

Síntesis de ZnAl-Estreptomicina para la inhibición de *Shigella sonnei* in vitro

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

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Ingeniería Química, Av. Francisco J. Múgica s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia Michoacán, 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:

15/julio/2021

Aceptado:

23/octubre/2021

Palabras clave:

Bacteria,
Material híbrido,
Inhibición

Keywords:

Bacteria,
Hybrid Material,
Inhibition

RESUMEN

En este trabajo se estudió la preparación del material híbrido tipo brucita, conocido como hidróxido doble laminar de Zn y Al, capaz de albergar una molécula activa conocida como estreptomicina, inhibiendo la síntesis de proteínas y las subunidades 30s y 16s del ribosoma, también se estudió la interacción entre el material y la bacteria patógena *Shigella sonnei*, puesto que genera resistencia ante los antibióticos comunes y representa ser un peligro mundial. Los Hidróxidos Dobles Laminares (HDL) actúan como camuflantes, debido a que la bacteria los identifica como cofactores, sin embargo, para poder ser estables ocupan tener un anión de soporte como lo es el grupo NO₃. Los análisis del material fueron llevados a cabo por FTIR-ATR y DRX, mientras que las pruebas biológicas se llevaron a cabo mediante la difusión del material en el agar y su respectiva observación en el microscopio. Se logró la inhibición y eliminación de *S. sonnei* usando 500 mg/mL de material híbrido con habilidad de ser recuperado y ser nuevamente usado con la misma efectividad.

ABSTRACT

In this work, the preparation of hybrid material type brucite was studied, known as double laminar hydroxide of Zn and Al, capable of harboring an active molecule known as streptomycin, inhibiting protein synthesis while attacking the 30s and 16s subunits of the ribosome, the interaction was also studied between the material and the pathogenic bacteria *Shigella sonnei*, since it generates resistance to common antibiotics and represents a global danger. HDL's act as camouflages, because the bacteria identifies them as cofactors, however, in order to be stable, they need to have a support anion such as the NO₃ group. The analyzes of the material were carried out by FTIR-ATR and XRD, while the biological tests were carried out by means of the diffusion of the material on the agar and its respective observation under the microscope. Inhibition and elimination of *S. sonnei* was achieved using 500 µg / mL of hybrid material, with the ability to be recovered and used again with the same effectiveness.

Introducción

Actualmente existe una demanda muy activa para lograr avances en la liberación de fármacos sin que las bacterias presenten resistencia ante éstos. Las áreas biomédicas han sido enfoque de exhaustivas investigaciones y dada la reciente pandemia ocasionada por COVID-19, se han estado apoyando aún más dichas investigaciones.

Shigella es una bacteria Gram negativa patógena, perteneciente a la familia Entereobacteriaceae, y se divide en 4 especies diferentes. Siendo *Shigella sonnei* la única especie en tener 1 solo serotipo, que ha afectado la salud de los humanos en países poco desarrollados que carecen de un sistema de salud apropiado, ya que el tratamiento suele ser costoso para tratar la Shigelosis (enfermedad gastrointestinal asociada con diarrea sangrienta que ha causado alta mortalidad). En años recientes, se ha presentado aún más debido a su facilidad de resistir antibióticos principalmente por plásmidos (Ranjbar J. y Farahani A., 2019; Qiu S et al., 2013; Tanajena N. y Mewara A., 2016; Kidane A. et al., 2015; Shad, A.A y Shad, W.A., 2021; Chatterjee S. y H. Raval I., 2019).

La estreptomycin es un antibiótico aminoglucósido que ataca a las subunidades ribosomales de la célula bacteriana y modifica el mRNA. Sin embargo, cepas *Shigella* y *Salmonella* generan la enzima aminoglucósido adeniltransferasa, generada por el gen *add1*, como respuesta inmune ante el fármaco (G.B. M y Schwarz S., 2016)

Los Hidróxidos Dobles Laminares (HDL) con fórmula química $[M(II)_{1-x}M(III)_x(OH)_2(A^{n-})_{n/x}]_m \cdot H_2O$, son arcillas aniónicas tipo brucita, que poseen la habilidad de retener moléculas biológicamente activas (MBA) o fármacos, cuya función permite ser altamente viable para la liberación controlada y prolongada, al mismo tiempo (Martínez D. R et al., 2012), que también funcionan como vehículos atrayentes al engañar a la bacteria que consume los cofactores (metales inorgánicos) que son requeridos como activadores de las enzimas que aceleran y favorecen las reacciones químicas que toman lugar dentro de la célula, así mismo su configuración electrónica permite que existan reacciones de óxido reducción (Fischer et al., 2010).

