

Efecto del anión del hidróxido doble laminar ZnAl en la intercalación con estreptomycin para la inhibición de *Escherichia coli*

Ruiz Hernandez Itan Homero¹, Guerra González Roberto¹, Vaca Toledo Diego¹, Santana Cruz Alejandra^{2*},
Flores Moreno Jorge Luis², Jaime Flores Nataly²

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciencias Básicas, Avenida Francisco J. Múgica S/N, Morelia, Michoacán, C.P. 58030, México.

²Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México, C.P. 02200, México.

Autor para correspondencia: sca@azc.uam.mx

Recibido:

14/julio/2021

Aceptado:

27/octubre/2021

Palabras clave:

HDL,
inhibición,
E. coli

Keywords:

HDL,
inhibition,
E. coli

RESUMEN

En este trabajo se estudió la preparación material híbrido de carácter orgánico/inorgánico, a base de estreptomycin con hidróxidos dobles laminares (HDL), la intercalación de la estreptomycin dentro de los HDL se llevó a cabo por intercambio iónico, estudiando la influencia del anión original en el HDL como son NO₃ y Cl⁻. La caracterización de los materiales se llevó a cabo por las siguientes técnicas, difracción de rayos X, espectroscopia de IR por transformada de Fourier-ATR. La evaluación de la actividad antibacteriana de estos materiales se llevó a cabo en cultivos de cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922 aplicando la técnica de difusión en agar para la determinación de positiva de los materiales, por último, se realizó la cinética de inhibición bacteriana en medio líquido a diferentes concentraciones del material híbrido para determinar la concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT

In this work, we studied the preparation of hybrid material organic/inorganic in nature, based in streptomycin using layered double hydroxide (LDH), the intercalation of streptomycin into the HDL was carried with ionic exchange, studying the influence of the original anion within LDH which are NO₃ and Cl⁻. The characterization of the material were studied in X-ray diffraction, IR-FT-ATR. The evaluation of the antibacterial activity was done with *Escherichia coli* strain ATCC 25922, applying the material in the agar, also known as agar diffusion to test and determinate if the hybrid materials became positive to it. For last a kinetic were carried in liquid media using different concentration of hybrid material to determinate the minimal inhibitory concentration.

Introducción

En la actualidad existe una demanda muy activa para lograr avances en la liberación controladas de moléculas biológicas o químicas y que son sensibles al ambiente, la mayoría de los nuevos fármacos que están siendo desarrollados y comercializados por las compañías farmacéuticas son de carácter molecular (Kidane A et al., 2015). La inmovilización de moléculas con actividad biológica dentro de matrices inorgánicas laminares biocompatibles (aquellos materiales que se forman para conseguir la combinación de propiedades (Askeland D. R. 2017) permite su aislamiento del ambiente mejorando a la vez su estabilidad y almacenamiento a largo plazo de esta forma, la estabilización de moléculas activas en materiales inorgánicos biocompatibles constituye una ruta interesante para la preparación de materiales híbridos que posean tanto las ventajas de las propiedades del material inorgánico receptor como las del material orgánico huésped, en un mismo material. Aparte del problema del almacenamiento y estabilidad de las especies activas se puede encontrar uno más (Morales Irigoyen et al., 2015) ligado al proceso de liberación de las mismas. Un sistema de liberación ineficiente puede resultar en altas concentraciones del fármaco causando posibles efectos secundarios en el lugar donde se pretenda actuar. Este problema puede encontrar solución si se diseñan nuevos sistemas de administración y liberación controlada de los principios activos. Estos sistemas deberán proporcionar perfiles cinéticos en los cuales la concentración de la molécula permanezca en los niveles de concentración adecuados y durante un periodo de tiempo adecuado (Morales Irigoyen et al., 2015).

Los hidróxidos dobles laminares, son arcillas aniónicas denominadas como brucitas con la habilidad de retener o poseer fármacos, cuya función permite ser altamente viable para la liberación controlada y prolongada de dichos compuestos. Su fórmula química es $[M(II)_{1-x}M(III)_x(OH)_2(A^{n-})_{n/x}]_m \cdot H_2O$, donde MII es Zn^{+2} y MIII Al^{+3} , el cual se encuentra agrupado octaédricamente por 6 grupos OH^- , en forma de láminas cargadas positivamente, para compensar esta carga, se introducen aniones que por electronegatividad compensan dicha carga, de acuerdo con S. Miyata (1983) son: $OH^- > F^- > Cl^- > Br^- > I^-$ para aniones monovalentes, mientras que para aniones divalentes: $CO_3^{2-} > NO_3^- > SO_4^{2-}$. Adicionalmente estudios realizados por (Santana Cruz A. 2014) Muestran que el grupo nitrato posee preferencia sobre el cloruro por lo que se acomoda así: $NO_3^- > Cl^- > CO_3^{2-}$

La síntesis de materiales híbridos permitiría eliminar la resistencia a los antibióticos, al actuar como vehículos atrayentes para *E. coli*, recordando de la bacteria ocupa los cofactores Al^{+3} y Zn^{+2} para llevar a cabo sus reacciones

bioquímicas y además que permitan que su uso sea prolongado y eficiente que pueda liberar y controlar su actividad en el sitio adecuado.

De acuerdo con (Liu J et al., 2013), el método de síntesis del material mediante la hidrólisis de la urea provee un material más homogéneo que por el método de síntesis por coprecipitación a baja saturación y que la relación óptima para preparar el HDL es $Zn/Al = 2$, por otra parte (Yasaei M y Khakbiz M y et al., 2019), propusieron que al adentrar una biomolécula en un HDL- $ZnAl-NO_3$ debe ser por el método de intercalación iónica, esto es porque HDL- NO_3 revelo que es posible admitir una mayor cantidad de fármaco que usando un anión CO_3 , ya que muestra tener un enlace más fuerte. La síntesis por intercambio iónico es más efectiva para la intercalación de fármacos y su liberación.

