



Evaluación del efecto antimicrobiano de saponita de Cu y Cu/Mg

Jiménez Hernández Abraham, Soto López Ismael, Meléndez Balbuena Lidia, Solano Ramírez Nereida, Muñoz Ávila Susana

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Departamento de Química Inorgánica Ext 7376. Avenida san Claudio No 105h., Puebla, Puebla. C.P. 72000. México.

*Autor para correspondencia: Alukar3@hotmail.com

Recibido:

26/mayo/2016

Aceptado:

16/agosto/2016

Palabras clave

Microorganismos,
Inhibición, Cobre

Keywords

Microorganisms,
Inhibition, Copper.

RESUMEN

Una vez realizada la síntesis y caracterización de Saponita, se procede a la preparación de sensidiscos con Mg, Al, Cu, en diferentes concentraciones, el Cu posee propiedades bactericidas es un inhibidor natural de crecimiento de microorganismos, de Igual manera Al y Mg, las características de las arcillas, nos permiten dopar estos materiales siendo así utilizados como catalizador, ya que presenta una alta acidez superficial por sustituciones isomórficas en la capa tetraédrica y con la incorporación de iones metálicos obtendremos materiales con diferentes propiedades de tipo bactericida, catalizador o aislante. El objetivo de este proyecto es emplear y comprobar la efectividad de las arcillas dopadas con diferentes concentraciones de Cu, Mg y Al, para realizar una evaluación el efecto bactericida e inhibitorio de estos materiales contra distintos agentes etiológicos en una prueba tipo antibiograma.

ABSTRACT

After the synthesis and characterization of saponite, proceed to preparation sensidiscs with Mg, Al, Cu, in different concentrations, Cu has bactericidal properties is a natural inhibitor of growth of microorganisms, likewise Al and Mg, the characteristics of clays, allow us undoped these materials thus being used as a catalyst, and having a high surface acidity of isomorphic substitutions in the tetrahedral layer and the incorporation of metal ions obtain materials with different properties bactericidal type, catalyst or insulating. The objective of this project is to use and test the effectiveness of clays doped with different concentrations of Cu, Mg and Al, for an evaluation bactericidal and inhibitory effect of these materials against different etiologic agents in antibiogram test type.

Introducción

Existe una amplia gama de materiales que puedan ser aplicados en catálisis, almacenamiento molecular, separación y purificación de líquidos y gases, entre otros. Dentro de las nuevas clases de sólidos porosos que han surgido, como las zeolitas modificadas y sintéticas o las arcillas, se seleccionó a las arcillas tipo saponita con características ácidas, la hidrotalcita con características básicas y la hidroxiapatita que de acuerdo a su composición puede tener ambas. Dichos materiales pueden ser modificados en su composición para direccionar sus propiedades a una actividad antibacteriana.

Las arcillas (Diez et al., 2007) son materiales con aplicaciones industriales, las saponitas han sido las que mayor atención han recibido, principalmente para ser utilizadas como catalizadores, removedores de impurezas, soporte para otros materiales, o grupos funcionales en sus estructura, entre otras aplicaciones., en este trabajo se plantea la utilización de saponitas con fines antimicrobianos en diferentes agentes etiológicos, empleando Mg/Al/Cu, el cobre tiene propiedades fungicidas, y antimicrobianas(Grass et al., 2011), por su parte el Mg potencializa el efecto del Cu, teniendo propiedades similares pero con un menor impacto bactericida para los microorganismos, Al como un inhibidor natural para el crecimiento bacteriano (Ikegami et al., 1999) en productos de higiene oral, aparatos médicos higiénicos, antisépticos y una gran cantidad de aplicaciones útiles. Con la incorporación del cobre a la estructura de la saponita se plantea cambiar sus propiedades químicas, para así obtener en este tipo de arcilla, un efecto antibacteriano.

Los sensidiscos son discos de papel filtro los cuales contienen antibióticos u otras sustancias, antibacterianas o bacteriostáticas, a concentraciones específicas las que alcanzan en los sistemas biológicos, cada compuesto está plenamente identificado, por lo que es fácil identificar en un cultivo de agar en una caja Petri, los halos de sensibilidad o la resistencia del microorganismo, a cada uno de ellos.

