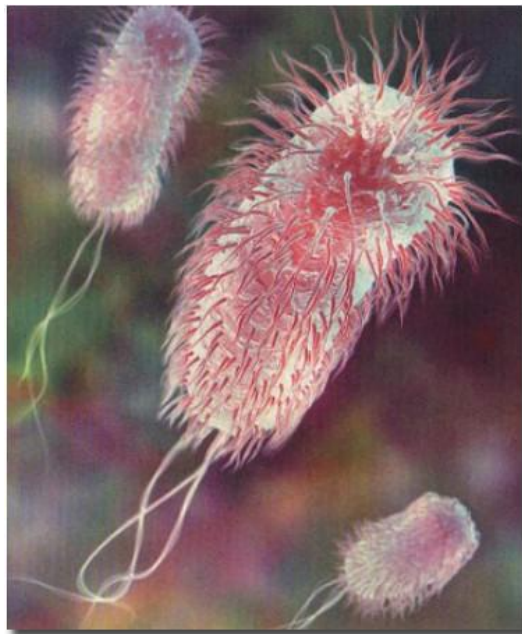


Efectos antimicrobianos sinérgicos de los tratamientos combinatorios y cristalinidad de hidroxiapatita dopada con Ag e hidroxiapatita dopada con Cu sobre *E. coli*

Crystallinity and Synergistic antimicrobial effects of Ag-doped hydroxyapatite and Cu-doped hydroxyapatite combinatorial treatments against *E. coli*



<https://www.usgs.gov/media/images/e-coli-bacteria-microscopic-organism-indicates-fecal-contamination>

Área: Biología y Química

M.C. Nabor Oswaldo Martínez Gracida, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. oswvaldo.martinez@uadec.edu.mx. **Primer Autor**

Dra. Elia Martha Múzquiz Ramos. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. emuzquiz@uadec.edu.mx.

M.C. Mayra Enriqueta Álvarez Monsiváis. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. alvarez-m@uadec.edu.mx

Dra. Nydia Alejandra Castillo Martínez, Universidad Autónoma de Baja California. nydia.castillo@uabs.edu.mx

Dra. Claudia López Badillo Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. cllopezb@uadec.edu.mx

Autor de correspondencia: emuzquiz@uadec.edu.mx.

Resumen

Uno de los problemas a la hora de realizar un implante ortopédico, consiste en la contaminación durante el proceso quirúrgico o de recuperación, lo que produce una infección. Esto conlleva a la necesidad de utilizar antibióticos. En el presente trabajo, se reporta la obtención de un material compuesto a base de hidroxiapatita dopada con plata (HA-Ag) e hidroxiapatita dopada con cobre (HA-Cu). La primera se obtuvo por el método de Pechini (sol-gel) y la segunda por co-precipitación. La HA-Ag no se obtuvo pura, sino una mezcla de HA, fosfato tricálcico (b-TCP) y Ag metálica, mientras que por la HA-Cu no presentó otras fases según DRX. Con estos materiales, utilizando un molino planetario, se obtuvo un compuesto HA-Ag/HA-Cu. Por el método de difusión en discos (Kirby-Bauer) se encontró que existe un efecto sinérgico contra la *E. coli* al formar un material compuesto HA-Ag/HA-Cu.

Palabras clave: Sinergismo, hidroxiapatita dopada, antibacterial

Abstract

The aim of this work was to obtain a composite of silver-doped hydroxyapatite (HA-Ag) and copper-doped hydroxyapatite (HA-Cu) in order to obtain an synergistic effect against *E. coli*. The first was obtained by the Pechini method (sol-gel) and the second one by co-precipitation. The HA-Ag was not obtained pure, but a mixture of HA, tricalcium phosphate (b-TCP) and metallic Ag was obtained, while the HA-Cu did not present other phases according to DRX. With these materials, using a planetary mill, a HA-Ag / HA-Cu compound was obtained. By the method of diffusion in discs (Kirby-Bauer) it was found that there is a synergistic effect against *E. coli* for the composite material HA-Ag / HA-Cu.

Key words: Synergism, doped hydroxyapatite, antibacterial

Introducción.