Metodología

Síntesis de hidróxidos doble laminares

Los sólidos de $ZnAl-NO_3$ fueron sintetizados por el método de urea (Sharma, M. K., y Melesse, S. F., 2011). Los cationes Zn^{2+} y Al^{3+} se precipitaron en forma de HDL gracias a la hidrólisis de urea a $90^\circ C$ a partir de una solución de 0.335 mol de $(Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O)$ y 0.165 mol de $(Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O)$ adicionando 1 mol de urea durante 10 h. Para evitar la intercalación del CO_3^{2-} que proviene del hidrólisis de la urea se introdujo en exceso NH_4NO_3 que proporciona iones NO_3^- en la solución. Posteriormente la solución fue separada por filtración a presión bajo una atmósfera de Argón y fue lavado con H_2O descarbonatada y desionizada. La muestra fue secada por 12 h en un desecador y posteriormente fue secado a $75^\circ C$ en un horno convencional (Inayat A. et al., 2011).

Por otra parte, para la obtención de $ZnAl-Cl$, es necesario sintetizar $ZnAl-CO_3$. Para su obtención, se utilizó el mismo método de obtención de $ZnAl-NO_3$ con la diferencia de usar Na_2CO_3 en exceso en vez de NH_4NO_3 (Yasaei M. et al., 2018). Posteriormente se suspendió en solución de $NaCl$ (0.1 M) a razón de 1 $g_{HDL}/50$ mL. Se tituló con HCl (0.1 M) por goteo manteniendo un pH de 5. Una vez obtenido el sólido, este fue aislado por centrifugación a 4000 RPM y se lavó con agua desionizada libre de CO_2 , finalmente se secó a $120^\circ C$ por 12 h en una estufa convencional (Santana-Cruz et al., 2014).

Síntesis de materiales híbridos

Para generar los materiales híbridos se pesaron 0.546 g de los materiales obtenidos en el apartado anterior ($ZnAl-NO_3$ y $ZnAl-Cl$), se mezclaron con 25 mL de una solución previamente burbujeada con argón, cuya concentración fue 4.8 mmol de estreptomycin a un pH

de 9.5, ajustado con solución de NaOH 0.1 M. La suspensión se dejó en agitación y añejamiento a 1100 RPM por 7 días, el sólido se separó de la solución por centrifugación a 4000 RPM por 15 min y se lavó con H₂O desionizada y descarbonatada, para finalmente ser secado a 50°C por un tiempo de 48 h (Santana-Cruz et al. 2014).

Caracterización de los sólidos

Difracción de rayos X

Los análisis de DRX se obtuvieron en el equipo D9 Advance, fabricado por Bruker. Los Rayos x (RX) se produjeron a partir de un tubo de cobre, la longitud de onda (λ) de los RX es 1.5418 Å. El barrido fue de 3.5 ° a 60°, el incremento fue de 0.02° con tiempo de integración de 0.6 s/paso, el tiempo total de barrido por muestra fue de 28.5 min.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR-ATR)

Los espectros se obtuvieron mediante un espectrómetro Nicoletis10 con un intervalo espectral de 4000-650 cm⁻¹ a temperatura ambiente, mediante la técnica de ATR con una resolución de 2 cm⁻¹.

Evaluación de la actividad antibacterial

La preparación del agar se llevó a cabo en una botella Duran Schott en la cual se prepararon 500 mL de agar MacConkey (AMC) y se esterilizó a 121°C/15 psi por 15 min. Por otra parte, en las cajas Petri, se colocaron 0.5 g de cada material híbrido obtenido (ZnAl-NO₃-EM y ZnAl-Cl-EM), posteriormente se vertió el AMC a 45°C con 1 mL de espesor, posterior a su solidificación, se sembró en forma de extensión por toda la placa con un hisopo estéril que contenía la cepa *E. coli*, la cual se preparó tomando 1 mL de 0.5 McFarland (MF) y diluyendo 1:100 de caldo soya tripticaseína (CST) al 4%, (etiquetada como solución A). Finalmente se incubó a 37°C por 48 h. Como control se colocaron dos placas, una sin material bactericida y otra con estreptomycin pura.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria de ZnAlNO₃-estreptomycin (ZAN-E) y ZnAlCl-estreptomycin (ZAC-E) a través de la cinética de inhibición en medio líquido, primeramente, se pesó 0.005, 0.01 y 0.015 g de material híbrido para cada ensayo por triplicado, se mezcló con 9 mL de CST al 4% y con 1 mL de solución A. Cada ensayo se llevó a la incubadora NB-T205 de la marca N-BIOTEK® a 37°C a 140 rpm, donde fue puesto de forma semi-horizontal.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 120 y 180 min), las cuales se sembraron por la técnica de estriado masivo con ayuda de hisopos estériles en 3

distintas direcciones en cajas Petri que contenían 10 mL de AMC sólido, posteriormente se incubaron a 37°C por 48 h en forma invertida. Finalmente se procedió al conteo de colonias.

Adicional a esto se colocaron como control 2 tubos que contenían la misma solución de los tubos anteriores, uno sin material híbrido y otro con estreptomycin pura, para ambos tubos se tomaron muestras en los mismos tiempos registrados para cada ensayo, de igual forma se sembró, incubó y se contó colonias al igual que los tubos que contenían a los materiales híbridos. Toda la evaluación se realizó por triplicado.

Resultados y discusión

Caracterizaciones de ZnAl- NO₃ y ZnAl-Cl

En la figura 1 se muestra el difractograma de ZnAl intercalado con iones NO₃. Por comparación con el patrón de difracción típico de la hidrotalcita se observa que no existen fases ajenas al material; es decir, que se obtuvo HDL puro. Resultado de la misma comparación se puede observar claramente las reflexiones de los planos (003), (006) y (009) muy característicos de este tipo de materiales.

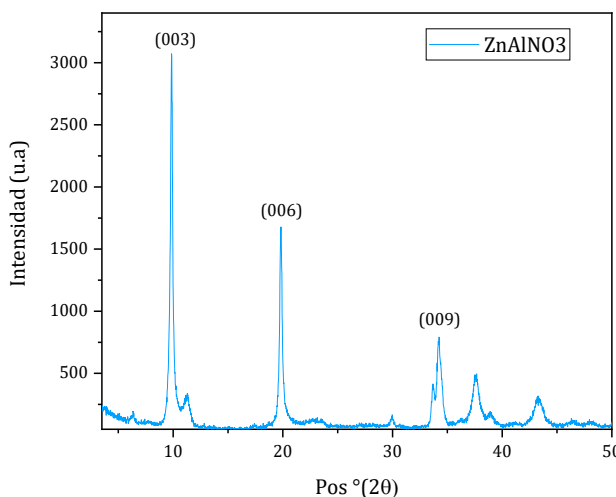


Figura 1. Difractograma de rayos-X del ZnAl-NO₃.

