

**COMPARACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE
NANOPARTICULAS DE ZnO DE DIFERENTE MORFOLOGIA SOBRE
*Escherichia coli***



WILSON ALEXANDER VARGAS URBANO

**QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS NATURALES Y DE LA
EDUCACION
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2016**

**COMPARACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE
NANOPARTICULAS DE ZnO DE DIFERENTE MORFOLOGIA SOBRE
*Escherichia coli***

WILSON ALEXANDER VARGAS URBANO

Trabajo de grado modalidad investigación

Director:

Dr. Jorge Enrique Rodríguez Páez

**Grupo de investigación en Ciencia y Tecnología de Materiales
Cerámicos (CYTEMAC)**

**QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS NATURALES Y DE LA
EDUCACION
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2016**

Nota de aceptación

Director:

Dr. Jorge Enrique Rodríguez Páez

Jurado:

Dra. Olga Lucia Hoyos S.

Jurado:

Dr. Johnny Vilard Gutiérrez P.

Dedico este trabajo a mis padres que han sido un soporte en mi vida y a mis hermanas por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi madre y mi padre por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por ser mi sustento.

A mis hermanas por ser parte de mi vida, por su apoyo y colaboración en el trascurso y desarrollo de este trabajo.

Mis sinceros agradecimientos al Dr. Jorge Enrique Rodríguez Páez docente investigador del Departamento de Física por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años además extender mis agradecimientos al Doctor Nelson Rojas, docente investigador de la Universidad del Cauca por su valiosa asesoría; como también a los grupos de investigación CYTEMAC y CELMOLEC por permitir el espacio y los equipos de laboratorios necesarios para la ejecución de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibido de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1. Introducción	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.3. JUSTIFICACIÓN	3
1.4. OBJETIVOS	4
REFERENCIAS	5
CAPÍTULO 2: OBTENCIÓN DE NANOPARTICULAS DE ZnO CON DIFERENTE MORFOLOGÍA	
2.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ZNO	6
2.2. USOS DEL OXIDO DE CINC	7
2.3. NANOPARTÍCULAS DE ZnO	7
2.4. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ZnO	8
2.4.1. Rutas Químicas	8
2.4.1.1 Método hidrotermal	8
2.4.1.2 Método Precursor polimérico (Pechini)	9
2.4.1.3 Método de Combustión	9
2.4.1.4 Método Mecanoquímico	10
2.4.1.5 Metodología sol-gel	11
2.4.1.6 Metodología de precipitación controlada	13
2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	15
2.5.1 Metodología sol-gel	16
2.5.2 Caracterización de las NPs-ZnO sintetizadas por el método sol-gel	17
2.5.3 Metodología precipitación controlada	20
2.5.4 Caracterización de las NP-ZnO sintetizadas por precipitación controlada	22
2.6. ANÁLISIS	26
2.7. CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS	30

CAPÍTULO 3: EL ZnO COMO BACTERICIDA

3.1 BACTERIAS	35
3.2 ASPECTOS GENERALES DE LOS BACTERICIDAS	36
3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	38
3.3.1 Curvas de crecimiento	39
3.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida	47
3.4 ULTRAESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS DE <i>E. COLI</i> SOMETIDAS A LA ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ZNO	48
3.5 ANALISIS	51
3.6 CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

CAPÍTULO 4. MECANISMO ANTIBACTERIAL DE LAS NANOPARTICULAS

4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO- ROS	56
4.2 DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL SISTEMA DE CULTIVO <i>E. coli</i> - NP-ZnO	58
4.2.1 Metodología	59
4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	60
4.4 EFECTO DE LA PRESENCIA DEL ANTIOXIDANTE EN EL SISTEMA	64
4.5 ANÁLISIS	66
4.6 DISOLUCIÓN DE LAS NPS Y SU APOORTE AL MECANISMO ANTIBACTERIAL	67
4.7 PROPUESTA DE MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NPS DE ZNO SOBRE LA CEPA DE BACTERIAS DE <i>E. COLI</i>	68
4.8 CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 2.1 Equipos y reactivos usados para la síntesis de ZnO, utilizando el método sol-gel.....	15
Tabla 3.1 Equipos y reactivos usados para para determinar la capacidad bactericida de las nanopartículas de ZnO.....	38
Tabla 3.2 Valores de absorbancia correspondientes a los blancos de las muestras de NPs de ZnO en los medios de cultivo, acicular y esférico, para las diferentes concentraciones de NPs.....	44
Tabla 3.3 Crecimientos del <i>E. coli</i> sometido a dosis incrementales de ZnO esférico, después de 12 horas de incubación	46
Tabla 3.4 Crecimientos del <i>E. coli</i> sometido a dosis incrementales de ZnO acicular, después de 12 horas de incubación.....	46
Tabla 3.5 Valores de CMI y CMB para los cultivos de <i>E. coli</i> , después de 12 horas de incubación, al ser expuestos a la acción de las ZnO-NP que presentaban las morfologías de interés.....	48
Tabla 4.1 Equipos y reactivos usados para determinación de la peroxidación lipídica en el sistema de cultivo <i>E. Coli</i> -ZnO.....	60
Tabla 4.2 Promedio de los valores de absorbancia para diferentes tratamientos De NPs de ZnO utilizando el ensayo de liberación de MDA.....	62
Tabla 4.3 Cantidad de MDA presente en los medios de cultivo de <i>E. coli</i> que contenían diferentes tratamientos ZnO-NPs, para las dos morfologías de interés.....	63
Tabla 4.4 Cantidad de MDA presente en los cultivos de <i>E. coli</i> que contenían ZnO-NPs esféricas, sin y con ácido ascórbico suplementado en los medios de cultivo.....	66

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 2.1 Estructuras cristalinas del ZnO: (a) blenda de Zn, (b) wurtzita hexagonal y (c) planos cristalinos de los átomos.....	6
Figura 2.2 Esquema del procedimiento general del método sol-gel.....	13
Figura 2.3 Procesos cinéticos involucrados en el proceso de precipitación controlada....	13
Figura 2.4 Esquema del proceso de nucleación y crecimiento de nanocristales en solución.....	15
Figura 2.5 Esquema de la síntesis de ZnO por el método sol-gel.....	17
Figura 2.6 Espectro IR del ZnO sintetizada por la metodología sol-gel.....	18
Figura 2.7 Micrografía obtenida con MET de ZnO sintetizado con la metodología solgel.	19
Figura 2.8 Difractograma de rayos X del ZnO sintetizado por el método sol-gel.....	20
Figura 2.9 Fotografías de la etapa de lavado en el método de precipitación controlada utilizado para sintetizar el ZnO con morfología acicular.....	21
Figura 2.10 Esquema de la síntesis de ZnO por precipitación controlada.....	22
Figura 2.11 Espectros de Infrarrojo (FTIR) correspondientes a muestras sólidas extraídas del sistema durante la etapa de lavado, en el desarrollo del proceso de precipitación controlada: (a) muestra sin lavar, (b) primer lavado, (c) segundo lavado, (d) tercer lavado y (e) cuarto lavado.....	24
Figura 2.12 Micrografías obtenidas con MET de sólidos obtenidos en diferentes etapas de lavado, en el proceso de precipitación controlada: (a) primer, (b) segundo, (c) tercero y (d) cuarto lavado.....	25
Figura 2.13 Difracción de rayos X de la muestra sintetizada por la metodología de precipitación controlada.....	26
Figura 3.1 (a) Pared celular de bacterias Gram negativas y (b) Bacteria E. coli.....	36
Figura 3.2 Curva de calibración de absorbancia vs UFC/mL para cultivo de E. coli.....	40
Figura 3.3 Procedimiento para preparar los tratamientos de ZnO.....	42

Figura 3.4 Esquema para la construcción de las curvas de crecimiento bacteriano.	43
Figura 3.5 Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> sometido al tratamiento con ZnO-NPs esférica.....	44
Figura 3.6 Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> sometido al tratamiento con ZnO-NPs acicular.....	45
Figura 3.7 Esquema de la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) para los tratamientos de las cepas de <i>E. coli</i> con ZnO-NPs esférica.....	47
Figura 3.8 Esquema que representa cómo podrían disponerse las nanopartículas en las secciones de los cortes transversales para TEM: (a) NPs sobre la cara extracelular de la doble capa de la bacteria, (b) NPs dentro del citosol y sobre la superficie celular.....	49
Figura 3.9 Micrografías de <i>E. coli</i> posterior al tratamiento con NPs de ZnO morfología esférica, (a) tratamiento sin NPs, (b) ataque sobre la superficie (c) cambio estructural de la membrana y (d) muerte de la bacteria.....	50
Figura 4.1 Interacciones célula-nanopartícula con un papel central para las especies reactivas de oxígeno (ROS). Resumen de las posibles reacciones celulares que tienen lugar después de interactuar nanopartículas (NPs) con sistemas celulares.....	58
Figura 4.2 Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico.....	59
Figura 4.3 Curva de calibración de absorbancia vs concentración de MDA utilizada para analizar los cultivos de <i>E. coli</i> estudiados en este trabajo.....	60
Figura 4.4 Esquema del procedimiento para medición de la peroxidación lipídica.....	61
Figura 4.6 Oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico.....	65
Figura 4.7 Curvas de crecimiento del <i>E. coli</i> en cultivos con presencia de ZnO-NPs esféricas (a) sin ácido ascórbico y (b) suplementado con ácido ascórbico 0,2 mM.....	65
Figura 4.8 Niveles de MDA como una medida de la peroxidación lipídica en los medios de cultivo de <i>E. coli</i> que contenían ZnO-NPs esféricas sin y con suplemento de ácido ascórbico (antioxidante).....	66
Figura 4.9 Esquema que indica el mecanismo de generación de ROS a partir del superóxido.....	69
Figura 4.10 Representación esquemática de algunos eventos clave de toxicidad de ZnO en células bacterianas, inducida por las NPs de ZnO.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM	Concentración mínima inhibitoria
CBM	Concentración mínima bactericida
CYTEMAC	Ciencia y tecnología de los materiales cerámicos
CEMOLEC	Biología celular y molecular
CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorio
DRX	Difracción de rayos X
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
GSH	Glutación
LPO	Peroxidación lipídica NPs
MET	Microscopia electrónica de transmisión
MDA	Malondialdehído
MC	Medio de cultivo
NPs	Nanopartículas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV-VIS	Ultravioleta visible
ZnO-NPs	Nanopartículas de óxido de cinc
ZnO	Óxido de cinc