El método de síntesis del HDL se lleva a cabo por la hidrólisis de urea, que permite obtener un material más homogéneo a diferencia del método clásico (baja co-precipitación) con relación molar de Zn/AL = 2 (Liu J et al., 2013). Los HDL's están formados por láminas apiladas infinitas simétricas donde los cationes Zn^{+2} (MII) y Al^{+3} (MII) se encuentran coordinados octaédricamente por 6 grupos OH- lo que le otorga

puentes de hidrógeno al material. Para adentrar la Molécula Biológicamente Activa (MBA) dentro de la región interlaminar, será necesario usar el método de intercambio iónico, que de acuerdo a Yasaei M, es más factible usar un HDL con nitratos (NO_3) por que puede admitir una mayor cantidad de fármaco que usando aniones tipo carbonato (CO_3) (Yasaei M y Khakbiz M et al., 2019), esto es para compensar el exceso de cargas positivas dentro del espacio interlaminar (A^{n-}).

Metodología

Los HDL que se sintetizaron fueron $ZnAlNO_3$ principalmente por su alta capacidad de ser desplazado por los aniones.

Síntesis de hidróxidos dobles laminares $ZnAl-NO_3$

Para esta síntesis, se utilizó un matraz 3 bocas de 500 mL, en el que se disolvieron 0.335 mol de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y 0.165 moles de $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ en 500 mL de agua descarbonatada y desionizada a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1.65 moles de urea y 1 mol de NH_4NO_3 en exceso. Los cationes se precipitan en forma de HDL debido a la hidrólisis de urea.

El sistema se montó en adición a un sistema de reflujo y un sistema de burbujeo de gas argón el cual estuvo en contacto con el líquido por 1 h. Se dejó en atmosfera inerte (con el motivo de evitar la oxidación del CO_2 atmosférico, el cual se transforma en CO_3) y se procedió a dejar por 10 h a $90^\circ C$.

Al finalizar este tiempo, obtuvo un precipitado de color blanco, el cual fue separado del líquido mediante centrifugación de 15 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue removido, para poder realizar una serie lavados con agua libre de CO_2 y desionizada. Finalmente fue secado en un desecador por 12 h y posteriormente fue secado a $75^\circ C$ (Santana-Cruz A et al., 2014; Sharma, M.K., y Melesse, S. F., 2011; Inayat A et al., 2011). Este material fue rotulado como ZANO₃.

El material fue llevado a caracterizar mediante DRX y FTIR.

Síntesis de materiales híbridos

Para generar el material híbrido, se ocupó un matraz de 3 bocas de 125 mL, en el que se depositó 4.8 mM de estreptomycin y se mezcló con 25 mL de H_2O descarbonatada y desionizada para poder obtener la sal, la cual se obtuvo al mezclar con 0.1 M de NaOH, ajustando la solución a un pH 9.5 con un medidor de pH previamente calibrado.

A continuación, se instaló el sistema de burbujeo de Argón y se dejó purgando por 10 min mientras se monitoreaba el pH usando agitación magnética a 1100 RPM.

Una vez pasado el tiempo, se procedió a destapar el matraz para adicionar 0.546 g de ZnO_3 al matraz mientras. A continuación, se introdujo nuevamente el argón. Se monitoreó el pH y el burbujeo, por 30 min.

Una vez finalizado este tiempo, se removió el medidor de pH y se procedió a sellar mientras continuaba el burbujeo de Ar por otros 30 min más. Finalmente, después de este tiempo se selló todo el sistema, dejando únicamente la entrada de Ar. El material permaneció en agitación y añejamiento por 7 días.

Al término del séptimo día, se traspasó el líquido con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico de 5 mL y se procedió transferirlo en tubos falcón que posteriormente se centrifugaron a temperatura ambiente a 4000 RPM por 15 min. Una vez terminada la centrifugación, se procedió a descartar el sobrenadante y a realizar lavados con H_2O descarbonatada y desionizada.

Posteriormente se transfirió a una caja Petri de vidrio, usando como tapa papel aluminio, se secaron a $45^\circ C$ en una estufa convencional de 24 a 48 h.

Al final se obtuvo el material híbrido ZnO_3 -Estreptomycin (ZANO₃-EST), que tenía una apariencia de polvo blanco sin aroma.

Caracterización de los sólidos

Difracción de rayos X

El análisis de DRX se obtuvo 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.

Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier de reflectancia atenuada (FTIR-ATR)

El espectro IR se obtuvo mediante un espectrómetro Nicolet is10 con un intervalo espectral de $4000-650\text{ cm}^{-1}$ a temperatura ambiente, mediante la técnica de ATR con una resolución de 2 cm^{-1} .

Evaluación de la actividad antibacterial

La preparación de las muestras microbiológicas se llevó a cabo en una botella Duran Schott en la cual se prepararon 500 mL de agar MacConkey (AMC) al mezclar 25 g de agar con 500 mL de agua desionizada y se esterilizó a $121^\circ C$ psi por 15 min.

