (2),113-121.
- Juarez Tomás MS, Nader-Macías ME (2007) Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 732-739.
- Kaushal ML, Grover PS, Gupta ML (1998) Non-fermenters in urinary tract infection. *J. Assoc. Physicians*, 46 (9), 798-800.
- Krasowska A, Sigler K (2014) How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontier in Cellular and Infection Microbiology* ([www.frontiersIn.org](http://www.frontiersIn.org)), 4 (112), 1-7.
- Lawrence JR, Korber DR, Wolfaardt GM, Caldwell DE. Behavioral strategies of surface-colonizing bacteria. En Gwynfryn Jones, J (ed). *Microbial Ecology*, volume 14. NY: Plenum Press. 1995, 1-75.
- Lemanceau P (1992) Effects bénéfiques de Rhizobactéries sur plantes: exemple des *Pseudomonas spp fluorescens*. *Agronomie*. 12, 413-437.
- Lemanceau P, Berta G, Escande A, Favelukes G, Arias A, Pidello A (2002). *Reduction of the chemical inputs in a vegetable crop by the use of beneficial rhizospheric microorganisms*. INCO-DC. Contrat number: ERBIC18CT970180. Office For Official Publications of the European Communities.Brussels.
- Lynch JM, Poole NJ (1979) *Microbial ecology: A conceptual approach*. John Wiley & Sons, New York.
- MacLehose HG, Gilbert P, Allison DG (2004) Biofilms, homoserine lactones and biocide susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53, 180–184.
- Manes J, Fiorentino MA, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R, Sanchez E, Paolicchi F (2010) Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Ruminant Research*, 94, 201–204.
- Manes J, Ungerfeld R (2015) Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones en ambiente vaginal y su relación con la fertilidad. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 39 (1), 104-108
- Maya JD, Bollo S, Nuñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, Périé J, Chauvière G. (2003) Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, 15, 65 (6), 999-1006.
- Mozes N, Rouxhet PG (1987) Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods* 6, 99-112.

Noguchi Kazuhiro, Tsukumi Kiyoshi, Urano Toru (2003) Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Convencionally Reared Mice, Rats, Hamster, Rabbits, and Dog. *Comparative Medicine*, 53 (4), 404-412.

Ombrella A, Ruiz Abad I, Coletti-Zabala T, Dogali C, Pidello A (2007) Cambios en el estado redox del fluido vaginal ante la infección microbiana: propuesta metodológica. *VII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. FCV. UNR. 128-129. Sociedad de Biología de Rosario. X Congreso, XXVII Reunión Anual. 177*

Ouwehand AC (1998) Antimicrobial components from acid lactic bacteria. En *Lactic acid bacteria Microbiology and functional aspects*. (S. Salminen y A Von Wright, eds) 2<sup>o</sup> edición pp 139-160. Marcel Dekker Inc. New York, USA.

Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkkio S, Salmien S (2001) Assesment of adhesion properties of novel probiotic strain to human intestinal mucus. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 119.

Owen DH, Katz DF (1999) A vaginal fluid simulant. *Contraception*, 59, 91-95.

Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D (2010) Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica organicacids produced by phosphate solubilizing rhizobacteria: a critical review. *Terra Latinoamericana*, 28 (1), 61-70.

Parsek, M, Greenberg EP. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13 (1), 27-33.

Perini M, Zerbato ME, Coletti Zabala T, Perotti EB, Pidello A (2015) Relación entre las variaciones de pH y la reducción del trifenil tetrazolio cloruro (TTC) en fluido vaginal sintético inoculado con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314. *XXXV Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario*.

Picot L, Abdelmoula SM, Merieau A, Leroux P, Cazin L, Orange N, Feuilloley MG (2001) *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes Infect.*, 3 (12), 985-995.

Pidello (2017) Curvas acumulativas Concentración/Potencial. Estudio de la modificación redox del grupo activo del Metronidazol . *Jornadas Divulgación Técnico- Científicas FCV*.

Pidello A (2003) Environmental redox potential and redox capacity concepts using a simple polarographic experiment. *J. Chem. Educ.*, 80 (1), 68–70.

Pidello A (2011) *Ecología Microbiana. Química Redox*. Corpus, 144 p. ISBN 978-950-9030-91-6.

Pidello A (2014) *Principes de chimie redox en écologie microbienne*. Éditions Quae, Collection Synthèses. Paris. ISBN: 9782759220793. 144 pp.

Pidello A (2017) Measurement of the antioxidant capacity of forage using the amount of superoxide radical in ruminal fluid. *Adv. Appl. Sci. Res.*, 8 (2), 55–61.

Pidello A (2003) Signification écologique du potentiel redox et de la capacité redox en sediment d'eau douce. . En *Qualité et gestion des sédiments d' eau douce. Éléments physico- chimiques et biologiques*. Coor. B. Montuelle. Cemagref editions. 105- 134.

Pidello A, Amichetti ML, Coletti-Zabala T, Menendez LT, Perotti EBR (2008) Characterization of electrochemical properties in fractions of different molecular size taken from natural soil organic matter of argentine humid pampa. *J Argent Chem Soc.* 95, (1-2), 10-19.

Pidello A, Jocteur-Monrozier L (2006) Inoculation of the redox effector *Pseudomonas fluorescens* C7R12 affects soil redox status at the aggregate scale. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 1396-1402.

Pidello A, Ombrella A, Ruiz Abad I, Faienza H (2010) Estudio voltamétrico del sistema metronidazol-hidroquinona. *XXX Reunión Anual. Sociedad de Biología de Rosario*, 28.

Pidello A, Zerbato ME, Faienza H (2013) Changes in the electrochemical behavior of a redox mediator in the presence of humic fractions. *Advanced Materials Research*, 664, 245–250 ISSN 1662-8985.

Pinchetti M., Crossley R., Maier L (2011). Flora bacteriana y sensibilidad microbiana de cepas aisladas a partir de úteros de perras con piometra. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12 (9), 1-6.

Prats A, Boucourt R, Rodríguez S (2005) Metodología para la determinación de la adherencia in vitro de lactobacilos a las células intestinales de cerdos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39 (2), 205-212.

Preuss I, Kaiser I, Gehring U (2001) Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Eur. J. Biochem.*, 268 (19), 5081-5091.

Purswell BJ. (1995) Vaginal Disorders. En: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. WB Saunders. Philadelphia. 1642-1648.

Quentin R (2006) Écologie bacterienne vaginale: nature, exploration et prise en charge des déséquilibres. En *Extrait des mises à jour en Gynécologie et Obstétrique*. Tome XXX. Paris.

Rashid HM, Kornberg A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa* *PNAS*, 97 (9), 4885-4890.

Reddy, KSC, Raju KGS, Rao KS, Rao KBR (2011) Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in btches. *Iraqi J. Vet. Sci.*. 25, 51-54.

- Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, Bruce A (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35 (2), 131-134.
- Reid G (1999) The scientific basis for probiotic strains of *lactobacillus*. Minireview *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3763.
- Rosenberg M (2006) Minireview. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH, *FEMS Microbiol. Lett.*, 262, 129–134.
- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E (1980) Adhesion of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 9, 29–33.
- Rossignol G (2008) Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiology*, 8:189 doi: 10.1186 / 1471-2180-8-189.
- Rosso KM, Smith DMAM, Wang Z, Ainsworth CC, Fredrickson JK (2004) Self-Exchange Electron Transfer Kinetics and Reduction Potentials for Anthraquinone Disulfonate. *J. Phys. Chem.*, 108 (16), 3292–3303.
- Sacherer P, Defago G, Haas D (1994) Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gac A* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.*, 116 (2), 155-160.
- Scott C, Manning SC (2003). Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J* 82 (suppl), 18-20.
- Shang Y, Zhang L, Jiang Y, Li Y, Lu P (2014) Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: The role of reactive oxygen species. *Chemosphere*, 100, 42–49.
- Shepherd JA, Waigh RD, Gilbert P (1988) Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1-3 diol (Bronopol). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32 (11), 1693–1698.
- Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY (1966) *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. Limusa-Wiley, 192–193.
- Simoes J, Aroutcheva A, Shott S, Faro S (2001) Effect of metronidazole on the growth of vaginal lactobacilli in vitro. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 9, 41-45.
- Skoog DA, Leary JJ, Holler FJ (1998) *Principios de análisis instrumental*, 5° ed.; Ed. McGraw-Hill.
- Spencer RJ, Chesson A (1994) The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J. Appl. Bacteriol.*, 77 (2), 215-20.

- Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146, 2345-2350.
- Stenstrom TA (1989) Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (1), 142-147.
- Stumm W, Morgan JJ (1996) *Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. NY. Third Edition. 461.
- Szewzyk U, Schink B (1989) Degradation of hydroquinone, gentisate, and benzoate by a fermenting bacterium in pure or defined mixed culture. *Archives of microbiology*, 151 (6), 541-545.
- Torres MR (2002) *Flora intestinal, probióticos y salud*. Segunda edición, Formas finas (ed). Guadalajara, Jal.
- Tovar Muñoz MA, Hernández Vásquez A (1985). Histología y morfometría del epitelio vaginal ovino en el diagnóstico de la gestación. *Rev. Fac. Med. Vet y de Zoot.* (38), 1.
- Tuomola E, Ouwehand A, Salminen S (1999) The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26, 137-142.
- Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P (2006) *Antimicrob. Agents Chemother*, 50 (1), 344-347.
- Vadillo S, Píriz S, Mateos E (2002) *Manual de Microbiología Veterinaria*. Mc Graw Hill/Interamericana de España, S.A.U. ©
- Van de Wijgert, J.H.H.M, Mason, P.R, Gwanzura, L (2000) Intravaginal practices, vaginal flora disturbances, and acquisition of sexually transmitted diseases in zimbabwean women. *The Journal of Infectious Diseases*, 181 (2), 587-594.
- Vásquez MS, Suárez MH, Zapata BS (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.*, 36 (1), 64-71.
- Versterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand A (2004) Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Reserch in Microbiology*, 156, 238-244.
- Wardman, P. (1989) Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 18 (4), 1637-1755.
- Whyte A, Lafong C, Malone J, Golda B (1999) Contaminated lithium heparin bottles as a source of pseudobacteremia. *J. Hosp. Infect.*, 42, 342-343.

Zerbatto ME (2008) Impacto de reductores inorgánicos y orgánicos sobre la talla de moléculas húmicas. *Informe Final. Beca de Investigación Científica para Estudiantes*. FCV UNR. 6 pp.

Zerbatto ME, Pidello A (2008) Efecto de la interacción entre la antraquinona disulfonato (AQDS) y las sustancias húmicas. *Sociedad de Biología de Rosario. XXVIII Reunión Anual*.

Zerbatto ME, Pidello A (2013) Eficiencia del Metronidazol en fluido vaginal sintético en presencia de efectores de óxido-reducción. *Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Facultad Cs. Veterinarias. UNR; XXXIII Reunión Anual, Sociedad de Biología de Rosario*.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1:

Medida del potencial redox (Modificado de la Referencia <sup>2</sup>)

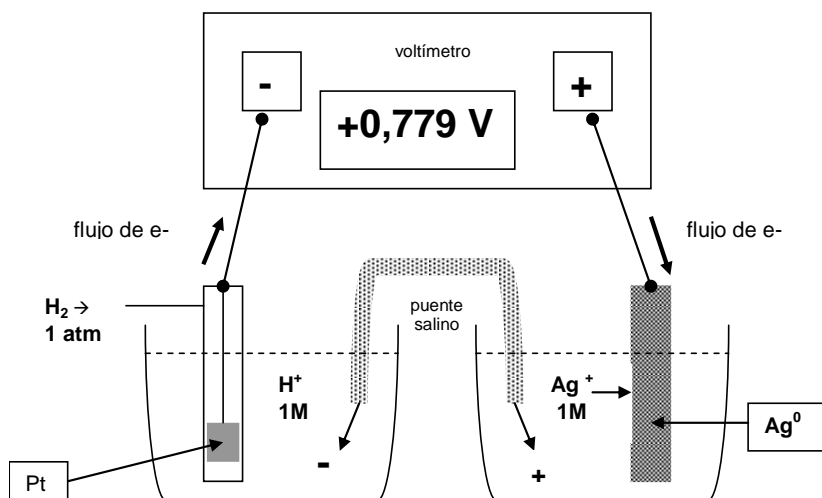


Figura 1. Medida del potencial de la semi reacción (o semi-pila)  $\text{Ag}^+ / \text{Ag}$  frente al electrodo estándar de hidrógeno ( $\text{H}^+ / \text{H}_2$ ) utilizando una celda electroquímica. El puente salino, que contiene un electrolito (KCl, por ejemplo) que no participa en la oxidación-reducción, conecta las dos celdas y posibilita que se mantenga un equilibrio de cargas, al permitir que se produzca un paso de iones entre las dos soluciones ( $\text{K}^+$  o  $\text{Cl}^-$ ). Este paso de cargas compensa, en este caso, aumento de cargas positivas en la semi-pila EEH y la disminución de cargas positivas en la semi-pila de  $\text{Ag}$ , debido a la deposición de iones  $\text{Ag}^+$  sobre el electrodo de  $\text{Ag}^0$ .

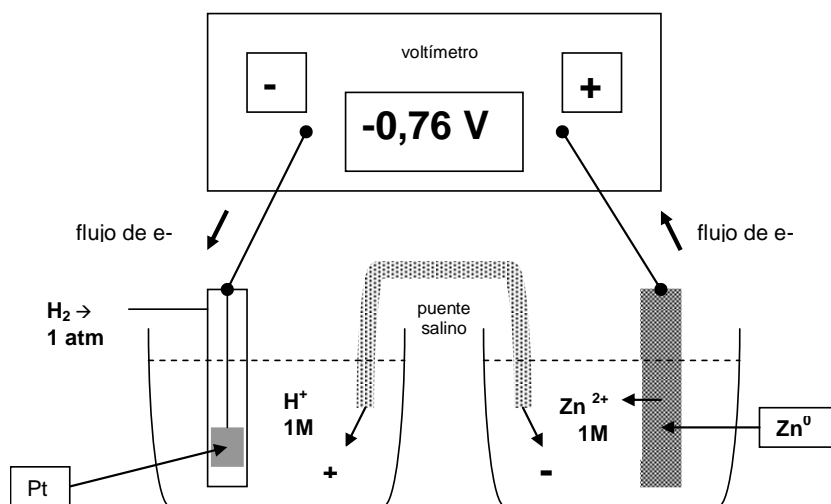


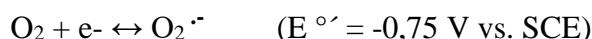
Figura 2. Medida del potencial de la semi reacción  $\text{Zn}^{2+} / \text{Zn}$  frente al electrodo estándar de hidrógeno ( $\text{H}^+ / \text{H}_2$ ). El puente salino compensa, en este caso, la disminución de cargas positivas en la semi-pila EEH y el aumento de cargas positivas en la semi-pila de  $\text{Zn}$ , debida a la disolución del electrodo de  $\text{Zn}^0$ .

## ANEXO 2:

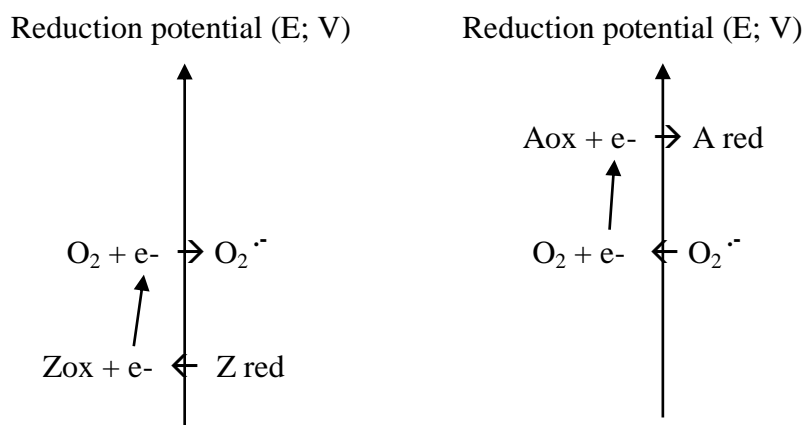
### Conceptos básicos sobre Voltametría Cíclica (VC)

(Modificado con autorización de “Supporting Information. Measurement of the antioxidant capacity of forage using the amount of superoxide radical in ruminal fluid” *Adv. Appl. Sci. Res.*, 8 (2) 55–56, 2017)

As explained in the main text, in an aprotic solvent such as dimethyl sulfoxide (DMSO) and at low electrochemical potentials, oxygen is reduced to stable superoxide radical<sup>9</sup> by a reversible process involving an electron. The reaction is:



Theoretically, according to the electrochemical scale, the reaction evolve to left (it will yield the electron) if confronted with a redox couple which has a greater reduction potential; and evolve to the right (it will take an electron) if confronted with a redox couple that has a lower reduction potential. In the first case it behaves as a *reductant* and the second as an *oxidant*.