RESUMEN

En este Trabajo de Grado, modalidad investigación, se determinó las propiedades antibacteriales de polvos cerámicos de óxido de cinc (ZnO) sintetizados por los métodos Sol-Gel y precipitación controlada. Durante la obtención de ZnO se variaron algunos parámetros de síntesis, tales como: naturaleza del solvente de síntesis y concentración de los precursores químicos, lo que permitió obtener dos morfologías para las nanopartículas de ZnO, esferoidal (Sol-Gel) y acicular (precipitación controlada), característica importante de los productos considerando el interés central del proyecto.

Los polvos sintetizados, por los métodos de síntesis mencionados, se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas: espectroscopia infrarroja (IR), para determinar los grupos funcionales presentes en los polvos sintetizados; difracción de rayos X (DRX), para determinar la fase cristalina presentes en los mismos; microscopía electrónica de transmisión (MET), para determinar el tamaño, la morfología y la homogeneidad de los polvos cerámicos sintetizados. Los resultados de estos estudios de caracterización indicaron que la metodología sol-gel permitió obtener ZnO de tamaño nanométrico, entre 20 nm y 40 nm con morfología esferoidal, y usando el método de precipitación controlada se obtuvieron partículas de ZnO con morfología acicular, de tamaño entre 40 nm de diámetro por 400 nm de longitud, muestra que presentó una mayor cantidad de aglomerados que la obtenida por Sol-Gel.

A los polvos cerámicos sintetizados, tanto esferoidales como aciculares, se les evaluó su capacidad antibacterial usando una cepa de bacterias Gram Negativa, *Escherichia coli*. Con estos estudios se determinó el efecto antibacterial de las nanopartículas de ZnO, encontrándose que parámetros como la morfología y la concentración de óxido, en el medio de cultivo, afectaron notablemente la acción antibacterial de este sobre la cepa de *E. coli*. Este efecto antibacterial se analizó registrando la fase de crecimiento de la cepa en un medio de cultivo líquido, tal que las curvas de crecimiento a los diferentes tratamientos de ZnO fueron construidas utilizando datos de espectrofotometría ultravioleta visible del sistema, midiendo la densidad óptica a 600 nm.

Por medio de estas curvas de inhibición al crecimiento de la cepa de bacterias se estableció la concentración mínima inhibitoria (CIM), referenciando las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), para determinar la mínima concentración de ZnO que inhibe el 50% del crecimiento bacteriano CIM, se obtuvo que esta era de 0,45 mg/mL, para la morfología esferoideal, y de 0,95 mg/mL, para la acicular. Los resultados indican que la morfología esferoideal, sintetizada por el método sol-gel, presento una mayor actividad antibacterial que la morfología acicular, sintetizada por el método de precipitación controlada, lo que indica el efecto tanto de la morfología como del método de síntesis sobre la funcionalidad del ZnO, concretamente sobre la potencial aplicación de estas nanopartículas como agentes antimicrobianos para combatir microorganismos patógenos.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCION

Una gran variedad de Nanopartículas (NPs) de óxidos metálicos están siendo empleadas en la fabricación y desarrollo de muchos productos, donde la capacidad catalítica única de estas nanoestructuras, sus propiedades optoelectrónicas y actividad antimicrobiana, entre otras funcionalidades, las hacen necesarias y prometedoras para una amplia gama de aplicaciones. La nanotecnología comprende el estudio, síntesis, manipulación de materiales, equipos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nivel de la nanoescala, siendo un nanómetro (nm) la billonésima parte de un metro [1]. A través de esta tecnología, es posible proponer y diseñar equipos y materiales con propiedades totalmente nuevas y únicas, con gran impacto en el desarrollo de la electrónica, la química, la medicina, etc., y en general de la industria. Específicamente, la actividad antibacteriana del óxido de cinc ha sido ampliamente explorada, encontrándose que la concentración, el tamaño de las nanopartículas y la temperatura pueden afectar dicha actividad [2].

Los microorganismos son responsables de una gran variedad de infecciones que, pueden llegar a ser mortales, entre ellas están la neumonía, meningitis, peritonitis, dermatofitosis, histoplasmosis, coccidiosis, etc. No obstante, el descubrimiento de los antibióticos ha tenido un efecto muy importante en la medicina moderna, ya que estos han facilitado la curación y/o control de muchas infecciones producidas por microorganismos que son una amenaza para la vida. Sin embargo la efectividad de estos agentes se está volviendo cada vez más limitada [3], debido, por ejemplo a su uso inadecuado, generando mutaciones genéticas en muchos microorganismos, como ha sucedido con algunas bacterias. Lo anterior ha permitido el desarrollo cada vez más frecuentemente, de cepas resistentes a los antibióticos las cuales, mediante mecanismos genéticos, transmiten estos genes de resistencia a su descendencia, imposibilitando a los antibióticos realizar su normal efecto antimicrobiano [4]. Esta problemática mundial ha generado la necesidad de buscar nuevas fuentes de principios antimicrobianos, lo que ha llevado a considerar a la nanotecnología como una prometedora alternativa, ya que resultados recientes, muestran que muchos metales y nanomateriales de óxidos metálicos, por ejemplo Ag, TiO₂, SiO₂, MgO y CaO están recibiendo atención científica significativa, por su posible uso como biocidas o agentes desinfectantes [1,2]. En este sentido, las NPs de ZnO han mostrado ser versátiles y se consideran como potenciales agentes biocidas o desinfectantes, con ventajas adicionales como su alta estabilidad y resistencia a

condiciones adversas de temperatura, humedad, etc., mayor a la que presentan los agentes desinfectantes o antimicrobianos basados en moléculas orgánicas.

En el presente estudio se determinó si las nanopartículas sintetizadas que presentaban diferentes morfologías, obtenidas empleando diferentes métodos de síntesis, tenían propiedades antibacteriales y que tan comparables eran sus capacidades antibacteriales sobre una cepa de bacterias *E. coli*, en ensayos *in vitro*. Para ello, se realizó un estudio sistemático con el fin de dilucidar el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS), como mecanismo, en la actividad antibacteriana de las NPs de ZnO. En un sistema biológico, los ROS se determinan usando el método de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), lo que lleva a la formación de un complejo de color rosa entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y malondialdehído (MDA) que se puede medir cuantitativamente usando un método espectrofotométrico a 532 nm [5]. El MDA se produce durante la peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados propiciada por radicales libres que involucran al oxígeno, donde la intensidad medida se relaciona con la concentración de ROS presentes en el sistema. Esta metodología fue usada ya que este ensayo, que involucra el TBARS, es un importante indicador de estrés oxidativo [6].

En este trabajo se han determinado los niveles de MDA como un indicador de los ROS generados durante la interacción entre el ZnO y las bacterias en los medios de cultivo, para diferentes concentraciones crecientes, de NPs de ZnO, tanto con morfología esférica como acicular. Se consideró que los ROS generados en los diferentes medios de cultivo tenían su origen en la oxidación de los lípidos que conforman la membrana de las bacterias *E. coli*, por lo que se condicionó el crecimiento bacteriano a condiciones bacteriostáticas o bactericidas. Además, se verificó el papel de los ROS en el proceso, en presencia de un antioxidante en el medio de cultivo por medio de los ensayos de TBARS, encontrándose una disminución del efecto antibacterial de las NPs de ZnO.

El tema tratado es de interés para el Grupo de Investigación de Ciencia y Tecnología de los Materiales Cerámicos - CYTEMAC, del Departamento de Física - FACNED, para fortalecer la línea de investigación de remediación medioambiental usando nanotecnología. La información reportada en este documento aporta al desarrollo de temas de investigación de vanguardia en el campo de la ciencia e ingeniería de los materiales y establece una importante referencia para la realización de estudios posteriores e, incluso, si se considera la elaboración de productos con éste tipo de

nanomaterial aprovechando sus propiedades como agentes antimicrobianos, para el beneficio de la humanidad.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la propiedad bactericida que presenta el ZnO [2], la literatura científica reporta que el mecanismo antibacterial aún no está completamente dilucidado; varios autores involucran en el mismo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas por interacciones superficiales con los medios de cultivo [7], las cuales participarían de manera activa en el mismo, así como iones libres del metal (Zn^{2+} por ejemplo) o complejos de este metal, e interacción con la membrana y el ADN [8], entre otros posibles mecanismos. Sin embargo, los detalles específicos de las reacciones entre las sustancias químicas y el sistema orgánico, que conforma la bacteria, no se comprende aun completamente. Por ello, es necesario la realización de trabajos de investigación orientados a evaluar el posible mecanismo involucrado en el efecto bactericida de dicho óxido metálico (ZnO) o que suministre información para conocer más sobre los posibles mecanismos.