Por otra parte, en las cajas Petri, se colocaron 0.05 g del material obtenido sin intercalar como control y adicionalmente en otra caja conteniendo 0.5 g de ZnO_3 -EST, como control se colocó una tercera placa conteniendo 0.05 g de estreptomycin.

Posteriormente se vertió el AMC a $40^\circ C$ con 1 mL de espesor, agitando ligeramente en círculo y posterior a su solidificación, se sembró en forma de extensión por toda la placa con un hisopo estéril que contenía la cepa *S. sonnei*, 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) CLSI (2018).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria de ZAN-EST a través de la cinética de inhibición en medio líquido, primeramente, se pesó 0.05, 0.01 y 0.015 g de material híbrido para cada ensayo, 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 $37^\circ C$ 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 previamente solidificado.

Posteriormente se incubaron a $37^\circ C$ 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, 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.

Para comprobar la efectividad de los materiales después de haber realizado la cinética de inhibición, los tubos son drenados y puestos a secar por 24 h a $45^\circ C$. Posteriormente se vuelve a impregnar la placa de agar con la solución A. y se deposita el material en el agar Mueller Hinton y se incuba a $36^\circ C$ por 24 h, si existe halo de inhibición quiere decir que el material sigue siendo efectivo.

Resultados y discusión

Caracterizaciones de ZnAl-NO₃

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.

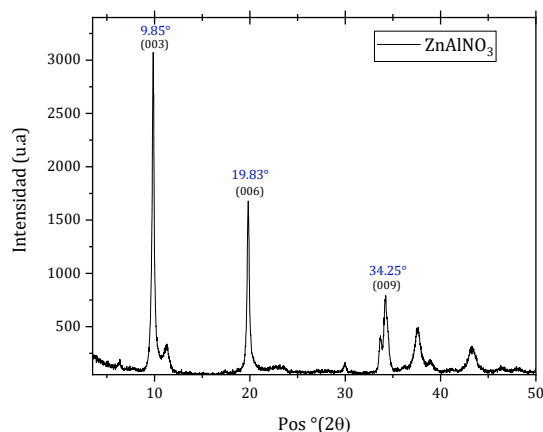


Figura 1. Difractograma de rayos-X del ZnAl-NO₃.

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 de ZnAlNO₃.

HDL	2θ Å	d_{003} Å	Parámetro de red c Å
ZnAlNO ₃	9.86	8.96	26.89

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

Por otra parte, el espectro de infrarrojo mostrado en la Figura 2, muestra vibraciones en 3444.4 cm⁻¹ por parte de los estiramientos de O-H, tanto por los 6 grupos OH como por las moléculas de H₂O dentro de la región interlamina, esto se confirma por el estiramiento de los hidrógenos con el oxígeno (H-O-H) en las regiones de 3600 a 3100 cm⁻¹ y la flexión en 1650-1615 cm⁻¹, que también confirmaría la presencia de puentes de

hidrógeno. Así mismo el grupo NO₃ muestra una banda intensa y muy característica entre 1390 - 1340 cm⁻¹.

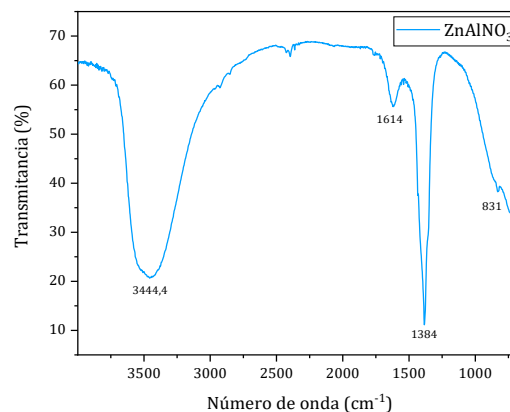


Figura 2. Análisis FT-IR de ZnAlNO₃

Caracterizaciones de materiales híbridos con estreptomicina

El material híbrido ZANO₃-EST fue preparado como se mencionó en la metodología y posteriormente caracterizado mediante DRX y FT-IR. El difractograma de ZANO₃-EST muestra 3 picos de difracción situados como se observa en la Figura 3. El análisis muestra que la EST está intercalada en la posición 6.37° (003) y en sus respectivos armónicos 12.74° (006) y 19.41° (009), así mismo el grupo nitrato se encuentra en la posición 9.98° que, de acuerdo a Adam, éste posee un ángulo de 9 aproximadamente (Adam N. et al., 2019).