La búsqueda para conferir propiedades bactericidas a la hidroxiapatita (HA), ha cobrado gran importancia en las investigaciones científicas actuales, por la problemática a nivel global, de las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos que surgen posterior a un procedimiento quirúrgico y que cada vez son más difícil de tratar debido a los múltiples mecanismos de resistencia que las bacterias presentan ante los antibióticos convencionales. Una de las alternativas para contrarrestar esta problemática, es el empleo de algunos cationes como la plata, el cual ha sido y sigue siendo objeto de estudio por su propiedad bactericida de amplio espectro y sobre todo, por la nula resistencia bacteriana que hasta ahora se ha reportado ante su uso (**Silver y col., 2000**).

Debido a que existen varios cationes ya conocidos con las mismas propiedades bactericidas, es posible considerar que se puede conseguir un efecto sinérgico con ellos al ser combinados, tal como sucede con los fármacos y por consiguiente reducir las concentraciones necesarias para lograr efectos terapéuticos efectivos, y evitar posibles intoxicaciones o efectos adversos no deseados **(Rincón y col., 2016)**. La palabra sinergismo proviene del griego *synergia*, “cooperación” e *ismos*, “proceso”. En farmacología la palabra sinergismo significa el aumento de un efecto terapéutico producido por la administración de dos fármacos de acción igual o similar en conjunto, que logran un efecto superior que la suma de cada uno de ellos cuando se administran por separado **(Flores, 2016)**.

Cuando dos sustancias son administradas simultáneamente, puede suceder lo que se conoce como interacción farmacológica, que es la modificación del efecto de un medicamento por la acción de otro (u otros). Y en estas interacciones puede haber una disminución en la intensidad del efecto de un medicamento o un aumento en la magnitud de ese efecto. Cuando existe un aumento, es cuando se llama un efecto sinérgico y cuando es una disminución en la intensidad, se habla de un antagonismo farmacológico **(Linares, 2002)**.

Cabe destacar que todo fármaco, por efectivo que sea, a mayor dosis, la toxicidad aumenta. Y es precisamente en esta parte donde el sinergismo busca minimizar la toxicidad, pero manteniendo la misma o mayor intensidad terapéutica al que se puede lograr en una administración por separado **(Rincón y col., 2016)**.

Se sabe que tanto la plata como el cobre presentan actividad bactericida, incluso se han propuesto mecanismos de acción de la plata que incluye la alta reactividad que tiene con los compuestos de azufre, presentes en las cadenas polipeptídicas de las proteínas de la membrana celular, alterando así la permeabilidad membranal y a la par, inhibiendo la fuerza motriz de protones y transporte de electrones en la cadena respiratoria, provocando disminución en producción de ATP (del inglés adenosine triphosphate) y eventualmente provocar la muerte del microorganismo **(Ayala, 2010; Silver y col., 2000; Cardoso, 2016)**, y por su parte al cobre se cree que inhibe o altera la síntesis de proteínas, con lo que impide que ella efectúe procesos claves del metabolismo, altera la permeabilidad de la membrana celular, causando la peroxidación, ya que induce daño oxidativo de los lípidos, que son claves en el intercambio de moléculas del medio intracelular al extracelular y viceversa (actividad bacteriostática) y se tiene la teoría de que también destruye o altera los ácidos nucleicos (DNA) de bacterias y virus. Su acción causa que los microorganismos pierdan su capacidad de multiplicarse y por tanto mueren **(Figueroa, 2013)**.

Lo anterior es lo que ha impulsado a llevar a cabo el presente trabajo, el buscar combinar plata y cobre como dopaje en la HA con la finalidad última de demostrar un efecto sinérgico entre ellos.

Metodología

La metodología de dopaje tanto con el cobre como con la plata, consistió en fracciones molares a partir de la fórmula estequiométrica $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. En este trabajo se reportan dopajes de 0.5 para la Ag y 1.0 para el Cu, debido a la actividad antibacteriana individual encontrada **(Martínez, 2018)**.

