

Inhibición de bacterias *Shigella sonnei* a partir de materiales híbridos a base de MgAl-amoxicilina

Jaime Flores Nataly¹, Flores Moreno Jorge Luis¹, Santana Cruz Alejandra^{1*}, Ruiz Hernandez Itan Homero², Vaca Toledo Diego², Guerra González Roberto²

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México, C.P. 02200, México.

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Ingeniería Química, Av. Francisco J. Múgica s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia Michoacán, México.

*Autor para correspondencia: sca@azc.uam.mx

Recibido:

15/julio/2021

Aceptado:

23/octubre/2021

Palabras clave:

Amoxicilina,
Shigella,
HDL

Keywords:

Amoxicillin,
Shigella,
LDH

RESUMEN

En este trabajo se realizó la síntesis de un material híbrido a base de un compuesto tipo hidrotalcita formado de $Mg(Al)O$ y amoxicilina como anión orgánico para su posterior reconstrucción, consiguiendo alojar a la molécula orgánica en la región interlaminar, finalmente se estudió la actividad antibacteriana sobre la *Shigella sonnei*. Para conocer las propiedades fisicoquímicas de los materiales obtenidos, se realizó análisis estructural por difracción de rayos-X, los grupos funcionales se lograron identificar con la realización de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier y la estabilidad térmica a partir de análisis termogravimétrico. El material híbrido MgAl-amoxicilina mostró un comportamiento controlado de amoxicilina y una actividad antibacteriana eficaz contra *Shigella sonnei*.

ABSTRACT

In this work, the synthesis of a hybrid material based on a hydrotalcite-type compound made up of $Mg(Al)O$ and amoxicillin as organic anion was carried out for its subsequent reconstruction, managing to accommodate the organic molecule in the interlaminar region, antibacterial activity on *Shigella sonnei*. To know the physicochemical properties of the material obtained, a structural analysis by X-ray diffraction was carried out, the functional groups were identified with Fourier transform infrared spectroscopy and thermal stability from thermogravimetric analysis. The MgAl-amoxicillin hybrid material showed controlled amoxicillin behavior and effective antibacterial activity against *Shigella sonnei*.

Introducción

Para la industria farmacéutica ha sido un gran reto la manufactura de nuevos productos, convirtiéndose en un largo y costoso proceso, en el que la química de materiales adopta un papel muy importante por su alta capacidad de desarrollo de nuevos materiales, siendo relevantes aquellos de escala nanométrica debido a su tamaño y a su capacidad de acoplarse a matrices orgánicas, como lo es este trabajo donde se utiliza una molécula biológicamente activa (MBA). La síntesis de estos materiales abrió un campo completamente nuevo para su aplicación en nanomedicina, ya que se ha demostrado que facilitan el suministro de genes y fármacos (Carbajal y Martínez, 2012), debido a sus propiedades deseables (Ladewig, 2009).

Se han considerado como tema de estudio materiales del tipo hidrotalcita (HT) por su amplia gama de aplicaciones relacionadas con su biocompatibilidad (Xu et al., 2006), estabilidad química (J.H. Choy et al., 2007), absorción celular y su capacidad de alojamiento de MBAs en el espacio interlaminar (Kang et al., 2006), la protección que le ofrece a las mismas ante factores que alteren su integridad durante el paso por el tracto digestivo y el transporte eficaz para llegar al sitio de acción, además de reducir considerablemente sus efectos adversos disminuyendo la frecuencia de ingesta (Hernández, 2017).

Los métodos de síntesis a base de hidróxidos dobles laminares (HDL) con *MgAl* y amoxicilina, son considerados de estudiarse por las capacidades derivadas de la MBA como potente bactericida que se orienta a los microorganismos *Gram negativo*, actuando específicamente sobre la bacteria *Shigella sonnei*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, que se encuentra estrechamente relacionada con el género *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas. Se caracteriza por no fermentar la lactosa, ser inmóvil, no produce lisina decarboxilasa y raramente produce gas a partir de hidratos de carbono. Su identificación se basa en características bioquímicas y antigénicas (Perilla et al., 2004). A menudo se presenta en el sistema digestivo por infecciones adquiridas al consumir alimentos o agua contaminados.