## CYCLIC VOLTAMMETRY

Cyclic voltammetry<sup>9</sup> is a widely used technique in various fields of chemistry. Usually it not used in quantitative measurements, but rather to study redox process and to understand the intermediate reactions. The technique is based on the variation of potential applied to the working electrode in both possible directions: for example, potential positive to negative, generating a call cathodic wave showing peaks potentials ( $E_{c,p}$ , Volts) (C1 and C2; Figure SI-1) and peak currents ( $I_{c,p}$ ; Current, Ampere) corresponding to the reducible compounds present in the analyte. Then, the scan direction

is reversed. This reverse scanning is the origin of the anodic wave, where the peaks appear indicating the potential at which oxidation of the compounds (A2 and A1) formed in the cathodic wave occurs ( $E_{ap}$ ;  $I_{ap}$ ). The number of times these cycles occur depends on the analytical purpose.

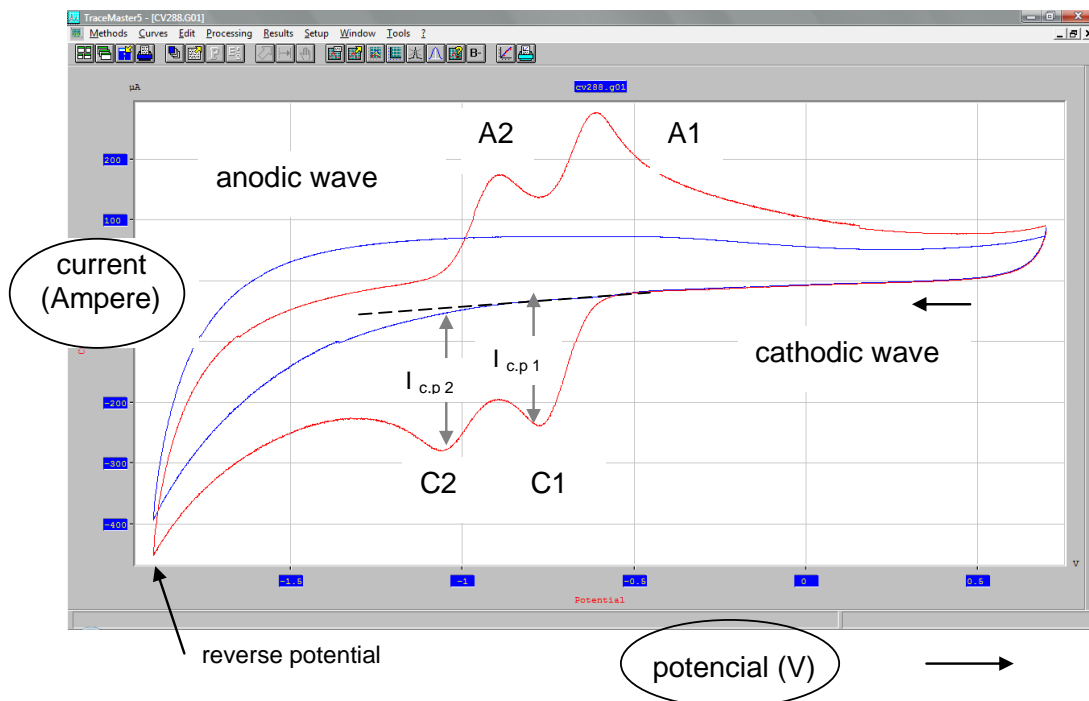


Figure SI-1: Cyclic voltammogram for a reversible reaction (red). The figure also shows the control voltammogram (the solution formed with the solvent + supporting electrolyte; in blue) (Pidello, non-published data).

## REDOX INTENSITY AND REDOX CAPACITY THROUGH ANALYSIS OF THE CYCLIC VOLTAMMOGRAMS

The Figure SI-2 shows that increasing contributions of ruminal fluid decreases the current value ( $I_{+rf c.p}$ ) (redox capacity factor = amount of electroactive species) corresponding to the signal potential of the pair  $O_2 / O_2^{\cdot-}$  ( $E_{c.p} = -1.1$  V vs. SCE) (redox intensity factor).

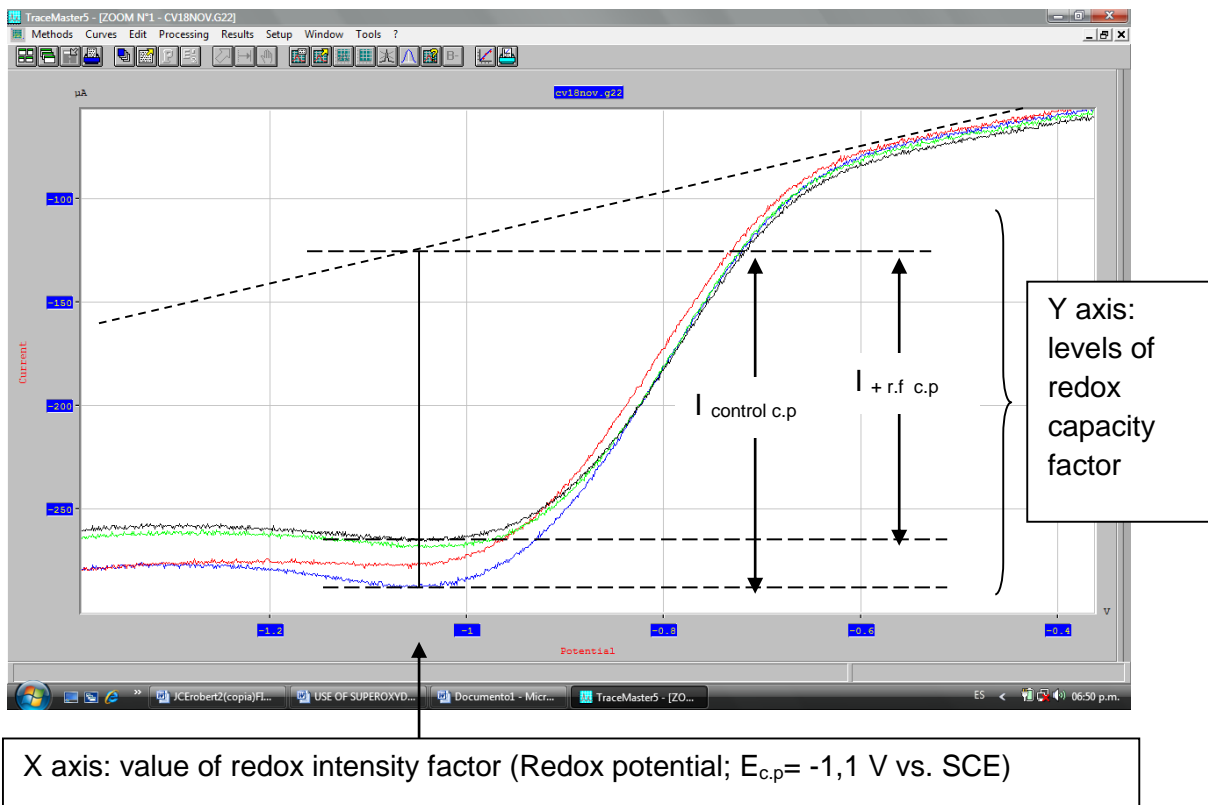


Figure SI-2. Cathodic wave of cyclic voltammogram of  $O_2/O_2^-$  system in aerated DMSO with increasing amount of ruminal fluid (0; 1; 2 and 3 %; v/v) (Blue, red, green and black respectively) (Pidello, non-published data).

### ANEXO 3:

Formulación del fluido vaginal sintético según la técnica de Owen<sup>91</sup> modificada.