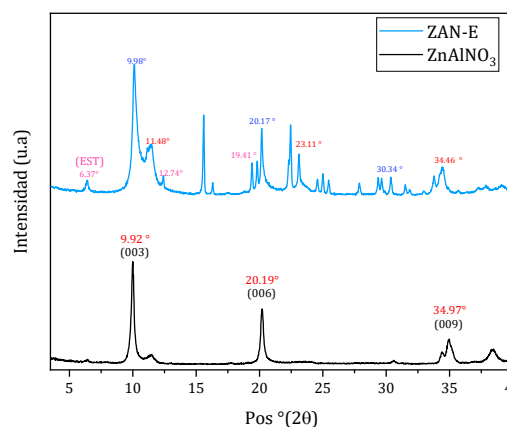


Figura 3. Análisis de DRX de ZAN-E comparativo con ZnAl-NO₃ sin intercalar.

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

$$D = \frac{kl}{\beta \cos \theta} \quad \text{Ecuación 1}$$

Obteniendo para $ZnAlO_3$ -EST un tamaño de cristal promedio de 72.7 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 $ZnAlO_3$ -EST el valor de $d = 8.74 \text{ \AA}$, 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.

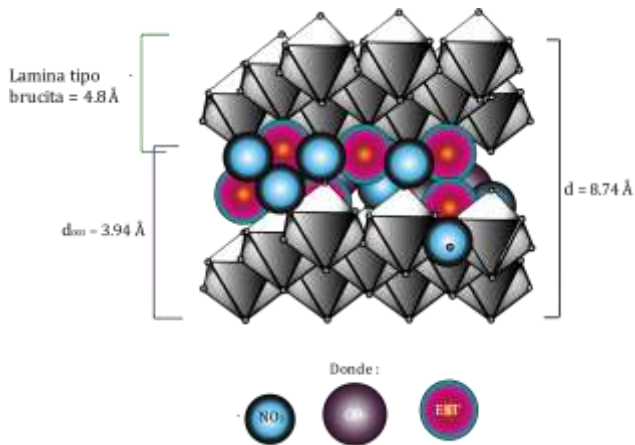


Figura 4. Estructura del $ZnAl$ - NO_3 -EST

Para obtener la altura de galería de la estreptomicina, se resta el tamaño de la lámina de 4.8 \AA (Martínez, D.R et al., 2012) menos la distancia interplanar 8.74 \AA , resultando en 3.94 \AA como se observa en la Figura 4.

Caracterización FTIR-ATR

Para poder corroborar que se encuentra la EST dentro del material, el sólido fue sometido a análisis de FTIR-ATR donde muestra que efectivamente se encuentra EST en $ZnAlO_3$ -EST como se observa en la Figura 5, 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 NH_x de 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 $(CH_2)_n$, los espectros de sólidos con cadenas largas y grupos polares terminales de las aminas entre 1350 a 1180 cm^{-1} .

De acuerdo con Llanos Rodríguez, en 1351 cm^{-1} existe una banda que se atribuye al NO_3 que el HDL guarda en su espacio interlamina (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 EST.

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.

En la región de 3400 - 3200 cm^{-1} (debido a su forma ancha) existen puentes de hidrógeno del tipo polimérico, así mismo podría confirmarse la presencia de agua intercalada en la región interlamina con el estiramiento de los hidrógenos con el oxígeno H-O-H en las regiones de 3600 a 3100 cm^{-1} y la flexión en 1650 - 1615 cm^{-1} .

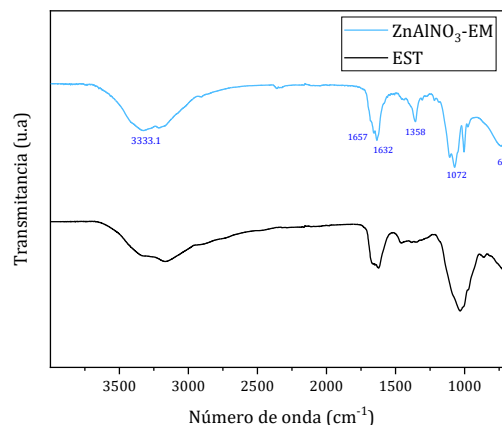


Figura 5. Análisis de FTIR de ZAN-EST.

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. Por otra parte, en 1740 a 1645 cm^{-1} se puede observar una señal intensa de estiramiento, característica del grupo nitrato.

Pruebas biológicas de los materiales híbridos

Pruebas microbiológicas usando $ZnAlO_3$ -EST

Finalmente se procedió a probar los materiales híbridos en contra de *S. sonnei* como se observa en la Figura 6, corresponde al HDL sin EM que fue usado como blanco para corroborar la acción bacteriana sobre dicho material.