Considerando que la intercalación específica de los materiales mencionados no se ha probado en conjunto, se pretende realizar un análisis para determinar su efectividad, conservando las propiedades de la amoxicilina y demostrar la inhibición prolongada de bacterias, logrando una disminución en el consumo de medicamentos y las consecuencias que trae consigo.

Metodología

Síntesis del material híbrido

El sólido de $MgAl-CO_3$ fue sintetizado por el método de coprecipitación de sales metálicas en condiciones de alta sobresaturación. Para ello se prepararon 100 mL de una solución con $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$. La concentración total de iones en esta solución fue de 1M. En un segundo paso, sobre la solución metálica se adicionó una solución que contenía K_2CO_3 y KOH , en una concentración total 2M, hasta alcanzar un pH igual a 9. Posteriormente la suspensión color naranja-café obtenida se deja añejar a $80^\circ C$ durante 18 h. El precipitado obtenido se lavó varias veces con agua desionizada caliente y libre de CO_2 y, en cada vez, las aguas de lavado se separaron del sólido por centrifugación. Finalmente, la pasta obtenida se secó a $120^\circ C$ durante 12 h en una estufa.

Después los HDL de $MgAl-CO_3$ se sometieron a un tratamiento térmico en flujo de N_2 , con una velocidad de calentamiento $5^\circ C \text{ min}^{-1}$ a $450^\circ C$, donde se mantuvo por 5 h para obtener el óxido mixto $MgAl(O)$ (Lima, E. et al., 2013), después de enfriarse a temperatura ambiente, se tomaron 0.3 g del óxido mixto de $MgAl(O)$ y se colocó en un matraz 3 bocas de 25 mL con una solución previamente burbujeada con Ar , que contenía 4.8 mmol del anión de interés proveniente de la amoxicilina a $pH=10$ monitoreado con potenciómetro y ajustado con solución de $NaOH$ 0.1 M. La suspensión se mantuvo en agitación por 7 días, el sólido se separó de la solución por centrifugación a 10 rpm en 5 ocasiones y se lavó con H_2O desionizada y libre de CO_2 , para finalmente secarlo a $45^\circ C$ durante 24 h.

Técnicas de caracterización

La caracterización estructural del material se llevó a cabo por difracción de rayos-X, con un difractor Phillips X'PERT PRO, donde las muestras se analizaron en forma de polvo en un intervalo de 4 a 50 en 2θ , con un tamaño de paso de 0.02 (2θ), un tiempo de barrido/scan de 0.4s y con longitud de onda $CuK\alpha_1=1.5418\text{\AA}$.

El estudio de los grupos funcionales de la $MgAl$ -amoxicilina se realizó mediante un análisis por FTIR en un espectrofotómetro NICOLET MAGNA IR 750. La región que se analizó fue de 400-450.

El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo TA Instruments, modelo STD Q 60, manteniendo control de atmósfera de nitrógeno y variando la temperatura desde 35 hasta $800^\circ C$ a razón de $10^\circ C/\text{min}$, en atmósfera de nitrógeno.

Evaluación del material híbrido

Para este estudio se empleó el método de dilución en caldo para determinar tanto la concentración mínima bactericida CMB (National Committee for Clinical Laboratory, 1999) como la concentración mínima inhibitoria CMI (McDermott, P.F, et al., 2005; Isada, L.D., 2001). Estas variables constituyen una herramienta para investigar las propiedades de nuevos agentes antimicrobianos (Ahmad, I. et al., 2006). Cabe mencionar que, en ocasiones, cuando una molécula biológicamente activa; en este caso la amoxicilina, se modifica, no forzosamente conserva sus propiedades antibacteriales. Así, resulta interesante analizar los resultados de las pruebas antibacteriales de los materiales híbridos preparados para saber si sus propiedades se conservaron, se exaltaron o desaparecieron.