Por otra parte, en la figura 2 se muestra el difractograma de ZnAl intercalado con iones Cl⁻ que también muestra las reflexiones en (003), (006) y (009), pero éstas se muestran más alejadas de 10 θ, que de acuerdo con la literatura reportada (S. Miyata, 1983), corresponde a la intercalación de los iones Cl⁻ en la región interlaminar puesto a que posee una mayor intensidad.

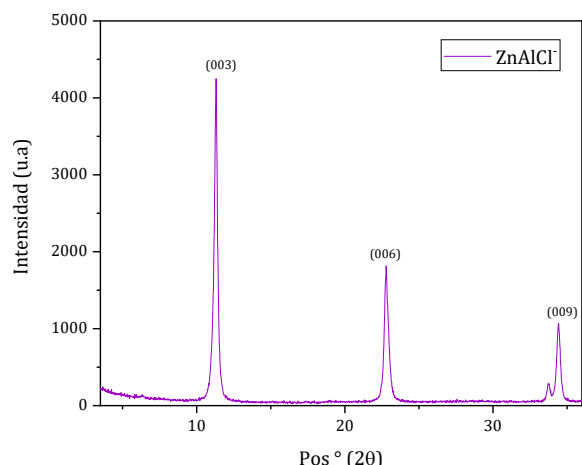


Figura 2. Difractograma de rayos-X de ZnAlCl.

Con el fin de obtener las distancias interplanares d_{003} , así como los parámetros de red c , calculados al multiplicar 3 por d_{003} , cuyos valores se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Distancia interplanar y parámetro de red c (Prc) de ZnAlNO₃.

HDL	2θ	d_{003} (Å)	Prc(Å)
ZnAlNO ₃	9.86	8.9637	26.8911
ZnAlCl	11.30	7.8241	23.4723

Las distancias interplanares obedecen a la tendencia esperada según el tamaño de cada anión presente en la región interlaminar como se describió previamente.

Por otra parte, el espectro de infrarrojo mostrado en la figura 3, muestra vibraciones en 3444.4 cm^{-1} , en tanto, los estiramientos de O-H, característicos de este tipo de material, que adicionalmente indica la presencia de H₂O dentro de la región interlaminar. Esto se confirma por el estiramiento de los hidrógenos con el oxígeno (H-O-H) en las regiones de $3600 \text{ a } 3100 \text{ cm}^{-1}$ y la flexión en $1650\text{-}1615 \text{ cm}^{-1}$. Así mismo el grupo NO₃ muestra una banda intensa y muy característica entre $1390\text{ - }1340 \text{ cm}^{-1}$.

Mientras que en la figura 4 (por razones de claridad no se muestra el espectro IR de ZnAlCl), se observó una banda de vibración situada a 1365 cm^{-1} que es muy característica del CO₃, pues proviene de los modos de vibración del anión que reside en el espacio interlaminar. En el espectro FTIR del sólido ZnAlCl (no mostrado), se observó una vibración situada a 1361 cm^{-1} . Sin embargo, su intensidad es netamente inferior a la observada en el sólido ZnAlCO₃ por lo que se podría afirmar que se logró el intercambio de distintos aniones.

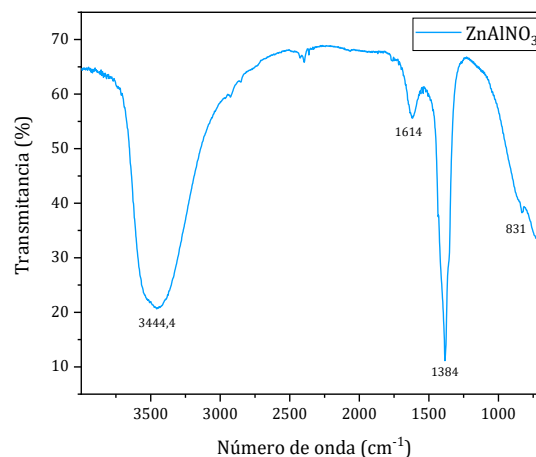


Figura 3. Análisis FT-IR de ZnAlNO₃.

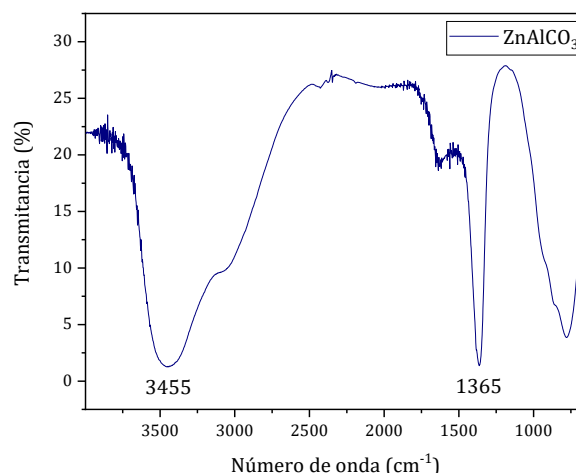


Figura 4. Análisis FT-IR de ZnAlCO₃.

Caracterizaciones de materiales híbridos con estreptomycin

Los materiales híbridos ZAN-E y ZAC-E fueron preparados como se mencionó en la metodología y posteriormente caracterizados mediante DRX y FT-IR. El difractograma de ZAN-E muestra 3 picos de difracción situados como se observa en la figura 5. Puede hacerse notar que los planos (006) y (009) han reducido su posición original en comparación con el material ZnAlNO₃, estar originalmente situados 20.19° y 34.97° pasó a 15.58° y 20.17° respectivamente.