Metodología

Elaboración de Sensidiscos de saponita de cobre método 1

Debido a las propiedades de la saponita de cobre, para realizar la prueba de inhibición de las bacterias se tuvo que hidratar esta arcilla con agua desionizada para así poder comprimirse en el molino de bolas (Figura 1). Posteriormente se obtiene un comprimido con un

diámetro igual a 1.5 cm., a partir de esto se cortan 3 sensidiscos con un diámetro de 0.5 cm. En esta parte del proyecto se utilizaron 16 sensidiscos (Figura 2), 8 de los cuáles se realizaron a un concentración de Cu: 5.67 y el resto a una concentración más baja de Mg-Cu 1:1.

Estos sensidiscos fueron secados en la estufa a una temperatura de 72 °C, después fueron pesados con la finalidad de obtener un peso estándar para realizar la prueba, el peso utilizado de los sensidiscos fue de 0.01800 g.



Figura 1. Molino de bolas para hacer sensidiscos

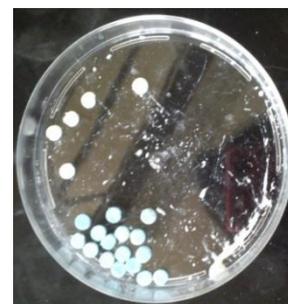


Figura 2. Sensidiscos de saponita de Cu

Elaboración de sensidiscos de saponita de cobre y magnesio Método 2

Al tener terminada la síntesis, hidrotalcita Mg/Al con una relación metálica molar de 2 a 1 a un pH de 11, con el método de irradiación de microondas con baño ultrasónico. Se procede a la elaboración de sensidiscos mediante una perforado de papel estándar, la cual se recuperan los discos perforados, se emplea papel filtro marca Whatman, de tipo 3 con espesor de 11.0 cm, este espesor es óptimo ya que absorbe de manera fácil y optima las solución de saponita, de esta manera se impregnan los discos de papel filtro con la solución de Mg/Al, las características obtenidas para dichos sensidiscos fueron:

La técnica utilizada fue de impregnación en solución, durante 24 horas a una temperatura de 320 °C, para obtener un desecado uniforme y una impregnación completa del material, el resultado son discos, con las características ya mencionadas, presentando una rigidez y en caso del Cu/Mg, una coloración azul clara (Figura 3).



Figura 3 Sensidiscos de saponita de Cu.

Después se pesaron con la finalidad de obtener un estandarizado en para realizar la prueba, el peso utilizado de los sensidiscos fue de 0.01400 g posterior a la perforación, una vez impregnados el peso fue de 0.01600 g, se emplearon 16 piezas, para nuro estudio, una vez verificando y estandarizando la metodología de obtención, estabilidad y calidad de los sensidiscos, se procede a la utilización de los mismos para comprobar la actividad antimicrobiana de los sensidiscos impregnados con las arcillas respectivas.

Técnicas de Aislamiento y Recuento

Existen diversos métodos para conseguir la separación, la mayoría de ellos se basan en la inmovilización y separación de las células microbianas en la superficie de unos cultivos sólidos. Al colocar (estriar) una célula bacteriana o una levadura en un lugar del medio de cultivo, ésta quedará inoculada en ese lugar, por la absorción de los nutrientes o los inhibidores tendremos el desarrollo del microorganismo deseado.

Esto nos permite distinguir las diferentes poblaciones microbianas que se encuentran en la muestra y separarlas transfiriendo una colonia de cada tipo a un nuevo medio de cultivo, a estos cultivos los consideraremos "puros ya que sólo tendremos un tipo microorganismo. (El fundamento es válido teniendo en cuenta sólo microorganismos cultivables (Ramírez et al., 2012).