La CMB de los materiales se determinó a través de la técnica de difusión en agar (método de Kirby-Bauer). Para ello, se inoculó una cantidad estandarizada de bacterias de *Shigella sonnei* sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. Se pusieron en contacto con discos de papel filtro impregnados con diferentes cantidades conocidas del material bactericida a evaluar.

Las bacterias fueron sembradas mediante la técnica de inoculación con el uso del replicador de Steer, el cual permite sembrar varias cepas en forma rápida y simultánea en el agar. El replicador se calibró para depositar alícuotas de 2 μ L de cada inóculo sobre la superficie del agar.

En cada ensayo (como se muestra en la Figura 1), se inoculó como control, una placa sin material bactericida, al comienzo y al final, para determinar pureza y detectar posibles contaminaciones durante el procedimiento. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta secar el inóculo. Luego se incubaron invertidas a 36°C por 24 h en atmósfera aeróbica. Las CMI y CMB obtenidas (Figura 1) presentaron diferencias significativas.

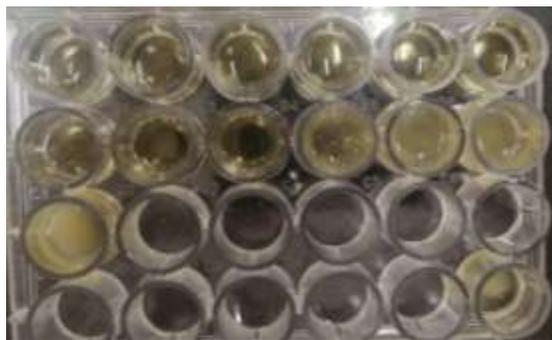


Figura 1. Amoxicilina en contra de *Shigella sonnei*, obtuvo el mejor CMI, situada en 4.88 mg/ml

La cinética de inhibición de crecimiento de *Shigella*, se llevó a cabo de la siguiente forma:

Debido a que se desconocía la cantidad de fármaco dentro del material, se tomó la decisión de usar una cantidad conocida y elevada del biomaterial. En tubos de 20 mL de capacidad, como se muestra en la Figura 2, y se pesaron 0.0278g del biomaterial para mezclarse con 20 mL de caldo soyatripticaseína.



Figura 2. Los biomateriales con soyatripticaseína en contra de *S. sonnei* antes de ser incubada a 36°C.

Resultados y discusión

Síntesis y Caracterización de los materiales

La estructura del sólido sintetizado de MgAl-CO₃ puede corroborarse por el difractograma de la Figura 3. Al observar la semejanza con el patrón típico de los HDL y al no existir picos de difracción pertenecientes a otras fases cristalinas, se puede afirmar que se obtuvieron HDL puros.

La tendencia observada en la Figura 3 para la distancia interlamina d_{003} de las muestras MgAl-CO₃ se da conforme a lo reportado en otras fuentes para este tipo de sólidos (Miyata, S., 1983; Costantino, V., y Pinnavaia, T., 1995; Costantino, U. et al., 2008).

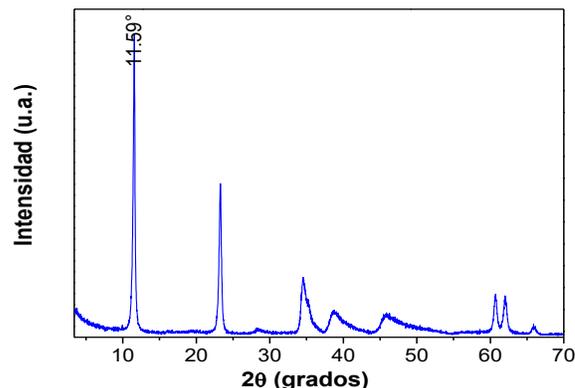


Figura 3. Difractograma de rayos-X de los HDL de MgAl-CO₃.