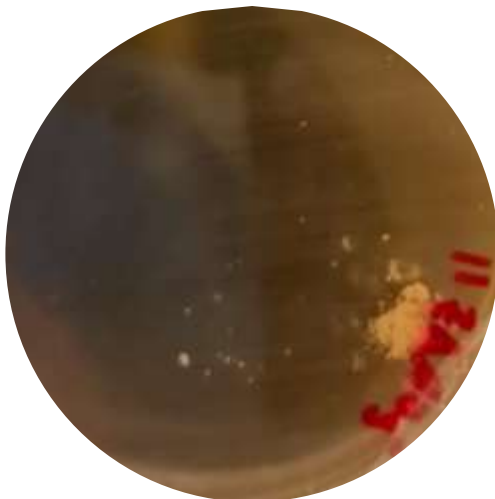


Figura 6. Material ZANO₃ sin EST (foto tomada a simple vista).

Entonces, se observa que no hay presencia de halos de inhibición sobre las láminas. Por lo que se procede a usar el material híbrido para verificar su inhibición. Usando el material ZAN-EST se observa en la Figura 7, que evidentemente hay inhibición de la bacteria en la zona cercana al material, ZAN-EST, además se muestra en color amarillo, esto es debido a que adquirió el color al ser mezclado con el AMC. Por otra parte, *S. sonnei*, cambia de color las placas de AMC porque no fermenta lactosa y por la reducción de pH. 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 ni impregnados en sensidiscos (para su difusión en agar).



Figura 7. ZAN-EST (foto tomada a 20x).

Por otra parte, observando los resultados mostrados en la Tabla 2, que son parte de la cinética de ZAN-E usando 0.05 g de material es muy notorio como en el minuto 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 subunidades 30s, 16s ribosomal al inhibir la biosíntesis de proteínas al alentar el movimiento de los ribosomas e interactuar con mRNA (Luzzatto L et al. 1969), en el min 120 se observa que solamente sobrevivieron 2 colonias amorfas de *S. sonnei*, para el minuto 180, (después de 3 h), no se observaron más colonias de *S. sonnei*. Los polisacáridos microbianos son productos metabólicos producidos a partir de polisacáridos cápsulares (CPS) y de EPS (Brune A et al., 2013; Alvarado Martínez V et al., 2015) como se observa en la Figura 8.

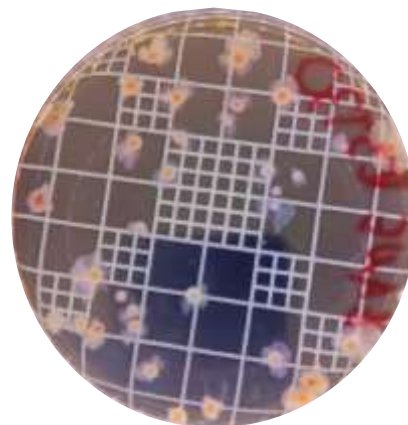


Figura 8. Parte de la cinética de ZAN-EST contra *S. sonnei* en el min 30

Pese a que los EPS y CPS son parte de la estructura celular, también forman parte de la colonia de la bacteria puesto a 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 como se observa en la Figura 9. Así mismo los materiales poseen la ventaja de ser camufladores. Al poseer cargas positivas en su mayoría, se depositan entre la membrana externa y los EPS a nivel colonia o lipopolisacáridos (LPS) a nivel celular (Romero Hurtado S. y Iregui C, A., 2010). Los LPS son los causantes de enfermedades en el humano a causa de bacterias Gram negativas, ya que, al soltarse de la membrana, se unen con receptores TLR4 que generan respuestas inflamatorias en el organismo o huésped infectado (Romero Hurtado S. e Iregui C, A., 2010; Cohen J., 2002; Watson et al., 2019).

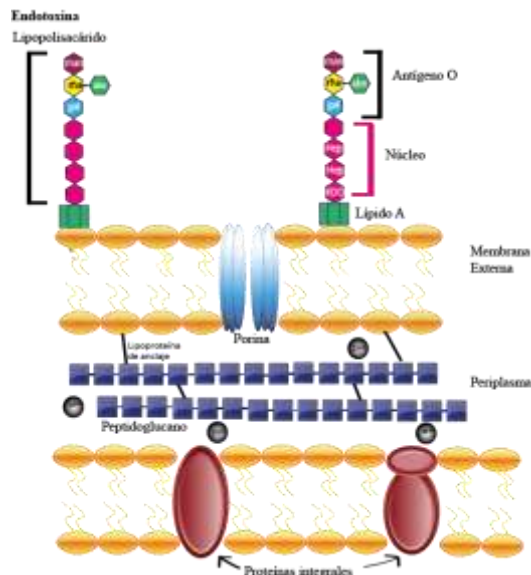


Figura 9. Parte de la membrana celular de la bacteria.