Con lo anterior surgen las siguientes inquietudes ¿Tendrá alguna influencia la morfología de las NPs de ZnO, considerando el efecto mecánico y superficial asociado a esta característica, sobre la capacidad antibacterial de las nanopartículas de ZnO? ¿Qué efecto tendría la presencia de un antioxidante en los medios de cultivos con nanopartículas?

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del ZnO nanoparticulado, con dos morfologías diferentes, sobre cepas de *E. coli*, cuantificando la evolución del malondialdehído (MDA), biomarcador producto de la peroxidación lipídica, generado durante la interacción ZnO - *E. coli*, utilizando para ello espectrofotometría ultravioleta UV-Vis; estos resultados son útiles como conocimiento básico para estructurar un modelo del mecanismo antibacterial.

1.3 JUSTIFICACIÓN

La literatura científica reitera la importancia de las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs) debido a sus propiedades ópticas y electrónicas que, considerando además su naturaleza semiconductor, las hace aptas para diferentes aplicaciones [1], entre las que se destacan: el diseño de sensores, transistores, celdas solares, nanofósforos con emisión en la región visible del espectro, etc. Específicamente, la actividad antibacteriana

del óxido de cinc ha sido ampliamente explorada, encontrándose que la concentración, el tamaño de las nanopartículas y la temperatura pueden afectar dicha actividad.

Las anteriores aplicaciones de las ZnO-NP requieren de la obtención controlada y reproducible de las mismas, propiciándoles las características requeridas para su funcionalidad. Para tener un buen control de la morfología obtenida es importante establecer e implementar, en forma adecuada, el medio y el método de preparación. Existen en la actualidad varios métodos de síntesis que ofrecen una gran variedad de alternativas para generar diferentes nanomateriales con diferentes características. En el presente trabajo se estudiaron dos métodos de síntesis para obtener dos morfologías diferentes de las nanopartículas de ZnO: uno de ellos fue el método de sol-gel y el otro el método de precipitación controlada [3]. Se consideró que controlando los parámetros físicos y químicos del sistema, durante el proceso de síntesis, era posible controlar el tamaño y la forma de la nanopartícula; este trabajo busca presentar una alternativa rápida y sencilla para sintetizar nano-partículas de ZnO, de diferente morfología, afectando la etapa de nucleación de la fase sólida. Para ello se varió la concentración del precursor de reacción, así mismo se usó un surfactante en la mezcla de reacción para impedir el crecimiento de los núcleos de ZnO. Finalmente, se evaluó la capacidad antibacterial del ZnO-NP sintetizado poniendo especial atención a la morfología que ellas presentaban, dependiendo del método de síntesis empleado.

En resumen, en el presente trabajo se describe los principales resultados obtenidos de la síntesis de Nanopartículas de ZnO, su caracterización estructural, y las propiedades antibacteriales de las mismas.

1.4 OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la morfología de las nanopartículas de ZnO sobre su funcionalidad antibacterial en bacterias *E. coli*.

Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas con morfologías definidas: esferoidales, empleando el método sol-gel, y nanoagujas haciendo uso del método de precipitación controlada.

- Determinar las características fisicoquímicas de las nanopartículas de ZnO sintetizadas utilizando técnicas como DRX, espectroscopia IR, y microscopia electrónica de transmisión.
- Identificar el efecto de la morfología de las nanopartículas de ZnO sintetizadas sobre su acción antibacterial, tomando como cepa referencia el *E. coli*, usando para ello como biomarcador, el MDA y observando los cambios estructurales en la membrana plasmática.
- Determinar, a partir de los ensayos de inactivación de bacterias, la importancia que tienen los efectos mecánicos y superficiales propiciados por la morfología de las nanopartículas.

REFERENCIAS

- [1] Poole C.P; Owens F.J, Introducción a la nanotecnología. Editorial Reverté, Barcelona, 2007. 417 p.
- [2] Brayner R; Ferrari-LliouR; Brivois N; Djediat S; Bebedetti M.F; Fievet F, Toxicology impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 2006 Vol 6, No.4, p 866–870.
- [3] Escobar M.L; Echeverría O.M; Ortíz R; Vázquez-Nin G.H. Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis*, 2008 Vol 13, p 1253–1266.
- [4] Crespo M.P. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colombia Médica*, 2002 Vol 33, No.4, p 179-193.
- [5] Rael L.T; Thomas G.W; Craun M.L; Curtis C.G; Bar-Or R; Bar-Or D, Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2004 Vol 37, No.6, p 749-752.
- [6] Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, 1998 Vol 108, No.1, p 101–106.
- [7] Dutta R.K; Nenavathu B.P; Gangishetty M.K; Reddy A.V.R, Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid Peroxidation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012 Vol 94, p 143–150.
- [8] Kumar A; Pandey A.K; Singh S.S, Shanker R; Dhawan A, Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*, *Free Radical Biology & Medicine*, 2011 Vol 51, p 1872–1881.

Capítulo 2

**OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO CON
DIFERENTE MORFOLOGÍA**

2.1 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ZnO

El óxido de cinc (ZnO) es un compuesto inorgánico de masa molecular 81,40 g/mol, parcialmente soluble y ligeramente alcalino en agua, de naturaleza semiconductor, tipo II-VI, con un valor de 3.37eV de banda prohibida (banda “gap”). Este óxido presenta un espectro de emisión con bandas en el UV-vis [1] características que en años recientes, ha generado un gran interés debido a que las propiedades físicas que de ella se derivan, propiciarían el desarrollo de componentes para aplicaciones optoelectrónicas [2]. Muchos semiconductores binarios del tipo II-VI, como el ZnO, cristalizan tanto en la estructura de blenda de zinc o como wurtzita hexagonal, siendo ésta última la estructura más estable del ZnO [2]; estas formas de cristalización se ilustran en la figura 2.1a y 2.1b. Los átomos se encuentran lo suficientemente alejados para compensar las repulsiones apreciables entre sus nubes de carga electrónica, generadas por la diferencia de electronegatividades entre el cinc (1.6) y el oxígeno (3.5). Para garantizar la estabilidad eléctrica de la estructura, cada anión se encuentra rodeado por cuatro cationes, en las esquinas de un tetraedro, y viceversa. Esta característica se puede apreciar con claridad en la figura 2b, siendo esta coordinación tetraédrica típica del enlace covalente con hibridación sp^3 .

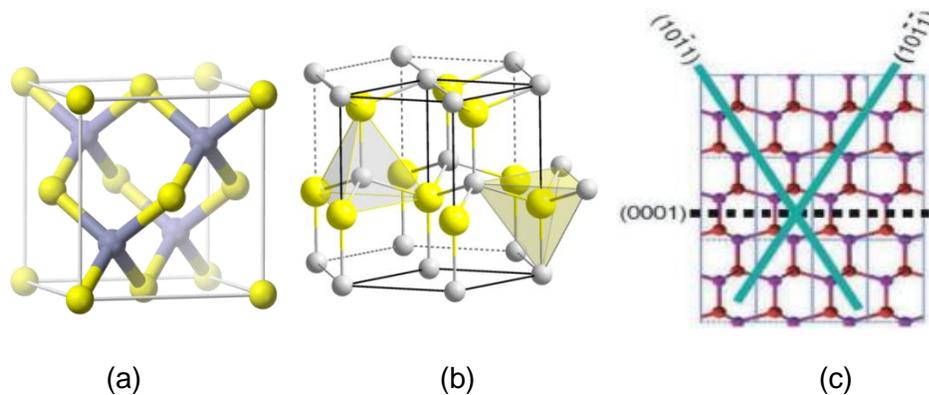
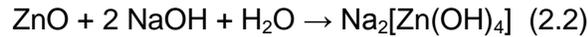
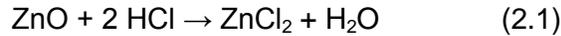


Figura 2.1 Estructuras cristalinas del ZnO: (a) blenda de Zn, (b) wurtzita hexagonal y (c) planos cristalinos de los átomos.

Esta estructura se puede considerar como una combinación alternada de planos de átomos de oxígeno y de planos de átomos de cinc, apilados a lo largo del eje c , con un desplazamiento entre ellos de $0.38c$, siendo c su parámetro de red en la dirección vertical (figura 2.1c). Los valores de los parámetros de red del ZnO, en condiciones normales de presión y temperatura, son $a=3.253 \text{ \AA}$ y $c=5.213 \text{ \AA}$ y su densidad es de $5,065 \text{ g/cm}^3$ [3]. El ZnO no es tóxico, ni irritante y es un compuesto que presenta características anfóteras que se disuelve tanto en ácido, formando sales, como en bases, produciendo cincatos del tipo $[\text{Zn}(\text{OH})_3]^-$ y $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ [4] tal como lo indican las ecuaciones (2.1) y (2.2).