La HA dopada con plata (HA-Ag) se obtuvo mediante el método de Pechini, utilizando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y AgNO_3 como precursores de calcio, fósforo y plata respectivamente. Ácido cítrico, etilenglicol y agua desionizada fueron utilizados también. Los cálculos fueron para obtener 2.5 g de HA-Ag con una relación Ca-Ag/P de 1.67. La relación de ácido cítrico/etilenglicol fue de 2:1 y de ácido cítrico/catión fue de 2:1. Los cálculos y condiciones de síntesis, se basaron en trabajo previo del grupo de trabajo de biomateriales de la Facultad de Ciencias Químicas **(Santillana, 2016)**.

La síntesis de la HA dopada con cobre (HA-Cu), se basa en el método reportado por **Wei y col. (2014)**, utilizando como precursores $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, precipitándose con NH_4OH al 30%.

Para obtener el material compuesto de HA-Ag/HA-Cu, se pesó la misma cantidad de cada material y se mezclaron utilizando un molino planetario a 250 rpm por 10 minutos con una relación carga/bolas de 1:15

Para evaluar la actividad antimicrobiana, se utilizó el método de difusión en discos (Kirby-Bauer). Para esto se pesaron 500 mg de las muestras de HA-Ag e HA-Cu por separado, además de un material compuesto de HA-Ag/HA-Cu. La bacteria (*E. coli*) fue previamente crecida en agar Muller Hinton por 24 horas a 37 ± 0.5 °C. Posteriormente se tomaron con hisopo estéril 4-5 colonias de tamaño similar y se sembraron en placas de agar Muller Hinton sobre toda la superficie del agar con el fin de obtener una de crecimiento bacteriano homogéneo. Posterior al sembrado, se procedió a colocar las 3 muestras en la misma placa cada una en 1/3 del agar, luego se incubaron por 24 horas a 37 ± 0.5 °C y finalmente se evaluó el halo de inhibición.

Resultados y discusión

Para conocer las fases cristalinas obtenidas, en el presente trabajo de investigación se utilizó un Equipo de Difracción de Rayos-X Marca PANalytical Modelo Empyrean con Voltaje: 40 kV y Corriente: 30 mA.

El difractograma de rayos X de la Figura 1 revela picos correspondientes a 3 fases distintas de compuestos; HA, β -Fosfato tricálcico (β -TCP) y plata, según las cartas cristalograficas PDF-

9-492, PDF-9-169 y PDF-04-0783 respectivamente. Los picos característicos de la HA están en los ángulos 2θ : 25.88, 28.97, 31.77, 32.20, 32.90, 34.05 y 39.82. Los picos característicos del β -TCP se encuentran en los ángulos 2θ 17, 25.80, 27.77, 31.03 y 34.37. En el caso de la plata, ésta se identificó como plata elemental y como una tercera fase, de acuerdo a la carta PDF-2 04-0783 donde los ángulos 2θ : 38.12, 44.28, 64.43 y 77.47 y sus correspondientes planos cristalográficos (111), (200), (220) y (311) en ese orden. Se concluye que la plata no se incorporó en la red cristalina de ninguna de las apatitas encontradas como se pretendía. Entonces, el producto obtenido mediante la adición *in situ* de AgNO_3 en la síntesis, resultó una mezcla de 3 fases cristalinas; HA, β -TCP y la plata elemental. Los resultados aquí presentados son similares a los reportados por los autores **Dubnika y col. (2017)** y **Stanić y col. (2011)**.

