

Incremento del efecto antibiótico contra la cepa *Staphylococcus aureus* del extracto de grana cochinilla (Ac) con hidroxiapatita (HAp)

Increase of the antibiotic effect against *Staphylococcus aureus* strain of cochineal gravel extract (Ac) with hydroxyapatite (HAp)

Michelle Jacqueline Galán Luna^a, Victor Hugo Hernández Pérez^{a*}, Dulce María Ramírez Contla^b, Aristeo Garrido Hernández^b, Lorena Chávez Güitron^b, Leticia Flores-Alatorre Hernández^b

^a Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, C.I.I.T.E.C., Cerrada de CECATI S/N. CP. 02250, Col. Santa Catarina Azcapotzalco, CDMX, México.

^b Universidad Tecnológica de Tecámac, División Químico Biológicas, Carretera Federal México - Pachuca, Km. 37.5, Predio Sierra Hermosa, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México, México.

Resumen

Se desarrolló un compuesto de hidroxiapatita (HAp) y extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico (Ac). Mediante la medición de halos de inhibición en medios de cultivo que probó un efecto antibacteriano eficiente sobre la cepa *Staphylococcus aureus*. La HAp se sintetizó mediante la técnica de precipitación y se implementó a concentraciones de 10, 20 y 30% de concentración en relación con el peso del extracto de grana cochinilla; el extracto obtenido de la grana cochinilla se utilizó a concentraciones de 30, 40 y 50%. Posteriormente se unieron ambas soluciones en una concentración de 2.5% para formar el bionanocompuesto de HAp/Ac por medio de un baño ultrasónico. Las sustancias individuales y el compuesto se caracterizaron por las técnicas de espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (DRX) y se llevaron a pruebas de antibiograma para evaluar su capacidad antibiótica in vitro contra una cepa de *Staphylococcus aureus*, teniendo como control positivo un antibiótico comercial de tetraciclina. A la cepa bacteriana se le realizaron pruebas primarias (Tinción Gram y prueba de catalasa) y pruebas bioquímicas para su identificación. Se observó la capacidad antibiótica de Ac al 40 y 50%, también se comprobó que al combinarlo con HAp, presentó un mayor halo de inhibición, por lo que el producto HAp/Ac tiene mayor poder antibacteriano sobre la cepa de prueba y puede ser utilizado como principio activo para fármacos en presentación tópica, antiséptico local para heridas e inclusive como desinfectante de áreas específicas.

Palabras Clave:

Hidroxiapatita, Grana cochinilla, antibiótico, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

A compound of hydroxyapatite (HAp) and cochineal grana extract containing carminic acid (Ac) was developed. By measuring inhibition halos in culture media that tested an efficient antibacterial effect on the *Staphylococcus aureus* strain. The HAp was synthesized by the precipitation technique and was implemented at concentrations of 10, 20 and 30% concentration in relation to the weight of the cochineal grana extract; the extract obtained from cochineal grana was used at concentrations of 30, 40 and 50%. Subsequently, both solutions were joined in a concentration of 2.5% to form the bio nanocomposite of HAp / Ac through an ultrasonic bath. The individual substances and the compound were characterized by the techniques of infrared spectroscopy by Fourier transform (FT-IR) and X-ray diffraction (DRX) and were carried out to antibiogram tests to assess their in vitro antibiotic capacity against a strain of *Staphylococcus aureus*, having a commercial tetracycline antibiotic as a positive control. The bacterial strain was subjected to primary tests (Gram stain and catalase test) and biochemical tests for identification. The antibiotic capacity of Ac at 40 and 50% was observed, it was also found that when combined with HAp, it presented a greater halo of inhibition, so the HAp / Ac product has greater antibacterial power over the test strain and can be used as an active ingredient for drugs in topical presentation, local antiseptic for wounds and even as a disinfectant for specific areas.

Keywords:

Hydroxyapatite, Cochineal Grana, Antibiotic, *Staphylococcus aureus*.

*Autor para la correspondencia: Victor Hugo Hernández Pérez.