2.2 USOS DEL OXIDO DE CINCO

El ZnO ha sido empleado en diversas aplicaciones por miles de años, El cinc es actualmente, el cuarto metal de mayor consumo en el mundo después del hierro, aluminio y cobre, y juega un papel importante en una amplia gama de aplicaciones, tanto domésticas como científicas. El ZnO es considerado como un gran material para la ingeniería, con una producción que se acerca al millón y medio de toneladas al año [5]. La principal aplicación se da en la industria del caucho donde el ZnO junto con el ácido esteárico, activan la vulcanización de este [4]. En una menor proporción se encuentra su aplicación en la industria de la cerámica, por sus propiedades físicas, lo convierten en un aditivo adecuado, tal como ocurre en la industria del hormigón mejorando sus propiedades. Por otro lado, las aplicaciones domésticas son altas, encontrándose en productos farmacéuticos, como en la crema de calamina (agente anti-picazón que es una mezcla de ZnO con Fe₂O₃), en las pinturas y en otros productos químicos. También se ha comprobado que el ZnO, en la presentación de finas partículas, tiene propiedades bactericidas, razón por la cual es añadido a varios materiales como el algodón, caucho, o los envoltorios de comida para cumplir esta funcionalidad. También es usado en una gran variedad de tratamientos para la piel, en productos como ungüentos antisépticos, cremas, lociones, protectores solares; este último uso se debe a que no es absorbido por la piel, por lo que se queda en la superficie, y bloquea los rayos ultravioleta [6]. Sus aplicaciones potenciales se dan en el campo de la electrónica ya que es un semiconductor de "gap" ancho (3,37eV) y por esto es usado para la fabricación de láseres de luz UV, LEDs, emisores de campo, celdas solares, sensores de gases, pantallas de cristal líquido, transistores, varistores, entre otros [7,8].

2.3 NANOPARTÍCULAS DE ZnO

Debido a sus propiedades, el óxido de cinc tiene un gran interés tecnológico en estructuras de baja dimensionalidad. Se pueden obtener nanoestructuras de ZnO en forma de nanopartículas, nanohilos, nanofibras, etc., todas ellas a escala nano (10⁻⁹ m). Por este tamaño tan pequeño, la relación entre los átomos de superficie y los del interior es mucho mayor que en materiales de mayor tamaño.

Las propiedades de los materiales dependen del ordenamiento de sus átomos y de cómo se disponen y mueven los electrones dentro de ellos. En un nanomaterial el movimiento de los electrones estará limitado por sus dimensiones, dando origen al denominado confinamiento cuántico de los electrones. La variedad de nanoestructuras ha propiciado la optimización de sus propiedades, permitiendo que sea considerado como un material con gran potencialidad en muchos campos de la nanotecnología. Puede presentar estructuras unidimensionales (1D), bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D). Siendo las primeras las que constituyen el mayor grupo y en ellas se incluyen las nanovarillas, nanoagujas, nanotubos etc. Como estructura 2D se obtienen nanoplacas y nanohojas, y en estructura 3D como flores diente de león, copos de nieve, etc. [9].

2.4 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ZnO

2.4.1 Rutas Químicas

Considerando los requerimientos en nanotecnología, la química de la síntesis, en general, ha sido utilizada para desarrollar diferentes métodos con el fin de obtener nanopartículas; cada uno de estos métodos tiene sus ventajas propias y limitaciones. Hay dos enfoques fundamentales para fabricar los nanomateriales. El denominado enfoque "abajo hacia arriba" ("bottom-up"), que involucra principalmente a los métodos químicos, considera la obtención de un nanomaterial, desde sus componentes básicos, a través de la condensación de átomos o moléculas, en fase gaseosa o en solución, lo que propicia la formación de núcleos y su crecimiento; controlando estos procesos, se podrían diseñar partículas con cierto tamaño y/o morfología, que presenten las propiedades deseadas. El segundo enfoque, método "arriba hacia abajo" ("top-down"), involucra, principalmente, métodos físicos que favorecen la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas (por ejemplo por molienda), implicando la re-estructuración de un material para obtener un nanomaterial [10].

2.4.1.1 Método hidrotermal

Esta es una técnica en la que un precursor metálico, normalmente una sal metálica, se disuelve en agua, en un recipiente cerrado, y luego se calienta, por encima del punto de ebullición del agua, generándose una presión superior a la atmosférica (normalmente moderada). Es una técnica muy usada en la síntesis de polvos cerámicos ya que esta permite controlar la morfología de las partículas, ajustando la concentración del solvente y la de los precursores utilizados [11]. Dadas las condiciones del proceso, se logra una mejor disolución de los componentes del sistema, permitiendo la disolución o la reacción

de especies muy poco solubles a condiciones habituales, por ejemplo: aluminosilicatos, titanatos y sulfuros [10]. El objetivo de esta técnica es lograr una mejor disolución de los componentes de un sistema y así se logran disolver o hacer reaccionar especies muy poco solubles en condiciones habituales, el agua es calentada a 600 °C, experimentando una disociación, en H_3O^+ y OH^- , por lo que agua a estas condiciones se comportaría, simultáneamente, como un ácido y una base bastante fuertes, capaces de propiciar ataques ácido-base mucho más agresivos. También, en este proceso, se puede controlar la homogeneidad de las fases ya que se pueden regular las especies involucradas en la formación de núcleos, con el previo conocimiento de las reacciones que ocurren en el sistema [9].

2.4.1.2 Método Precursor polimérico (Pechini)

Recibe el nombre de su pionero M. Pechini quien en 1967 desarrollo la técnica para obtener titanatos alcalinotérreos para su utilización como dieléctricos de condensadores [12]. El método se estructuró como una variación del método sol-gel, el cual fue empleado para la obtención de películas delgadas. Sin embargo, este ha sido ampliamente usado para el desarrollo de otras novedades tecnológicas [13].

El método Pechini está basado en la formación de complejos metálicos favoreciendo la reacción de ácidos alfa-hidroxicarboxílicos, que contienen grupos hidroxílicos, y cationes metálicos, donde se ha hecho uso, principalmente, de ácido cítrico, el cual actúa como agente quelante de dichos cationes [12,13]. Después, con la adición de un polialcohol, como el etilenglicol, se origina una resina polimérica al reaccionar este alcohol y el ácido quelante [12,14]. Posteriormente, al calentar el sistema, se elimina agua y se forma la resina polimérica con los iones precursores acomplejados en su estructura; este material es calcinado, para descomponer la estructura orgánica de la resina, y posteriormente tratado térmicamente a una temperatura adecuada para obtener la fase cristalina deseada. Entre las ventajas que este método ofrece, está la alta pureza y homogeneidad que presenta el producto final y la posibilidad de sintetizar materiales nanométricos de composiciones complejas; esto ha hecho que el método Pechini sea ampliamente utilizado para obtener diversos óxidos multicomponentes, para diferentes aplicaciones [15].

2.4.1.3 Método de combustión

Es una técnica muy utilizada en la síntesis de materiales cerámicos con cierta estructura y que presentan funcionalidad, entre ellos catalizadores, aleaciones y nanomateriales en

general. En este método, el calor requerido para llevar a cabo la síntesis, es aportado principalmente por la reacción exotérmica que ocurre entre los reactivos precursores y el “combustible”, por ejemplo la urea, reduciendo significativamente la cantidad del calor que tiene que ser aportado por la fuente externa [16].

La síntesis por combustión química, en solución, consiste en poner en contacto una solución acuosa de sales del metal de interés, como los nitratos, con un apropiado combustible orgánico, como la urea, a temperaturas en el intervalo de 400-800 °C. Cuando la mezcla empieza a calentarse, se genera energía térmica de manera muy rápida, lo que propicia una reacción exotérmica brusca dando como resultado la formación en el sistema, de un óxido metálico en forma de polvo, que puede ser empleado como material adsorbente [16] y/o para hacer uso de su actividad fotocatalítica, dada su gran área superficial. Este método es fácil y rápido comparado con otros métodos convencionales y está basado en la descomposición explosiva de reactivos de nitrato, haciendo uso de un combustible orgánico, lo que puede originar estructuras porosas de nanopartículas, por ejemplo de ZnO [17].

2.4.1.4 Método mecanoquímico

Es una de las metodologías de síntesis más ecológicas actualmente, debido a que no se usan disolventes químicos y se aprovecha la energía mecánica generada por los elementos de molienda o por los morteros comunes. La fricción generada en estos procesos, sobre los materiales iniciales, origina cambios energéticos en los sólidos, propiciados por la acumulación de defectos en condición de no-equilibrio en los materiales. Lo anterior ocasiona estiramientos reversibles de los enlaces y una alta energía de vibración de los átomos de los reactivos en contacto, favoreciendo la ruptura de los enlaces activos para la formación de los enlaces de los productos, disminuyendo así las energías de activación y activando los sólidos para que ocurran las reacciones químicas en estado sólido [10]. Este método se ha aplicado ampliamente en la síntesis de una gran variedad de nanopartículas, incluyendo ZnS, CdS, LiMn₂O₄, SiO₂ y CeO₂ [18].

Un diluyente, a menudo el subproducto de la reacción (sal), se incorpora a los materiales de partida durante el procesamiento mecanoquímico para separar las nanopartículas y prevenir su posterior crecimiento [18]. La eliminación de esta sal de la matriz se lleva a cabo, generalmente, a través de un simple lavado y, como resultado, el polvo sintetizado no presenta al final gran aglomeración. Es un método simple, barato y cómodo que es especialmente adecuado para la producción de las nanopartículas a gran escala [19].