Métodos de Siembra

Sembrar: Es colocar el material bacteriológico en el medio de cultivo para promover su crecimiento, desarrollo y posteriormente su multiplicación. Las siembras pueden ser primarias: cuando el material es inoculado en los medios por primera vez, Secundaria: cuando el material a inocular procede de una siembra primaria (Tortora et al., 2012), se emplean dos tipos de

agar para este trabajo uno es el agar EMB es un medio de cultivo usado en el aislamiento y diferenciación de *Escherichia coli*, es semisólido, y está destinado al cultivo en placa, un medio de tipo selectivo/diferencial, adecuado para el crecimiento de enterobacterias, inhibe el crecimiento de bacterias Gram (+), permite la diferenciación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, dando lugar a colonias incoloras, las no fermentadoras, y colonias de color azulado-negro con cierto brillo metálico, las fermentadoras. Las colonias de *E. coli* sobre agar Levine miden 2-3mm de diámetro.

El segundo agar nutritivo es un medio de cultivo usado para todo tipo de bacteria. Es muy útil porque permanece sólido incluso a relativamente altas temperaturas. Además, crecimiento bacteriano en este agar lo hace sobre la superficie del medio, es de tipo semisólido, por lo que se distinguen las colonias pequeñas. Una vez preparado los medos se procede a su esterilización en una autoclave, durante 30 minutos a una temperatura de 180 °C, una vez realizado este proceso y dejado enfriar (Temperatura ambiente, evitando la gelificación) los medios son vertidos en placas Petri de plástico pequeñas llenándolas a la mitad, se deja gelificar el agar y se procede a la inoculación de los microorganismos, (Figura 4).

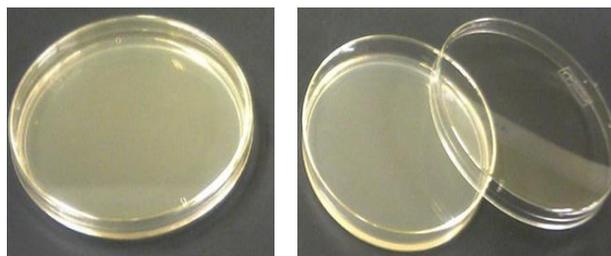


Figura 4. Placa Petri con agar gelificado.

Concluido el llenado, enfriamiento de las placas Petri se procede a la inoculación de los microorganismos *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp* y *Pseudomonas aeruginosa*, Por medio de la técnica de estriado tipo cola de ratón (Gómez, 2006) Terminada la inoculación, se separan las placas por grupos marcando el microorganismo con el cual fue inoculada cada placa, posteriormente se colocan los sensidiscos de igual manera para su fácil reconocimiento se divide la placa en dos, donde en un lado se coloca un disco elaborado con el método 1 y otro elaborado con la técnica 2, esto con la finalidad de apreciar cuál de los dos discos presenta mayor inhibición del microorganismo, (Figura 5).

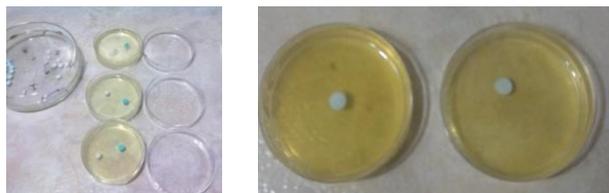


Figura 5. Sensidiscos de saponita de Cu/Mg.

Prueba tipo antibiograma

El antibiograma se realiza para cuantificar la sensibilidad o resistencia de un microorganismo a un determinado grupo de antibióticos. El antibiograma se emplea en el laboratorio clínico y de microbiología para estudiar la efectividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones. Se considera un antimicrobiano a las sustancias con la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Pueden ser naturales, sintéticos o semi sintéticos. La utilidad del antibiograma es la instauración de antibiótico o agente que funcione como uno.

Las primeras pruebas se realizaron inoculando la superficie de una placa de agar con el microorganismo en estudio, colocando pequeñas cubetas (de metal o vidrio) sobre el agar y agregando las soluciones de los diferentes antimicrobianos dentro de dichas cubetas. Los agentes antimicrobianos difundían en el medio en forma radial alrededor de la cubeta e inhibían el desarrollo del microorganismo en la zona donde su concentración era suficientemente alta.