Correo electrónico: mgalan1900@alumno.ipn.mx (Michelle Jacqueline Galán Luna), vhernandezp1900@alumno.ipn.mx (Victor Hugo Hernández Pérez), ari_teogh@hotmail.com (Aristeo Garrido Hernández), lrmchavez@yahoo.com (Lorena Chávez Güitron), floalahe@hotmail.com (Leticia Flores-Alatorre Hernández).

1. Introducción

En la actualidad, las cepas de *Staphylococcus aureus* han desarrollado resistencia a distintos antibióticos como meticilina, penicilina, entre otros (M. Rodríguez, 2009). Este microorganismo produce lesiones superficiales en la piel y abscesos localizados en otros sitios, causa también infecciones del sistema nervioso, vías respiratorias, infecciones del tracto urinario y de igual forma, es la principal causa de infecciones nosocomiales que hoy en día son un problema relevante de salud pública y que tienen gran trascendencia económica y social. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad, ya que estas infecciones se dan en el área hospitalaria y se tiene reportado que, en los últimos años, México ha tenido un promedio del 10 al 15% personas contagiadas con esta bacteria al momento que ingresan a centros de salud (Ayala Nuñez, 2010).

En años recientes, el ácido carmínico ha comenzado a retomar importancia por las nuevas investigaciones, que revelan que posee propiedades antibacteriales, en especial por tratarse de un elemento químico natural y aceptado para su uso por la FDA (Food and Drug Administration) (F. D. D. C. Rodríguez, 2012); así lo demuestran algunas investigaciones, como la realizada en 2012 por Saavedra et al., en el cual se menciona que las antraquinonas tienen un poder antibiótico, anticancerígeno y antiviral. De igual forma, existen investigaciones como Revelador de placa dentobacteriana a base de extracto de grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) en la cual se evalúa el comportamiento del ácido carmínico en presencia de bacterias (Méndez Gallegos y col., 2010).

Por otra parte, la hidroxiapatita (HAp) es un bio-cerámico formado por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, dando como resultado la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Este compuesto perteneciente a la familia de las apatitas está presente en los dientes y huesos, otorgando dureza y resistencia. Por ello, se realizan diversas investigaciones acerca de su aplicación como un biomaterial; todo ello como se muestra en el artículo titulado “La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica” (Garduño & Gasga, 2006).

Este compuesto, entre sus diversas propiedades cuenta con una porosidad de 0.1 a 3%, además de tener propiedades químicas como: inercia química en contacto con fluidos biológicos, biocompatibilidad, alta resistencia a la compresión y a la fricción y en ocasiones, cierta bioactividad como lo anuncia la empresa (Melero y col., 2011).

La hidroxiapatita es un compuesto mineral que tiene características biocompatibles y bioactivas (Bedolla, 2014), siendo materiales que encapsulan sustancias activas actuando como vehículo de dispensación del fármaco ya sean naturales o químicos pudiendo potencializar su efecto en el organismo, además de todas estas bondades, demostró tener propiedades cicatrizantes (B., 1998)

Para poder comprobar que el ácido carmínico tiene propiedades antibacteriales y que la hidroxiapatita tiene características biocompatibles y no solo puede ser utilizado como transportador, si no como un potencializador para la inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Las combinaciones se realizaron con concentraciones de 30%, 40% y 50% del ácido carmínico y 10%, 20% y 30% de

hidroxiapatita. El efecto antibiótico se evaluó por medio de la prueba de antibiograma por el método de difusión disco-placa para poder medir su efecto inhibitorio, de igual forma, para probar una posible potencialización del efecto, los dos productos se combinaron, tomando en cuenta las concentraciones en donde se obtuvo un mayor halo de inhibición, para poder comprobar si aumentó el efecto antibacterial contra el patógeno.