2.4.1.5 Metodología Sol-Gel

Es una ruta química de síntesis de gran importancia científica y tecnológica que permite obtener polvos cerámicos nanoestructurados. Es una excelente opción para producir materiales de alta calidad y pureza, con alta homogeneidad de los productos, utilizando bajas temperaturas para su obtención si se compara con los procesos convencionales. A través de este proceso se pueden sintetizar principalmente óxidos inorgánicos pero, también, se pueden obtener nitratos, sulfuros, híbridos orgánicos e inorgánicos, entre otros materiales. Consta de varios pasos: mezclado, gelificación, envejecimiento, secado y calcinación [20].

Este proceso implica la transición de un sistema predominantemente líquido, “sol” (suspensión coloidal de partículas sólidas con tamaños nanométricos, con diámetros de 1-100 nm), a uno predominantemente sólido, “gel” (sólido constituido por al menos dos fases, con la fase líquida atrapada e inmovilizada en la fase sólida) [20]. La química del proceso Sol-Gel está basada en el desarrollo, en el seno del sistema, de reacciones de hidrólisis y condensación de especies químicas provenientes de los precursores moleculares utilizados para formar el “sol”. Los precursores se usan para conformar soluciones acuosas y estos pueden ser o una sal inorgánica o un compuesto órgano-metálico, entre otros posibles reactivos químicos que contengan el catión de interés [21,22]

En estas suspensiones, la fase dispersada es tan pequeña que las fuerzas gravitacionales se pueden despreciar y las interacciones que predominan son las fuerzas de corto alcance, tipo atracción de Van der Waals, las coulómbicas y las estéricas. La transformación posterior de sol a gel, denominada proceso de gelación, comienza después de que el precursor se dispersa homogéneamente y se forma el “sol”, a través de reacciones de hidrólisis y oxolación que favorecen las reacciones de condensación [20-23], llegando a rigidizarse el sistema por el desarrollo de un cambio brusco de líquido altamente viscoso a fase sólida. Se puede utilizar un ácido o base como catalizador, para favorecer la hidrólisis del ion de interés por ejemplo el Zn^{2+} , propiciando la formación de especies acuoso, hidroxilo u oxo, o combinaciones de ellas, o adicionalmente, como para el caso del cinc, especies $Zn(OH)_2$ o $Zn(OR)_2$ con R= alquilo). Estas especies pueden dar origen a núcleos de la fase sólida, que crecen y pueden formar precipitados, tal que su composición química, tamaño y forma de partícula primaria puede depender del tipo de solvente, así como de la naturaleza del precursor. En el caso de que el gel perdure, o sea

que no se presente separación de fases, éste puede estar constituido por una red de grandes cadenas polinucleares o cadenas de partículas sólidas muy finas (en el rango de los nanómetros), reteniendo en su interior un fase líquida (solvente orgánico o acuoso) [20,22,24].

Durante el proceso de gelación, la viscosidad se incrementa rápidamente, sin embargo con un control apropiado del sistema, principalmente de las reacciones de condensación, la viscosidad del “sol” puede cambiar de manera controlada. Algunos parámetros importantes que se consideran para el proceso son: la concentración de los precursores, la temperatura a la que se realiza el proceso y la presencia de catalizadores ácidos o básicos; cualquier cambio del pH de la solución desplazará el equilibrio de hidrólisis y por lo tanto ocasionará un cambio de la electronegatividad promedio del medio, que puede afectar el tamaño de las partículas, por ejemplo. El uso de surfactantes en la mezcla de reacción impide el crecimiento exagerado e irregular de los núcleos, favoreciendo la formación de las nanopartículas con un tamaño y morfología determinada [25-28].

El “gel” es por lo tanto, una interconexión de una red rígida constituida por poros de dimensiones submicrométricas y cadenas poliméricas. El término “envejecimiento” es utilizado para denominar al proceso de cambio de la estructura y de las propiedades del sistema después de la gelación; si éste se deja reposar a temperatura ambiente, durante un cierto periodo de tiempo, el gel se encogerá expulsando tanto el solvente como al agua residual presentes en la estructura [20]. El envejecimiento involucra procesos de condensación, disolución y re-precipitación, así como las transformaciones de fase que puedan ocurrir dentro de las fases sólidas o líquidas que existen en el sistema. Al terminar el tiempo de envejecimiento, por lo general aún la fase sólida contiene solvente y agua los cuales pueden ser retirados de la misma por un método separativo (centrifugación, filtración o evaporación). Tras un proceso térmico el sólido se somete a una etapa de calcinación, donde finalmente se obtienen los polvos cerámicos de interés con diversas formas de monolito (esferas, fibras, etc.), o de película delgada, cuando el “sol” se deposita sobre un sustrato de vidrio y se forma un “gel húmedo” sobre este; al secar el sistema, y tratarlo térmicamente, se obtiene un polvo cerámico [29,30]. En la figura 2.2 se muestra el esquema del procedimiento general del método sol-gel.



Figura 2.2. Esquema del procedimiento general del método sol-gel.

2.4.1.6 Método de precipitación controlada

Éste método consiste en la disolución de una sal de cinc utilizando un agente acidulante, en agua, para conformar una solución homogénea totalmente traslúcida. Posteriormente, se adiciona de manera controlada el agente precipitante, normalmente una base débil como hidróxido de amonio (NH_4OH) manteniendo el sistema en constante agitación, hasta propiciar la precipitación de un compuesto de cinc sólido en el seno de la solución; este sólido se extrae, y se trata térmicamente [31,32]. Durante la adición del agente precipitante se registran los cambios de pH, El precipitado obtenido al final del procedimiento, se trata térmicamente para obtener el sólido de interés.

El proceso de precipitación controlada, utilizado para la obtención de los polvos cerámicos, involucra diferentes etapas entre las que se destacan: la nucleación de la fase sólida, el crecimiento de los núcleos y el proceso de envejecimiento del sistema [31-33], etapas que se representan esquemáticamente en la figura 2.3. El intervalo de tiempo dentro del cual ocurre el proceso de precipitación puede variar, desde unos pocos segundos, hasta días, meses o años [31].

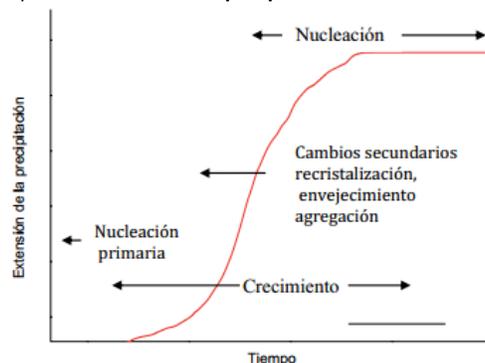


Figura 2.3 Procesos cinéticos involucrados en el proceso de precipitación controlada.

En la solución que se disuelve la sal de cinc, se obtiene la fase sólida, la fase líquida ópticamente homogénea y en continua agitación, estaría constituida por átomos, moléculas e iones complejos enlazados con moléculas del solvente y otros constituyentes de la solución. Con el proceso de precipitación se busca la transición de esa fase líquida homogénea a una estructura sólida homogénea dispersa en el sistema, en forma de pequeñas partículas de sólido de dimensiones nanométricas y que pueden presentar patrones reticulares regulares de largo rango (cristales) o de orden local (amorfo) [34].

El agente precipitante promueve la formación de especies químicas no solubles a través de reacciones fisicoquímicas que ocurren en el seno del sistema. Estas nuevas especies químicas pueden ser asociaciones de iones o moléculas, complejos de iones individuales, especies mono o polinucleares u oligómeros, principalmente (figura 2.4). Posteriormente, debido a que la concentración de estas especies aumenta, lo que ocasiona cambios en su actividad, así como del pH de la solución, se favorece la formación de embriones o sea de unidades que carecen de una red cristalina estable, que se forman y se disuelven fácilmente [35]. Cuando los embriones alcanzan un “tamaño crítico” se forman los núcleos de la fase sólida, esta etapa denominada “nucleación”, es el principal proceso relacionado con la formación de los cristales en el seno de la solución, el cual ocasiona un cambio de estado en una región pequeña del volumen del sistema, pero estable. Es decir, para comprender la formación de un cristal en el seno de un líquido, se debe considerar que, inicialmente, en la disolución se tienen monómeros y moléculas simples, sometidas a movimiento browniano y a colisiones inelásticas. En segundo lugar se debería contemplar la acción de las fuerzas intermoleculares que tratarían de unir a los monómeros, favoreciendo la formación de especies polinucleares y, finalmente, de los núcleos; estas fuerzas dependerían de factores como: pH, fuerza iónica, constante dieléctrica del disolvente, etc.

Para que la nucleación de la fase sólida se produzca, se debe superar una barrera energética durante el proceso lo que exige un cierto grado de sobresaturación (ver figura 2.3) [31]. Los núcleos son unidades básicas que pueden crecer debido a que poseen una estructura básica de sólido cristalino. Esta transición de líquido a sólido ocurre en varias etapas, tal como lo ilustra la figura 2.4.