Posterior al proceso de calcinación el $MgAl-CO_3$ forma $MgAl(O)$ es corroborado en la Figura 4.

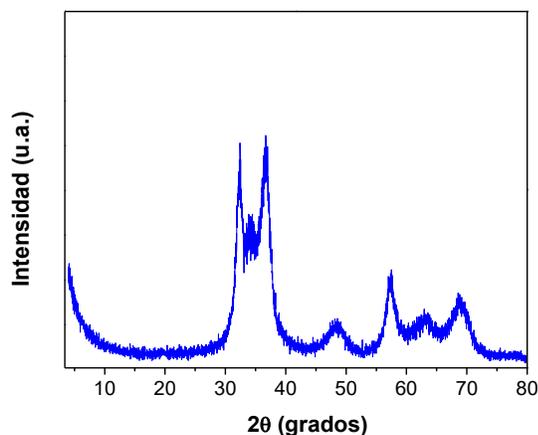


Figura 4. Difractograma de rayos-X de $MgAl(O)$.

Después de tener el óxido de $MgAl$ se prosiguió a realizar el material híbrido y como se muestra en la Figura 5. El difractograma de $MgAl$ -amoxicilina muestra una clara reconstrucción. El plano 003 se desplaza a ángulos menores indicando que existe un anión de mayor tamaño que los carbonatos en la región interlaminar, la cual es atribuida a la molécula de amoxicilina.

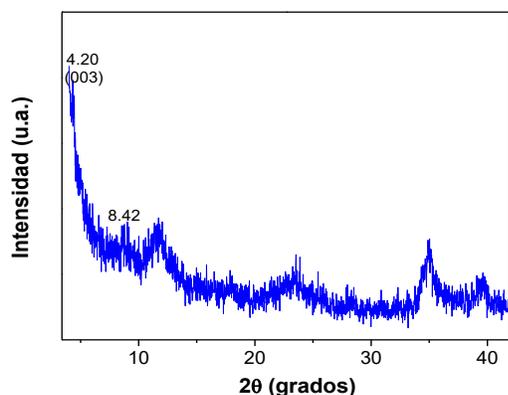


Figura 5. DRX del material $MgAl$ -amoxicilina

En la Figura 6 se muestra el espectro de infrarrojo del sólido $MgAl-CO_3$, que presenta una banda de absorción a 1373 cm^{-1} , siendo estas bandas características de los modos de vibración de estiramiento del grupo CO_3^{2-} , lo que corrobora la presencia de los iones carbonato en la región interlaminar del sólido. La banda de absorción que normalmente se asocia al modo de vibración de flexión de los grupos $O-H$ en las moléculas de H_2O aparece a 1637 cm^{-1} para los sólidos $MgAl-CO_3$. La región del IR que se encuentra por debajo de 1000 cm^{-1} contiene bandas que se asignan a modos de vibración de los enlaces $M-O$ y $O-M-O$ que conforman la red del hidróxido doble laminar

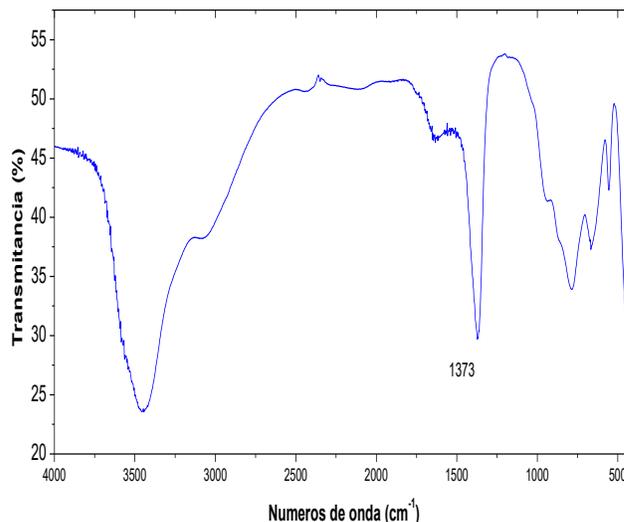


Figura 6. Espectro de infrarrojo de HDL $MgAl-CO_3$ frescos.

