UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE UNA MOLÉCULA ORGÁNICA EN UN HDL (ZnAl).

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA

MAYRA GUADALUPE BARAJAS PLANCARTE

ASESORES

DR. ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

DR. LUIS FERNANDO LIRA BARRAGÁN

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE DEL 2020.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme llegar hasta el día de hoy, por darme la capacidad de concluir esta etapa en mi vida, por poner a mi lado a personas increíbles que fueron indispensables en mi formación.

Mamá, gracias por apoyarme incondicionalmente, por nunca quejarte en el camino, al contrario, animarme siempre en seguir adelante. Este logro no es solo mío, también te pertenece, porque sin tu ayuda no hubiera llegado hasta donde hoy estoy, te amo mucho.

Papá, gracias por apoyarme, animarme, por convertir mis días tristes en días llenos de felicidad. Porque, aunque a veces no todo macha de la mejor manera, siempre hay una forma de seguir, eres un ejemplo a seguir y te debo todo lo que con tanta paciencia me enseñaste.

Mamatela, más que mi mamá, usted es mi amiga y confidente, me orienta en cada dificultad, su apoyo durante esta etapa sin duda fue indispensable, le agradezco por el tiempo dedicado en cada uno de esos consejos que me llevaron hasta el día de hoy.

Tío Eraclio, todo esto no lo lograría sin usted y su ayuda, gracias por el apoyo de principio a fin.

Asesor, gracias por enseñarme tanto, por cada uno de sus consejos, por ser amigo y maestro. Lo admiro y aprecio mucho.

Hermana, gracias por echarme porras siempre, por nunca dudar de mí, por tu apoyo incondicional, por estar cuando más lo necesitaba y convertirte en mi lugar de descanso después de un día pesado, te quiero muchísimo.

Agradezco mucho a mi amiga Salud, que estuvo conmigo desde el principio, no cabe duda que nuestra amistad no conoce de límites, contigo a lado todo se volvió más fácil y tú te convertiste en mi otra hermana, en mi otra familia.

FENIMH, mi segundo hogar, me diste todas las herramientas necesarias para lograrlo, gracias.

Gracias por estar a mi lado en las buenas y en las malas, ayudándome en todo sentido, impulsándome a seguir, por no dejarme en el camino y llegar conmigo al final de esta etapa. Te quiero muchísimo y sé que siempre estarás conmigo.

Índice

Agradecimientos 1

Índice 2

Lista de tablas 4

Lista de figuras 4

Lista de gráficas 4

Glosario 5

Resumen 1

Abstract 2

I. Introducción 3

I.1 Justificación 5

I.2 Objetivo general 6

I.2.1 Objetivos específicos 6

I.3 Hipótesis 6

II. Marco teórico 7

II.1 Materiales híbridos 8

II.2 Hidróxidos dobles laminares 8

II.3 Métodos de síntesis 9

II.3.1 Método de coprecipitación a baja saturación de sales metálicas. 9

II.3.2 Método de coprecipitación a alta sobresaturación de sales metálicas. 10

II.3.3 Método de coprecipitación homogénea con urea. 10

II.4 Efecto memoria de los HDL 11

II.5 Intercambio iónico 12

II.6 Bacterias 12

II.7 Escherichia coli 12

II.8 Ácido nalidíxico. 13

III. Metodología 14

III.1 Método de coprecipitación homogénea con urea 14

III.2 Síntesis de materiales híbridos 16

III.3 Intercalación por efecto memoria 16

III.4 Técnicas experimentales de caracterización 17

III.4.1 Difracción de rayos X. 17

III.4.2 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. 19
III.5 Técnicas de evaluación para la inhibición del crecimiento de microorganismos 20
III.5.1 Método de dilución por agar. 20
III.5.2 Método de dilución en caldo. 20
III.5.3 Cepas bacterianas 21
III.6 Pruebas de pureza 21
III.7 Turbidez estándar para la preparación del inóculo 21
III.8 Preparación de los inóculos 22
III.9 Crecimiento bacteriano en presencia de materiales híbridos 22
IV. Análisis y discusión de resultados 23
IV.1 Caracterización de materiales ZnAl-X 23
IV.2 Caracterización de materiales híbridos 25
IV.3 CMIs y CMBs del ácido nalidíxico. 26
IV.4 Pruebas microbiológicas para evaluar tiempos de inhibición 28
V. Conclusiones 33
Recomendaciones 34
Sugerencias para trabajo futuro 35
Referencias 36

Lista de tablas

Tabla 1. . Distacia interlaminar de los HDLs AnAl-X..... 24
Tabla 2. CMIs de diferentes concentraciones de ácido nalidixico..... 27
Tabla 3.CBIs de diferentes concentraciones de ácido nalidíxico 27
Tabla 4.Colonias de E. coli vs materiales HDLs ZnAl-CO3 y ZnAl-NO3..... 29
Tabla 5.Colonias de E. coli vs materiales ZnAl-NAD intercalado del HDL-NO3..... 31
Tabla 6.Colonias de E. coli vs materiales ZnAl-NAD intercalado del HDL-CO3..... 32

Lista de figuras

Figura 1:Esquema para la descomposición de la urea en solución acuosa..... 10
Figura 2: Síntesis de ZnAl-NO3 11
Figura 3: Estructura química del anión del ácido nalidíxico..... 14
Figura 4: Obtención de hidróxidos dobles laminares (HDLs).. 15
Figura 5: Rutas de obtención de materiales híbridos a partir de hidróxidos dobles laminares. 16
Figura 6: Difractograma de rayos-X de los HDLs..... 23
Figura 7:Espectros de infrarrojo de HDL ZnAl-X frescos. a) ZnAl-CO_3 y b) ZnAl-NO_3. 24
Figura 8: Caracterización de la molécula de ácido nalidíxico. a) Espectro FTIR, b) DRX. 25
Figura 9: Caracterización del HDL con la molécula de ácido nalidíxico. a) Espectro FTIR, b) DRX 26
Figura 10: Antibiograma en medio líquido y sólido de *E. coli* frente a NAD, CMBs (mg/mL) de: a) 0.0, b) 0.11, c) 0.17, d) 0.22 y e) 0.27. 28

Lista de gráficas

Gráfica 1: Cinética de crecimiento de la bacteria frente a los HDLs. 29
Gráfica 2: Cinética de inhibición de la *E. coli* frente a los materiales híbridos intercalado del HDL-NO3.....31
Gráfica 3: Cinética de inhibición de la E. coli frente a los materiales híbridos intercalado del HDL-CO3.....32

Glosario

Compuesto tipo hidrotalcita: Es un material micro poroso con estructura laminar y propiedades de intercambio aniónico.

Bacteria coliforme: Bacteria que sirve como indicador de contaminantes y patógenos cuando son encontradas en las aguas. Estas son usualmente encontradas en el tracto intestinal de los seres humanos y otros animales de sangre caliente.

Plásmidos: Son moléculas circulares de ADN que se replican de manera independiente al cromosoma de la célula hospedera.

Bacterias Gram negativas: Dícese de la bacteria que no se tiñe con la coloración de Gram. Sus paredes, que son muy finas, contienen lipopolisacáridos. Pertenecen a este grupo las Salmonella, Escherichia, Neisseria, bruselas, espirilos y vibrios, entre otros.

Anisotropía: Es la propiedad general de la materia según la cual cualidades como: elasticidad, temperatura, conductividad, velocidad de propagación de la luz, etc. varían según la dirección en que son examinadas.

Bactericida: Es una sustancia que tiene la capacidad de matar bacterias.

Bacteriostático: Es aquel que, aunque no produce la muerte a una bacteria, impide su reproducción; la bacteria envejece y muere sin dejar descendencia.

Biocida: Es los destinados a destruir, neutralizar, impedir la acción o ejercer control de otro tipo sobre cualquier microorganismo dañino por medios químicos o biológicos.

Perovskita: Cualquier material que tenga el mismo tipo de estructura cristalina que el titanato de calcio ($CaTiO_3$).

Peptidoglicano: Es un copolímero resistente que protege a las bacterias de una ruptura.

Intrón: Es un fragmento de ADN que está presente en un gen pero que no codifica ningún fragmento de proteína.

Resumen

En este trabajo se prepararon distintos materiales híbridos orgánicos/inorgánicos y se estudió su desempeño como bactericidas de *Escherichia coli* (*E. coli*). Los materiales híbridos sintetizados consistieron en la asociación de un hidróxido doble laminar inorgánico, o compuesto tipo hidrotalcita, con aniones de moléculas orgánicas con actividad antibacterial. Las moléculas biológicamente activas fueron alojadas en los sólidos aprovechando las propiedades de intercambio iónico y de efecto memoria de los hidróxidos dobles laminares. Para la preparación del material híbrido se utilizó compuesto tipo hidrotalcita ZnAl y aniones orgánicos provenientes del ácido nalidíxico. Se hicieron experimentos de inhibición de *E. coli* frente a los materiales, los materiales se reutilizaron para determinar si la molécula orgánica fue liberada de manera controlada. La caracterización del material se llevó a cabo por difracción de rayos X y espectroscopia de IR por transformada de Fourier.

Palabras claves: Materiales híbridos, *E. coli*, ZnAl, hidrotalcita, ácido nalidíxico

Abstract

In this research, different organic / inorganic hybrid materials were prepared and their performance as bactericides of *Escherichia coli (E. coli*) was studied. The hybrid materials synthesized consisted of the association of an inorganic lamellar double hydroxide, or hydrotalcite-type compound, with anions of organic molecules with antibacterial activity. The biologically active molecules were housed in the solids taking advantage of the ion exchange and memory effect properties of the laminar double hydroxides. For the preparation of the hybrid material, a hydrotalcite-type compound ZnAl and organic anions from nalidixic acid were used. Inhibition experiments of *E. coli* were made against the materials, the materials were reused to determine if the organic molecule was released in a controlled manner. The characterization of the material was carried out by X-ray diffraction and Fourier transform IR spectroscopy.