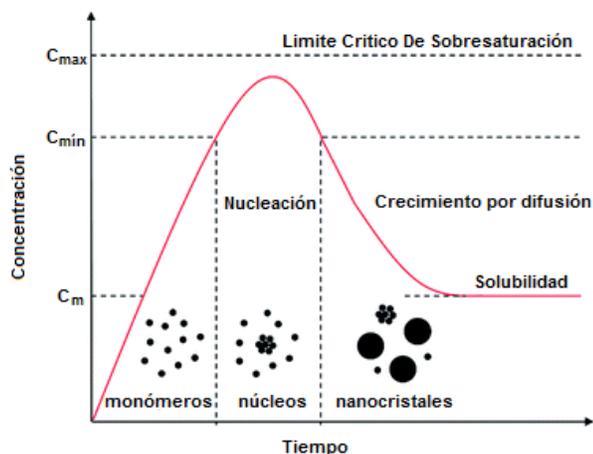


Figura 2.4 Esquema del proceso de nucleación y crecimiento de nanocristales en solución.

Finalmente, se conforma el núcleo base para que, posteriormente, se forme un cristal. Existen diferentes tipos de nucleación: (1) la nucleación primaria que puede clasificarse en homogénea, si ocurre directamente a partir de disoluciones puras, y heterogénea, inducida por otras superficies ajenas al cristal. (2) La nucleación secundaria es inducida por la presencia de otros cristales y el crecimiento cristalino se realiza por la formación de capas monomoleculares de las especies químicas, componentes del precipitado, que no han reaccionado y que se pueden adsorber individualmente sobre la superficie de los núcleos o cristalitos iniciales, ocasionando el crecimiento de los mismos.

2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para la obtención de los polvos cerámicos de óxido de cinc con diferentes morfologías se emplearon dos metodologías diferentes, el método sol-gel y el método de precipitación controlada, para obtener nanopartículas de ZnO con morfologías esférica y acicular, respectivamente; óxidos con morfologías de interés para este trabajo. Se emplearon los equipos y reactivos listados en la tabla 2.1, donde se indica su pureza y marca.

Tabla 2.1 Equipos y reactivos usados para la síntesis y caracterización del ZnO.

REACTIVO	MARCA	PUREZA
Acetato de cinc di-hidratado.	Merck	99%
Bromuro de cetiltrimetilamonio	Merck	99.97%
Etanol absoluto	Merck	99%
hidróxido de amonio	Mallinkrodt	28%
Ácido nítrico	Merck	67%
dosificador	Dosimat Metrohm775	-----
Dispensor de alta cizalla	Ultraturrax T50	-----

pH-metro	Metrohm 744	-----
Horno	Carbolite	-----
Espectrofotómetro (FT-IR)	Termo Electrón Nicolet IR 200 FT-IR	-----
Microscopio electrónico	JEOL 1.200 EX	-----
Difractómetro de rayos X	Bruker modelo D8 Advance	-----

2.5.1 Metodología sol-gel

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados en este trabajo es importante obtener un polvo cerámico de ZnO nanoparticulado y con baja aglomeración. Para cumplir con estos requerimientos se controlaron los parámetros más importantes que intervienen en el desarrollo del proceso de síntesis, tales como: naturaleza y concentración de los precursores, naturaleza del solvente, pH del sistema y presencia de un surfactante, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), así como la temperatura y tiempos de duración de los tratamientos térmicos.

1. En el método sol-gel, tal como se mencionó anteriormente, la obtención de los “soles” de ZnO se realizó a través de las reacciones de hidrólisis y policondensación del acetato de cinc dihidratado $Zn(O_2CCH_3)_2(H_2O)_2$ - (AcZn). Para ello se empleó como solvente alcohol etílico, en el que se disolvió el acetato de cinc (0,15 M) y la solución obtenida se agitó durante 20 minutos, a una temperatura de 70°C, hasta obtener una disolución completa del precursor (figura 2.5).
2. Después se adicionó a la mezcla el surfactante, Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (0,005 M), Luego se incorporó el “agente precipitante” una solución de hidróxido de amonio, NH_4OH al 28%, de manera controlada con la ayuda de un dosificador, manteniendo en agitación continua el sistema durante 2 horas, hasta llegar a un pH 8.5.
3. La suspensión resultante, después de adicionar el agente precipitante, se dejó envejecer por 3 días y pasado ese tiempo la suspensión obtenida conformó un “gel” el cual se puso a calentar en una plancha de calentamiento a 80°C, por 48 horas, para evaporar el solvente (fase líquida) y obtener la fase sólida.
4. Una vez eliminado el solvente, el precipitado sólido se maceró, usando un mortero de ágata, hasta obtener un polvo fino el cual se sometió a tratamientos térmicos para eliminar totalmente el solvente y la fase orgánica presente en las muestras. Para ello

se estructuró un programa de calentamiento que involucro una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, desde temperatura ambiente hasta 150 °C. Manteniendo esta temperatura por 2 horas, con el fin de evaporar el agua fisisorbida y remanente del solvente, a continuación se incrementó la temperatura a 400 °C, donde se mantuvo por 2 horas para favorecer la calcinación de la fase orgánica, luego se disminuyó la temperatura hasta temperatura ambiente, para completar un total de 9 horas de tratamiento térmico de la muestra sólida en el horno. Al final se obtuvo un sólido blanco, el cual se caracterizó usando diferentes técnicas según se describe a continuación de la figura 2.5.

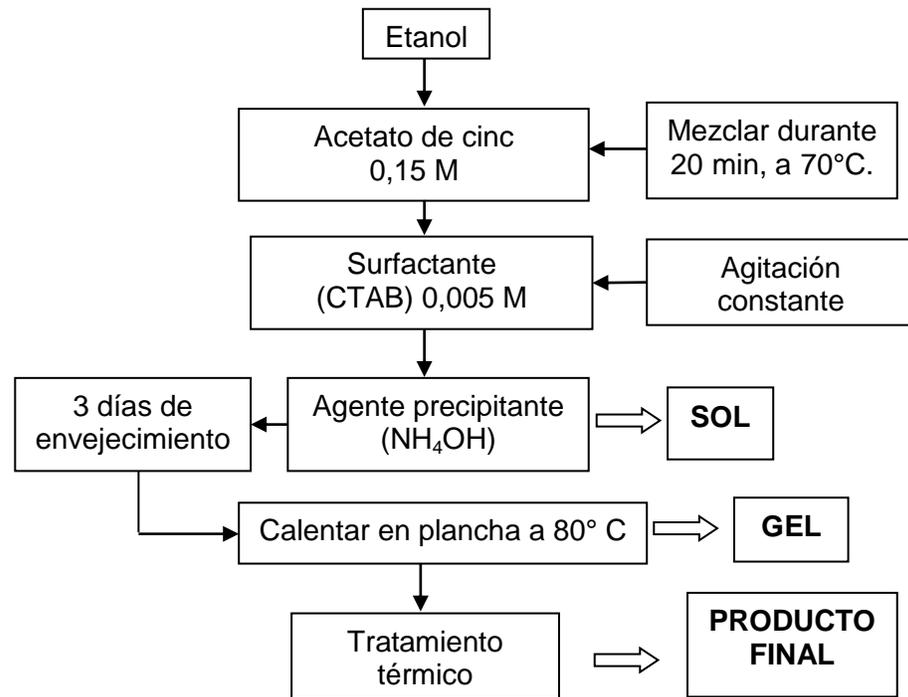


Figura 2.5 Esquema de la síntesis de ZnO por el método sol gel.

2.5.2 Caracterización de las NPs-ZnO sintetizadas por el método sol-gel

El óxido de cinc fue caracterizado, usando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) para determinar los grupos funcionales presentes en los sólidos y, principalmente, la presencia de las bandas características del ZnO. Se utilizó Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) para conocer el tamaño, grado de aglomeración y morfología de las partículas. Posteriormente, los sólidos se caracterizaron usando difracción de rayos X (DRX) para determinar las fases cristalinas presentes en las partículas nanométricas.

❖ Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

El espectro de infrarrojo del sólido sintetizado, se obtuvo empleando un espectrofotómetro FT-IR. El barrido se realizó entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} y las muestras se prepararon mezclando los sólidos en polvo con bromuro de potasio, en la figura 2.6 se muestra el espectro IR correspondiente a la muestra sólida obtenida por el proceso sol-gel y que fue sometida a tratamiento térmico a 400°C . Se observa la banda típica del agua a 3450 cm^{-1} , correspondiente a los modos vibracionales de tensión de los grupos funcionales hidroxilos (OH^-) y otras bandas alrededor de 1378 cm^{-1} y 1570 cm^{-1} que se pueden asociar a los modos vibracionales de tensión asimétrico y simétrico del COO^- . Una banda intensa a 445 cm^{-1} que corresponde al modo vibracional de tensión del grupo funcional Zn-O del ZnO [31]. Otras bandas son evidentes como la ubicada a 2930 cm^{-1} , que se podría asociar al modo de tensión del grupo metilo, y otra a 2370 que correspondería al CO_2 adsorbido del medio ambiente por la muestra [31].

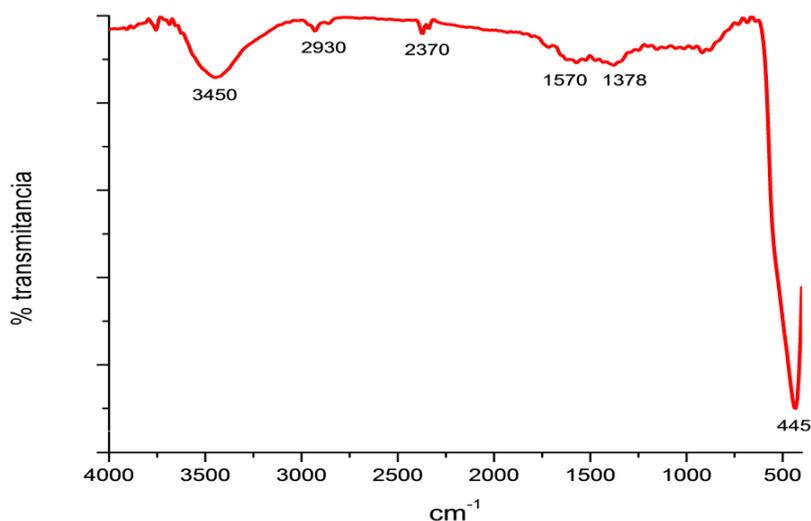


Figura 2.6 Espectro IR de ZnO sintetizada por la metodología sol-gel.