Sin embargo, el plano (003) parece haber incrementado su posición al estar situado originalmente en 9.92° y pasar a 10.11° , esto puede deberse a una mezcla entre NO₃ y EM mientras que en la posición 11.41° representa a una mezcla entre EM y CO₃. Esto puede deberse a la introducción de aire contaminante (CO₂ atmosférico) al momento de realizar la síntesis y que acapare partes del espacio interlaminar (Sasai, R et al., 2019)

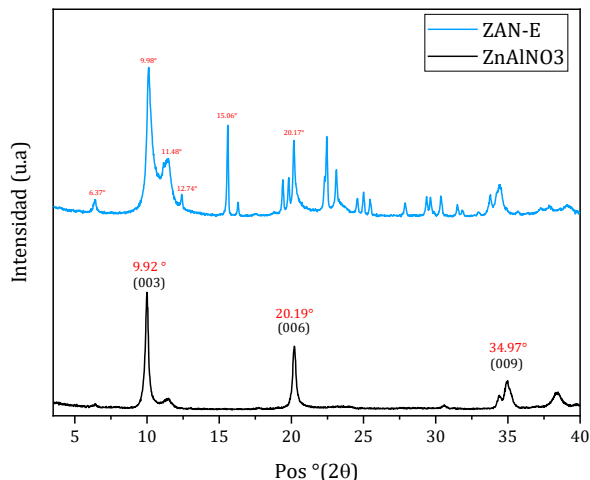


Figura 5. Análisis de DRX de ZAN-E comparativo con ZnAlNO₃ sin intercalar.

Por otra parte, en la figura 6 se muestra el difractograma de ZAC-E, donde plano (003) ha reducido su ángulo original de 11.31° a 6.61°, así mismo, sus armónicos, (006) paso de 22.43° y (009) pasó a 19.80° esto indica de que efectivamente está intercalada la estreptomycin dentro del material aunque de una manera muy pobre en comparación de ZAN-E, así mismo la posición 9.81° muestra que hay residuos de iones Cl⁻ que no lograron ser desplazados de la región interlamina por lo mismo de que en el ángulo de 10.23° se encuentran iones tipo carbonato, que interactuarían tanto con los iones Cl como con la estreptomycin.

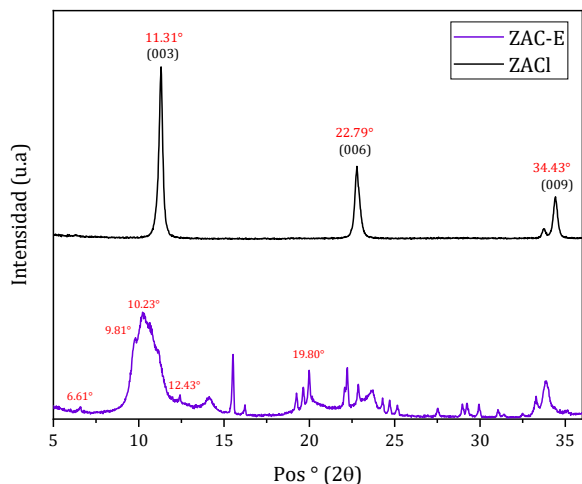


Figura 6. Difractograma de ZAC-E.

Una vez identificadas las reflexiones características, se usó la ecuación de Scherrer (Ecuación 1).

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Obteniendo para ZAN-E un tamaño de cristal promedio de 72.7 nm. Mientras que para ZANC-E el tamaño de cristal promedio fue de 78.12 nm. Usando los mismos datos del DRX es posible sacar el parámetro d, usando la ecuación de Bragg.

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad \text{Ecuación (2)}$$

Resultando para ZAN-E el valor de $d = 13.78 \text{ \AA}$, que representa la distancia interplanar, así mismo se puede calcular los parámetros de red a y c , los cuales son calculados con las reflexiones (110) y (003), donde $a = 2d_{110}$ y $c = 3d_{003}$, obteniendo así 3.36 \AA y 26.24 \AA para el plano 003. Para obtener la altura de galería de la estreptomycin, se resta el tamaño de la lámina de 4.8 \AA (Martinez, D.R et al., 2012) menos la distancia interplanar 8.74 \AA , resultando en 8.9897 \AA como se observa en la figura 7.

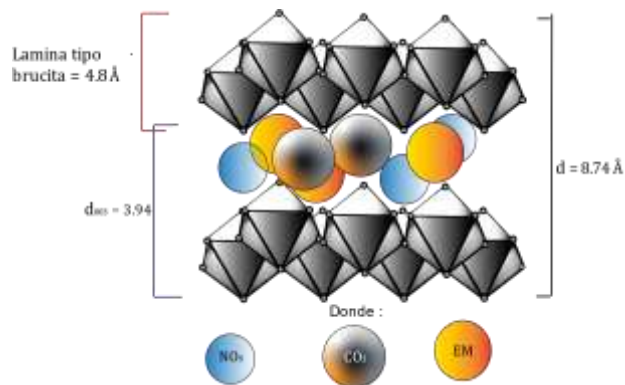


Figura 7. Dimensiones de ZnAlNO₃-Estreptomycin (EM)

Mientras que para ZANC-E, $d = 7.69 \text{ \AA}$, por lo que la altura de galería corresponde a 2.89 \AA , como se observa en la figura 8.

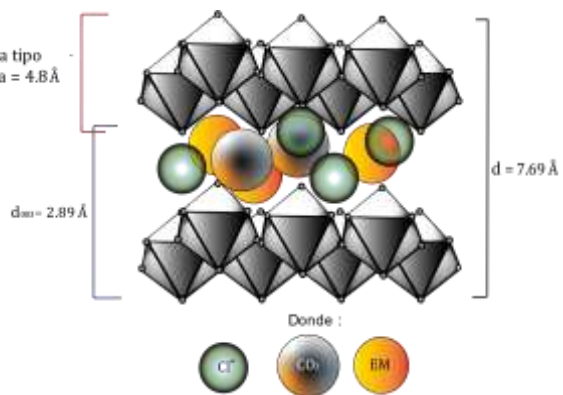


Figura 8. Estructura doble lamina de ZnAlCl con estreptomycin (EM).