2. Procedimiento

2.1. Síntesis de Hidroxiapatita (HAp)

La hidroxiapatita utilizada para la elaboración del compuesto antibacterial fue sintetizada por el método de precipitación. Partiendo del nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 0.5 M y fosfato hidrogenado de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) al 0.5 M con una relación Ca/P de 1.67. La solución que contiene el precursor aniónico se introdujo por goteo a la solución que contiene el precursor catiónico, terminada la mezcla de ambos se llevó a pH básico, utilizando hidróxido de sodio (NaOH) al 1.5 M, para después dejarlo con un tiempo de envejecimiento de 24 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados usando agua destilada, entre cada lavado, se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos, el sedimento se dejó secar a 120°C durante 12 horas. Para des-aglomerar los polvos obtenidos, nos ayudamos de un mortero con pistilo para el proceso de molienda.

Los polvos de HAp fueron caracterizados por las técnicas de espectroscopia infrarroja con asistencia de un equipo Hitachi 1500 y la difracción de rayos X por un equipo ECOD8 Advance Bruker utilizando una energía de incidencia de Cu y se obtuvieron con patrones de 20-80° (2θ) mediante un tamaño de paso de 0.02°.

2.2. Extracción de Grana Cochinilla

Para el segundo paso, se obtiene el extracto de la grana cochinilla que contiene el ácido carmínico (Ac); para su elaboración se efectuaron 3 lavados de la grana cochinilla seca con Alcohol etílico al 96%, luego, se secó en una estufa bacteriológica a 50°C durante 2 horas; pasado el tiempo se sometió a un proceso de molienda, utilizando mortero y pistilo. Los polvos obtenidos se solubilizaron en agua destilada, a una concentración del 5% con una agitación constante a una temperatura de 90°C por 15 min; la solución obtenida se sometió a un proceso de centrifugado a 4500 rpm durante 15 min. Finalmente, el sobrenadante se filtró con papel whatman 50p y se vació en frascos ámbar para proceder a esterilizar en una autoclave a 121°C, 1.1 atm de presión durante 15 min.

Debido a que este producto cuenta con una concentración del 5% de ácido carmínico se sometió a evaporación por medio de un baño maría, esto para poder tener concentraciones que se requieren de 30, 40 y 50% de ácido carmínico.

2.3. Dispersión de HAp en Ac

Para la dispersión de la HAp en el Ac, se utilizó un baño ultrasónico en el cual se tuvo que modificar los tiempos a 30 min y bajar la concentración de la HAp al 2.5% en peso del

ácido carmínico, debido a que se presentaba una saturación de la solución tal y como se muestra en la figura 1.

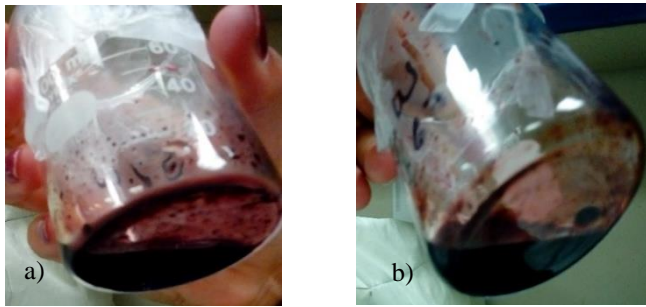


Figura 1 "Dispersión de HAp dentro del extracto de ácido carmínico siendo a) 5% y b) 2.5% en concentración"

Como tercer paso de este proceso experimental, se procedió a la producción del bionanocompuesto de HAp/Ac, para ello se utilizaron diferentes concentraciones de ambos compuestos como se muestra en la tabla 1, estas combinaciones se realizaron por medio de una solubilización de los polvos de HAp en el líquido de Ac en un baño ultrasónico por tiempos de 20 minutos para cada muestra. Para el cálculo de estas concentraciones se utilizó en el caso del extracto la cantidad teórica de Acido carmínico que posee y para el HAp el peso del extracto de grana cochinilla.