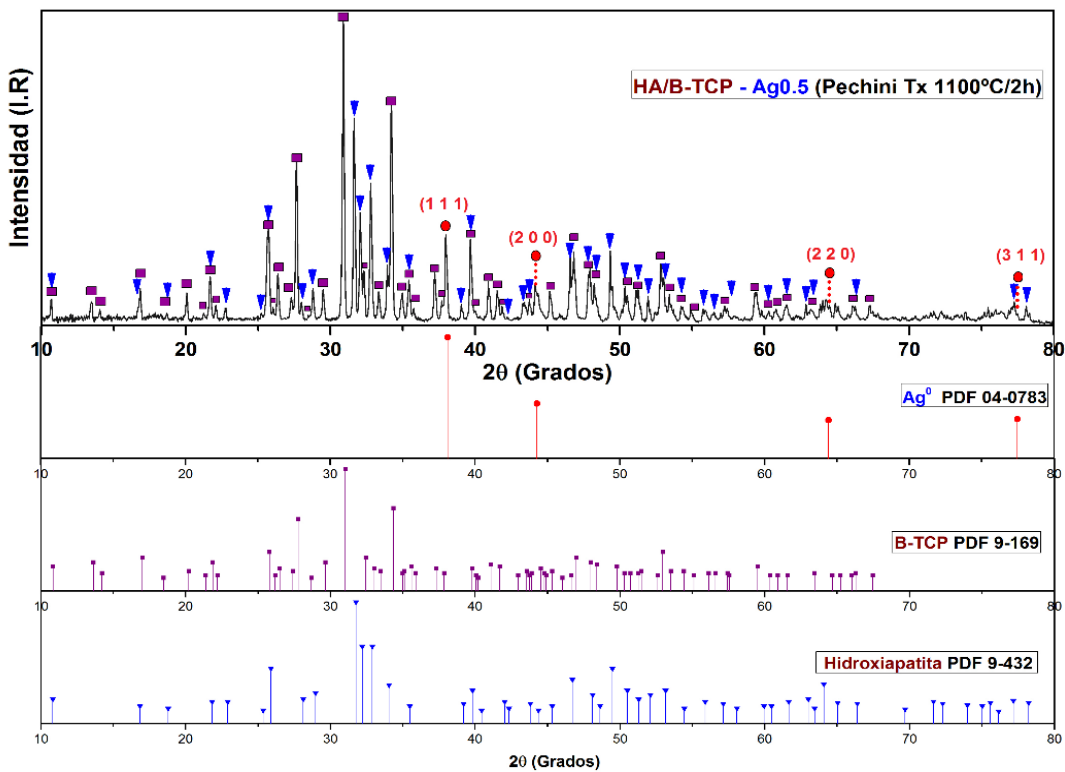


Figura 1. Difractograma de muestra dopada a 0.5 mol de plata obtenida por el método de Pechini

En la Figura 2 se presenta el difractograma de la muestra dopada a 1.0 mol de cobre y se puede observar que los picos característicos de la HA se identificaron con los ángulos 2θ

correspondientes según la carta PDF-2 9-432, asimismo sus los planos cristalográficos. Los picos identificados son correspondientes únicamente a la fase de la HA, a diferencia de las muestras del método Pechini, donde se obtuvo un producto con tres fases. Por lo tanto, hasta el momento se puede considerar que el cobre se incorporó en la estructura cristalina de la HA, al no observarse picos adicionales que correspondan a otra fase, a diferencia de lo que sucedió en el método Pechini con la plata, que finalmente se quedó en la muestra en forma de un metal elemental. La diferencia mostrada por los métodos de síntesis aquí empleadas, se podría deber en gran medida al tipo de catión dopante y características propias ya de cada método. Para que un cation dopante pueda entrar en la red cristalina y ocupar la posición tridimensional del catión saliente, el dopante debe ser lo más similar posible en radio iónico, radio atómico, carga, valencia, etc. En el caso de la plata esto no se cumple, debido a que la plata tiene un radio iónico mucho mayor y una valencia menor que la del calcio, mientras que el cobre es similar en radio iónico e igual en valencia, lo que facilita su incorporación en la red cristalina de la HA, lo que propicia una síntesis homogénea y monofásica.

Wei y col. (2014) emplearon el método de coprecipitación para obtener HA y el producto obtenido fue un material de una sola fase y que además los autores destacan que el método tiene la ventaja de poder controlar varios parámetros de reacción como; la pureza, la cristalinidad y la morfología de la HA. Aunque el método Pechini también tiene ventajas similares (**Carballo, 2001**), la diferencia encontradas en este trabajo se podrían atribuir a las características de los cationes entrantes (plata y cobre) y a las del saliente (calcio).