Keywords: Hybrid materials, *E. coli*, ZnAl, hydrotalcite, nalidixic acid

I. Introducción

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) o gastrointestinales, son un problema que afecta tanto a adultos como a niños, y la Escherichia coli (*E. coli*) se encuentra entre las principales causas bacterianas de diarrea. Sus patotipos se han relacionado como la principal causa de muerte por EDA.

Existen muchas desventajas asociadas al empleo de determinados fármacos. Éstos se distribuyen en el organismo según sus propiedades físicas, tales como la solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar gran variedad de sitios en los cuales puede que se encuentren fuera de su intervalo terapéutico, que sean inactivos, o que su acción sea indeseada o nociva, y, por tanto, con efectos secundarios negativos.

La liberación controlada de fármacos es una nueva modalidad para tratar patologías de diverso tipo y características. El término de liberación controlada se refiere a la capacidad de un sistema de administrar una droga durante un período prolongado de tiempo a una tasa controlada, ofreciendo una atractiva alternativa para conseguir niveles constantes de fármaco en el organismo, y a su vez reduciendo los posibles efectos tóxicos del mismo.

Los hidróxidos dobles laminares (HDLs) son estructuras sintéticas formadas por láminas de hidróxidos metálicos cargadas positivamente que son estabilizadas con aniones interlaminares. La presencia de grupos hidroxilo en las superficies de sus láminas y los aniones intercambiables los hace compuestos ideales para preparar productos de funcionalización o hibridación con moléculas orgánicas permitiendo la obtención de nuevos materiales en escala nanométrica que cubren una gama amplia de aplicaciones, desde materiales biológicamente compatibles hasta catalizadores o materiales para remediación ambiental. En la actualidad existen muchos materiales inorgánicos potencialmente útiles, los HDLs preparados a partir de elementos biocompatibles (Mg, Al, Zn, Fe) muestran una baja toxicidad y propiedades

características que pueden ser aprovechadas para evitar algunos efectos secundarios, o bien, disminuir o eliminar las propiedades fisicoquímicas adversas de algunos medicamentos, como el mal olor, su baja solubilidad, su alta volatilidad, así como su descomposición en presencia de irradiación, agua, oxígeno, etc.

En este trabajo de investigación se estudiaron las características químicas y estructurales de compuestos ZnAl con la intercalación de una molécula orgánica (ácido nalidíxico) con propiedades antibacteriales y su evaluación en la inhibición de la *E. coli*, los métodos de síntesis, sus productos de intercalación o funcionalización.

I.1 Justificación

El objetivo ideal de los sistemas de administración y liberación controlada de moléculas activas biológicamente contempla dos aspectos importantes, la localización espacial y la liberación temporal o controlada de la molécula activa. La localización espacial se relaciona con el hecho que la molécula pueda alcanzar un órgano o tejido en específico. La liberación controlada se refiere al control de la velocidad de liberación de la especie activa en el lugar donde se requiere. Estos dos aspectos no siempre pueden alcanzarse, por lo que aún, en numerosos casos, se necesitan avances en la investigación para poder proponer nuevos sistemas de administración y liberación controlada de moléculas activas. Por lo anterior, siempre se tienen que tomar en consideración tanto al vehículo y a la ruta de administración, como al objetivo (órgano o tejido) para proponer una estrategia que permita incrementar la eficiencia terapéutica y, en muchos casos, disminuir los efectos secundarios. En este trabajo se pretende que el material híbrido, preparado por asociación de matrices inorgánicas (ZnAl) y moléculas orgánicas con propiedades antibacterianas (ácido nalidíxico), no solamente mantenga las propiedades bactericidas o bacteriostáticas de la molécula orgánica, sino que también evite la pérdida del principio activo para fines de reciclaje, ya que la molécula orgánica al ser liberada causa un problema ambiental.

I.2 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar materiales híbridos biocompatibles inmovilizando moléculas con actividad antibacterial en matrices inorgánicas a base de hidróxidos dobles laminares y evaluar su actividad frente a *E. Coli*.

I.2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar materiales híbridos por intercalación de aniones orgánicos provenientes del ácido nalidíxico en el HDL (ZnAl).
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los sólidos mediante técnicas de difracción de rayos-X y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.
- Determinar la cinética de inhibición de la bacteria *E. coli* frente al material híbrido y su liberación controlada.

I.3 Hipótesis

Es posible preparar materiales híbridos biológicamente activos a partir de hidróxidos dobles laminares y moléculas con actividad antimicrobiana para *E. coli*. El híbrido obtenido conservará las propiedades antibacterianas de la molécula biológicamente activa el cual se liberará de manera controlada.

II. Marco teórico

Hoy en día, debido al gran avance que ha sufrido la medicina, prácticamente nadie está completamente sano, poco a poco las personas sanas se convierten en pacientes. Anteriormente, la industria farmacéutica se enfrentaba a problemas relacionados con la síntesis de fármacos sin preocuparse por los efectos secundarios derivados de la administración de éstos. Pasado el tiempo, se le ha dado la preocupación necesaria a las consecuencias que trae consigo el uso de fármacos.

Se pueden producir interacciones entre fármacos que compiten por el mismo receptor o que actúan sobre el mismo sistema fisiológico. Las interacciones se pueden producir cuando un fármaco altera la absorción, distribución o eliminación de otro fármaco, puesto que aumenta o disminuye la cantidad que llega a la zona de acción. Las interacciones fármaco-fármaco son algunas de las causas más frecuentes de efectos adversos. Cuando se administran dos fármacos a un paciente, pueden actuar de manera independiente o interactuar entre sí. La interacción puede aumentar o disminuir los efectos de los fármacos implicados y puede causar toxicidad inesperada.

En la actualidad, de manera general, se busca que la terapia con medicamentos sea más eficaz procurando que éstos sean colocados justo en el sitio adecuado para lograr así la respuesta farmacológica deseada sin ocasionar daños *(Colin R. Gardner, 1985)*.

De esta forma, las condiciones para que la terapia con medicamentos sea adecuada son: que el fármaco llegue al objetivo sin dañar otros órganos o tejidos y que haya una correcta cantidad del fármaco absorbido en el blando. El conjunto de condiciones que favorecen el mejor aprovechamiento de los fármacos es llamado, sistema de liberación controlada, el cual está basado en la creación de nuevos sistemas que faciliten la administración, transporten y liberen el principio activo en el lugar adecuado.

Una parte de la estrategia actual consiste en el diseño de nuevas formas de

administración-liberación mediante el uso materiales híbridos que consisten en matrices biocompatibles, en las cuales se encapsulan moléculas orgánicas o fármacos.

II.1 Materiales híbridos

La combinación de materiales de distinta naturaleza (orgánica e inorgánica) da lugar a los llamados Materiales Híbridos, con propiedades muy superiores a la de sus constituyentes. Se organizan en niveles discretos, dando lugar a materiales con una estructura jerárquica a escala molecular, nanoscópica, microscópica y macroscópica.

Estos materiales tienen la capacidad de actuar como matrices inorgánicas receptoras de moléculas orgánicas de interés biológico y dar lugar a la formación de materiales híbridos interesantes *(J. Oh et al., 2009; S.-J. Ryu et al., 2010).*

Dentro de la variedad de matrices inorgánicas laminares con características biocompatibles podemos encontrar a los hidróxidos dobles laminares (HDLs) comúnmente llamados materiales tipo hidrotalcita, que son materiales fáciles de sintetizar en el laboratorio y poseen una textura nano-organizada.

II.2 Hidróxidos dobles laminares

Los hidróxidos dobles laminares (HDLs) son estructuras sintéticas formadas por láminas de hidróxidos metálicos cargadas positivamente que son estabilizadas con aniones interlaminares. La presencia de grupos hidroxilo en las superficies de sus láminas y los aniones intercambiables los hace compuestos ideales para preparar productos de funcionalización o hibridación con moléculas orgánicas permitiendo la obtención de nuevos materiales en escala nanométrica que cubren una gama amplia de aplicaciones.

Pueden representarse con la fórmula general *(S. Miyata, 1980)*:

$$[{M_n}^{2+}{M_m}^{3+}(OH)_{2(n+m)}]^{m+}[A^{x-}]_{\frac{m}{x}} * \ y\ H_2O$$

Dónde M^{2+} y M^{3+} son cationes de metales divalentes y trivalentes, respectivamente. A, representa al anión que se encuentra en la región interlaminar (normalmente el ion carbonato), finalmente, y, es el número de moléculas de agua del espacio interlaminar. El ion divalente puede ser Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, etc., y el ion trivalente puede ser Al^{3+}, Fe^{3+}, Cr^{3+}, etc.

II.3 Métodos de síntesis

Existen numerosos métodos por los cuales se pueden preparar hidróxidos dobles laminares *(A. de Roy et al., 2001)*. Entre los principales se encuentran los métodos electroquímicos, de precipitación a pH constante *(S. Miyata, 1980),* de precipitación a pH variable, de precipitación en emulsión *(J. He et al., 2004)*, sol-gel *(T. López et al., 1997)* y de cristalización hidrotérmica usando radiación de microondas *(P. Benito et al., 2009; P. Benito, M. Herrero et al., 2008; G. Fetter et al., 1997)* o no, entre otros. En este trabajo solamente se describirán los métodos de coprecipitación a baja y a alta sobresaturación, así como la coprecipitación homogénea por descomposición de urea. Esta elección es debida a que estos métodos son los más adecuados para la síntesis de grandes cantidades de materiales y son los más comunes.

II.3.1 Método de coprecipitación a baja saturación de sales metálicas.

En general, las precipitaciones a baja sobresaturación se realizan por adición lenta de una solución que contiene una mezcla de sales de cationes divalentes y trivalentes a un recipiente que contiene agua. Una segunda solución alcalina, que contiene los aniones que se desean tener en la región interlaminar, se añade simultáneamente al recipiente a una velocidad tal que permita mantener el pH constante en un valor seleccionado para que conduzca a la coprecipitación del HDL.

En general, este método de baja sobresaturación da lugar a precipitados con mayor cristalinidad que los obtenidos en condiciones de alta sobresaturación, ya que

en este caso la velocidad de crecimiento del cristal es superior a su velocidad de nucleación *(J.A.D. Jianyi Shen et al., 1994)*.