Tabla 1 "Relación de concentraciones"
Relación HAp/Ac a probar

	HAp 10%	HAp 20%	HAp 30%
Ac 30%	10/30	20/30	30/30
Ac 40%	10/40	20/40	30/40
Ac 50%	10/50	20/50	30/50

HAp: Hidroxiapatita

Ac: Extracto de grana cochinilla con ácido carmínico

A las diferentes relaciones HAp/Ac se les realizaron pruebas antibacteriales para evaluar la inhibición de nuestros productos en contra de la bacteria *Staphylococcus aureus*; Para ello, se prepararon medios de cultivo de Agar Müller-Hinton, pesando lo indicado por el fabricante, para preparar el número de cajas requerido y se esterilizó con calor húmedo (autoclave).

2.4. Preparación de medio de cultivo

Posteriormente, se vació el medio en placas Petri (25-30 mL/caja), el grosor del agar en la placa debe ser de 4 mm y se realizaron las pruebas de esterilidad para cada lote de Müller-Hinton, incubando todas las placas de cada lote en estufa bacteriológica a 38 °C durante 24 h. para evaluar que no hay contaminación y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

Para elaborar los sensibilizadores, se cortaron discos de 6 mm de diámetro de papel filtro Whatman 50p y se esterizaron en calor húmedo (121°C, 1.1 atm de presión, 15 min), para

después empapar los discos en cada solución a evaluar (30, 40 y 50%) y se dejaron secar en estufa bacteriológica a 50°C, 2 horas, en condiciones asépticas.

Para la HAp se perforó la placa de agar con un sacabocados estéril, de diámetro aproximado de 6 mm, en el cual se colocó la solución de HAp. Se realizó este mismo proceso para la colocación de la solución del bionanocompuesto de HAp/Ac dentro de la placa utilizando como control un sensibilizador de tetraciclina. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3. Resultados

3.1. Resultados y discusión de FT-IR

A continuación, se observan las bandas características en Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR) de las partículas de HAp sintetizada a diferentes relaciones de Ca/P (0.89, 1.67 y 2.4), como son la vibración de banda P-O a 1090, 1023 y 962 cm⁻¹, además de que la banda C-O que se encuentra a los 885cm⁻¹ se encuentra presente a la relación de 1.67 y 2.4. La banda O-H que se observa a 631 cm⁻¹ es atribuible a la hidratación de la muestra durante la preparación. En cuanto a otros enlaces presentes en la formación de la hidroxiapatita, se observa la aparición de las bandas de O-P-O a 601 y 560cm⁻¹ (Figura 2).

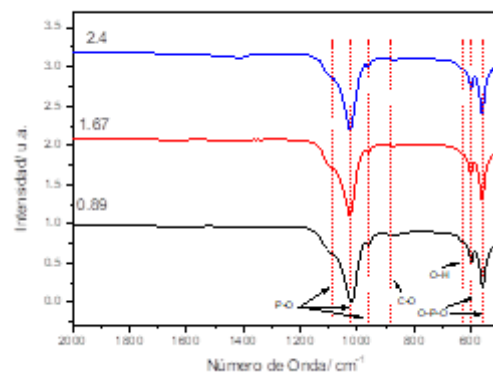


Figura 2 "Caracterización FT-IR de HAp".

3.2. Resultados y discusión de DRX

Posteriormente en la caracterización por difracción de Rayos X de polvos de hidroxiapatita se muestra la obtención de la fase hexagonal de la HAp; en todos los casos están presentes las reflexiones correspondientes al compuesto en estudio (JCPDS 09-432), estos presentan los picos de difracción acorde a los de la hidroxiapatita en relación a la concentración de Ca, siendo de esta forma que es necesaria una concentración mínima de la misma que gráficamente se observa comienza en 1.67 (Figura 2).