Se observa el espectro FTIR del sólido $MgAl$ -amoxicilina en la Figura 7, constatando las bandas de absorción características de las frecuencias de vibración de los enlaces de la amoxicilina, que para su mejor entendimiento se muestra la estructura de la molécula en la Figura 8. La amoxicilina debe mostrar bandas de absorción en 1456 cm^{-1} correspondiente a la frecuencia de vibración del estiramiento simétrico $C=C$ de los anillos; a 1473 cm^{-1} debida al modo de estiramiento simétrico $C=N$; a 1712 cm^{-1} debida al modo de estiramiento del enlace $C=O$ de en uno de los anillos; y, finalmente se observa otra banda muy intensa a 1617 cm^{-1} que se asigna a la frecuencia de vibración del estiramiento asimétrico $C=C$ de los anillos.

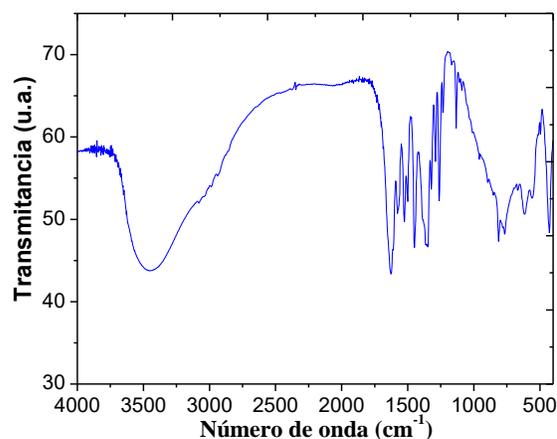


Figura 7. Espectro de infrarrojo de $MgAl$ -amoxicilina

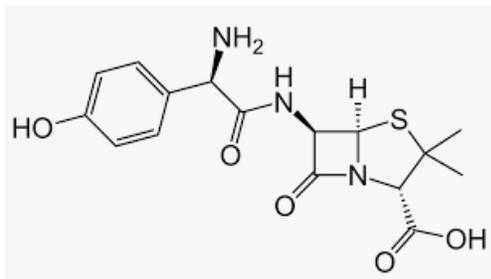


Figura 8. Molécula de amoxicilina

El análisis termogravimétrico del material híbrido se representa en la Figura 9, indicando que por debajo de 200°C se observa una pérdida de 14.22% p/p la cual corresponde a la pérdida del agua de cristalización del espacio interlaminar. Los procesos de deshidroxilación de las láminas y de descomposición del anión de la amoxicilina, que se encuentra en la región interlaminar, se traslapan dando lugar a una pérdida de peso entre 200 y 600°C con máximos situados a 290 y 380°C.