II.3.2 Método de coprecipitación a alta sobresaturación de sales metálicas.

Se parte de 2 soluciones: una que contiene los cationes M^{2+} y M^{3+} y otra, de características alcalinas, que también contiene a los aniones que se desean tener en el espacio interlaminar. La solución que contiene los cationes se agrega sobre la solución básica o viceversa. En este caso la velocidad de nucleación de los cristales es mayor a su velocidad de crecimiento por lo que se producen materiales con menor cristalinidad. De igual forma, debido a que se observa un cambio continuo en el pH de la solución, la formación de impurezas de tipo $M(OH)_2$ o $M(OH)_3$ es común. En este método no hay control de pH *(J. He, M. Wei et al., 2006).*

II.3.3 Método de coprecipitación homogénea con urea.

Los cationes Zn^{2+} y Al^{3+} precipitan en forma de HDL gracias a la hidrólisis de urea a 90 °C a partir de una solución de nitratos de Zn y Al durante 10 h. Para evitar la intercalación del $CO3^{2-}$ que proviene de la hidrólisis de la urea se introduce un exceso de NH_4NO_3 que proporciona iones NO^{3-} en la solución.

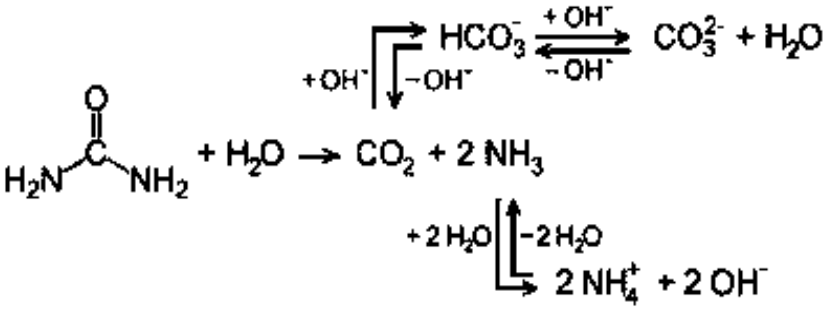


Figura 1:Esquema para la descomposición de la urea en solución acuosa

$$Zn(NO_3)_2 \rightarrow Zn^{+2} + 2NO_3^-$$

$$Al(NO_3)_3 \rightarrow Al^{+3} + 3NO_3^-$$

$$CO_3^{-2} + 2(NH_4NO_3) \rightarrow (NH_4)_2CO_3 + 2NO_3^- \xrightarrow{+ZnAl} ZnAlNO_3$$

Figura 2: Síntesis de ZnAl-NO3

El sólido de ZnAl-NO_3 (ion nitrato) fue sintetizado por el método de hidrólisis de urea, para evitar la intercalación del CO_2, en forma de CO_3^{2-}, que proviene de la hidrólisis de la urea, se introduce un exceso de NH_4NO_3 (nitrato de amonio) que proporciona iones NO^{3-} en la solución *(A. Inayat et al., 2011).*

II.4 Efecto memoria de los HDL

La evolución estructural de un HDL en función de la temperatura del tratamiento térmico es la siguiente:

- A temperaturas menores a 150ºC se observa una pérdida de moléculas de agua adsorbidas físicamente sin que exista modificación de la estructura laminar.
- Entre 300 y 500ºC tiene lugar la deshidroxilación de las láminas que trae consigo el colapso del arreglo laminar.

En todos los estados, excepto cuando el HDL se somete a temperaturas superiores a 600°C y se ha formado la fase perovskita, si el sólido se pone en contacto con una solución que contenga aniones, éste recobrará su estructura laminar original. La capacidad de reconstruir la estructura laminar recibe el nombre de efecto memoria. Esta propiedad es muy útil cuando se quiere intercalar un anión diferente al original, sobre todo en el caso de aniones orgánicos de gran tamaño *(A.L. McKenzie et al., 1992)*.

II.5 Intercambio iónico

Esta afinidad tiene una influencia directa sobre las propiedades del intercambio aniónico de los HDL. Los aniones divalentes son más afines con el espacio interlaminar *(S. Miyata, 1983)* que los cationes monovalentes; es decir, es fácil reemplazar aniones monovalentes inicialmente presentes en la región interlaminar por aniones divalentes. De igual forma, es más fácil intercambiar aniones NO_3^- que aniones Cl^-.

Aniones divalentes: $CO_3^{-2} > SO_4^{-2}$

Aniones monovalentes: $OH^{-1} > F^{-1} > Cl^{-1} > Br^{-1} > NO_3^{-1} > I^{-1}$

De esta forma, en muchos procesos de intercambio aniónico se utilizan HDL en su forma HDL-NO_3 y se evita la presencia del CO_2 atmosférico porque éste se absorbe fácilmente y forma iones CO_3^{-2} por su gran afinidad con los HDL.

II.6 Bacterias

Las bacterias son microorganismos que poseen las siguientes características:

- No contienen peptidoglicano en la pared celular.
- Los lípidos en la membrana citoplásmica son moléculas hidrocarbonadas (no contienen ácidos grasos) que están unidas al glicerol.
- Existe intrones y no tienen núcleo verdadero ni mitocondrias.

II.7 Escherichia coli

La *E. coli* es una bacteria Gram-negativa, anaerobio facultativo que se asocia con las enfermedades gastrointestinales. Este microorganismo presenta diferentes factores de virulencia que son responsables de una amplia gama de enfermedades diarreicas *(J. P. Nataro et al., 1998)*. Se encuentra generalmente en los intestinos

animales, por lo cual resulta fácil que se deposite en aguas negras, las cuales son llevadas a medios nutritivos, principalmente provenientes de las aguas de riego. La *E. coli* puede causar algunas enfermedades en los humanos entre las que destacan la diarrea y la disentería. Se encuentra en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos, es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. En individuos sanos, es decir, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal, ayudando así a la absorción de nutrientes.

II.8 Ácido nalidíxico.

El ácido nalidíxico (*NAD*) es un agente antimicrobiano perteneciente a la primera generación de las quinolonas. Dado que se concentra en la orina produciéndose concentraciones en plasma muy bajas, el ácido nalidíxico sólo se utiliza en el tratamiento de las infecciones urinarias producidas por bacterias gram-negativas susceptibles *(D.C. Hooper et al., 1995; V.T. Andriole et al., 1988)*. Entre los gérmenes que suelen ser sensibles al ácido nalidíxico se encuentran las Enterobacter sp., Escherichia coli, Klebsiella sp., Morganella morganii, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Providencia rettgeri, Salmonella sp. y Shigella sp. Las Pseudomonas son indefectiblemente resistentes a este fármaco.

Como mecanismo de acción, el ácido nalidíxico interfiere con la ADN-polimerasa bacteriana, interfiriendo con la síntesis de ADN. La resistencia al ácido nalidíxico se suele desarrollar con bastante rapidez.

El ácido nalidíxico cuya fórmula molecular es $C_{12}H_{12}N_2O_3$, es conocido químicamente como ácido 1-etil-7-metil-4-oxo-[1,8] naftiridine-3- carboxílico.

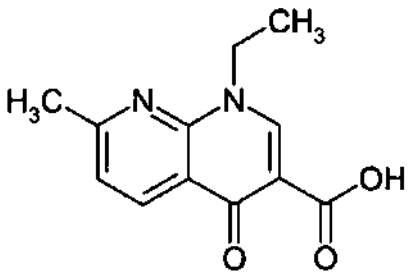


Figura 3: Estructura química del anión del ácido nalidíxico

III. Metodología

En este capítulo se describe el método de preparación del HDL ZnAl, así como la preparación de los materiales híbridos a partir de los HDL y del anión orgánico del ácido nalidíxico. De igual forma se describen las técnicas utilizadas para la caracterización de los diferentes materiales. La metodología de las técnicas se siguieron de acuerdo con lo reportado por (*Alejandra Santana Cruz, 2014*).

III.1 Método de coprecipitación homogénea con urea

El sólido de ZnAl-NO_3 fue sintetizado por el método de hidrólisis de urea, tradicionalmente, debido a los productos de la hidrólisis de la urea *(A. Inayat et al., 2011)*, este método conduce a la formación de HDL con aniones carbonato en la región interlaminar. Este resultado es independiente del tipo de sales metálicas utilizadas en las síntesis (cloruros o nitratos). Así, los cationes Zn^{+2} y Al^{+3} precipitan en forma de HDL gracias a la hidrólisis controlada de la urea a 90°C a partir de una solución de nitratos de Zn y Al. Durante la síntesis, el pH de la solución se incrementa de manera gradual conforme la hidrólisis de la urea transcurre a la vez que se logran concentraciones locales homogéneas que resultan en la formación de sólidos de mayor cristalinidad, mayor tamaño de cristal (del orden de los µm) y una distribución de tamaño de cristal homogénea; todo esto en comparación con los sólidos sintetizados por el método de coprecipitación en condiciones de alta o baja sobresaturación. Para evitar la intercalación del CO_2, en forma de CO_3^{-2}, que proviene

de la hidrólisis de la urea, se introduce un exceso de NH_4NO_3 que proporciona iones NO_3^- en la solución.

Para la síntesis del sólido ZnAl-NO_3 se disolvieron 0.335 moles 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 desionizada libre de CO_2 a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 1.65 moles de urea y 1 de mol NH_4NO_3 y la solución resultante se colocó en un matraz de bola de tres bocas de 500 mL equipado con un sistema de reflujo. El sistema se purgó por burbujeo de gas argón durante 1 h y la temperatura se incrementó a 90°C con ayuda de un baño termostatizado con arena.

Después de 10 h a esta temperatura, el precipitado blanco obtenido se centrifugó durante 15 min, se lavó varias veces con agua desionizada caliente y libre de CO_2. Finalmente, el sólido se secó a 120 °C durante 12 h en una estufa. El sólido preparado tiene una relación Zn^{+2} / Al^{+3}= 2.