En este trabajo se utilizó fluido vaginal sintético preparado en el Laboratorio de Química Biológica FCV UNR. La composición del mismo está basada en la formulación propuesta por Owen et al (1999) (*Vaginal fluid simulant*) la cual fue levemente modificada por nosotros. (Coletti Zabala et al 2011)<sup>31</sup>.

#### Fluido vaginal modificado (g.l<sup>-1</sup>)

Glucosa	10
Glicerol	0,16
Ácido láctico	2
Ácido acético	2
Urea	0,5
Na Cl	3,5
K OH	1,4
Ca OH	0,22
Extracto de levadura	3

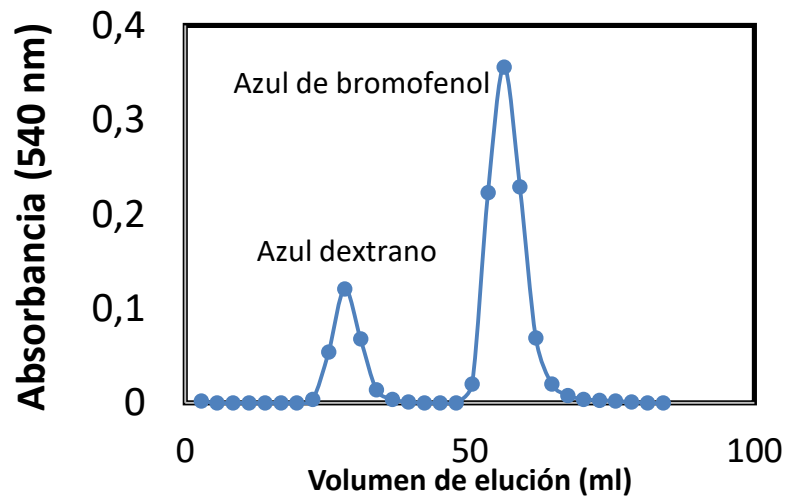
El pH se ajustó a 6.

Como información complementaria se incluye la composición descrita por Juárez Tomás y Nader-Macías<sup>94</sup>. En la tabla siguiente se presenta la composición del fluido vaginal sintético en relación con la composición del fluido vaginal natural (Modificado de Juárez Tomás y Nader-Macías, 2007):

<b>Componente</b>	<b>Medio Juárez Tomás y Nader-Macías (g. l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Composición del fluido vaginal natural (g. l<sup>-1</sup>)</b>
Glucose	10.00	6.2-10
Glycogen	10.00	15
Glycerol	-	0.16
Lactic acid	2.00	0.9-4.0
Acetic acid	1.00	0.52
Albumin	2.00	0.018-3.75
Mucin	0.25	0.25
Urea	0.50	0.49
NaCl	3.50 (Na <sup>+</sup> : 1.38; Cl <sup>-</sup> : 2.12)	Na <sup>+</sup> : 1.00-1.95; Cl <sup>-</sup> : 2.20-2.94; K <sup>+</sup> : 0.55- 1.17; Ca <sup>2+</sup> : 0.12
KCl	1.50 (K <sup>+</sup> : 0.79; Cl <sup>-</sup> : 0.71)	
KOH	-	
Ca(OH) <sub>2</sub>	-	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-
MgSO <sub>4</sub>	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	-
Tween 80	1.064	-
Cystein-HCl	0.50	-
Hemin	-	-
Vitamin K	-	-
Vitamin mix <sup>e</sup>	-	-
pH	4.25 ± 0.05	Normal: < 4.5

ANEXO 4:

Curvas de absorbancia correspondientes a la elución de Azul Dextrano (PM: 2.106 Da; CAS No115-39-9) y Azul de Bromofenol (PM: 669.97 Da; CAS N° 87915-38-6) en Sephadex G25 © según la técnica de Cooper (1984)<sup>95</sup>. Columna de vidrio; 50 cm de longitud; 1cm de diámetro.



## ANEXO 5: Referencia<sup>110</sup>

Condiciones redox en el ecosistema vaginal normal humano. *Sociedad de Biología de Rosario. XI Congreso, XXVIII Reunión Anual, 95*

### CONDICIONES REDOX EN EL ECOSISTEMA VAGINAL NORMAL HUMANO

Coletti Zabala, Tamara<sup>1</sup>; Ombrella, Adriana<sup>2</sup>; Ruiz Abad, Isabel<sup>3</sup>; Dogali, Carina<sup>2</sup>; Pidello, Alejandro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Química Biológica. Facultad de Ciencias Veterinarias, CIUNR. <sup>2</sup>Cátedra de Microbiología. <sup>3</sup>Cátedra de Ginecología. Facultad de Ciencias Médicas. UNR. E-mail: [apidello@fveter.unr.edu.ar](mailto:apidello@fveter.unr.edu.ar)

#### Introducción

Fueron descriptos distintos fenómenos, como la perturbación de la adhesión bacteriana en presencia de efectores redox o el mecanismo de acción de ciertos antibióticos, que prueban la importancia del conocimiento de ecosistema redox vaginal.

#### Objetivos

Vincular la estructura de la población microbiana normal de la vagina humana con la condiciones redox del ecosistema vaginal y aportar información que permita contribuir al conocimiento del funcionamiento de fármacos que sean efectores redox (Metronidazol; por ejemplo)

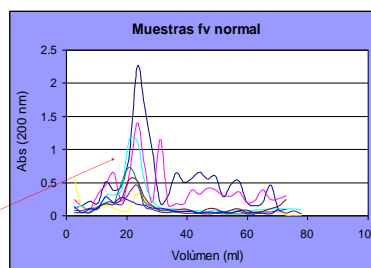
#### Materiales y metodología

Para cumplir con éste objetivo se estudiaron algunas características del fluido vaginal normal: distribución de los componentes a nivel de talla molecular (fraccionamiento con Sephadex G25® y absorbancia a 200 nm) y concentración de componentes electroactivos [CCE] en la fracción mayoritaria detectada en éste fraccionamiento.

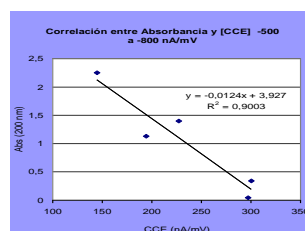
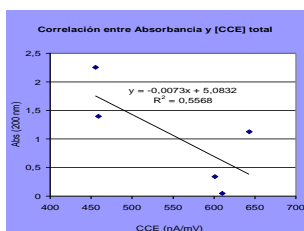
Se utilizaron muestras de secreciones de fondo de saco vaginal que se tomaron en mujeres en edad reproductiva, no diabáticas ni gestantes, sin tratamientos antimicrobianos locales y/o sistémicos durante el mes previo al muestreo y abstinencia sexual de 72 horas.

Para realizar el estudio microbiológico se realizaron tomas de flujo vaginal con hisopos estériles de algodón y se realizó la recuperación por cultivo de los microorganismos presentes. Se retuvieron como muestras normales las que presentaron predominio neto de *Lactobacillus* spp.<sup>1-2</sup>

❖ Para determinar la distribución según talla, suspensiones de 0,5 ml de secreción/ 2 ml de solución fisiológica fueron filtradas (Millipore®; 0,2 micras) y 0,4 ml de esta dilución se fraccionó con Sephadex G25® (n=8). Se recogieron 30 fracciones de 2,8 ml. Todas las muestras presentaron máximos de absorbancia en la fracción f 8 o f 9 (22,4-25,2 ml)



❖ Esta fracción fue retenida para los estudios voltamperométricos (VPD; Radiometer Analytical, Fr). Estos valores presentaron una correlación negativa con [CCE] total y con [CCE] en el rango de potenciales entre -500 a -800 mV ( $R^2= 0,55$  y  $R^2= 0,90$  respectivamente).



#### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos sugieren que la reserva reductora del sistema estaría representada por compuestos insaturados de masa molecular relativamente elevada (fracción excluida por Sephadex G25; f 8 o f 9) comprendidos en un rango de potenciales relativamente bajos, entre -500 a -800 mV.

#### Referencias

<sup>1</sup>Harold L; Martín Jr.; Richardson B et al. Lactobacilli, vaginal flora microbial and risk of Virus of Immunodeficiency Human Type 1 and sexually transmission acquisition of disease. J. Infect. Dis. 1999; 180: 1863-68.