❖ Microscopia electrónica de transmisión (MET)

La muestra de ZnO a analizar se suspendió en 1mL de etanol y se llevó a un baño ultrasónico, por 30 minutos, para dispersarla. Posteriormente, con una micropipeta, se tomó una pequeña cantidad de ella y se depositó sobre una de las rejillas circulares empleadas en microscopia electrónica de transmisión y a las que previamente se les ha depositado una película Formvar; ésta finalmente se introdujo al microscopio y se observó

la muestra. Para este estudio se utilizó el microscopio electrónico, a 80 keV. En la figura 2.7 se observa una micrografía de la muestra sintetizada por el método sol-gel donde se evidencia las partículas de ZnO con un tamaño del orden de los nanómetros (<20nm) y presentan una morfología esferoidal.

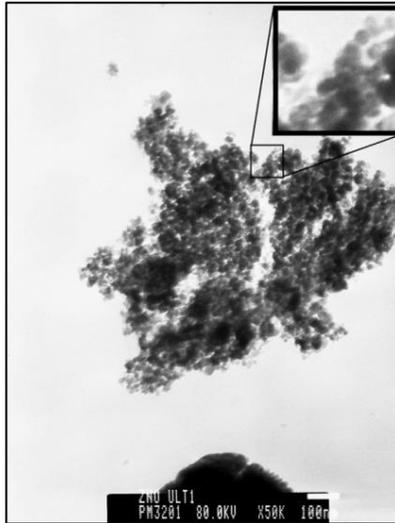


Figura 2.7 Micrografía obtenida con MET de ZnO sintetizado con la metodología Sol-gel.

❖ Difracción de rayos X DRX

Esta técnica de caracterización se utilizó para identificar y determinar la estructura cristalina de la muestra sintetizada [30]. La muestra obtenida fue macerada y compactada en el portamuestras, para posteriormente llevarla al difractómetro. En la figura 2.8 se muestra el difractograma de rayos X del sólido obtenido después de 3 días de envejecimiento del sistema sintetizado por la metodología sol-gel, usando etanol como solvente. Se identificó que la fase del ZnO, tiene una estructura cristalina hexagonal tipo wurtzita. Los espectros indican las direcciones preferenciales a lo largo de los planos (100), (002) y (101) según la base de datos (JCPDS 36-1451). Además, se evidencia la presencia de los planos (102), (110), (103) y (112) que corresponden a la misma fase wurtzita del ZnO [36].

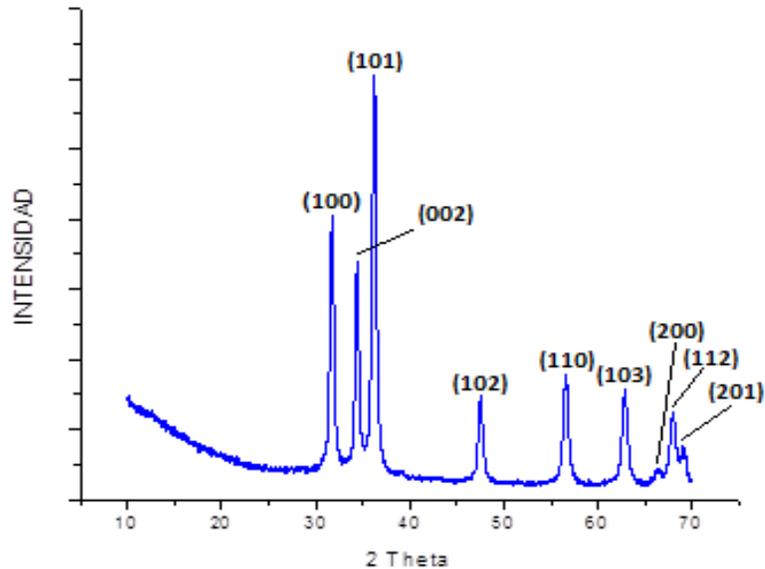


Figura 2.8 Difractograma de rayos X del ZnO sintetizado por el método sol-gel, (PDF 36 1451).

2.5.3 Metodología precipitación controlada

Para la obtención de los polvos cerámicos de óxido de cinc con morfología acicular se empleó el método de precipitación controlada - MPC, procedimiento que ha sido utilizado con éxito para obtener óxidos metálicos de interés industrial [36-41]. Los equipos y reactivos usados para el desarrollo de esta parte del proyecto, indicando su pureza y marca, son listados en la tabla 2.1.

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados en este trabajo, se controlaron los parámetros de síntesis sobre las características finales del ZnO sintetizado, entre ellos: el pH del sistema, la temperatura y los lavados realizados al precipitado que se forma en el sistema, parámetros que afectan las características finales del producto, principalmente su morfología y tamaño de las partícula, según estudios realizados previamente [31,32].

1. Se empleó como precursor acetato de cinc dihidratado $Zn(O_2CCH_3)_2(H_2O)_2$ (AcZn) y como solvente agua destilada, en un volumen tal que, usando la cantidad adecuada de AcZn, se obtuviera una solución con concentración 0,2 M.
2. La solución obtenida se agito durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se acidifico adicionando ácido nítrico HNO_3 , hasta obtener un $pH = 2$ (figura 2.9 (a)). Posteriormente, mientras se adicionaba el hidróxido de amonio NH_4OH (Agente precipitante), acción que se realizó usando un dosificador a una velocidad de 0.034 ml/seg, bajo continua agitación del sistema (200 rpm), se controló el incremento del pH

con la ayuda de un pH-metro, hasta alcanzar un $\text{pH}=8.2$; este proceso se realizó a temperatura ambiente y el precipitado resultante se dejó envejecer durante 3 días (figura 2.9 (b)).

3. Pasado este tiempo, la suspensión obtenida se filtró al vacío para eliminar el solvente, utilizando para ello una membrana con un tamaño de poro de $0,22\ \mu\text{m}$ (figura 2.9(c)), y el sólido obtenido se secó y se re-dispersó en el mismo volumen de agua usado para la síntesis, empleando un dispersor de alta cizalla, a 10000 rpm durante 20 minutos (figura 2.9(d)); a este tratamiento de redispersión, envejecimiento y filtración del precipitado se le denominó “proceso de lavado” y se repitió cuatro veces, cada 24 horas.
4. El producto resultante, después de realizar el proceso de lavado, se secó en una estufa a una temperatura de $100\ ^\circ\text{C}$, durante 12 horas, se maceró en un mortero de ágata y posteriormente se caracterizó para conocer la evolución de la fase sólida durante la síntesis. El polvo obtenido se sometió a tratamiento térmico, a una temperatura de 400°C durante 2 horas, usando un horno. El polvo cerámico obtenido se maceró y posteriormente se caracterizó por diferentes técnicas. Un esquema general del método de precipitación controlada se ilustra en la figura 2.10 [33]

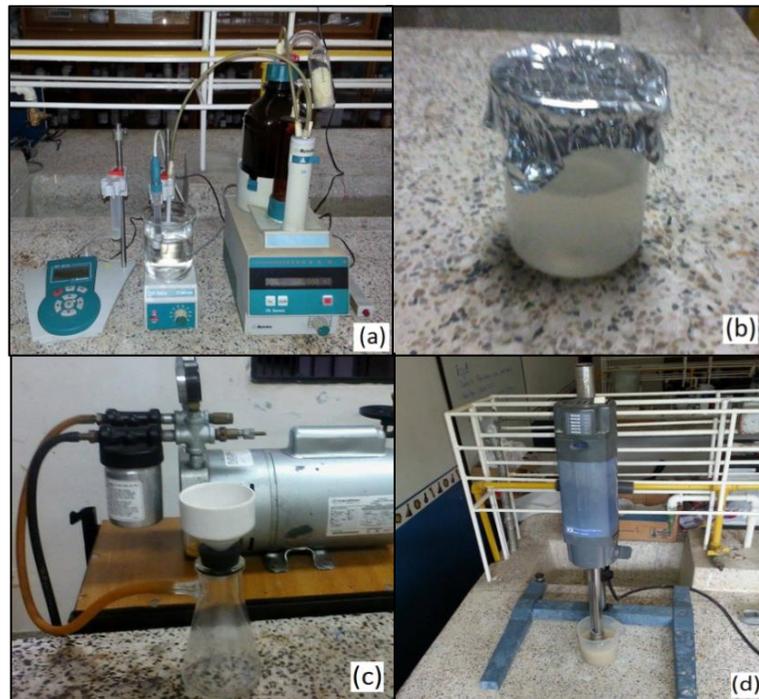


Figura 2.9 Fotografías de la etapa de lavado en el método de precipitación controlada utilizado para sintetizar el ZnO con morfología acicular.