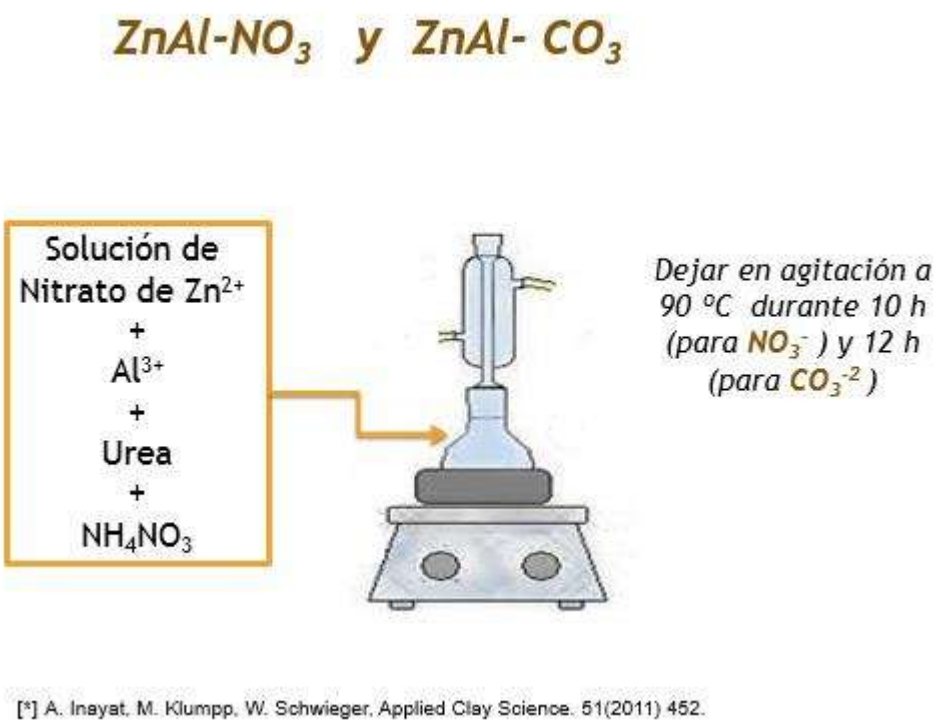


Figura 4: Obtención de hidróxidos dobles laminares (HDLs).

III.2 Síntesis de materiales híbridos

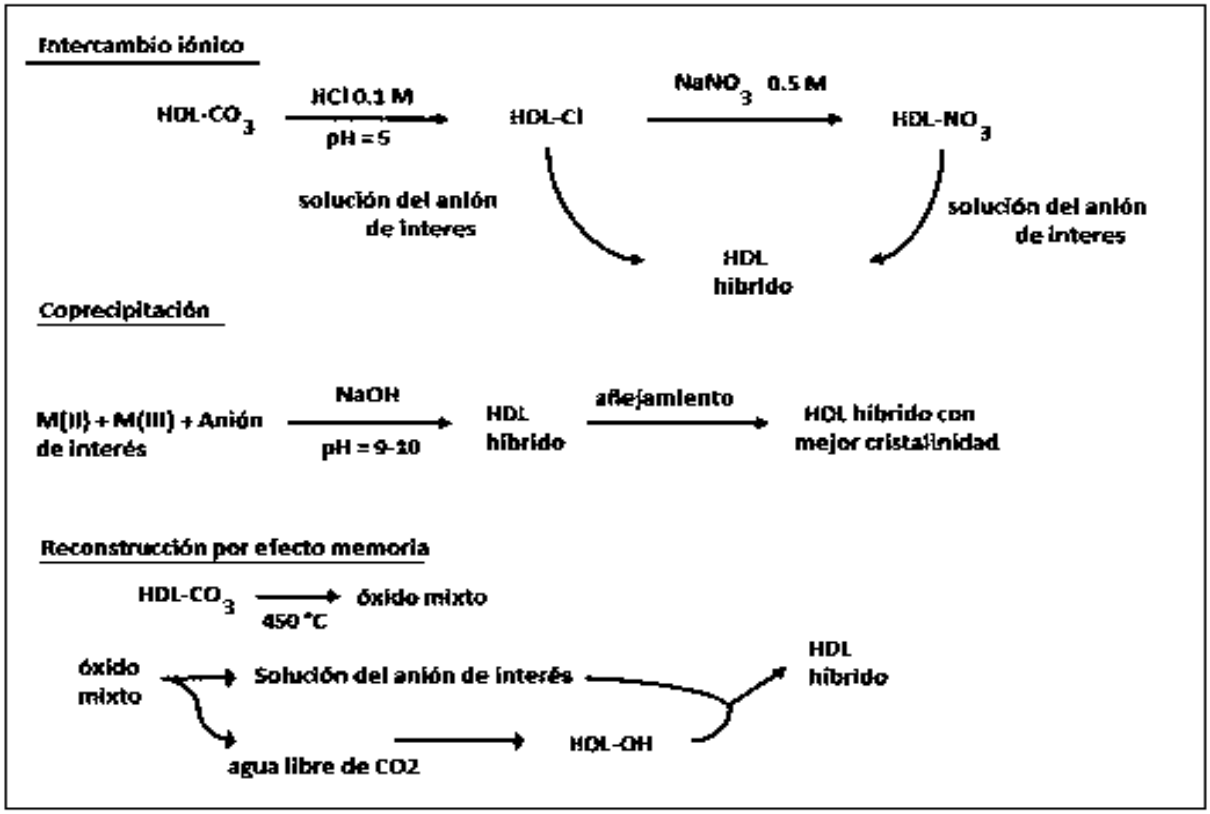


Figura 5: Rutas de obtención de materiales híbridos a partir de hidróxidos dobles laminares.

Como ya se mencionó, una reacción de intercalación en los HDL puede llevarse a cabo por varias vías, o por una sola dependiendo del sistema HDL/anión estudiado. En este trabajo se abordó una estrategia similar a la reportada en la literatura a fin de realizar las reacciones de intercalación para cada sistema HDL/anión *(U. Costantino et al., 2008)*. La estrategia empleada se ilustra en la Figura 5.

III.3 Intercalación por efecto memoria

En este caso se trata de un método de intercalación indirecto en el cual el óxido mixto obtenido después del tratamiento térmico del HDL correspondiente, se pone en

contacto con una solución que contenga el anión de interés. Después de un cierto tiempo, el HDL recobrará su estructura laminar original y en la región interlaminar residirán los aniones contenidos en la solución. Esta propiedad es muy útil cuando se quiere intercalar un anión diferente al original, sobre todo en el caso de aniones orgánicos de gran tamaño.

En primer lugar, 0.5 g del HDL se sometieron a un tratamiento térmico a 500°C (5°/min) durante 5 h en un flujo de N_2. El óxido mixto obtenido se puso en contacto con 30 mL de una solución, previamente burbujeada con argón, que contiene al anión de interés (4.8 mmol) y ajustado el pH a un valor de 9 con NaOH (0.1 M). La suspensión obtenida se dejó en agitación durante 7 días. Transcurrido este tiempo, el sólido se separó de la solución por centrifugación y se lavó con H_2O desionizada libre de CO_2 para finalmente secarlo a 50 °C durante 48 h. De esta forma se obtuvieron los sólidos ZnAl-NAD.

III.4 Técnicas experimentales de caracterización

III.4.1 Difracción de rayos X.

El método de difracción de rayos-X de polvo cristalino es capaz de suministrar información cualitativa y cuantitativa sobre la composición de las fases cristalinas presentes en una muestra sólida. Las estructuras cristalinas poseen planos, producidos por ordenamientos repetitivos de átomos, que son capaces de difractar rayos-X. El fundamento de esta técnica se debe a la ley de William Bragg para interferencias constructivas. Bragg desarrolló una explicación de lo que sucedía cuando un haz monocromático de rayos-X llegaba a un cristal. Cuando un haz de rayos-X incide con un ángulo θ en una estructura ordenada la ley establece que para que las ondas reflejadas estén en concordancia de fase, y por tanto den lugar a una interferencia constructiva (difracción), es necesario que la diferencia de camino recorrido de las dos reflexiones sea múltiplo entero de la longitud de onda del haz incidente. Estas observaciones se traducen matemáticamente en la ecuación:

2d sen □ = n □

Donde d es la distancia interplanar, n un número entero que representa el orden de difracción y λ la longitud de onda de la fuente de rayos-X.

Los sólidos que poseen suficiente orden periódico son cristalinos y por tanto dan lugar a patrones de difracción bien definidos. Las distancias entre los diferentes planos que definen la red cristalina determinan el valor del ángulo de Bragg, cuya posición se considera como “huella única” del sólido ordenado. De este modo, los patrones de difracción suministran información inequívoca de la estructura cristalina. La posición angular de los máximos de difracción se relaciona con los parámetros de la celda unidad mientras que las intensidades reflejan la simetría de la red y la densidad electrónica dentro de la celda unidad.

Para llevar a cabo cada análisis, se molieron los polvos de los catalizadores a un tamaño inferior a 200 mallas (74 μm); se colocaron en el porta muestras y se introdujeron en el aparato. Las condiciones de operación fueron con un tamaño de paso de 0.6 □° en un intervalo de análisis de 10-80°. A un voltaje de 40 KeV y una corriente de 30 mA.

Los difractogramas de rayos-X (DRX) de las muestras en polvo se obtuvieron en un difractómetro Philips X’PERT PRO; las muestras se analizaron en un rango de 3.4-80 (2θ) y con longitud de onda CuKα1 =1.5418 Å. Se utilizó un voltaje-amperaje de 45 kV y 40 mA respectivamente.

La interacción de los rayo X con la materia esencialmente ocurre mediante dos procesos: a) Algunos fotones del haz incidente son desviados sin pérdida de energía, constituyen la radiación dispersada exactamente con la misma λ que la radiación incidente (es la que origina el fenómeno de la difracción). b) Los fotones pueden sufrir una serie de choques inelásticos al incidir sobre un blanco y su energía incrementa la T de la muestra o da lugar al fenómeno de fluorescencia.

Un rayo difractado puede definirse como un rayo compuesto de un gran número de rayos dispersados que se refuerzan mutuamente. La difracción es, por tanto, esencialmente un fenómeno de dispersión. Los átomos dispersan la radiación incidente en todas direcciones, y en algunas direcciones los rayos dispersados estarán completamente en fase y por tanto se refuerzan mutuamente para formar rayos difractados.