<sup>2</sup>Hawes, SE; Hillier SL; Benedetti, J; et al. Hydrogen peroxide - producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. J. Infect. Dis. 1996; 174: 1058-63

ANEXO 6: Referencia <sup>137</sup>.

*Rev. Argent. Microbiol.*, (2016) 48 (4): 313 – 319 (Artículo citado en *Science.gov*;  
Portal de *U.S Federal Science*)



ORIGINAL ARTICLE

Effect of metronidazole supplemented  
with hydroquinone on the adhesion  
of *Lactobacillus acidophilus* in ovine vaginal cells



Tamara L. Coletti Zabala<sup>a,\*</sup>, María E. Zerbato<sup>a,b</sup>, Elda B.R. Perotti<sup>a</sup>,  
Ana M. Smacchia<sup>a</sup>, Adriana Ombrella<sup>b</sup>, Alejandro R. Pidello<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Química Biológica I, Facultad de Ciencias Veterinarias, Consejo de Investigaciones, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina

<sup>b</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina

Received 29 December 2015; accepted 22 August 2016

Available online 2 December 2016

KEYWORDS

Microbial adhesion;  
Metronidazole;  
Vaginal cells;  
Ovine;  
Redox;  
Voltammetry

**Abstract** This work demonstrates that the addition of metronidazole together with a ubiquitous quinone compound reduces adherence of *Lactobacillus acidophilus* to ovine vaginal cells.

Spectrophotometric and voltammetric studies have shown that neoformed compounds were observed in these systems; there were also changes in their electroactive composition, and the oxidant status had a significantly higher value compared to the control ( $p < 0.05$ ). Based on reduction potential (E; mV), the distribution of electroactive compound concentrations suggests that the compounds with low reduction potential induce this behavior, which would indicate that the addition of metronidazole with a ubiquitous quinone compound to the vaginal system might increase the reductive capacity of these systems.

This work shows that the study of behavior and fluctuations of the redox compounds that compose the vaginal environment, in terms of concentration and species of redox molecules, must be hierarchized in order to better understand the early stages of colonization by microorganisms.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author.

E-mail address: [tamara.coletti@hotmail.com](mailto:tamara.coletti@hotmail.com) (T.L. Coletti Zabala).

**PALABRAS CLAVE**

Adhesión microbiana;  
Metronidazol;  
Células vaginales;  
Ovinos;  
Redox;  
Voltametría

**Efecto del metronidazol suplementado con hidroquinona en la adherencia de *Lactobacillus acidophilus* en células vaginales ovinas**

**Resumen** Este trabajo demuestra que la incorporación de metronidazol conjuntamente con un compuesto quinónico ubícuo disminuye la adherencia de *Lactobacillus acidophilus* a células vaginales ovinas.

Los estudios espectrofotométricos y voltamétricos mostraron que en estos sistemas aparecieron compuestos neoformados y que hubo modificaciones en la composición electroactiva; asimismo, el estatus oxidante presentó un valor significativamente superior con respecto al control ( $p < 0,05$ ). Según los potenciales de reducción ( $E$ ; mV), la distribución de las concentraciones de los compuestos electroactivos muestra que los compuestos con bajos potenciales de reducción inducen este comportamiento. Esto indicaría que la incorporación de esta mezcla al sistema vaginal aumentaría su capacidad reductora.

El trabajo muestra que el estudio del comportamiento y las fluctuaciones de los compuestos redox que componen el ambiente vaginal, en términos de concentración y especies moleculares, debe ser jerarquizado para comprender mejor las primeras etapas de la colonización de este ambiente por parte de los microorganismos.

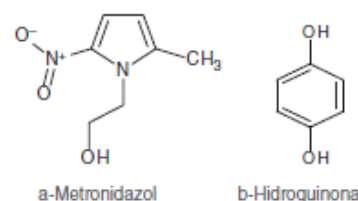
© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Microbial adhesion to surfaces is the first step of the early processes not only in beneficial but also in pathogen microorganism installation in many diverse ecological niches<sup>24</sup>. At this first stage of bacterial adherence processes there are physicochemical conditions acting in non-specific interactions (such as electrostatic repulsion and Van Der Waals' force)<sup>23,24</sup>. Moreover, it has been shown that in cell-cell adhesion processes there is intervention of molecules that can undergo intra- and inter-molecular interactions with molecules or ubiquitous functional groups, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or thiols, through chemical reactions as well as redox reactions<sup>5,9,20</sup>. Based on these facts it is evident that the factors affecting these physicochemical variables must be especially considered in order to characterize this biological scenario<sup>8,13</sup>. Studies on bacterial adherence in bovine vaginal cells showed that the presence of oxidant compounds, such as periodate ions, may affect this process<sup>11</sup>, which suggests that the redox status of an extracellular environment, defined in terms of intensity (reduction potential;  $E_h$ ) and capacity (number of electroactive compounds)<sup>14</sup>, might be a significant proximity factor<sup>13</sup> in microorganism adherence to the vaginal mucosa.

Metronidazole (MTZ) (Fig. 1a) is an antibiotic used in the digestive, reproductive and skin systems. The mechanism of action consists in inhibiting the synthesis of nucleic acids. MTZ and other nitroimidazole derivatives are active redox compounds which perform a significant antibiotic activity based on intracellular reduction from a nitro group to a nitro radical ( $R-NO_2 + e^- \rightarrow R-NO_2^{\cdot-}$ ), which is the reason why they are widely used in various microbial ecosystems inside the animal's body, including the vaginal environment<sup>10,19</sup>.

Quinones are molecules that play important roles in living organisms, such as the  $e^-$  transfer in photosynthesis and in vitamin K. They are mostly benzoquinones, naphthoquinones and anthraquinones. Their important feature for this work is



**Figure 1** (a) Molecular structure of Metronidazol; (b) molecular structure of Hidroquinona.

their ability to act reversibly in redox processes. Currently, natural and synthetic quinone derivatives are being strongly studied because of their chemotherapeutic activity against diseases such as cancer; furthermore, they have antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties<sup>1,21</sup>.

Independently of its antibiotic nature, when MTZ is in the vaginal-mucus-physicochemical-environment, it may act as a redox effector interacting with other ubiquitous redox compounds such as quinines (Fig. 1b), and in biological processes that are affected by redox conditions, for example in microbial adherence to vaginal cells.

This work aimed to assess the effect of adding MTZ alone and MTZ with hydroquinone (H<sub>2</sub>Q) (as a model of ubiquitous redox compounds in biological systems) on *Lactobacillus acidophilus* adherence to ovine vaginal cells suspended in simulated vaginal fluid, in order to hierarchize the study of the electrochemical scenario as a systemic view.

## Materials and methods

### Ovine vaginal cells

Ovine vaginal epithelial cells (VECs) were taken with a sterile swab from the vaginal cavity of experimental animals.

This technique consists in separating the lips of the vulva, introducing the sterile swab into the dorsal commissure bypassing the clitoral fossa in dorsocraneal direction and rotating it in order to extract the cells.

Samples were put inside tubes containing 10 ml Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma®). After agitating the mixture for 2 min with a Vortex agitator, the swab was removed and VECs remained refrigerated (4 °C) until they were used. Before carrying out the trials, cells in the MEM medium were centrifuged at 200 g for 10 min. The sediment was resuspended in sterile saline solution (SS) and washed twice (200 g; 10 min) to eliminate native bacteria<sup>11</sup>. Finally, cells were resuspended in 3 ml synthetic vaginal fluid (SVF) to give a final concentration of 10<sup>4</sup> cells/ml (Thoma counting chamber).

Sterile swabs were used to obtain ovine vaginal fluid from the experimental animals (the same technique described to obtain the cells was used). Swabs were put in 4 ml SS, agitated in Vortex, and filtered with 0.2 µm (Millipore®). Synthetic vaginal fluid was also used, and it was prepared using the formula suggested by Owen and Katz<sup>12</sup> modified (glucose: 10 g/l; glycerol: 0.16 g/l; lactic acid: 2 g/l; acetic acid: 1 g/l; urea: 0.5 g/l; NaCl: 5.5 g/l; KOH: 1.4 g/l CaOH: 0.22 g/l; yeast extract: 3 g/l; pH: 6)<sup>4</sup>.