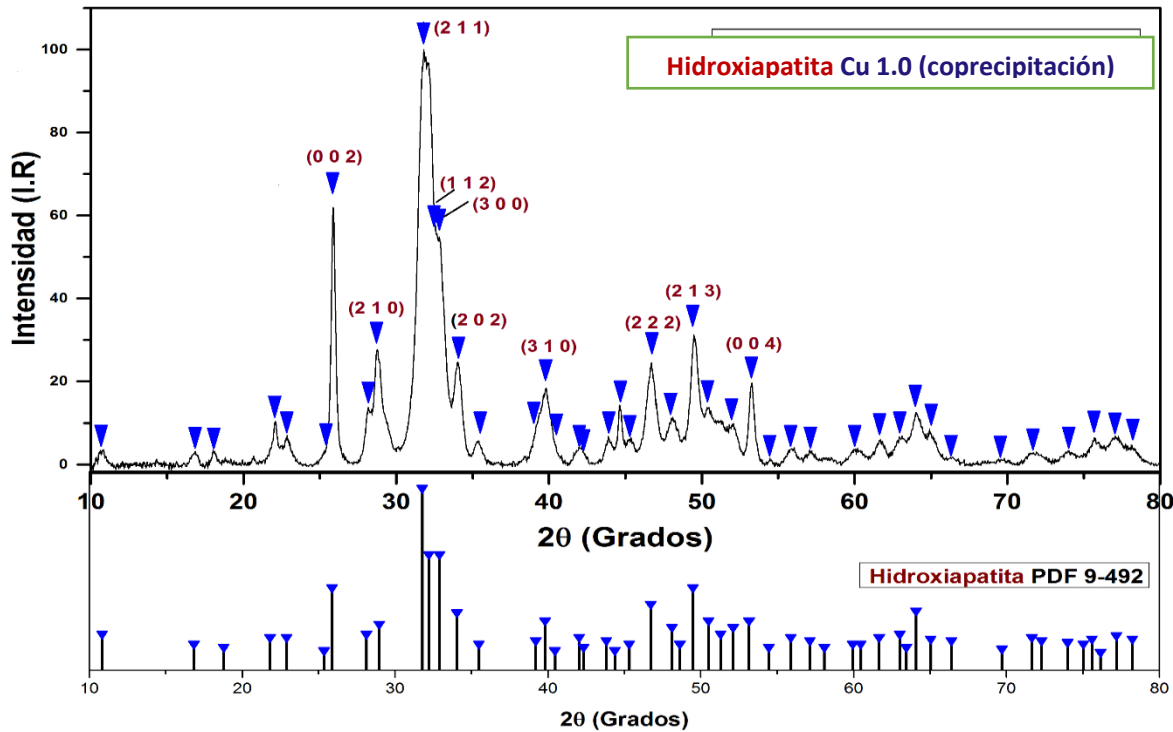


Figura 2. Difractogramas de la HA dopada con 1.0 mol de cobre obtenida por el método de co-precipitación.

La Figura 3 corresponde a la prueba de actividad antimicrobiana por el método de difusión en discos (Kirby-Bauer), el halo de inhibición presentado por la muestra dopada a 0.5 mol de plata (a), la dopada a 1.0 mol de cobre (b) y el compuesto (Ag1.0-Cu0.5) (c). Se observa que la muestra HA-Ag 0.5 mol, no presentó halo de inhibición claro o significativo y las muestras HA-Cu1.0 mol y el compuesto, presentaron un claro halo de inhibición de aproximadamente 5 mm. El halo del compuesto es ligeramente mayor y mucho más definido en comparación con el del dopado con cobre.

En diferentes literaturas se ha reportado que tanto el cobre (Hadidi y col., 2017; Huang y col., 2016), y la plata (Stanić y col., 2015; Jadalannagari y col., 2014; Radovanović y col., 2014,) tienen actividad bactericida, en especial la plata, que es ampliamente reportado. No obstante, en este trabajo no evidenció las propiedades esperadas. Se cree la plata metálica en forma de partículas o nanopartículas pudiera tener interacción directa con el sitio diana en la bacteria, sin embargo, se considera, que antes de que eso suceda, es necesaria la generación de plata iónica a partir de las NPs para que el efecto bactericida se dé (Silver y col., 2000; Cardoso, 2016), entonces la falta de actividad presentada en este trabajo se podría explicar debido a que el material obtenido contiene plata en su forma metálica. En cambio, el

cobre al liberarse de la red cristalina de la hidroxiapatita en su forma iónica, puede ser la respuesta a su mayor eficacia bactericida frente a la plata metálica.