III.4.2 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

La espectroscopia infrarroja (IR) se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben la luz en el rango infrarrojo del espectro electromagnético y esta energía se convierte en vibración molecular. Esta absorción es específica de los enlaces entre los átomos presentes en la molécula. Utilizando un espectrómetro, esta absorción de luz infrarroja a través del material de la muestra se mide en función de la longitud de onda.

En lugar de comprobar la absorción de la muestra una tras otra con longitudes de onda individuales (dispersivas), la espectroscopia permite registrar toda la información espectral simultáneamente. Para ello, se necesita una fuente de luz continua para generar luz en un amplio rango de longitudes de onda infrarrojas. Esta luz infrarroja pasa a través de un interferómetro y luego se dirige a la muestra.

Esto produce un interferograma, una señal en bruto que representa la intensidad de la luz en función de la posición de un espejo. Esta señal primero necesita ser transformada en Fourier (FT) para producir la conocida representación IR de intensidad contra el número de onda. De ahí el nombre FT-IR o FTIR.

El resultado es un espectro que proporciona una característica "huella digital molecular" con la que se puede examinar, escanear e identificar muestras para muchos componentes orgánicos e inorgánicos diferentes.

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron mediante un espectrofotómetro NICOLET MAGNA IR 750. La región analizada fue de 4000-400 cm^{-1}. La metodología utilizada para obtener los espectros fue por formación de una pastilla mezclando la muestra con KBr en una relación muestra: KBr de 1:100 en peso en una prensa manual. Los espectros de IR se obtuvieron en el modo transmitancia.

Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales.

III.5 Técnicas de evaluación para la inhibición del crecimiento de microorganismos

III.5.1 Método de dilución por agar.

El antibiograma disco-placa es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los agentes antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde hacia el agar radialmente formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase formada entre las bacterias en crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI.

III.5.2 Método de dilución en caldo.

En la dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2 en tubos con un caldo de cultivo que sostenga el desarrollo del microorganismo. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda, para la mayoría de los microorganismos, utilizar caldo Mueller-Hinton (MH), al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. Se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Regularmente se prepara la batería de tubos con 1 mL de medio estéril sin antibiótico. Al primero de ellos se añade 1 mL de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que, una vez inoculados los tubos, con 1 mL de inóculo,

se diluirá nuevamente la concentración del antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 mL al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 mL de medio con agente antimicrobiano con objeto de mantener el volumen final igual a 1 mL. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin agente antimicrobiano que solamente tiene 1 mL de caldo.

III.5.3 Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de E. coli con el Número de Colección de Cepas Americana (en inglés American Type Culture Collection (ATCC) 14028. Las cepas fueron obtenidas del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, las cuales se hicieron crecer en cuñas de agar soya tripticaseína a 37°C por 24 h y se resembraron cada 12h por 5 días para garantizar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4°C, con el fin de mantener la viabilidad.

III.6 Pruebas de pureza

Como hace mencion en el apartado anterior las bacterias fueron donadas por por Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán las cuales nos fueron entregadas con su numero ATCC por lo que sólo se verificó la pureza de las cepas de *E. coli*, observando su morfología en microscopio óptico a 100x.

III.7 Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se usó una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de McFarland). Las pruebas de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 4000. Se midió la absorbancia a 625 nm, incubando bajo las mismas condiciones hasta alcanzar un crecimiento en un rango comprendido entre 0.7 y 0.8 de densidad óptica. Los estándares se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

III.8 Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se tomaron 3 colonias aisladas del mismo tipo de morfología de las cepas mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, y se hicieron crecer en tubos con 5mL de caldo de soya tripticaseína a 37 °C hasta alcanzar la turbidez estándar. Esta suspensión contiene aproximadamente $1x10^8$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL de *E. coli*. Los inóculos se resembraron cada 12 h por 5 días para confirmar la fase exponencial de crecimiento. Estas cepas fueron conservadas a 4°C, con el fin de mantener la viabilidad.

III.9 Crecimiento bacteriano en presencia de materiales híbridos

Se determinó el crecimiento de las bacterias en presencia de los materiales biocidas. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y la CMB promedio. Se enfrentó a un inóculo normalizado a concentraciones fijas de agente antimicrobiano en un caldo. Se inoculó 0.5 mL de muestra de los sistemas líquidos con bacterias (E. coli), en 10 mL de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregó una cantidad de material biocida (cantidad determinada como CMB promedio) a cada tubo incubando a 37°C con agitación a 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 min). La muestra tomada se sembró en cajas Petri con 20 mL de agar MacConkey por la técnica de estriado en placa. Como control, una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 37 °C por 24 h en atmósfera aeróbica y se realizó el conteo de colonias.

IV. Análisis y discusión de resultados

Con el fin de facilitar la identificación de los hidróxidos dobles laminares y los materiales híbridos se adoptó la siguiente nomenclatura para los HDL: ZnAl-X, donde X indica el anión residente en la región interlaminar. En nuestro caso en específico, X puede ser NO_3^- o CO_3^{2-} .

IV.1 Caracterización de materiales ZnAl-X

Los hidróxidos dobles laminares a base de Zn y Al fueron sintetizados con diferentes aniones por diferentes métodos para obtener los sólidos ZnAl-CO_3 y ZnAl-NO_3. En la figura 6 se muestran los difractogramas de rayos-X de estos sólidos y en tabla 1 las distancias interplanares d_{003}. Todos los difractogramas muestran picos asociados a los planos característicos de la hidrotalcita, no se observan otras fases ajenas a este mineral; es decir que se obtuvieron HDLs puros.

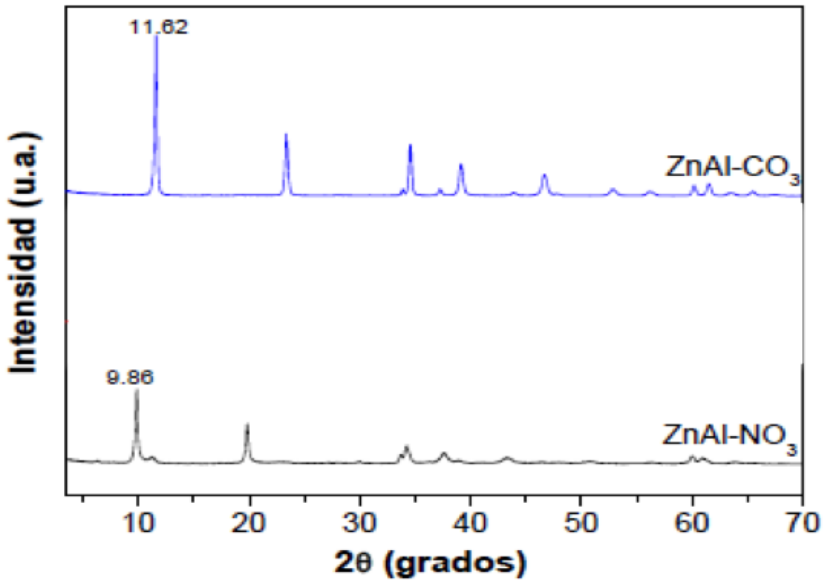


Figura 6: Difractograma de rayos-X de los HDLs

Tabla 1.Distacia interlaminar de los HDLs AnAl-X

Sólido	2θ (º)	d_{003} (Å)
ZnAl-CO₃	11.62	7.61
ZnAl-NO₃	9.86	8.96

En la figura 7 se muestra el espectro de infrarrojo para los sólidos ZnAl-NO_3 y ZnAl-CO_3 se observa una banda de absorción ancha y muy intensa, centrada alrededor de 3445 cm^{-1}, que se atribuye a la frecuencia de vibración del modo de estiramiento v_{OH} de los grupos O-H que forman las láminas tipo brucita, por lo que se puede afirmar que hasta aquí se dispone de dos diferentes tipos de sólidos ZnAl-X que se usaron como materiales de partida para la posterior preparación de materiales híbridos, mostrando un picos a 1363 cm^{-1} y 1384 cm^{-1} que corresponden al -CO_3 y –NO_3 respectivamente.

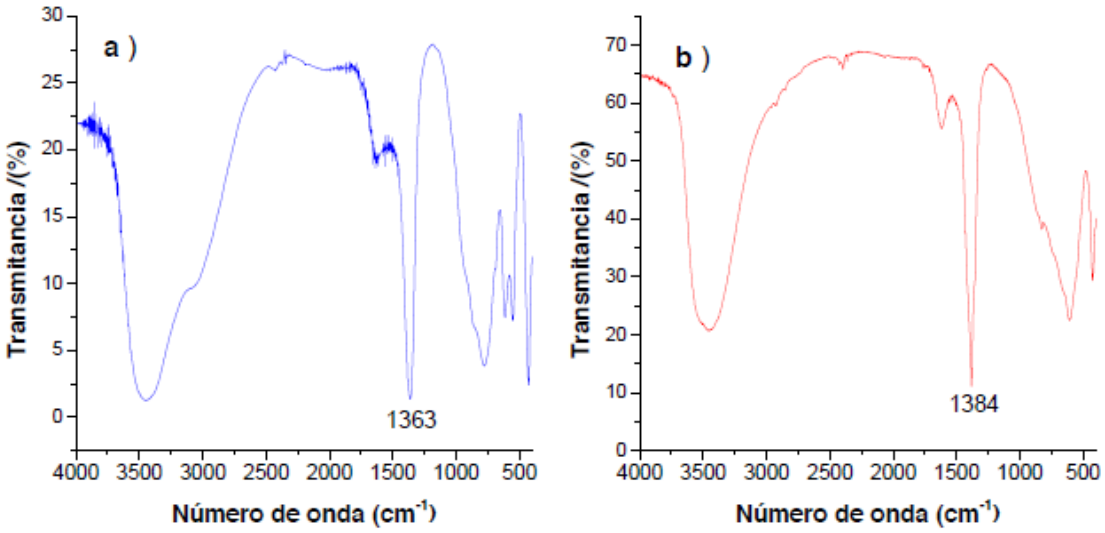


Figura 7:Espectros de infrarrojo de HDL ZnAl-X frescos. a) ZnAl-CO_3 y b) ZnAl-NO_3.