Para poder corroborar de que se encuentra la estreptomicina dentro del material, los sólidos fueron sometidos a análisis de FTIR donde muestra que efectivamente se encuentra EM en ZAN-E como se observa en la figura 9, donde debajo de 1000 cm^{-1} se encuentra la región de interacción de los grupos NH y N con mayor intensidad por los grupos NO_3 del material y por 7 grupos distintos de NH, NH_2 y NH_3 que posee la estreptomicina. Al situarse en la región entre 730 y 710 cm^{-1} se pueden observar señales que corresponden a $n \geq 4$ cadenas de $(\text{CH}_2)_n$, los espectros de sólidos con cadenas largas y grupos polares terminales de las aminas entre 1350 a 1180 cm^{-1} . De acuerdo con Llanos en 1351 cm^{-1} existe una banda que se atribuye al NO_3 que el HDL guarda en su espacio interlamilar (Llanos Rodríguez et al., 2018). Lo que explica la intensidad de la banda en esa zona al estar tanto los NO_3 como los grupos N-H de la EM. Por otra parte, en 1635 cm^{-1} se puede observar una señal intensa de estiramiento, característica del grupo nitrato. Además, en la región de 3200 - 3650 cm^{-1} hay presencia de aminas (NH_2) que son muy características de la estreptomicina, así mismo, en la región 1690 - 1640 cm^{-1} existe estiramiento de C=N, las aminas primarias y secundarias en la región 900 - 650 cm^{-1} debido a la torsión y que confirman que el material híbrido posee la estreptomicina.

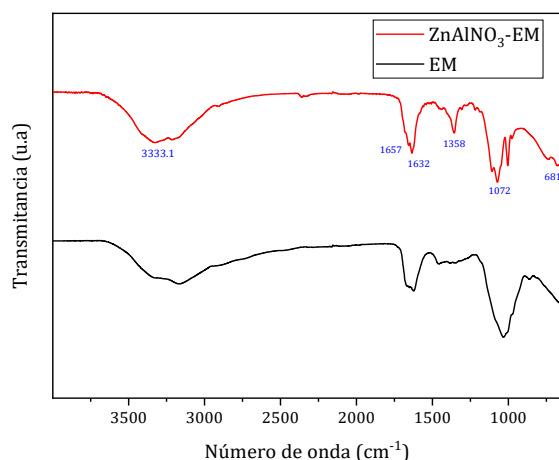


Figura 9. Análisis de FTIR de ZAN-E.

Para el material ZAC-E el IR muestra bandas de mayor transmitancia a diferencia de ZAN-E debido a que presenta interacciones con los iones cloruro, como se observa en la figura 10, en el número de onda 745 cm^{-1} la cual corresponde a la interacción C y Cl. Mientras que entre 3215 y 2905 cm^{-1} corresponde a las interacciones entre H y Cl además de que hay pequeñas señales en 1800 cm^{-1} (no mostrado) que corresponden al halogenuro Cl. Así mismo en 3340 cm^{-1} esta banda corresponde al estiramiento del grupo N-H característico de la estreptomicina, en 1634 cm^{-1} se encuentran enlaces C=N.

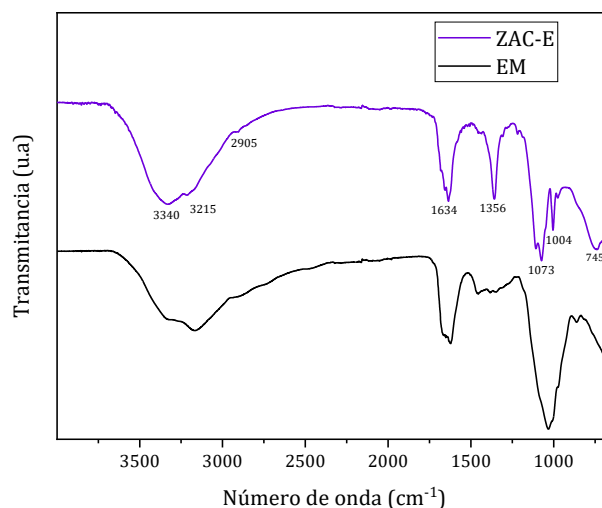


Figura 10. Análisis de FTIR-ATR de ZAC-E.

Pruebas microbiológicas de los materiales híbridos

Finalmente se procedió a probar los materiales híbridos en contra de *E. coli*, como se observa en la figura 11, corresponde al HDL sin EM que fue usado como blanco para corroborar la acción bacteriana sobre dicho material.

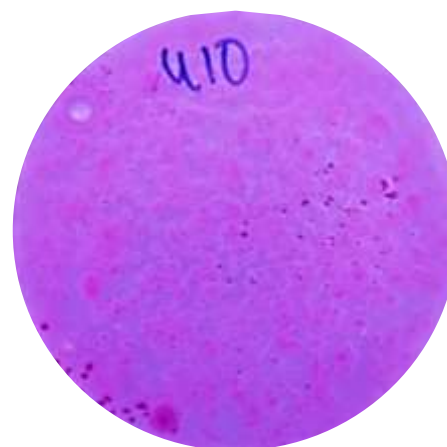


Figura 11. Material ZAN sin EM.

Usando el material ZAN-E se observa en la figura 12, que evidentemente hay inhibición de la bacteria en la zona cercana al material, el material además se muestra en color violeta, esto es debido a que adquirió el color al ser mezclado con el AMC que posee cristal violeta.

La difusión en agar es un buen método para probar los materiales híbridos. Debido a la alta hidrofobicidad de los materiales, estos no pueden ser probados en sensidiscos (para su difusión en agar).

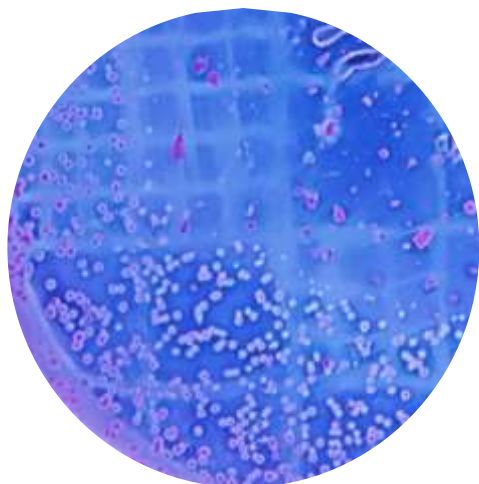


Figura 12. ZAN-E con *E. coli*.


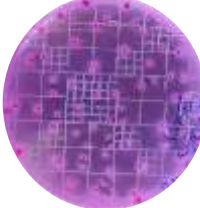
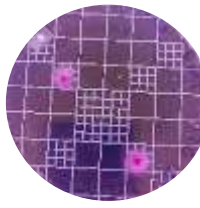
Por otra parte, observando los resultados mostrados en la tabla 2, que son parte de la cinética de ZAN-E usando 0.005 g de material es muy notorio como en el min 0 empieza a existir inhibición de crecimiento, así como algunas colonias que empiezan a cambiar su morfología, esto es por la interacción de la estreptomycin sobre la subunidad 30s ribosomal al inhibir la biosíntesis de proteínas al alentar el movimiento de los ribosomas e interactuar con mRNA (Lizzatto L et al. 1969).