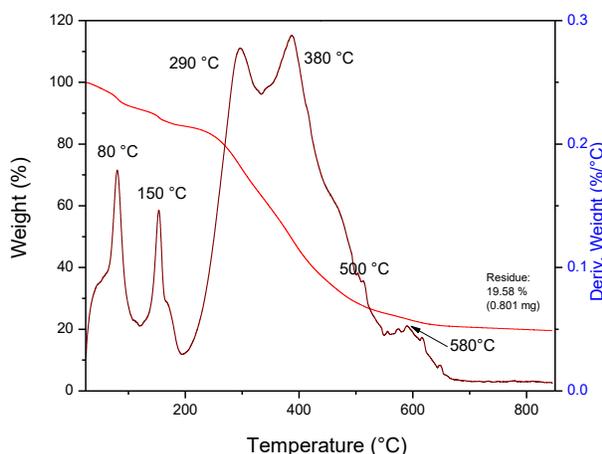


Figura 9. Termogramas del material MgAl-amoxicilina

Evaluación antibacteriana

Es preciso mencionar que la inhibición *Shigella sonnei* con amoxicilina no es viable (Williams y Berkley, 2018), puesto que ya presentaba una leve resistencia de acuerdo con la guía de la Organización Mundial de la Salud en 2005 (OMS, 2005), debido a la penetración en la mucosa intestinal de forma pobre. Sin embargo, los primeros resultados obtenidos en cuanto a la CMI y CMB del material híbrido sometido a la amoxicilina muestran resultados favorables como se muestra en la Tabla 1. Lo cual da indicio de que el HDL mejora las condiciones de la molécula para que esta pueda actuar de manera oportuna en la inhibición de la bacteria.

Tabla 1. Resultados CMI y CMB

amoxicilina		
Bacteria	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>Shigella sonnei</i>	9.76	39.06

Posteriormente al realizarse la cinética de inhibición de crecimiento de *Shigella* (véase Figura 10) en caldo de soyatripticaseína, se obtuvo una concentración de 1280 mg/mL (27800 mg/20 mL = 1280 mg/mL). La gráfica indica que sin la presencia del fármaco no existe inhibición bacteriana en el HDL de referencia, a medida que transcurre el tiempo de la reacción, la concentración de bacterias disminuye, lo cual corrobora que se elimina el 99.85% de colonias de *Shigella sonnei* a los 120 min y esto permanece constante hasta los 150 min, lo que indica que no existe un rebrote de la bacteria y que el material híbrido cumplió con su función inhibitoria.

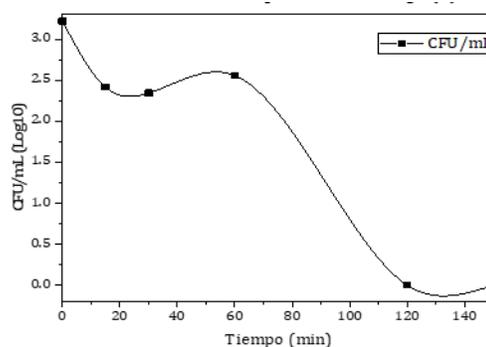


Figura 10. Cinética de inhibición de *Shigella sonnei* con MgAl-amoxicilina.

La evaluación del efecto bactericida de los materiales se realizó al medir la viabilidad celular a los 0, 15, 30, 60, 120 y 150 minutos después de la exposición e incubación de las bacterias con el material, como se logra apreciar en la Tabla 2, confirmando que los materiales MgAl-amoxicilina, son bactericidas para la bacteria de *Shigella sonnei*.

Por otra parte, entre el minuto 30 y 60 que se muestran en la Tabla 2, se nota un ligero crecimiento, esto se puede deber a la cantidad de fármaco que hay en el medio, que podría indicar una ligera resistencia o bien que no ha sido liberada una cantidad considerable de fármaco, lo cual apoya la teoría de que se trata de un material que controla la liberación de fármaco en el entorno. Aunque en el minuto 150 (Tabla 2), se logra observar un ligero crecimiento de colonias, que en realidad no lo son, lo que se muestra son residuos de membranas plasmáticas y de

exopolisacáridos (EPS) a nivel colonia y polisacáridos (LPS) a nivel celular, que no deben considerarse como células o colonias de bacteria, de hecho; presentan formas irregulares o amorfas por acción de la amoxicilina sobre la biosíntesis de peptidoglicanos y por el mismo motivo han derramado su contenido por el agar. A diferencia de la referencia o blanco que se representa en la Figura 11, donde las colonias son redondas y planas. Cabe resaltar que el estriado realizado fue con un asa calibrada a 10 μ L.

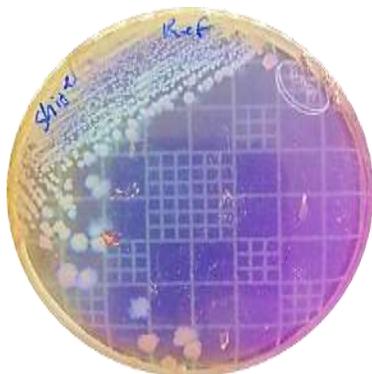


Figura 11. Referencia o blanco de *Shigella sonnei* 1×10^8 UFC/mL.