IV.2 Caracterización de materiales híbridos

Para entender mejor la caracterización de los materiales híbridos, se presenta tanto el espectro de infrarrojo como el patrón de difracción de rayos-X de las moléculas que se estudiaron. Esto es con la finalidad de tenerlos como resultados de análisis de referencia. Así, en la figura 8 se muestran el espectro de FTIR y el patrón de DRX del ácido nalidíxico.

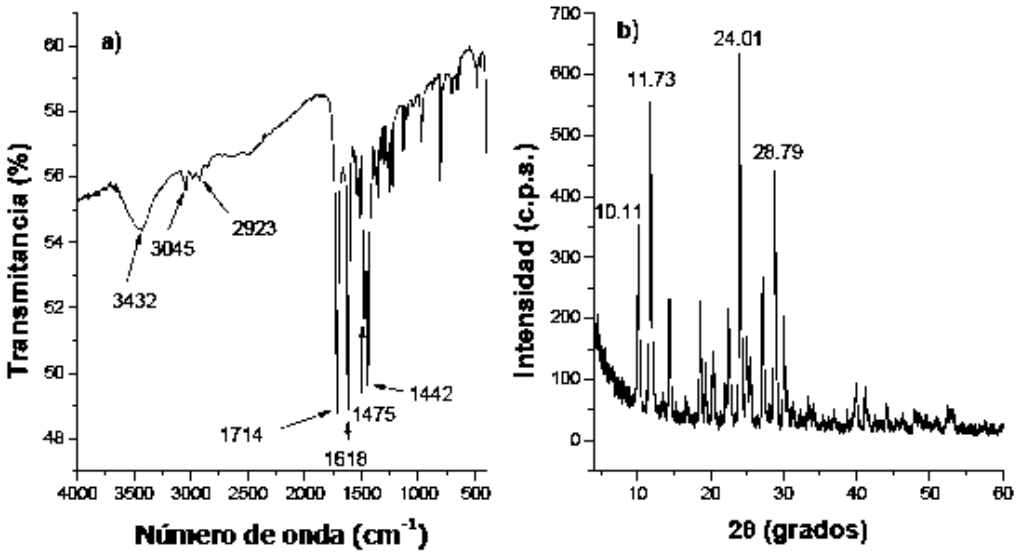


Figura 8: Caracterización de la molécula de ácido nalidíxico. a) Espectro FTIR, b) DRX.

A partir de la fórmula general de los HDLs y de las cargas de los aniones entrante y saliente, se conoce la cantidad necesaria de aniones que pueden entrar al espacio interlaminar, teniendo en cuenta la estequiometría del intercambio; por ejemplo, un ión NO_3^- sería reemplazado por un ión de la molécula orgánica y viceversa; sin embargo, un solo anión CO_3^{2-} tendría que ser reemplazado por dos iones NO_3^- o por dos iones de la molécula orgánica para no crear un desbalance de cargas en la región interlaminar. De esta forma se deben tomar en cuenta las cargas, tanto del anión inicialmente presente en la región interlaminar, como del anión que se desea introducir para determinar la cantidad mínima estequiométrica del anión entrante necesaria para lograr el 100% de reemplazo. Sin embargo, el proceso de intercalación

no asegura que el anión ocupe todo ese espacio entre las láminas o logre una tasa de reemplazo de 100 %. Debido a lo anterior, cuando sólo se coloca la cantidad mínima estequiométrica de anión entrante en contacto con un HDL, es probable que el intercambio sea sólo parcial *(Y. T. Kameda et al., 2006)*. En este caso se debe jugar con la relación anión entrante/HDL para asegurar tasas de intercambio más elevadas *(U. Costantino et al., 2008)*. Este fue el caso en las síntesis de materiales híbridos reportadas en este trabajo; por ello se reportan los resultados obtenidos haciendo variar la relación anión/HDL, en los casos donde fue necesario. En la figura 9 se puede apreciar que la molécula orgánica fue intercalada en el HDL.

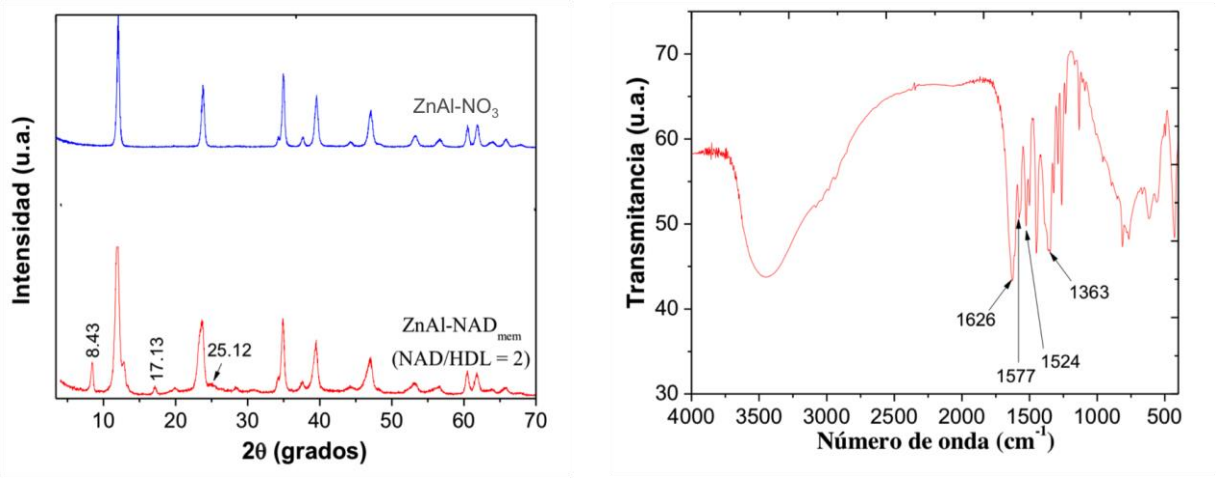


Figura 9: Caracterización del HDL con la molécula de ácido nalidíxico. a) Espectro FTIR, b) DRX

IV.3 CMIs y CMBs del ácido nalidíxico.

Con la finalidad de comprobar la concentración de ácido nalidíxico para que surja efecto bactericida para la *E. coli*, se realizaron pruebas de CMI y CMB para este propósito. En las tablas 2 y 3, se muestran los valores de las CMIs y CMBs respectivamente del fármaco como inhibidor de la *E. coli*, utilizando el método de diluciones y siembra en agar. La reproducibilidad se hizo por triplicado para la cepa bacteriana. Los valores reportados son el promedio de las CMIs y CMBs para cada prueba, en caldo y agar Müller-Hinton (MH) respectivamente. La turbidez en los tubos inoculados, permitió determinar la CMI después de las 24 horas de exposición de las

bacterias frente a los diferentes materiales. La cuantificación de colonias bacterianas que crecieron en placas con agar MH, se realizó después de 24 horas de incubación a 37 ºC.

Tabla 2. CMIs de diferentes concentraciones de ácido nalidixico

CMI (mg/mL)						
	0.17	0.22	0.27	0.33	0.38	0.43
Ácido nalidíxico	+	+	+	+	-	-

+: significa presencia de bacterias y el - : significa ausencia de bacterias.

Tabla 3.CBIs de diferentes concentraciones de ácido nalidíxico

CBI (mg/mL)						
	0.17	0.22	0.27	0.33	0.38	0.43
Ácido nalidíxico	+	+	+	+	-	-

+: significa presencia de bacterias y el - : significa ausencia de bacterias.

Las muestras expuestas que no presentaron turbidez fueron sembradas en cajas petri con agar MH, observándose que el crecimiento de las bacterias fue nulo. Esto demuestra que los materiales tienen efecto bactericida para *E. coli* a una concentracion de 0.27 mg/mL. Cabe señalar que se consideran sistemas en donde no hubo crecimiento, aquellos tubos translúcidos cuya turbidez era muy baja (menos de 50 NTU) o cercana a cero. Aquellos tubos con turbidez aparente y valores mayores a 50 NTU se consideran sistemas con crecimiento microbiano.

Con este método descriptivo de ensayo turbidimétrico se pueden obtener algunas respuestas sobre el comportamiento de las bacterias, en presencia de los agentes bactericidas, tales como supresión en el nivel de crecimiento en la fase estacionaria, disminución de la velocidad de crecimiento y la letalidad *(Davidson and Parish, 1989).*

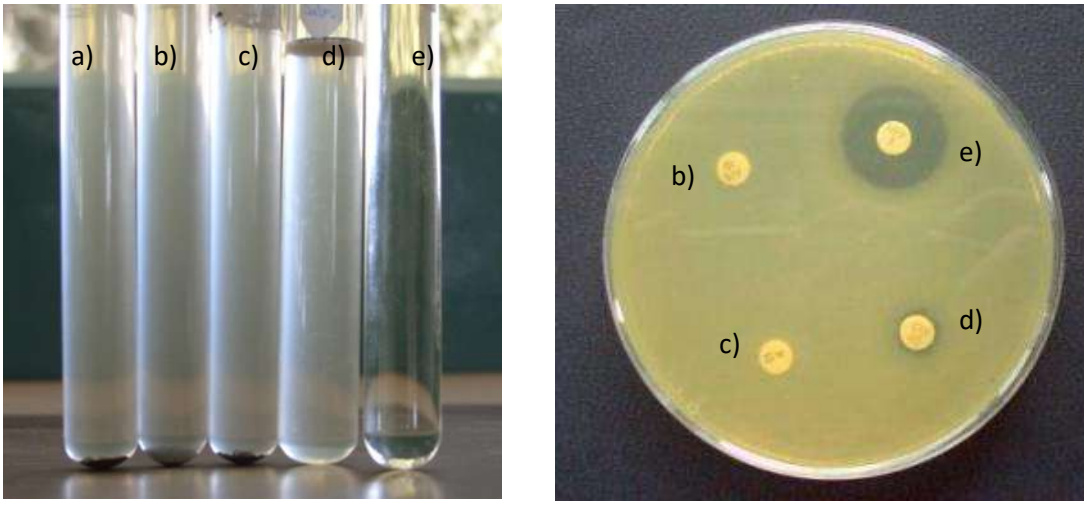


Figura 10: Antibiograma en medio líquido y sólido de *E. coli* frente a NAD, CMBs (mg/mL) de: a) 0.0, b) 0.11, c) 0.17, d) 0.22 y e) 0.27.