En el min 120 se observa que solamente sobrevivieron 3 colonias amorfas de *E. coli*, para el min 180, (después de 3 h), no se observaron más colonias de *E. coli*. Observando en el microscopio invertido a 5x como se observa en la figura 13, usando una colonia sana, no hay deformidad y en comparación de las figuras 14, 15 y 16 si existe una deformidad que incluso provoca posteriormente la ruptura de la capsula y liberando exopolisacaridos (EPS), de acuerdo con Brune y Alvarado. Los polisacáridos microbianos son productos metabólicos producidos a partir de polisacáridos capsulares (CPS) y de EPS (Brune A et al., 2013; Alvarado Martínez V et al., 2015).

Pese a que los EPS y CPS son parte de la estructura celular, también forman parte de la colonia de la bacteria puesto que crea una capa protectora de peligros potenciales, ej: bacteriófagos o antibióticos. De hecho, es culpa de los CPS y EPS de que la bacteria pueda mantenerse aferrada a los materiales ya que por cuestión de cargas la barrera permite el paso de átomos o moléculas positivas y repele a las negativas (Cescutti P, 2010). Además, forman parte del sistema inmune de las bacterias, es decir, son las responsables de detectar y producir enzimas degradadoras del antibiótico.

Algunas de las imágenes están en blanco y negro para observar mejor la dispersión de las células sobre el agar, ya que a color no se logra distinguir. Cabe aclarar que actualmente no existen estudios de materiales híbridos interaccionando con esta bacteria siendo observados en microscopio en la literatura.

Tabla 2. Parte de la cinética realizada en contra del material híbrido ZAN-E contra *E. coli*.

Blanco (sin HDL ni EM)	ZAN-E 0 min	ZAN-E 120min
		

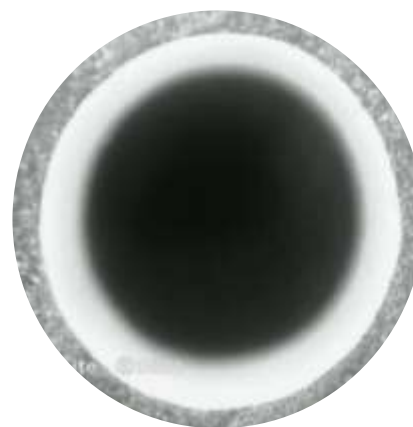


Figura 13. Colonia sana de *E. coli* tomada del patrón de referencia a 20x.

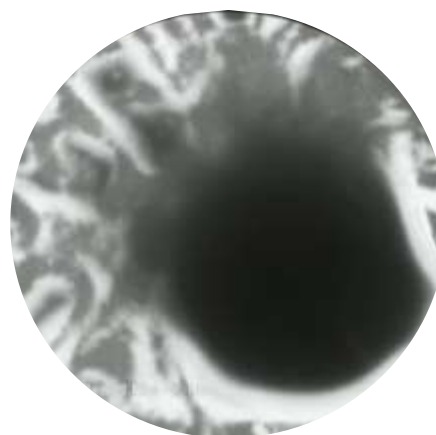


Figura 14. Fotografía del crecimiento bacteriano en AMC en presencia de ZAN-E, a los 120 min. Magnificación a 20x.

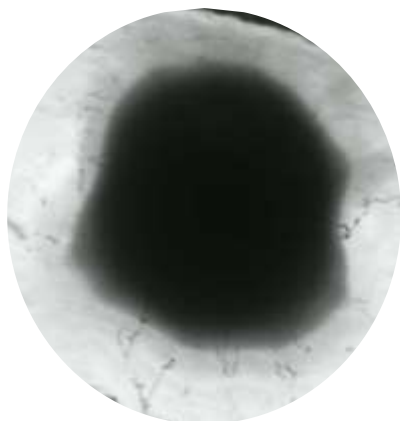


Figura 15. Colonia con forma amorfa y sin presencia de glicocálix tomada en el min 60 (no mostrada en la tabla) contra ZAN-E foto tomada con microscopio invertido a 20x.



Figura 16. Colonia de *E. coli* a color, mostrando la ruptura de su glicocálix de EPS y liberando células en el agar a 20x.

Así mismo la cinética de ZAC-E mostro resultados menos favorables a comparación de ZAN-E, debido a que tanto en el T 0 min y T 120 min todavía existía un número considerable de colonias como se observa en la tabla 3. Por ello en T 180 min, si existe la inhibición de la bacteria como se observa en la figura 17.

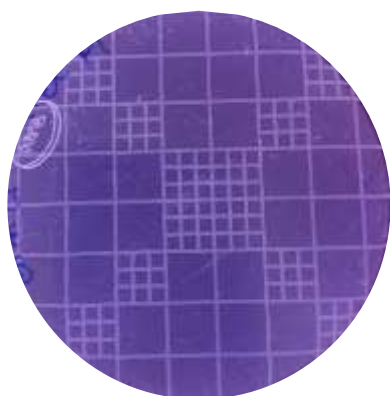


Figura 17. ZAC-E en AMC sin presencia de colonias después de 3 h.

Esto puede ser debido a la cantidad introducida de EM dentro del material, como se observó en los análisis de DRX en el apartado anterior. Lo que indicaría y confirmaría que es más susceptible la introducción de estreptomycin en un material con iones NO_3 que con uno con iones Cl^- .

Tabla 3. Cinética de crecimiento de ZAC-E.

Blanco (sin HDL ni EM)	ZAC-E T = 0 min	ZAC-E T = 120 min

Por otra parte, la curva de inhibición de la bacteria usando ZAN-E muestra una ligera tendencia al alta entre el min 15 y 30, esto es a que la bacteria aún no destruye las láminas que contienen la EM, no se observaron mutaciones ni deformaciones de las colonias bacterianas. A continuación, un número menor de colonias empiezan a estar presentes a partir del min 60 y que conlleva a la eliminación total en el min 180 (3 h), así mismo se encontró que la concentración mínima inhibitoria de ZAN-E fue de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.005 g).