Tabla 2. Correspondientes a la cinética de crecimiento MgAl-amoxicilina VS tiempo.

MgAl(O)(19)-Amoxicilina	Tiempo (min)	MgAl(O)(19)-Amoxicilina	Tiempo (min)
	0		60
	15		120
	30		150

Conclusión

La intercalación del compuesto MgAl-amoxicilina se alcanzó con éxito, a través de la reconstrucción de MgAl(O). El análisis térmico confirma una buena estabilidad térmica de los materiales híbridos, y el difractograma de rayos-X corrobora que se obtuvieron sólidos cristalinos. El análisis por espectroscopia de IR

Por transformada de Fourier mostro la presencia de la molécula de amoxicilina en el hidróxido doble laminar.

Existe una buena compatibilidad entre los componentes del material híbrido MgAl-amoxicilina mostrando un comportamiento controlado de amoxicilina y una actividad antibacteriana eficaz contra *Shigella sonnei*, resultando ser un hospedador inorgánico biocompatible muy bueno, permite conducir la liberación de moléculas biológicamente activas en el crecimiento de los medios con tiempo. En general, el material muestra resultados que prometen una liberación sostenida de amoxicilina, lo cual aumenta su biodisponibilidad para que logre llegar a otras áreas del cuerpo.

Referencias

Ahmad I. Aqil F., Owais M. (2006). Modern Phytomedicine. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Carbajal GG, Martínez DR. (2009). Hidróxidos dobles laminares: Arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Av en Quim.* 7: 87-99.

Costantino, V., Pinnavaia T. (1995). Basic properties of $Mg^{2+}_{1-x}Al^{3+}_x$ layered double hydroxides intercalated by carbonate, hydroxide, chloride, and sulfate anions, *Inorg. Chem.* 34: 883.

Costantino U., Ambrogi V., Nocchetti M., Perioli L. (2008). Hydrotalcite-like compounds: Versatile layered hosts of molecular anions with biological activity, *Microporous Mesoporous Mater.* 21: 107-149.

Flores Moreno J.L., Santana Cruz A., Leyva Gómez G., Krötzsch E. (2013). Controlled release of ferulic acid from a hybrid hydrotalcite and its application as an antioxidant for human fibroblast. *Microporous and Mesoporous Materials.* 181: 1-7.

Hernandez K. (2017). Estudio de la síntesis del óxido mixto ZnAl(O) y su posterior uso en la preparación de materiales híbridos. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana, México.

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

Isada L.D. C. M, Bernard L. K, Goldman M. P. Gray J.A.A. (2001). Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures. 5^a Ed. Lexi Comp, pp. 843-847.

J.-H. Choy S.-J. Choi J.-M. Oh TP. (2007). Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. *Appl Clay Sci.* 36: 122.

J.-M. Oh, M. Park S.-T. Kim J.-Y. Jung J.-G. Kang HC. (2006). Efficient delivery of anticancer drug MTX through MTX-LDH nanohybrid system. *J Phys Chem.* 67: 1024.

Ladewig K. (2009). Layered Double Hydroxide nanoparticles in gene and drug.

Miyata S., Okada, A. (1977). Synthesis of hydrotalcite like compounds and their physico-chemical properties. The systems $Mg^{2+}Al^{3+}SO_4^{2-}$ and $Mg^{2+}Al^{3+}CrO_4^{2-}$. *Clays and Clay Minerals.* 25: 14.

Miyata S. (1983). Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays and Clay Minerals.* 31: 305.

McDermott P.F., Bodeis-Jones S.M., Fritsche T.R., Jones, R.N, Walker R.D. (2005). Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 43: 6136.

S. National Committee for Clinical Laboratory, (1999). Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. (2006). Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci.* 61(3):1027-1040.