Las CMIs y CMBs obtenidas por los dos métodos ensayados (microdilución en líquido y microdilución en agar) no presentaron diferencias significativas. La eficacia, refleja un radio CMB/CMI igual a 1, indicando que los materiales son bactericidas.

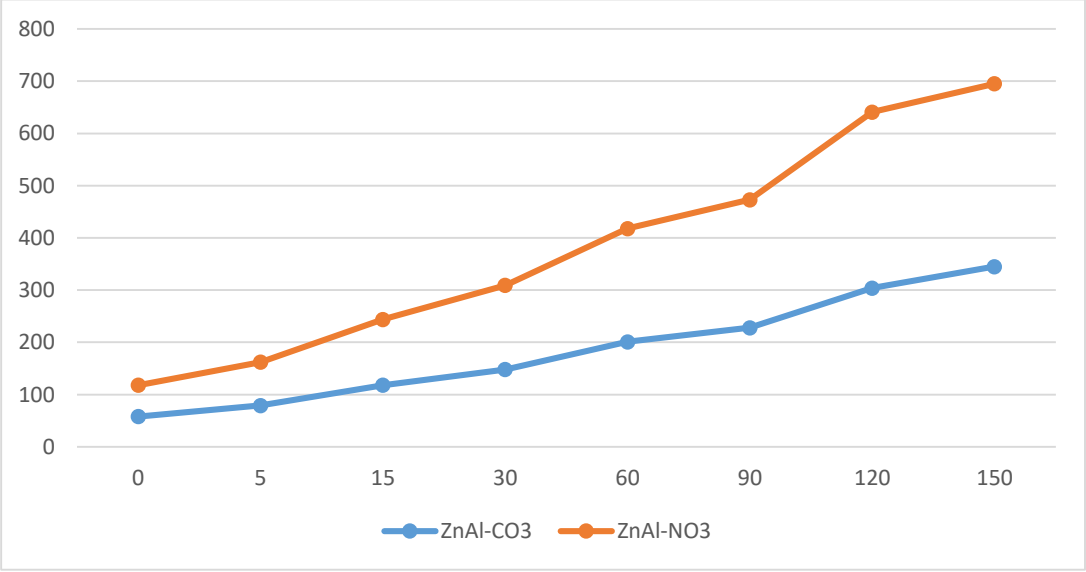
IV.4 Pruebas microbiológicas para evaluar tiempos de inhibición

Antes de evaluar el carácter bactericida de los materiales se realizaron los controles de calidad a las cepas de trabajo por microdiluciones. Los resultados de los controles de calidad (viabilidad y pureza) de *E. coli,* empleados en la evaluación bactericida, cumplieron con los criterios de aceptación al obtenerse valores de viabilidad del orden de $1x10^8$, de modo que los resultados de pureza cumplen con la condición de cultivos libres de contaminación microbiana. Se realizaron pruebas con *ZnAl-CO_3* y *ZnAl-NO_3* antes de imponerles la molécula de NAD para comprobar que el cartucho no es bactericida frente a colonias de *E. coli* estos resultados se reportan en la tabla 4 y figura 9. La valoración del efecto bactericida de los materiales se implementó para medir la viabilidad celular a los 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después de la exposición e incubación de las bacterias con los distintos materiales. Las pruebas se realizaron por triplicado en placas con agar McConkey.

Los resultados expuestos en la tabla 4 y gráfica 1 muestran que en las pruebas microbiológicas, las colonias de *E. coli* sobrevivieron en cada uno de los ensayos, para cada uno de los tiempos de exposición a los diferentes materiales evaluados para validar si son biocidas, mostrando que el material no es bacteriostático o bactericida para la bacteria *E. coli*.

Tabla 4.Colonias de E. coli vs materiales HDLs ZnAl-CO3 y ZnAl-NO3

TIEMPO	$ZnAl\text{-}CO_3$	$ZnAl\text{-}NO_3$
0	58	60
5	79	83
15	118	126
30	148	161
60	201	217
90	228	245
120	304	337
150	345	>350



Gráfica 1: Cinética de crecimiento de la bacteria frente a los HDLs.

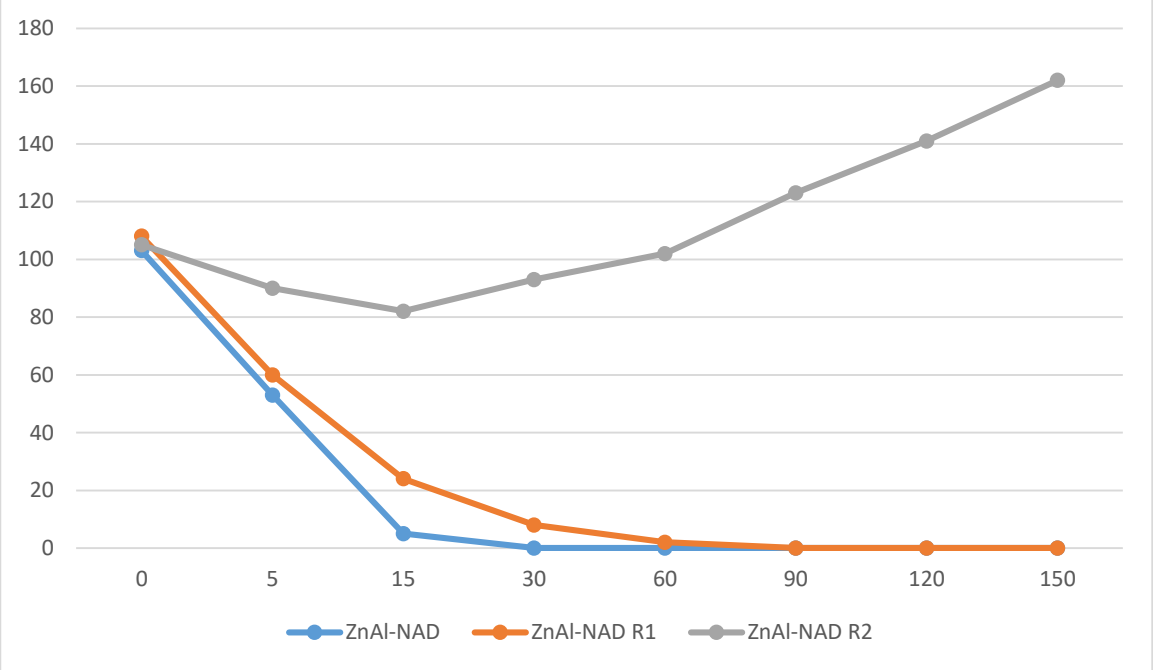
Una vez confirmado que los HDLs no inhiben a la bacteria, se realizaron pruebas con los HDLs con la molécula intercalada, la cual sustituyó a los iones NO_3^- o CO_3^{2-} . Estas pruebas permitieron definir el momento en el que el agente biocida actúa sobre el ciclo de replicación bacteriano, de tal forma que cada prueba con el ácido nalidíxico (NAD) presenta una gráfica diferente que va de acuerdo a su mecanismo de acción. Los resultados de las curvas corresponden a la media de los tres experimentos. La pauta de administración de los bactericidas está en función de la CMB promedio determinada por la bacteria. En las tablas 5 y 6 se muestran las pruebas microbiológicas de los HDLs donde el NAD fue sustituido por el ion NO_3 observándose el número de las colonias de *E. coli* que sobrevivieron en cada uno de los ensayos, para cada uno de los tiempos de exposición al fármaco evaluado como biocida.

Para demostrar que la molécula orgánica es liberada de forma controlada en presencia de la bacteria, los materiales híbridos se recuperaron en dos ocasiones y se realizaron exposiciones frente a las bacterias. En la tabla 5 y gráfica 2, se muestra el número de colonias que sobrevivieron al exponerse a los HDLs reciclados por primera ocasión (R1) y segunda ocasión (R2), donde se puede apreciar que el híbrido ZnAl-NAD elimina más del 95% de las bacterias en un tiempo de 15 minutos, en la primera exposición, eliminando por completo las bacterias a los 30 minutos. En la segunda exposición, las bacterias fueron eliminadas a los 90 minutos en tanto que, en la tercera exposición, el material híbrido presentó un comportamiento bacteriostático inicialmente y después de los 60 minutos se aprecia un incremento en la población bacteriana.

Se realizó el mismo procedimiento para HDLs con el catión CO_3^{2-} que fue sustituido por el NAD, como se puede apreciar en la tabla 6 y gráfica 3, que el híbrido ZnAl-NAD elimina más del 95% de las bacterias en un tiempo de 15 minutos en la primera exposición, eliminando por completo las bacterias a los 30 minutos. En la segunda exposición, las bacterias fueron eliminadas a los 150 minutos en tanto a que, en la tercera exposición, el material híbrido presentó un comportamiento bacteriostático inicialmente y después de los 15 minutos se aprecian un incremento en la población bacteriana.