Las áreas de inhibición grandes indicaban una actividad antimicrobiana más efectiva. Este método fue modificado en 1947 Bondi et al., incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel de filtro. Fue un paso adelante gigantesco ya que el uso de los discos de papel permitía preparar un gran número de pruebas idénticas y almacenarlas para uso futuro. El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos o agentes químicos los cuales posean propiedades similares a estos (Cantón, 2002).

Una vez colocados los sensidiscos de Al/Mg y Cu se incuban las placas por un periodo de 16-24 horas a 32-35 °C con monitoreo constante colocando las placas de cabeza (la tapa a si abajo para evitar la condensación y esta precipite sobre el agar) al cabo de este tiempo se evalúa el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la

zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias publicadas por el CDC de USA. Con esta referencia se compara con el resultado obtenido en nuestra placa para saber si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente (S, I, R) en las placas. (Kahlmeter et al., 2003), la sensibilidad se mide dependiendo del tamaño del halo de crecimiento alrededor del sensidisco, es decir si nuestro material inhibe aparecerá un halo (Área de inhibición no crecimiento del microorganismo) alrededor del disco, los halos son medidos con una regla y se toma el radio partiendo a partir del disco como punto de referencia, si el halo es < 0.9 mm se dice que presenta resistencia al antimicrobiano o es poco efectivo, si presenta ≥ 1.1 cm a 2.1 es mediamente o altamente sensible, si el halo es > 2.2 cm es altamente sensible. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2010).

Resultados y discusión

Las pruebas de inhibición tipo antibiograma para hidrotalcita de Cu con una relación metálica molar de 1/1 y pH de 11 empleando el método de irradiación con microondas (Prihod'ko et al., 2004) permite observar inhibiciones microbianas dadas las propiedades antibactericidas del Cu demostrando ser efectivo con *E. coli* (Tabla 1). Saponita Cu con una relación metálica molar de 1/1, por su parte Mg/Al con relación molar de 2/1 presenta un alto nivel de inhibición dado que al agregar Mg potenciamos el efecto bacteriostático generando halos de inhibición bien delimitados (Tabla 2), nuestro material presenta características para la inhibición bacteriana (Figura 6).



Figura 6. Halos de inhibición para *E. coli*

Los valores presentados para la tabla 1 son valores medios obtenidos de un total de 30 placas empleadas como muestra.

Tabla 1. Inhibición *E. coli*.

Sensidiscos de papel filtro relación Molar 2/1 Mg/Al		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
>/=1.75 cm	>/=2.0 cm	>/=2.1 cm
>/=2.0 cm	>/=2.1 cm	>/=2.4 cm
Sensidiscos comprimidos filtro relación Molar 2/1 Mg/Al		
>/=1.98 cm	>/=1.9 cm	>/=2.1 cm
>/=1.8 cm	>/=1.75 cm	>/=1.9 cm

Los valores presentados para la tabla 2 son valores medios obtenidos de un total de 90 placas empleadas como muestra, divididas en grupos de 30.

Tabla 2. Inhibición Mg/Al Relación 2.1 Molar.

<i>Escherichia coli</i>	
Concentración Cu: 1:1 relación metálica sensidisco papel filtro	Concentración Cu: 1:1 relación metálica sensidisco comprimido
>/ 1.7 cm.	>/1.4 cm.
>/1.2 cm.	>/1.0 cm.

Conclusiones

La saponita de cobre presenta propiedades bactericidas para las cepas *E. coli*, ya que se observan distintos halos de inhibición para los dos tipos de discos empleados. A la concentración de Cu: 1:1 se obtuvieron halos de inhibición con diámetros mayores a > 1.0 cm, donde los discos impregnados de papel filtro presentan mayores halos de inhibición respecto a sus contrapartes comprimidas, de esto podemos entender que la liberación de los iones metálicos es rápida y prolongada. La combinación Mg:Al 2:1 donde los halos presentan un tamaño poco mayor con respecto a Cu, los halos >a 1.5 cm y un máximo de 2.4 cm en la utilización de discos de papel filtro, por su parte los discos de tipo comprimido presentan un ligera disminución de diámetro en 0.1 a 0.4 mm respecto a los otros Sensidiscos, podemos concluir la efectividad del dopaje con iones metálicos a las arcillas como antimicrobianos, siendo ambas combinaciones efectivas.