Cabe recalcar que no existen actualmente estudios de materiales híbridos interaccionando con la bacteria y siendo observados en microscopio en la literatura.

Tabla 2. Parte de la cinética realizada en contra del material híbrido ZAN-EST contra *S. sonnei*.

Blanco (sin HDL ni EST)	ZAN-EST 0 min	ZAN-EST 120 min

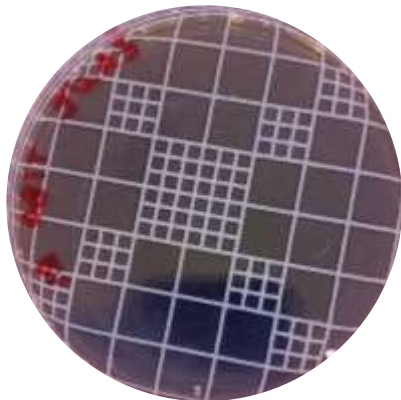


Figura 10. Usando 0.005 g de ZAN-EST, después de 3 h no se observa crecimiento.

En la Figura 10, se observa que después de 3 h de haberse inoculado el tubo conteniendo al material, ya no existe crecimiento de la bacteria usando 0.005 g de ZAN-EST.

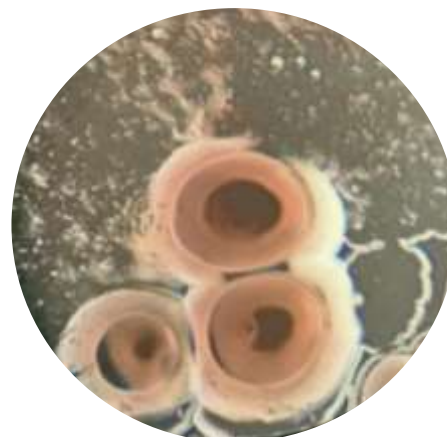


Figura 11. Colonia de *S. sonnei* fotografiada a partir de AMC en el min 0 contra ZAN-EST a 20x.

Observando en el microscopio invertido a 20x como se observa en la Figura 11, del min 0, se empieza denotar deformidad ocasionada por la ruptura de la cápsula y liberando exopolisacáridos (EPS), de acuerdo con Brune y Alvarado.

Cinética de inhibición de *S. sonnei* usando el material híbrido ZnAlNO₃ con EST.

La curva de inhibición de la bacteria usando ZAN-E muestra una tendencia a la baja entre el min 15 y el min 30. Como se observa en la Figura 12. 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 (después de 3 h), así mismo se encontró que

La concentración mínima inhibitoria de ZAN-E fue de 500 µg/mL (0.05 g).

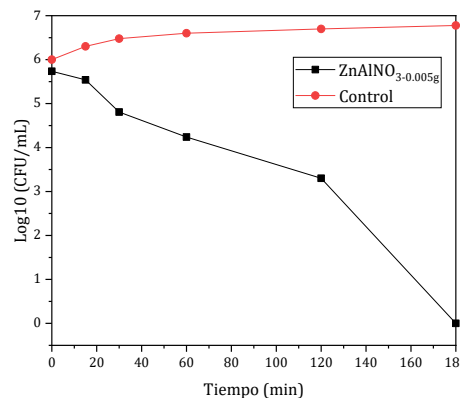


Figura 12. Curva de inhibición de *Shigella sonnei* usando ZANO₃-EST.

Así como se vio anteriormente sobre el efecto de los LPS y EPS, se analizó una sección del agar y se encontró que esta teoría es cierta, como se ve a continuación en la Figura 13, observado a 45x, donde las células están efectivamente adheridas al material, así mismo en la Figura 14 se muestran fragmentos de material y bacterias vista a 100x usando la tinción de Gram. En la Figura 15 donde la colonia se encuentra con menor carga celular al entrar en contacto con una partícula de material observada a 10X, mientras aquellas que están un poco más alejadas del material, en el momento de tomar la foto, están perdiendo la cápsula extracelular y empiezan a soltar miles de células en el agar y en la Figura 16, se observa el EPS inundando el agar a 20x.

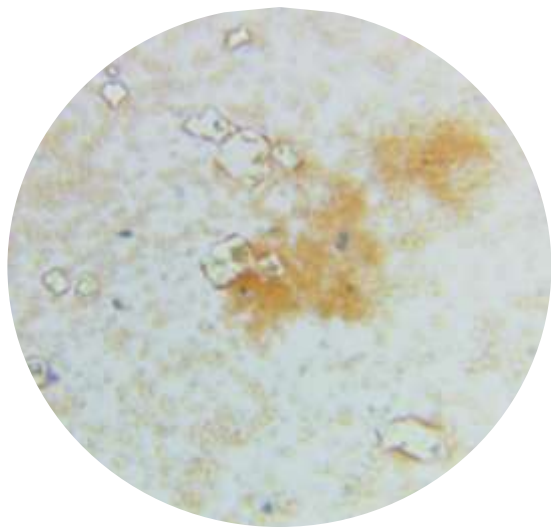


Figura 13. *Shigella sonnei* consumiendo el material sin MBA sin tinción de Gram.