Tabla 5.Colonias de E. coli vs materiales ZnAl-NAD intercalado del HDL-NO3

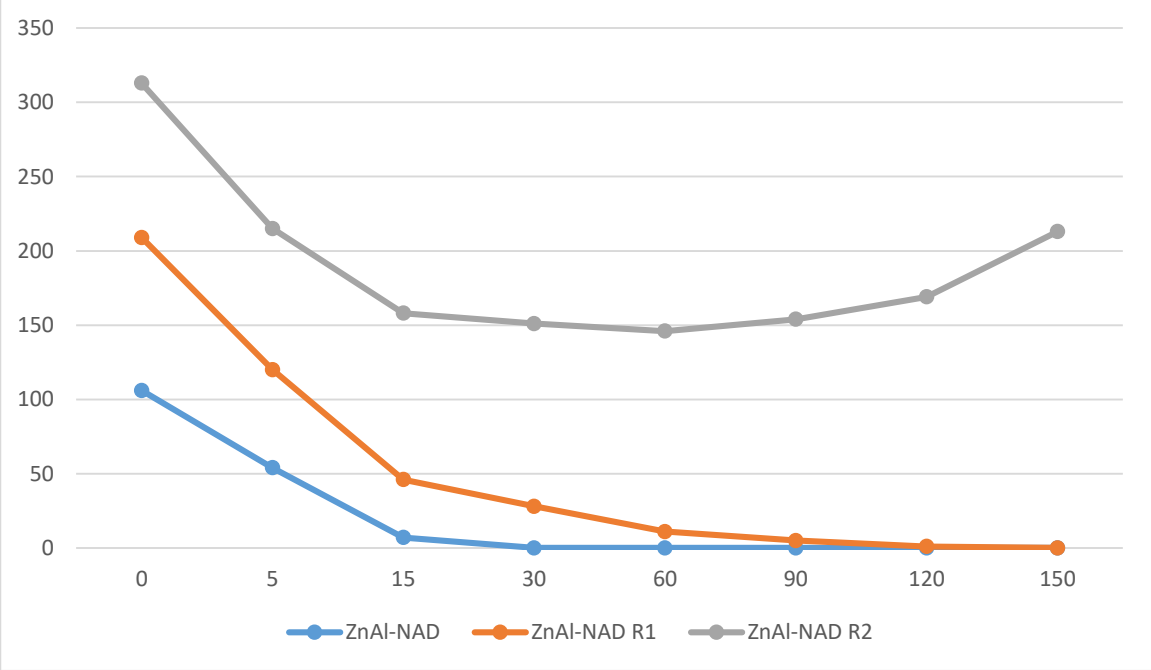
TIEMPO	*ZnAl-NAD*	*ZnAl-NAD$_{R1}$*	*ZnAl-NAD$_{R2}$*
0	103	108	105
5	52	60	90
15	5	24	82
30	0	8	93
60	0	2	102
90	0	0	123
120	0	0	141
150	0	0	162



Gráfica 2: Cinética de inhibición de la *E. coli* frente a los materiales híbridos intercalado del HDL-NO_3

Tabla 6.Colonias de E. coli vs materiales ZnAl-NAD intercalado del HDL-CO3

TIEMPO	*ZnAl-NAD*	*ZnAl-NAD$_{R1}$*	*ZnAl-NAD$_{R2}$*
0	106	103	104
5	54	66	95
15	7	39	112
30	0	28	123
60	0	11	135
90	0	5	149
120	0	1	168
150	0	0	213



Gráfica 3: Cinética de inhibición de la *E. coli* frente a los materiales híbridos intercalado del HDL-CO_3

V. Conclusiones

- De acuerdo a los resultados obtenidos el HDL **ZnAl-NAD** presenta una liberación controlada, ya que al exponer el material tres veces frente a las bacterias de *E. coli*, éste continuaba presentando eliminación de bacterias, observándose un efecto bacteriostático en la tercera exposición, ya que no eliminó las bacterias.
- Los materiales ZnAl-CO_3 y ZnAl-NO_3 son materiales laminares cristalinos como se demuestra por DRX.
- El contar con mayor diámetro interlaminar del ZnAl-NO_3, permite tener una mayor intercalación de la molécula orgánica, y eliminar mayor cantidad de bacterias.
- El menor diámetro interlaminar del ZnAl-CO_3 en cierto punto es una ventaja porque no se requiere mucho antibiótico para que presente buena actividad antibacterial, esto se debe a un efecto sinérgico entre la matriz inorgánica y el antibiótico.
- En general, sobre los sistemas híbridos analizados la actividad antibacteriana no siempre es función directa de la cantidad de antibiótico intercalado. Parece ser que la actividad depende justamente del sistema matriz inorgánica-orgánica estudiados.

Recomendaciones

Para obtener una mejor valoración de los materiales, se deberá estudiar las especificaciones respecto a los siguientes aspectos: propiedades organolépticas (color, sabor, olor); pureza (TLC, HPLC, IR); densidad (densidad verdadera, densidad de empaquetamiento, entre otras); forma cristalina (si la tiene); tamaño/distribución de partículas (tamaño medio, homogeneidad, factor de forma, área superficial).

Sugerencias para trabajo futuro

- Deberá evaluarse cuidadosamente las propiedades fisico-químicas de la molécula orgánica que se considere como un potencial candidato para su empleo en sistemas de liberación controlada.
- Debe evaluarse las características del sistema de liberación y en la fisiología y/o anatomía de la zona de aplicación en el organismo.
- Se deben investigar materiales que presenten especificaciones estrictas respecto a las propiedades organolépticas (color, sabor, olor), pureza, densidad, forma cristalina (si la tiene) y tamaño/distribución de partículas (tamaño, medio, homogeneidad, factor de forma, área superficial).

Referencias

1. Baker, William H. " Perspectiveson Acute Enteric Disease Epidemiology and Control"(Perspectivas en la epidemiología y control de las enfermedades entéricas agudas.) PanAmerican Health Organization Bulletin. 9 (2):148-156.1975.
2. Gwatkin, Davison. "How Many Die? A Set of Demographic Estimates of the Annual Number of Infant and Child Deaths in the World"(¿Cuántos mueren? Un conjunto de estimados demográficos sobre el número de muertes anuales de infantes y niños en el mundo).American Journal of Public Health. 70:1286-1289.1980.
3. NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
4. Chopra, "The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?" Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59 (2007) 587.
5. J.-M. Oh, T.T. Biswick, J.-H. Choy, "Layered nanomaterials for green materials".*Journal of Materials Chemistry* (2009) 2553.
6. X. Wang, W. Lu, W. Shi, F. Li, W. Min, D.G. Evans, X. Duan, "A thermochromic thin film based on host-guest interactions in a layered double hydroxide". *Langmuir* (2010) 1247.
7. S.-J. Choi, J.-M. Oh, J.-H. Choy, "Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells". *Journal of Inorganic Biochemistry* (2009) 463.
8. J.-H. Choy, S.-J. Choi, J.-M. Oh, T. Park, "Clay minerals and layered doublé hydroxides for novel biological applications". *Applied Clay Science* (2007) 122.
9. J.-H. Choy, M. Park, J.-M. Oh, "Bio-nanohybrids based on layered doublé hydroxides". *Current Nanoscience* (2006) 275.
10. Alejandra Santana-Cruz, Jorge Luis Flores-Moreno, Roberto Guerra-González, María de Jesús Martínez-Ortiz, Antibacterial Activity of Pipemidic Acid ions-

MgFeAl Layered Double Hydroxide Hybrid Against E. coli and S. typhi. J. Mex. Chem Soc., 60-2 (2016) 62-66.

11. J.-M. Oh, M. Park, S.-T. Kim, J.-Y. Jung, J.-G. Kang, H. Choy, "Efficient delivery of anticancer drug MTX through MTX-LDH nanohybrid system". *Journal of Physics and Chemistry* (2006) 1024.
12. Colin R. Gardner, Potential and limitations of drug targeting: An overview, *Biomaterials*. (1985) 153.
13. Alejandra Santana Cruz, Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias e ingeniería de materiales “Materiales Híbridos como bactericidas de Escherichia Coli y Salmonella Typhi” (2014)
14. J. Oh, T. Biswick, J. Choy, Layered nanomaterials for green materials, *J. Mater.Chem.* (2009) 2553.
15. S.-J. Ryu, H. Jung, J.-M. Oh, J.-K. Lee, J.-H. Choy, Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system, *J. Phys. Chem. Solids*. (2010)685.
16. S. Miyata, Physico-Chemical Properties of Synthetic Hydrotalcites in Relation to Composition, *Clays Clay Miner.* (1980) 50.
17. A. de Roy, C. Forano, J.P. Besse, Layered double hydroxides: synthesis ands postsynthesis modification, in: V. Rives (Ed.), Layer. Double Hydroxides Present Futur.,*Nova Sci. Pub. Inc.*, New-York, 2001: pp. 1.
18. P. Benito, F.M. Labajos, V. Rives, Microwaves and layered double hydroxides: A smooth understanding, *Pure Appl. Chem.* (2009) 1459.
19. P. Benito, M. Herrero, C. Barriga, F.M. Labajos, V. Rives, Microwave-assisted homogeneous precipitation of hydrotalcites by urea hydrolysis., *Inorg. Chem.* (2008) 5453.
20. G. Fetter, F. Hernández, A.M. Maubert, V.H. Lara, P. Bosch, Microwave Irradiation Effect on Hydrotalcite Synthesis, *J. Porous Mater.* (1997) 27.
21. J.A.D. Jianyi Shen , J. M. Kobe , Yi Chen, Synthesis and Surface Acid/Base Properties of Magnesium-Aluminum Mixed Oxides Obtained from Hydrotalcites, *Langmuir*. (1994) 3902.
22. J. He, M. Wei, B. Li, Y. Kang, D.G. Evans, X. Duan, Preparation of Layered Double Hydroxides, *Struct. Bond.* (2006) 89.

23. A. Inayat, M. Klumpp, W. Schwieger, The urea method for the direct synthesis of ZnAl layered double hydroxides with nitrate as the interlayer anion, *Appl. Clay Sci.*(2011) 452.
24. A.L. McKenzie, C.T. Fishel, R.J. Davi, Investigation of the surface structure and basic properties of calcined hydrotalcites, *J. Catal.* (1992) 547.
25. S. Miyata, "Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds". *Clays and Clay Minerals* (1983) 305.
26. A. Inayat, M. Klumpp, W. Schwieger, "The urea method for the direct synthesis of ZnAl layered double hydroxides with nitrate as the interlayer anion". *Applied Clay Science* (2011) 452.
27. U. Costantino, V. Ambrogi, M. Nocchetti, L. Perioli, Hydrotalcite-like compounds:Versatile layered hosts of molecular anions with biological activity, *Microporous Mesoporous Mater.* 107 (2008).