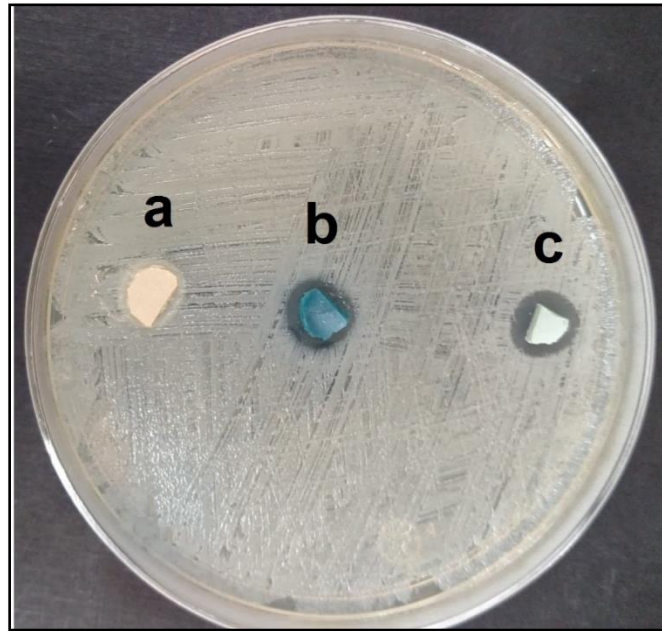


Figura 3. Halo de inhibición presentado por la muestra 0.5 mol de plata, obtenida por el método Pechini (a), el dopado con 1.0 de cobre por el método de co-precipitación (b) y el compuesto HA-Ag/HA.Cu (c) sobre *E.coli*.

Es importante recalcar que el compuesto HA-Ag/HA-Cu contiene 75 % menos de cobre y aunque se observó que los materiales que contienen plata (Ag^0) no presentaron actividad bactericida significativa, es gracias a esta combinación lo que provocó la mejora en la actividad bactericida del compuesto. Aunque aún faltan muchas pruebas biológicas, estos resultados confirman que existe un efecto sinérgico al formar un material compuesto de HA-Ag con HA-C.

La actividad antibacteriana mejorada del compuesto puede ser atribuida al efecto sinérgico, el cual se da a partir de dos o más agentes con efecto antibacteriano igual o similar. El mecanismo bactericida de Ag y Cu, al liberarse como iones en el medio y por el mecanismo similar al que se le ha atribuido como es el; destruir la pared celular o la membrana, alterar la síntesis de proteínas y procesamiento, para evitar la replicación del ADN o alterar el sistema antioxidante bacteriana por la generación de ROS, mecanismos que en su proceder simultaneo durante la desinfección provoca mayor efecto bactericida, a pesar de que por separado el material HA-Ag no presentó un efecto bactericida significativo.

El efecto antibacteriano sinérgico se ha reportado en otros trabajos similares como la combinación de Ag y ZnO (Zhang y col., 2014) o compuesto de lizosima, quitosán, Ag e hidroxiapatita (Yu y col., 2018).

Conclusiones

Aunque aún faltan muchos estudios, en el presente trabajo se asentó que es posible aumentar el efecto bactericida de la HA dopada con Cu o con Ag, al formar un material compuesto a base de estas dos sustancias, HA-Ag/HA-Cu, lo cual representa un efecto sinérgico en el combate contra la *E. coli* en implantes óseos y/o dentales.