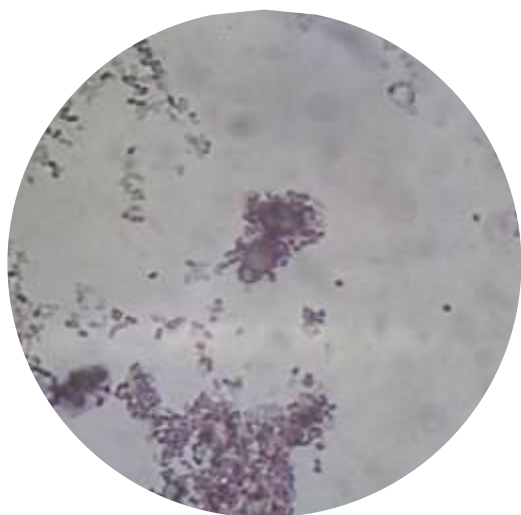


Figura 14. Tinción Gram de *S. sonnei* con el material sin EST.

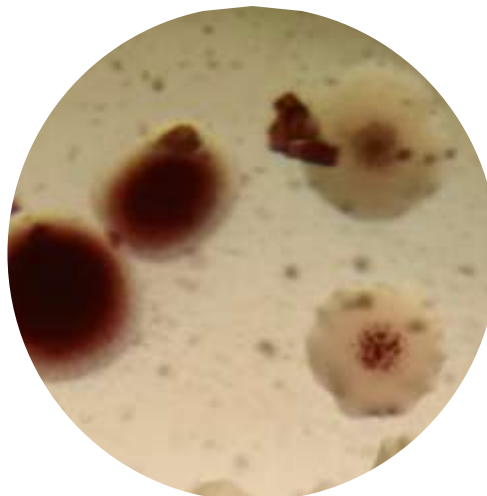


Figura 15. *Shigella sonnei* consumiendo el material híbrido intercalado con EST.

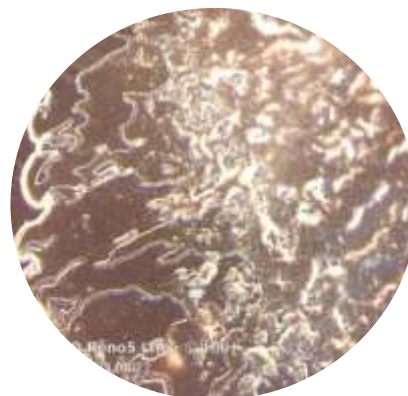


Figura 16. Derrame de EPS de *S. sonnei* sobre AMC de ZANO₃-EST a 20x.

Cinética de inhibición de *S. sonnei* usando estreptomicina pura.

La estreptomicina se usó en las mismas cantidades que el material híbrido, por lo que usando 0.05 g (500 µg) revelo que no existe crecimiento desde el min 0, como se observa en la Figura 17. Sin embargo, como es completamente soluble en el líquido, está no se puede recuperar a diferencia de los materiales sólidos, donde después de drenar el líquido y ser secados a 45°C por 24 h, fueron puestos nuevamente sobre AMC impregnado con la solución A y puestos en la incubadora a 37°C por 48 h como se observa en la Figura 18.

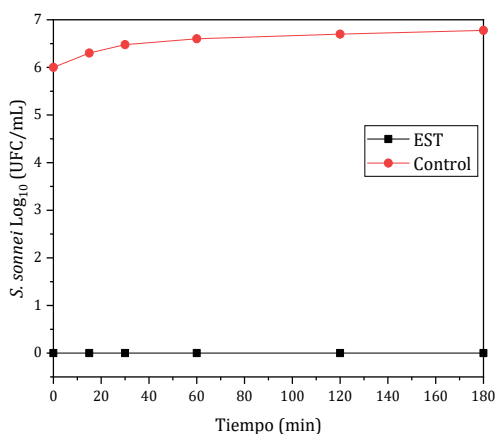


Figura 17. Cinética de inhibición usando 0.005 g de estreptomicina pura contra *S. sonnei*.