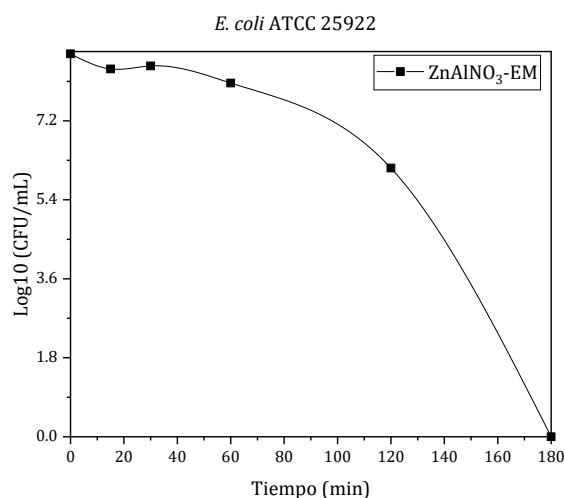


Figura 18. Curva de inhibición de *Escherichia coli* en presencia de ZAN-E.

En el caso de ZAC-E, primero se enfrentó su blanco en contra de la bacteria para corroborar que fuera completamente inútil, en la figura 19, el material está localizado fuera del círculo central (que corresponde a una burbuja de aire) y no tiene efecto inhibitorio sobre la bacteria.

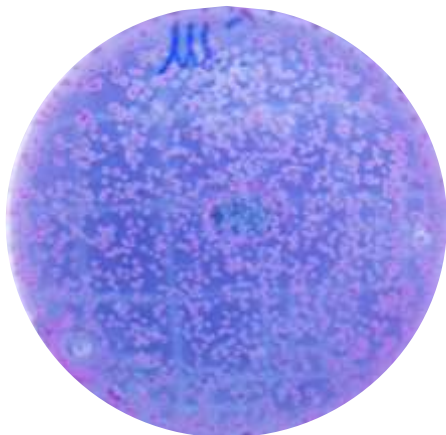


Figura 19. ZACI sin EM. La foto fue tomada a simple vista.

Al momento de usar el material híbrido ZAC-E se percibe que efectivamente hay inhibición bacteriana, pero en menor proporción que ZAN-E como observa en la figura 20 y en la tabla 3. Al analizarse en el microscopio se encontró que también había residuos de EPS como se observa en la Figura 21, donde este residuo colinda con una colonia con su capsula íntegra y con otra que ha perdido totalmente su capsula.

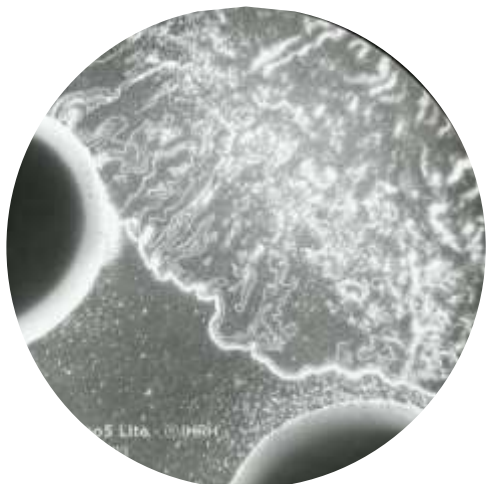


Figura 20. Derrame de EPS de *Escherichia coli* sobre AMC de ZAC-E a 20x.

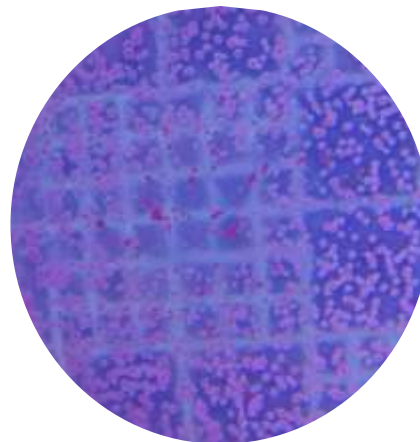


Figura 21. ZAC-E inhibiendo *Escherichia coli* (foto tomada simple vista).

Con base a lo anterior, el material híbrido ZANC-E muestra también comportamientos similares a la curva de inhibición de ZAN-E con la diferencia entre el min 30 y 60, donde se observa en la figura 23 que evidentemente empieza a existir una tendencia a la baja sin embargo al situarse entre la primera hora y la segunda hora está la tendencia indica resistencia al material híbrido debido a lo descrito previamente por las cantidades de estreptomicina. Sin embargo, sí logró inhibir después de los 180 min de actividad.

Ambos materiales son los responsables de la inhibición, ya que como se observa a continuación en la figura 22, se perciben dos partículas del material ZAN-E donde se ha creado un halo de inhibición con respecto a las células de la bacteria.

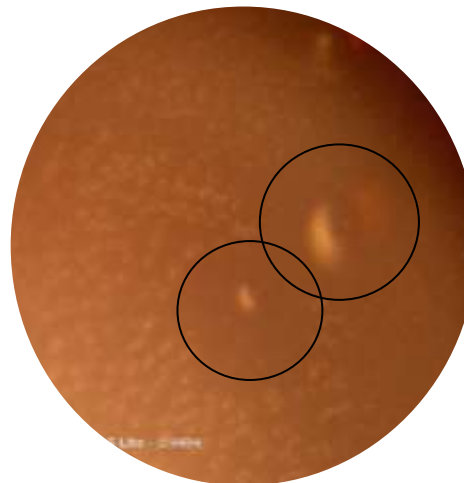


Figura 22. Halo de inhibición sobre *Escherichia coli* vista en el microscopio a 20x.

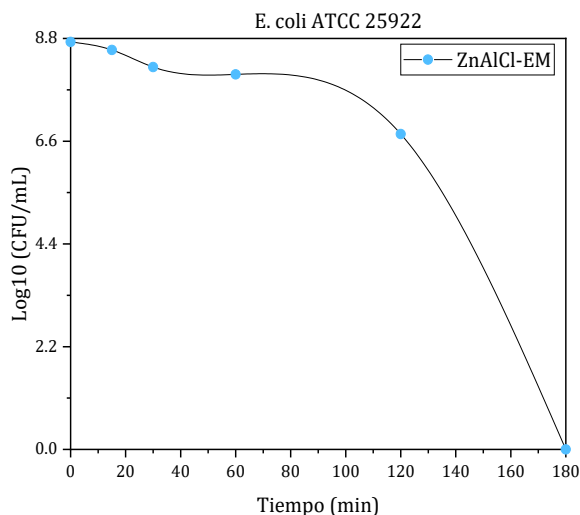


Figura 23. Curva de inhibición de *Escherichia coli* en presencia de ZAC-E.