The strain used in this study was *L. acidophilus* ATCC 314 (USA), which was kept in suspension with skimmed milk at -20 °C until it was used. Bacteria were activated in modified LAPT broth (proteose peptone: 2%; yeast extract: 1%, glucose: 1% Tween 80: 0.1%; pH: 6.5) at 37 °C for 24 h with two picks every 12 h.

Bacteria were harvested by centrifugation at 3500 × g for 15 min at room temperature. Sedimented cells were washed twice with SS and resuspended in sufficient solution to give a final concentration of 10<sup>7</sup> cells/ml (Thoma counting chamber), corresponding to 10<sup>6</sup> UFC/ml (MRS agar). This bacterial suspension was used for the adherence assays, named bacteria.

### Adherence assays

In order to incubate VECs with *L. acidophilus* in various treatments, 0.5 ml of bacteria was added to 0.5 ml VEC suspension. The systems were incubated during 1 h at 37 °C. After incubation, the treatments were centrifuged at 70 × g for 10 min, then washed in accordance with the protocol suggested by Prats et al.<sup>16</sup>, and were resuspended in SS. Following the incubation period, aliquots of the resulting suspension were stained with Tinción 15 (Biopur®), then placed on microscope slides, and cells and bacteria were counted under the microscope (AxioLab Zeiss Jena Gm).

The MTZ solution (0.125 ml; 0.14 mmol/l) and H<sub>2</sub>Q solution (0.125 ml; 0.01 mol/l) were used for the experiments.

The treatments were: (i) bacteria and cells (Control), (ii) bacteria and cells supplemented with MTZ, (iii) bacteria and cells supplemented with H<sub>2</sub>Q, (iv) bacteria and cells supplemented with MTZ and H<sub>2</sub>Q. All the experiments were carried out in triplicate.

The results were expressed as an adhesion percentage (%), defined as the number of VECs with adhered bacteria, divided by the total number of VECs observed and multiplied by 100<sup>11</sup>.

### Molecular fractionation

Molecular fractionation of ovine vaginal fluid suspensions was done by putting 0.4 ml aliquots in a matrix of Sephadex G25<sup>®</sup> gel (Pharmacia). Gel calibration was carried out with Blue Dextran (MW: 2.106 Da; CAS No. 115-39-9) and Bromophenol Blue (MW: 669.97 Da; CAS No. 87915-38-6) following Cooper's technique (1984)<sup>3</sup>. Using a fraction collector (Roucaire, Retriever II, France), 26 fractions were recovered (2.8 ml each), which were measured for absorbance at 200 nm (Hitachi U, 1500 France).

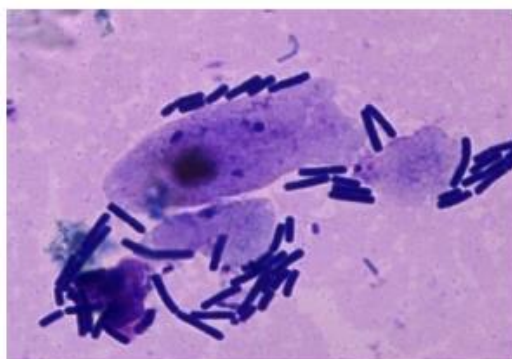
### Voltammetric measurements

Cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were used to characterize the electroactive components in the studied systems. A POL 150 (Radiometer Analytical, France)<sup>17</sup> equipment was used to record current/potential scans. The experiments were carried out with no oxygen after purging the system with O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub> for 3 min before performing each voltammetric scan. In every case, the supporting electrolyte used was KCl 0.04 mol/l. The working electrode was a vitreous carbon electrode; the reference electrode was a Pt foil, and every potential was measured in relation to a calomel standard electrode (CSE). Each sample underwent five repeated voltammetric scans until a reproducible cycle was reached, and the average for this value was found using the Trace-Master 5 software (Radiometer Analytical). CV scans started in the negative direction at +0.700 V up to -1.900 V with 0.025 V/s scan speed.

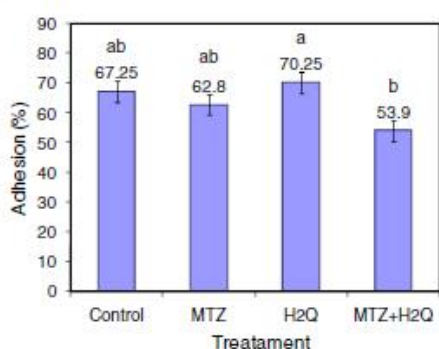
In order to study the electrochemical changes in the systems of VECs and bacteria supplemented with H<sub>2</sub>Q and MTZ, DPV scans were performed. Scans were performed between +0.500 V and -1.300 V (step duration: 0.4 s; width: 5 mV). The voltammetric cell contained 900 µl of analyte (constituted by bacteria in SS (0.5 ml; 10<sup>7</sup> cells/ml), the VEC suspension in SVF (0.5 ml), 0.125 ml of 10<sup>-2</sup> mol/l H<sub>2</sub>Q and 0.125 ml of 1.5 × 10<sup>-4</sup> mol/l MTZ), 2000 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO), 2000 µl O<sub>2</sub> - free distilled H<sub>2</sub>O and 100 µl of 2 mol/l KCl as supporting electrolyte. In every case, final MTZ and H<sub>2</sub>Q concentrations in the voltammetric cell were, respectively, 2.5 × 10<sup>-6</sup> mol/l and 1.7 × 10<sup>-4</sup> mol/l. In DPV, the current unit/potential unit (nA/mV) quotient was recorded for each reduction potential value. These values are linearly dependent on element concentration (Radiometer, 2002) and were used to determine the system-oxidant-status, following the expression used by Pidello<sup>14</sup>, defining the variable by adding the reduction potential (intensity factor) (E; Volts) multiplied by the electroactive compound concentration (capacity factor) in the various redox pairs in a given system:

$$\text{oxidant status} = \sum_{i=1}^{n(\text{par})} E_i(\text{mV}) \times [\text{oxidated species; nA/mV}]$$

MTZ, H<sub>2</sub>Q, DMSO and KCl compounds were proanalysis reactive and were used without additional purification.



**Figure 2** Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 to ovine vaginal epithelial cells suspended in synthetic vaginal fluid (SVF).



**Figure 3** Adhesion (%) of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 to ovine epithelial cells in systems treated with metronidazole (MTZ), hydroquinone (H2Q) and metronidazole plus hydroquinone. Similar letters indicate that there are no statistical significant differences ( $p < 0.05$ ).

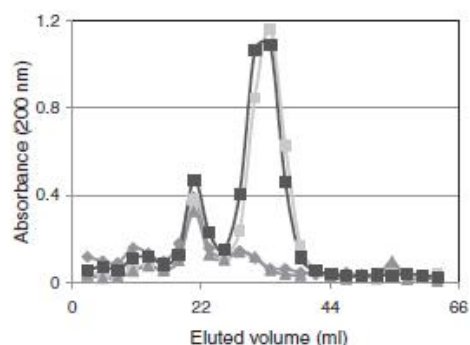
#### Statistical analysis

The Chi-squared distribution by means of the test of independence was used to analyze frequency in bacterial adherence studies. The *t*-Student test<sup>15</sup> was used to evaluate the differences between treatments in the voltammetric studies.

#### Results

##### Adhesion of *L. acidophilus* ATCC 314 to ovine vaginal cells

Figure 2 shows adhesion of bacterial cells in the studied system. Adhesion studies were conducted with aliquots of VEC suspension and *L. acidophilus* cells both unsupplemented and supplemented with MTZ, H<sub>2</sub>Q or MTZ and H<sub>2</sub>Q. Figure 3 shows the results of adding *L. acidophilus* to ovine vaginal



**Figure 4** Spectrophotometric behavior (200 nm) of fractions obtained after elution of ovine vaginal fluid suspensions alone (-◇-), supplemented with metronidazole (-△-), supplemented with hydroquinone (-□-), and supplemented with metronidazole plus hydroquinone (-x-), in Sephadex G25<sup>®</sup> gel.

cells, expressed as an adherence percentage as described in Materials and Methods.