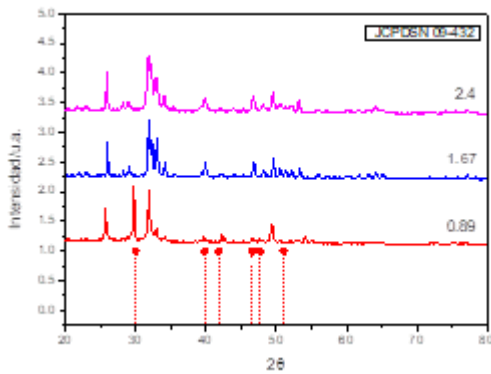


Figura 3 "Caracterización DRX de HAp"

3.3. Resultados y discusión de MEB

En la figura 4 se puede observar una morfología de partícula de HAp esférica y homogénea de un tamaño de 80 nanómetros en promedio. Además de ello, se puede observar que en algunas regiones la partícula tiende a formar aglomerados irregulares de 0.5 a 1 micrometro.

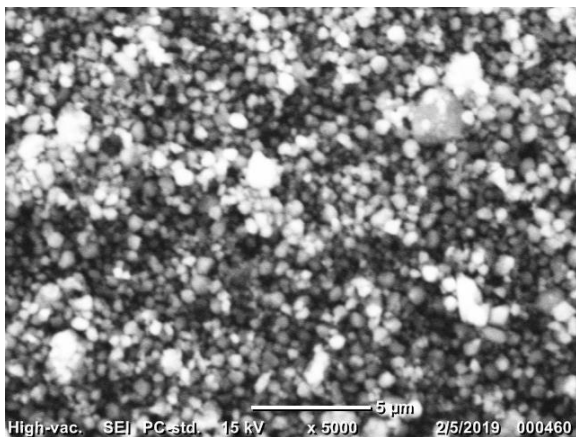


Figura 4 "Caracterización MEB de HAp"

3.4. Resultados y discusión de inhibición

Tabla 2 "Halos de inhibición de los compuestos a evaluar".

HAp		Extracto de grana cochinilla (Ac)		HAp/ Ac	
[%]	Halo (mm)	[%]	Halo (mm)	[%]	Halo (mm)
10%	0	30%	8.5	10/30	15
				20/30	16.5
				30/30	15.3
				10/40	10.6
20%	0	40%	7	20/40	12.6
				30/40	15.6
				10/50	16
30%	0	50%	12.3	20/50	16.6
				30/50	13.6

En la tabla anterior se muestran los halos de inhibición de los diferentes compuestos, a diferentes concentraciones, tanto de manera independiente de la HAp y Ac así como el conjunto de las concentraciones de los compuestos independientes ahora combinados. Estos halos de inhibición obtenido por un medio de cultivo muestran que las concentraciones de ácido carmínico por sí solos tienen una mayor resistencia hacia la bacteria dando como resultado un mayor halo de inhibición y que la HAp por sí sola no tiene ninguna resistencia hacia la bacteria. Sin embargo, al combinar y comparar los halos de inhibición de cada componente con el compuesto de HAp/Ac se tiene un incremento en el área de inhibición de forma considerable por parte de este al compararlo con el halo de inhibición del control de tetraciclina (Tabla 2 y Figura 4).

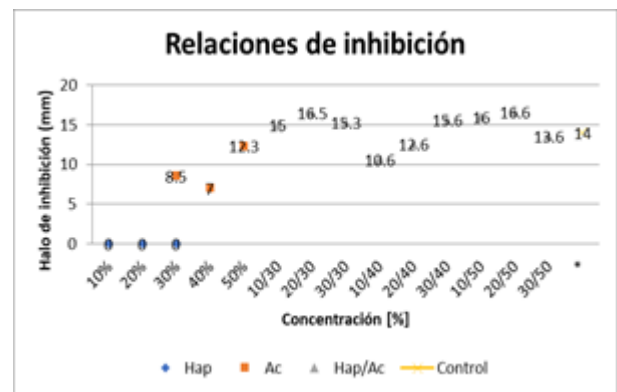
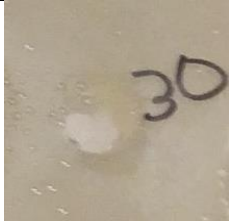
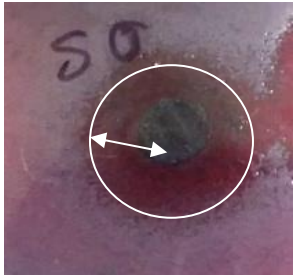
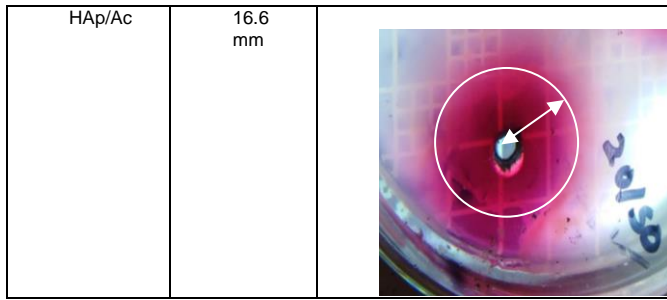