Referencias Bibliográficas

- Ayala, N. V. (2010). Nanopartículas de plata como microbicidas: actividad y mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos. (Tesis doctoral). *Universidad Autónoma de Nuevo León*, Monterrey, México.
- Carballo Suárez, L., & Galindo V., H. (2001). Estudio de los procesos Sol-gel para la obtención de un aglutinante apropiado para el peletizado de alúmina. 1. Ensayos de una técnica de peletizado. *Ingeniería e Investigación*, 48: 57–63.
- Cardoso P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiana e impacto en el área de la salud. *Revista del Hospital de Niños (Buenos Aires)*, 58(260):19-28.
- Dubnika, A., Loca, D., Rudovica, V., Parekh, M. B., & Berzina-Cimdina, L. (2017). Functionalized silver-doped hydroxyapatite scaffolds for controlled simultaneous silver ion and drug delivery. *Ceramics International*, 43(4): 3698–3705. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.11.214>.
- Figueroa, G. (2013). Propiedades Antimicrobianas del Cobre. De: Cobre, salud, medio ambiente y nuevas tecnologías. *International Copper Association, Ltd*, pp 33-56
- Flores, J. M., Ochoa, M. G., López, L. L., Trejo, E. A., & Morelos, A. G. (2016). Interacciones farmacológicas relacionadas con la administración de antibióticos betalactámicos. *Revista de la Asociación Dental Mexicana* 73(5): 227–234.
- Hadidi, M., Bigham, A., Saebnoori, E., Hassanzadeh-Tabrizi, S. A., Rahmati, S., Alizadeh, Z. M., Rafienia, M. (2017). Electrophoretic-deposited hydroxyapatite-copper nanocomposite as an antibacterial coating for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology*, 321: 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.04.055>.
- Huang, Y., Hao, M., Nian, X., Qiao, H., Zhang, X., Zhang, X. & Zhang, H. (2016). Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition. *Ceramics International*, 42(10): 11876–11888. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.04.110>

- Jadalannagari, S., Deshmukh, K., Ramanan, S. R., & Kowshik, M. (2014). Antimicrobial activity of hemocompatible silver doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by modified sol-gel technique. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 4(2): 133–141. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0197-x>.
- Linares, (2002). Interacciones medicamentosas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 21 (2): 139-48.
- Martínez, N. O. (2018). Obtención de compósito de hidroxiapatita biocompatible y con actividad antibacteriana potencializada por un efecto sinérgico a partir del dopado con plata y cobre. (Tesis de maestría). *Universidad Autónoma de Coahuila*. Saltillo, México.
- Radovanović, Ž., Jokić, B., Veljović, D., Dimitrijević, S., Kojić, V., Petrović, R., & Janačković, D. (2014). Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag⁺ - and Cu²⁺-doped biphasic hydroxyapatite/ α -tricalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag⁺ - and Cu²⁺-doped hydroxyapatite. *Applied Surface Science*, 307: 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.066>.
- Rincón, A. R., Verduzco, F. M., Valle, R., Espinosa, R., Góngora, J. L. & Jaramillo, F. (2016). Interacciones farmacológicas. De: Farmacología general. *Universidad Autónoma de Aguascalientes*, pp 209-245. ISBN: 978-607-8285-75-4.
- Santillana, R. A. (2016). Desarrollo de sistemas Hap/Zirconia dopada con Itrio, Lantano y Hafnio para aplicaciones biomédicas. (Tesis doctoral). *Universidad Autónoma de Coahuila*. Saltillo, México.
- Silver, S., Lo, J. F., & Gupta, A. (2000). Los cationes de plata como agentes antimicrobianos: Usos clínicos y resistencia bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 20(3): 102–106.
- Stanić, V., Janačković, D., Dimitrijević, S., Tanasković, S. B., Mitrić, M., Pavlović, M. S. & Raičević, S. (2011). Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. *Applied Surface Science*, 257(9): 4510–4518. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.12.113>.
- Wei, M & Kramer, E., Podurgiel, (2014). Control of hydroxyapatite nanoparticle morphology using wet synthesis techniques: Reactant addition rate effects. *Materials Letters*, 131: 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.05.105>.
- Yu, W. Z., Zhang, Y., Liu, X., Xiang, Y., Li, Z., & Wu, S. (2018). Synergistic antibacterial activity of multi components in lysozyme/chitosan/silver/hydroxyapatite hybrid coating. *Materials and Design*, 139: 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.11.018>.
- Zhang, Y., Gao, X., Zhi, L., Liu, X., Jiang, W., Sun, Y., & Yang, J. (2014). The synergetic antibacterial activity of Ag islands on ZnO (Ag/ZnO) heterostructure nanoparticles and its mode of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 130(1): 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.004>.