The results show that adhesion of *L. acidophilus* ATCC 314 to ovine VECs with H<sub>2</sub>Q was significantly affected by the supplementation with MTZ plus H<sub>2</sub>Q ( $p < 0.0001$ ). In the latter case, adhesion decreased significantly. Moreover, differences were found between Control and systems supplemented with MTZ or with H<sub>2</sub>Q alone ( $p > 0.05$ ).

##### Spectrophotometric behavior of the studied suspensions

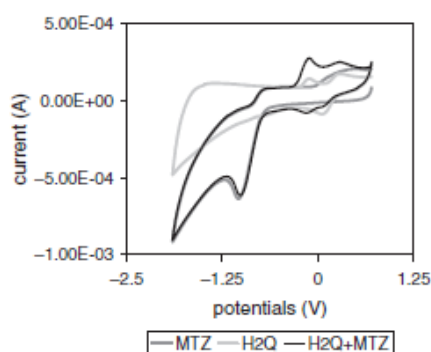
Figure 4 shows the spectrophotometric behavior of eluted solutions of unsupplemented and supplemented ovine vaginal fluid after fractionation with Sephadex G25. Absorbance values, measured at 200 nm, indicate that the fraction with greater molecular weight (excluded fraction) in the ovine vaginal fluid samples was only slightly increased when it was supplemented with H<sub>2</sub>Q or MTZ (13%). The absorbance values of the solution containing H<sub>2</sub>Q (0.1 l; 0.01 mol/l) had a very well-defined signal at 200 nm, which was observed in the fractions eluted with 30–40 ml, with an approximate 1.2 absorbance value, coinciding with the behavior observed in previous studies<sup>23</sup>.

MTZ molecules (0.14 mmol/l; 0.1 ml) were eluted with 20–30 ml, and these values coincided with the elution volume of ovine-vaginal-fluid-components, which showed a signal at wavelength 200 nm. Although the MTZ absorbance signal under these fractionation conditions linearly responds to higher concentration (data not shown), with the amounts used in these experiments this signal was not different from the absorbance of ovine vaginal fluid alone (Fig. 3).

##### Voltammetric behavior

###### MTZ and H<sub>2</sub>Q aqueous solutions

Figure 5 shows the result of CV scans performed between +0.700 and -1.900 V of the MTZ at a  $4 \times 10^{-3}$  mol/l final concentration with deoxygenated distilled water or with



**Figure 5** Cyclic voltammetry (CV) scans of metronidazole (MTZ), hydroquinone (H<sub>2</sub>Q), and metronidazole plus hydroquinone solutions. Every potential was measured against the CSE. Voltammograms started from a negative direction at +0.700 V with 0.025 V s<sup>-1</sup> scan speed. For further details see Materials and Methods.

an H<sub>2</sub>Q  $7 \times 10^{-4}$  mol/l aqueous solution, and H<sub>2</sub>Q aqueous solutions ( $7 \times 10^{-4}$  mol/l). The solution containing MTZ alone had a single reduction peak (-1.034 V) and its corresponding oxidation peak (-0.758 V), with  $E_{1/2} = -0.890$  V and  $\Delta E_p = 0.276$  and, therefore, electron transfer was irreversible under these conditions. The solution containing H<sub>2</sub>Q alone showed a single peak in the cathodic wave (+0.086 V), whereas in the anodic wave there were two peaks corresponding to oxidation occurring in two stages of one electron each (-0.103 V and +0.275 V), which is characteristic of quinone behavior in unbuffered aqueous systems<sup>18</sup>. When two compounds constituted the same solution, MTZ did not change its electroactive behavior, while H<sub>2</sub>Q increased the intensity of anodic peaks and showed two signals corresponding to complementary cathodic peaks.

#### Ovine vaginal cell and *L. acidophilus* ATCC 314 suspensions

Based on the adherence percentages shown in "Adhesion of *L. acidophilus* ATCC 314 to ovine vaginal cells" section and the results observed in "MTZ and H<sub>2</sub>Q aqueous solutions" section, in order to study the electrochemical characterization of systems, only the systems supplemented with H<sub>2</sub>Q, and MTZ plus H<sub>2</sub>Q were retained. DPV scans indicate that these systems showed a total concentration of electroactive compounds (nA/mV) of  $158.2 \pm 4.7$  and  $166.7 \pm 11.2$  respectively, and these values did not differ statistically if compared between each other ( $p < 0.05$ ). However, when analyzed by potential reduction ranges, the treatments differed significantly at various potential values ( $p < 0.05$ ). While the systems supplemented with H<sub>2</sub>Q alone had greater electroactive compound concentrations in the -0.2/-0.4 V and -0.6/-0.8 V ranges, the systems supplemented with MTZ and H<sub>2</sub>Q had greater concentrations in the 0.4/0.2 V and -1.0/-1.2 V ranges (Fig. 6). The calculation of oxidant status, including only the potential ranges which differed significantly, showed  $-40.2 \pm 1.5$  and  $-44.3 \pm 1.1$  values for the treatments supplemented with H<sub>2</sub>Q or MTZ plus H<sub>2</sub>Q

respectively, which also differed significantly when they were compared ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6, inserted figure).

## Discussion

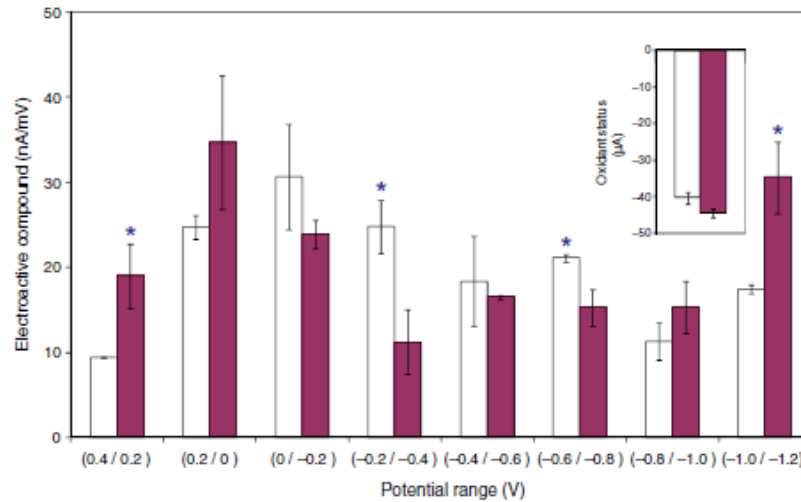
Given the fact that the redox status is a conditioner of bacterial adherence, in this work we studied systems where: (i) there was an intention to modify adherence by adding an imidazole molecule (MTZ), which is a potential effector of the redox status due to its chemical structure, and (ii) there was also an intention to modify speciation of this molecule by adding another redox effector (H<sub>2</sub>Q).

Under certain conditions and concentrations, MTZ inhibits *Lactobacillus* spp. growth (from 1000  $\mu$ g/ml), while under other conditions it stimulates growth (between 128 and 256  $\mu$ g/ml)<sup>22</sup>. In this work, 25  $\mu$ g/100 ml of MTZ were employed, which would be innocuous for the strain used<sup>22</sup>. This fact was confirmed in this work, showing that adherence does not differ significantly when the control and the system supplemented with MTZ are compared. Furthermore, it was observed that adherence is not different in the control compared to the system supplemented with the quinone compound used (H<sub>2</sub>Q) to modify MTZ electrochemical behavior. However, the results showed that *L. acidophilus* ATCC 314 adherence to ovine VECs changed by the presence of the MTZ and H<sub>2</sub>Q combination. This result suggests that the chemical composition and redox status<sup>20</sup> of the system were modified.

The spectrophotometric characterization of the various mixtures (Fig. 4) supports this interpretation, as it shows that when MTZ and H<sub>2</sub>Q molecules constituted the same solution there is a slight increase in the fractions with greater molecular size after fractionation with Sephadex G25. In addition, as the absorbance scan was performed at 200 nm, the neoformed compounds eluting at this fraction were unsaturated and had a greater molecular mass than H<sub>2</sub>Q.