Por último, en la figura 24, se muestran los controles para cada uno de los experimentos, es decir los HDL's sin intercalar y la estreptomicina pura en presencia de *E. coli* cuya CMB fue de 300 µg/mL, sin embargo, la cantidad usada dentro de los materiales híbridos fue de 86 µg/mL.

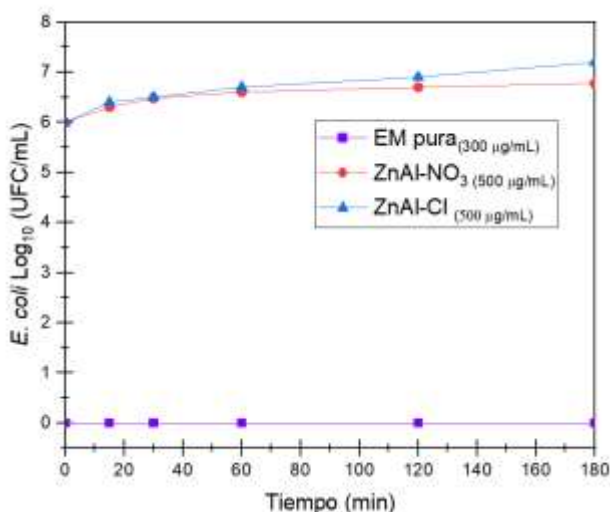


Figura 24. Curva de inhibición en presencia de los HDL's sin fármaco intercalado y en presencia del fármaco puro.

Conclusiones

Ambos materiales presentaron análisis de DRX y FTIR contundentes que demuestran haber intercalado estreptomicina por el método de intercambio iónico.

Es favorable intercalar estreptomicina usando un HDL-NO₃ que con HDL-Cl, esto es por la afinidad electrónica que posee el Cl⁻ sobre la estreptomicina y el material.

Los materiales ZAN-E (T 120 min) y ZANC-E (T 180 min) logran inhibir a *E. coli* sin presencia de resistencia al antibiótico.

Los materiales sin estreptomicina intercalada no poseen efecto bactericida o inhibitorio, por otra parte, la cantidad de estreptomicina pura tiende a degradarse con facilidad y no se puede recuperar. Los materiales híbridos de ZAN-E y ZAC-E si se pueden recuperar y aún logran tener efecto bactericida, lo que conllevaría a que son materiales liberadores de fármaco controlado y paulatino.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Arnoldo Bedolla por permitirnos llevar a cabo las caracterizaciones de DRX dentro de la UMSNH y también agradecer a C.M José Alejandro Onchi Resendiz por realizar los analisis de FTIR-ATR en la UNAM campus Morelia. Al Dr. Eliel Rafael Romero García y a IBQ. Miriam Aguilar Pineda por proporcionarnos conetindo bliografico acerca del comportamiento de las bacterias frente a los antibioticos.

Referencias

Alvarado Martínez V. (2015). Evaluación del exopolisacrido producido por una bacteria psicrotolerante aislada del noroeste de México y sus potenciales aplicaciones industriales. Tesis de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

Askeland D. R., Fulay P. P. (2017). Ciencia e Ingeniería de los materiales 6ª Ed. CENGAGE Learning, p.60-76

Brune, A. (2013). The Prokaryotes. Springer Link 4th ED 192, pp.545-577.

Cescutti P. (2010). Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides. In *Microbial Glycobiology* (First edition). Elsevier Inc.

Inayat A., Klumpp M., Schwieger W. (2011). The urea method for the direct synthesis of ZnAl layered double hydroxides with nitrate as the interlayer anion. *Applied Clay Science*, 51(4), 452-459.

Kidane A., Bhatt P. P. (2005). Recent advances in small molecule drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(4), 347-351.

Llanos Rodriguez V., Cruz Santana A., Flores Moreno J, L., Soto Portas M, L., Loera Serna S., Martinez Ortiz M, J. (2018). Material híbrido de hidroxidos dobles laminares ZnAl con ácido ursodesoxicólico y su evaluacion como sistemas de liberacion controlada *in vitro*. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación Química*, 4(4), 696-705.

Liu J., Song J., Xiao H., Zhang L., Qin Y., Liu D., Du N. (2014). Synthesis and thermal properties of ZnAl layered double hydroxide by urea hydrolysis. *Powder Technology*, 253, 41–45.

Martínez D. R., Carbajal G. G. (2012). Hidróxidos dobles laminares: Arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances En Química*, 7(1), 87–99.

Miyata S. (1983). Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays & Clay Minerals*, 31(4), 305–311.

Morales-irigoyen E. E., Flores Moreno J. L., F., Santana Cruz A., Olivia Franco, M. (2015). Material híbrido como bactericida de *Pectobacterium carotovorum*. *XVI Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería*. Guadalajara (21-26 de junio).

Santana Cruz A. (2014). Materiales híbridos como bactericidas de *Escherichia coli*. Tesis de Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales, Universidad Autónoma Metropolitana Campus Azcapotzalco, CdMx.

Sasai R., Sato H., Sugata M., Fujimura T., Ishihara, S., Deguchi., Ohki S., Tansho M., Shimizu T., Oita N., Numoto M., Fujii Y., Kawaguchi S., Matsuoka Y., Hagura K., Abe T., Moriyoshi C. (2019). Why do Carbonate Anions have extremely high stability in interlayer space of layered double hydroxides? Case study of layered double hydroxides of Mg and Al. *Inorganic Chemistry*. 10928-10935

Sharma M. K., Melesse S. F. (2011). Optimal block designs for CDC experiments method (2). *Metron*, 69(3), 297–307.

Yasaei M., Khakbiz M., Ghasemi E., Zamanian A. (2019). Synthesis and characterization of ZnAl-NO₃(-CO₃) layered double hydroxide: A novel structure for intercalation and release of simvastatin. *Applied Surface Science*, 467–468(October 2018), 782–791.