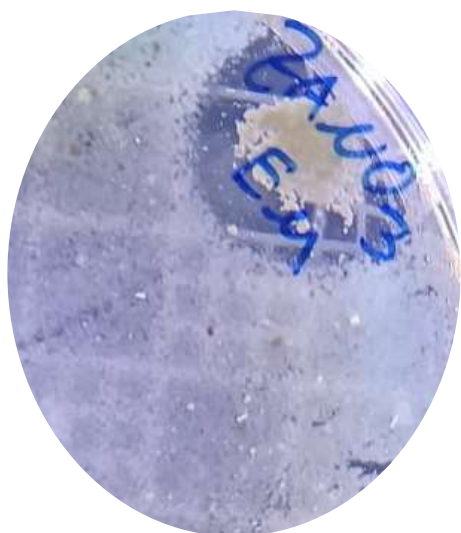


Figura 18. Comprobación de efectividad tras recuperación del material en agar Mueller Hinton.

Conclusiones

El material híbrido de $ZnAlNO_3$ -Estreptomicina (ZANO₃-EST) muestra análisis de DRX y FTIR contundentes que demuestran haber intercalado la molécula dentro de la región interlamilar por el método de intercambio iónico.

El material híbrido $ZnAlNO_3$ -EST inhibe el crecimiento de la bacteria a partir de 120 min de exposición usando 0.05 g, que representa su concentración mínima inhibitoria

Dichos materiales se pueden recuperar y aún logran tener efecto bactericida, lo que conllevaría a que son materiales liberadores de fármaco controlado y paulatino.

La concentración mínima inhibitoria de ZANO₃-E (500 μ g/mL) en contra de *S. sonnei*, mientras que la CMI para la estreptomicina pura fue menor a 300 μ g/mL, sin embargo, esta no se puede recuperar y tiende a degradarse con facilidad.

El análisis por microscopio arrojó resultados favorables para saber cómo actúan las bacterias frente a este tipo de materiales y comprobar de que los EPS tienen una gran participación en la interacción material-bacteria.

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 Reséndiz permitirnos realizar los análisis de FTIR-ATR en la UNAM campus Morelia. Al Dr. Eliel Rafael Romero García y a IBQ. Miriam Aguilar Pineda por proporcionarnos conteniendo bibliográfico acerca del comportamiento de las bacterias frente a los antibióticos.

Referencias

- Adam N., Mohd Ghazali S. A. I. S., Dzulkipli N. N., Hak C. R. C., Sarijo S. H. (2019). Intercalations and characterization of zinc/aluminium layered double hydroxide-cinnamic acid. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 14(1), 165–172.
- Shad A.A., Shad, W.A. (2021). *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance. *Arch microbiol* 203, 45-58.
- Alvarado Martínez V. (2015). Evaluación del exopolisacárido 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.
- Brune A. (2013). *The Prokaryotes*. Springer Link 4th ED 192, pp.545–577.
- Chatterjee S., H. Raval I. (2019). Pathogenic microbial genetic diversity with reference to health. *CSIR-Central Salt and Marine Chemical Research Institute, India*.
- Cohen J. "The immunopathogenesis of sepsis". *Nature* 420. (2002): 885–891.
- CLSI. (2018) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

- Julia D. Fischer, Gemma L. Holliday, Syed A. Rahman, Janet M. (2010). Thornton, The Structures and Physicochemical Properties of Organic Cofactors in Biocatalysis, *Journal of Molecular Biology*, Volume 403(5):803-824
- G. B. Michael, Schwarz S. (2016). Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: An alarming trend?, *Clinical Microbiology and Infection*. 22(12):968-974.
- 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.
- 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.
- Luzzatto L., Apirion D., Schlessinger D. (1968). Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60(3), 873-880.
- Llanos Rodríguez V., Cruz Santana A., Flores Moreno J, L., Soto Portas M, L., Loera Serna S., Martínez Ortiz M, J. (2018). Material híbrido de hidróxidos dobles laminares ZnAl con ácido ursodesoxicólico y su evaluación como sistemas de liberación controlada *in vitro*. *Tendencias en Docencia e Investigación Química*, 4(4), 696-705.
- 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.
- Qiu, S., Wang, Y., Xu X., Li P., Hao R., Yang C., Song H. (2013). Multidrug-Resistant Atypical Variants of *Shigella flexneri* in China. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1147-1150.
- Santana A. (2014). Materiales híbridos como bactericidas de *Escherichia coli*. Tesis de Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales, Universidad Autónoma Metropolitana Campus Azcapotzalco, Estado de México.
- Sharma M. K., Melesse S. F. (2011). Optimal block designs for CDC experiments method (2). *Metron*, 69(3), 297-307.
- Taneja N, Mewara A. (2016). Shigellosis: Epidemiology in India. *Indian J Med Res*. 143(5):565-76.
- Ranjbar R., Farahani A. (2019). Shigella: Antibiotic-Resistance Mechanisms and new horizons for treatment. *Dovepress*, 12: 3137-3167.
- Romero Hurtado, S., Iregui C. A. (2010). El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, 37-45.
- 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.