Figura 4 "Halos de inhibición de las formulaciones a evaluar".

La mayor inhibición que se presentó fue de un diámetro de halo de inhibición de 16.6 y 16.5 mm perteneciente al compuesto HAp/Ac en una proporción de 10/50 y 20/50 respectivamente, los cuales al ser comparados con el mayor de Ac de 12.3 mm y de HAp de 0 mm, se puede considerar que el compuesto cumple su función de tener una mayor efectividad antibacteriana, siendo corroborado con imágenes en la tabla 3.

Tabla 3 "Principales halos de inhibición."

Principales halos de inhibición		
Compuesto	mm de inhibición	Imagen
HAp	0 mm	
Ac	12.3 mm	



4. Conclusiones

Con base a los resultados preliminares se concluye que el bionanocompuesto de HAp/Ac tiene un halo de inhibición mayor a comparación de sus componentes individuales.

De igual forma, al utilizar la HAp dentro del compuesto y en revisión bibliográfica se plantea la posibilidad de una función de biocompatibilidad, esto para la implementación como fármaco tópico y de esta forma asegurar que no presente riesgos a la salud humana.

Siendo de esta forma, se plantea una posible continuación del proyecto en la cual se experimente y evalúe su posible aplicación como fármaco y/o crema, para ello se sugiere realizar estudios de farmacocinética y farmacodinamia. Una propuesta más de uso es para desinfección de áreas que requieran condiciones asépticas como quirófanos, consultorios, cocinas, etc.

Agradecimientos

Queremos agradecer el apoyo constante brindado por nuestros asesores la Dra. Leticia Flores Alatorre Hernández, al Dr. Aristeo Garrido Hernández, así como al personal académico y administrativo de la Universidad Tecnológica de Tecámac. La

cual, además, proporcionó el equipo necesario para la realización de este proyecto.

Referencias

- B., M. D. R. (1998). Síntesis y Análisis de Hidroxiapatita. *Revista Ingeniería E Investigación*, 41, 57–63.
- García, E. C., Gonzalez, R. G., & María, P. S. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61(1), 28–40. Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx
- Guardiño, M. V. G., & Gasga, J. R. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 9(2), 90–95.
- González, D. E. E. (2014). Incorporación de Porfirinas en una Matriz de sílica Xerogel. *Centro de Investigación En Materiales Avanzados*, 1(1).
- Llinàs, M. C., & Sánchez-garcía, D. (2014). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Affinidad*, LXXI(565), 20–31.
- Méndez-Gallegos, S. de J., Tarango-Arámbula, L. A., Carnero, A., Tiberi, R., & Díaz-Gómez, O. (2010). Crecimiento poblacional de la cochinilla *Dactylopius coccus costa* criada en cinco cultivares de nopal *Opuntia ficus-indica* mill. *Agrociencia*, 44(2), 225–234.
- Ouahid Hessissen, A. (2011). *Nanotecnología y sus potenciales aplicaciones en microbiología*. Universidad de Sevilla.
- Rodríguez, M. (2009). *Evaluación de seis métodos para la extracción de ácido carmínico obtenida a partir de cochinilla (Dactylopius coccus costa) según condiciones de laboratorio de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala*. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2467.pdf