Voltammetric scanning (VS) of pure compound aqueous solutions (Fig. 5) provided a clear signal of MTZ with  $E_{1/2}$  value of -0.890 V, which is therefore moved toward negative potentials in relation to the values presented in the bibliography<sup>6,7</sup>. Zuman and Rupp<sup>26</sup> explain that these movements, which occur both in aqueous means and in solutions with different percentages of organic solvents, are due to pH increase and to the existence of an acid-base balance that precedes the transfer of the first e<sup>-</sup> of the R-NO<sub>2</sub> group to form the nitro radical. This interpretation, which suggests a possible neoformation of electroactive species, might explain the results obtained in an aqueous means, which is a potential proton donor. On the other hand, CV scans also show that the presence of both MTZ and H<sub>2</sub>Q changes the electroactive compound concentration in potentials ranging between -0.500 and +0.500 V, indicating that each mixture has a characteristic oxidant status, which helps anticipate that, as these mixtures are redox effectors, they generate significantly different electroactive behaviors in the systems where they are included<sup>20</sup>.

After performing DPV scans, when the electroactive behavior in the H<sub>2</sub>Q solution and the H<sub>2</sub>Q and MTZ mixture in the presence of ovine cells and bacteria was grouped by potential ranges (Fig. 6), significant differences between



**Figure 6** Number of electroactive compounds (nA/mV) in suspensions formed by ovine vaginal cells and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 supplemented with hydroquinone (□) and metronidazol plus hydroquinone (■), determined from DPV scans within +0.4 and -1.2 V potential ranges. Values were grouped at 0.2 V intervals. The inserted figure shows the oxidant status in each of the systems considered. Bars on the columns show the standard error of the mean. An asterisk over the columns indicates that there are significant differences at  $p < 0.05$ . For further details see Materials and Methods.

treatments were observed at some ranges ( $p < 0.05$ ). Using the concept of oxidant status led to overcome the evident difficulty of interpreting the influence that those partial differences had over adherence, as it helped compare the redox situation systemically. The oxidant status, calculated using the ranges that differed significantly ( $p < 0.05$ ), indicates that this variable had a higher value in the systems supplemented with the H<sub>2</sub>Q and MTZ combination (Fig. 6, inserted figure). Moreover, as the expression that defines oxidant status (see Materials and Methods) confirms that if there is a given concentration in an electroactive compound A with an  $E_1$  potential, this same concentration in a compound B with an  $E_2$  potential (being  $E_2 < E_1$ ) will originate a significantly greater oxidant status. Therefore, it may be concluded that although the H<sub>2</sub>Q and MTZ combination changes the number of redox compounds compared with H<sub>2</sub>Q alone at various potentials, an increase in the redox status will occur due to a concentration increase in the lowest negative potentials within the studied range, that is, between -1.0 and -1.2 V. Based on this analysis, an increase in low-potential compounds should be associated to a decrease observed in the adherence phenomenon. In other words, adherence is reduced when there is an increase in low-potential redox couples which, under normal circumstances in a vaginal system (potentials greater than -1.0 V), should behave as reducers. This result coincides with the results indicated in the bibliography, which show that cell-cell adherence is induced by oxidant agents<sup>20</sup>.

Since MTZ is an antibiotic having redox behavior commonly used in both veterinary and human medicine, this paper aims to demonstrate the importance of considering how the environment in which it must work can be modified and consequently affect the speciation of the molecule,

finally influencing bacterial adhesion. Although the redox nature of this complex relationship is not explained in this work, the results show that the study of behavior and fluctuations of the redox compounds that compose the vaginal fluid, in relation to concentration and species<sup>20</sup>, must be hierarchized in order to better contribute to understanding the early stages of microbial colonization in animal body cavities, such as the vaginal environment. Because of the results we wonder: if a given strain considered potentially probiotic fails to form biofilm, should not we investigate the redox conditions present in the medium before discarding their effectiveness? And on the other hand: could the redox status be modified through the incorporation of effector molecules in order to prevent pathogenic bacterial colonization?

## Ethical disclosures

**Protection of human and animal subjects.** The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this study.

**Confidentiality of data.** The authors declare that no patient data appear in this article.

**Right to privacy and informed consent.** The authors declare that no patient data appear in this article.

## Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests

## Acknowledgment

Financing: Proyecto "Efecto de cambios de pH en suspensiones de líquidos biológicos sobre el comportamiento de un electrotractor antraquinónico extracelular". 1 VET 135 Res C.S. 979/2012. Secretaría de Ciencia y Técnica – Universidad Nacional de Rosario.

The authors appreciate the comments made by the reviewers of this article.

## References

- Al-Malki AL, Sayed BMC. Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa- $\beta$ . *BMC Complement Altern Med*. 2014;3:282.
- Bollo S, Nuñez-Vergara LJ, Bontá M, Chauviere G, Périé J, Squella JA. Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megalol and sotod nitroimidazole derivatives. *J Electroanal Chem*. 2001;511:46–54.
- Cooper TG. *Instrumentos y Técnicas de Bioquímica*. Barcelona: Reverté ed; 1984.
- Coletti Zabala T, Ferrari F, Zerbato ME, Perotti E, Pidello A. Adherencia de *Lactobacillus acidophilus* a células epiteliales vaginales caninas y ovinas. XIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas Facultad de Ciencias Veterinarias ISSN N° 1667-9326. UNR ed; 2012. p. 87–8.
- Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:881–90.
- La-Scalea MA, Serrano SHP, Gutz IGR. Voltammetric behaviour of Metronidazole at Mercury electrodes. *J Braz Chem Soc*. 1999;10:127–35.
- Leach SC, Weaver RD. Polarographic analysis of heterocyclic nitrogen compounds. *J Electroanal Chem*. 1981;129:213–27.
- McCormick BA. Invasion mechanisms of *Salmonella*. In: Lamont RJ, editor. *Bacterial invasion of host cells*. New York: Cambridge University Press; 2004. p. 1–24.
- Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci*. 2001;84:1294–309.
- Moreno NJ, Mason RP, Docampo R. Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *J Biol Chem*. 1984;259:8252–9.
- Otero MC, Nader-Macías ME. *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. In: Mendes-Vilas A, editor. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Formatex; 2007. p. 749–57.
- Owen DH, Katz DF. A vaginal fluid simulant. *Contraception*. 1999;59:91–7.
- Pidello A. Signification écologique du potentiel redox et de la capacité redox en sédiment d'eau douce. In: Montuelle B, editor. *Qualité et gestion des sédiments d'eau douce. Éléments physico-chimiques et biologiques*. Paris: Cemagref Editions; 2003. p. 105–33.
- Pidello A. Principes de chimie redox en écologie microbienne. Paris: Éditions Quae; 2014. p. 144.
- Pimentel Gomez F. *Curso de estadística experimental*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Hemisferio Sur; 1978.
- Prats A, Boucourt R, Rodriguez S. Metodología para la determinación de la adherencia in vitro de lactobacilos a las células intestinales de cerdos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2005;39:205–12.
- Radiometer. POL150 Polarographic Analyzer; 2002. User's Manual.
- Rafiee M, Nematollahi D. Voltammetry of electroinactive species using Quinone/Hydroquinone redox: a known redox system viewed in a new perspective. *Electroanalysis*. 2007;19:1382–6.
- Rosenblatt JE, Edson RS. Symposium on antimicrobial agents. *Metronidazole*, vol. 62. Division of Infectious Diseases and Internal Medicine, Mayo Clinic; 1987. p. 1013–7.
- Sen CK, Roy S. Antioxidant regulation of cell adhesion. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:377–81.
- Shang Y, Zhang L, Jiang Y, Li Y, Lu P. Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: the role of reactive oxygen species. *Chemosphere*. 2014;100:42–9.
- Simoës JA, Aroutcheva AA, Shott S, Faro S. Effect of metronidazole on the growth of vaginal lactobacilli *in vitro*. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2001;9:41–5.
- Speranza G, Gottardi G, Pederzoli C, Lunelli L, Canteri R, Pasquardini L, Carli E, Lui A, Maniglio D, Brugnara A, Anderle M. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*. 2004;25:2029–37.
- van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev*. 1990;54:75–87.
- Zerbato ME, Pidello A. Efecto de la interacción entre la antraquinona disulfonato (AQDS) y las sustancias húmicas. Congreso de la Sociedad de Biología de Rosario. XXVIII Reunión Anual; 2008. p. 216. ISSN N° 1668-0154 UNR ed.
- Zuman P, Rupp E. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic nitro compounds: Part VIII. Effects of solvents and surfactants on current-voltage curves obtained with DC and differential pulse polarography. *Electroanalysis*. 1995;7:132–7.