Referencias

- Cantón R., (2002). Lectura interpretada del antibiograma: ¿Ejercicio intelectual o necesidad clínica?. *Enfermedad Infecciosa Microbiología Clínica*, 20, pp. 176-185.
- Calvo J.P., Alonso A.M., García del Cura M.A. (1989). Models of Miocene marginallacustrine sedimentation in the Madrid Basin (Central Spain). *Palaeogeog., Palaeoclim., Palaeoecol.*, 70: 199-214.
- Bisio C., Gatti G., Boccalesri E., Marchese L., Superti G.B. (2008). Understanding physicochemical properties of saponite synthetic clays. *Microporous Mesoporous Mater.*, 107: 90-101.
- Brewer R. (1976). *Fabric and mineral analysis of soils*. R. E. Krieger Pub. Co., Huntington, Nueva York, 482 págs.
- Buurman, P. (1975). *Possibilities of paleopedology*. *Sedimentology*, 22: 289-298.
- Brindley G.W., Brown G. (1980). *Crystal structures of clay minerals and their X-ray identification*. Editado por G.W. Brindley y G. Brown. Mineralogical Society, Londres.
- Fusetani N., Clare A.S. (2006). *Antifouling Compounds*. Germany: Springer Berlin Heidelberg Fraga B.M. (1998). Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Report.*, 14: 73-92.
- García M.P., Paredes S.F., Fernández B.M.T. (1994). *Microbiología clínica práctica*, Editorial Servicio Publicaciones UCA.
- Gómez M.O. (2006). *Técnicas bacteriológicas básicas seminario microbiología general*. Editorial UNAM México.
- Greenberg E.P. (2003). Bacterial communication and group behavior. *The Journal of Clinical Investigation*. 112: 1288-1290.
- Heidelberg J.F., Heidelberg K.B., Colwell R.R. (2002). Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5488-5497.
- Hellio C., Clare A.S., Marechal J.P., Véron B., Bremer G., Le Gal Y. (2004). Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany Coast (France) *Marine Biotechnol.*, 6: 67-82.
- J. Tortora G., Berdell R. F., Case C. L. (2012). *Introducción a la microbiología* (Ed 2), Editorial EUNED, México.
- Kawi S., Yao Y.Z. (1999). Saponite catalysts with systematically varied Mg/Ni ratio: synthesis, characterization, and catalysis. *Microporous Mesoporous Mater.*, 33: 49-59.



Lewis Al., Keevil C.W. (2004). The Viability of Antimicrobial Copper as a Hygienic Material for HVAC System Components; a white paper for Copper Development Association Inc. and International Copper Association. Ltd.

Lewis Al. (en revisión), The Antimicrobial Viability of Copper Alloys fo Inhibit Cross-Contamination in the Healthcare and Food-Processing Industries: a white paper for Copper Development Association Inc. and International Copper Association, Ltd.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, (2010). Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. NCCLS, Wayne, PA.

Prihod'ko R., Hensen E.J.M., Sychev M., Stolyarova I., Shubina T.E., Astrelin I., van Santen R.A. (2004).

Physicochemical and catalytic characterization of non-hydrothermally synthesized Mg-, Ni- and Mg-Ni-saponite-like materials. *Microporous Mesoporous Mater.*, 69: 49-63.

Ramírez L., González G.A., Ávila de N. (2012). Bacteriología Clínica Taxonomía Básica, Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Corrales

Suquet H., de la Calle C., Pezerat H. (1975) Rev. (2015). Swelling and structural organization of saponite. *Clays Clay Miner.*, 2: 1-9.