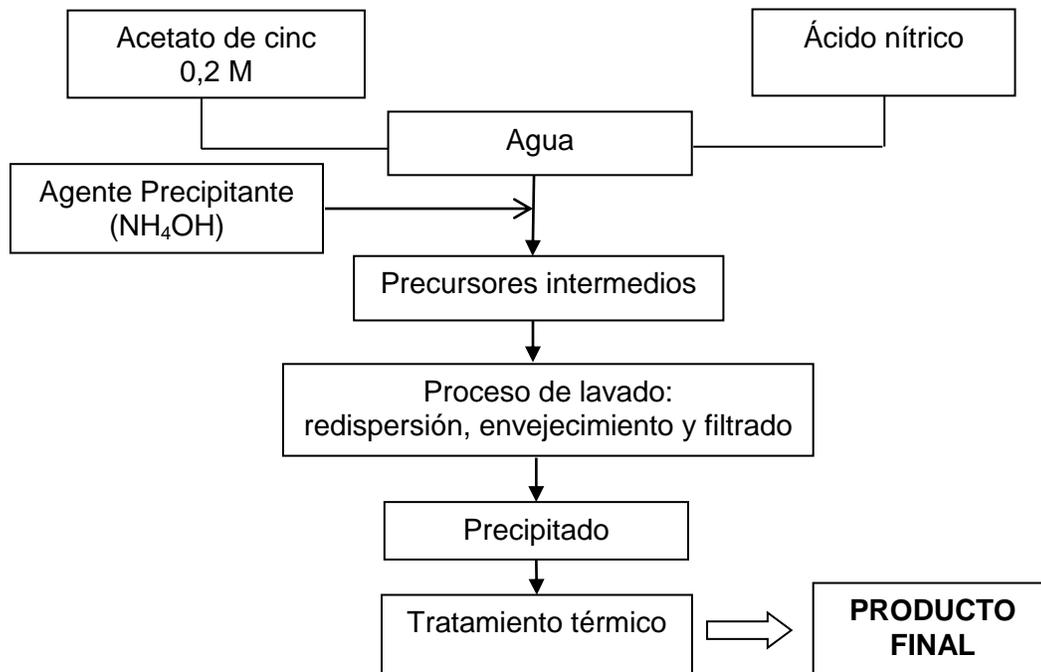


Figura 2.10 Esquema de la síntesis de ZnO por precipitación controlada.

2.5.4 Caracterización de las NPs-ZnO sintetizadas por precipitación controlada

Las muestras obtenidas al finalizar el proceso de lavado, se caracterizaron usando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), para determinar la presencia de las bandas características del ZnO y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) para conocer el tamaño, grado de aglomeración y morfología de las partículas, así como la evolución de la muestra durante el lavado. Al finalizar el proceso se tomó la muestra sólida resultante y se caracterizó usando difracción de rayos X (DRX) para determinar la fase cristalina presente en la misma. Los resultados obtenidos con estas técnicas de caracterización se describen a continuación.

❖ Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

En la figura 2.11 se muestran los espectros IR obtenidos para las muestras sintetizadas por el método de precipitación controlada, donde es evidente la evolución de las bandas más características disminuyendo la intensidad de las mismas hasta su desvanecimiento. Las bandas que se observan entre 3700 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} se pueden asignar a los modos vibracionales de tensión de los enlaces O-H y N-H correspondiente a los grupos funcionales hidroxilos (OH^-), del agua e

intermoleculares, y los producidos por la incorporación del NH_4OH y/o del HNO_3 al sistema. La evolución de los grupos funcionales en el sólido, durante el proceso de lavado (figura 2.11), muestra una disminución en el sistema de la cantidad de OH^- libres, y/o de los enlaces intramoleculares, y de la interacción del HNO_3 con oxígenos superficiales. En el intervalo de frecuencias entre 3000 cm^{-1} y 2800 cm^{-1} se observa la disminución de la intensidad de dos señales a 2950 cm^{-1} y a 2870 cm^{-1} tal que la primera se podría asociar al enlace NH-O [42]. La otra señal, a 2870 cm^{-1} , corresponde al modo vibracional simétrico de tensión CH_3 adsorbido. Algunas bandas indicarían la formación de complejos de cinc durante el proceso de síntesis, como es el caso de las señales ubicadas a 1380 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} que se podrían asociar a modos vibracionales de tensión asimétrico y simétrico del COO^- , con una separación de número de onda de $\Delta\lambda=170\text{ cm}^{-1}$, lo que indicaría la formación de un compuesto monodentado de carboxilo con el cinc, así como las señales $\sim 1641\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1340\text{ cm}^{-1}$ que podrían contener información adicional de la presencia de especies bidentadas, quelante y puente del carboxilo, las cuales redujeron su intensidad (figura 2.11).

Este comportamiento indicaría que estos complejos, en presencia de agua, se transformaron en otros durante el proceso de lavado, tal como se observa en el segundo y tercer lavado donde persisten las bandas de tensión asimétrico y simétrico del COO^- alrededor de 1380 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} [36]. La absorción a 1060 cm^{-1} corresponde al modo vibracional C-O.

Los espectros IR de la figura 2.11 muestran que, a través del proceso de lavado, se favorece la consolidación de los enlaces Zn-O (500 y 450 cm^{-1}) y Zn-OH (878 cm^{-1}); la banda más intensa se encuentra a 446 cm^{-1} la cual se puede asociar al modo vibracional de tensión del grupo funcional Zn-O del ZnO [31]. Este último resultado también se observa en el espectro IR de la muestra sintetizada por sol-gel (figura 2.6) y con los encontrados en la literatura [31-33]. Comparando la forma de la banda a bajas frecuencias correspondientes al enlace Zn-O de la muestra sintetizada por precipitación controlada (figura 2.11) con la obtenida por sol-gel (figura 2.6), la primera es más ancha que la segunda lo que indica que existen diferencias “locales” en la estructura de los respectivos sólidos [43].

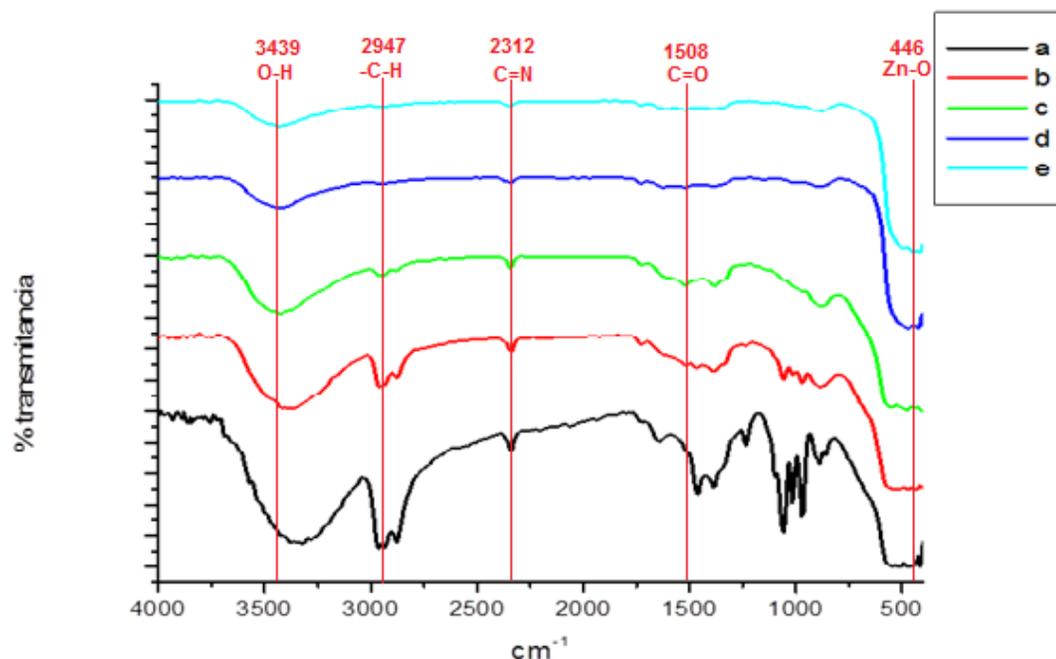


Figura 2.11 Espectros de Infrarrojo (FTIR) correspondientes a muestras sólidas extraídas del sistema durante la etapa de lavado, en el desarrollo del proceso de precipitación controlada: (a) muestra sin lavar, (b) primer lavado, (c) segundo lavado, (d) tercer lavado y (e) cuarto lavado.

❖ Microscopia electrónica de transmisión (MET)

La muestra de ZnO obtenida al finalizar la etapa de lavado se suspendió en 1mL de etanol y esta suspensión se colocó en un baño ultrasónico, por 30 minutos. Posteriormente, con una micropipeta, se tomó una pequeña cantidad de ella y se depositó sobre una de las rejillas circulares empleadas en microscopia electrónica de transmisión a la que previamente se le había depositado una película Formvar; ésta, finalmente, se introdujo en el compartimiento de porta muestras del microscopio y se observó la muestra depositada.

En la figura 2.12 se observan las micrografías de muestras extraídas en diferentes instantes de la etapa de lavado cuando el ZnO se obtuvo por el método precipitación controlada. En el sólido sin lavar se observan grandes aglomerados de partículas, con formas y tamaños irregulares (fig. 2.12a), mientras que en el segundo lavado se observan los primeros cristales con forma acicular (fig.2.12b). Algo similar se observa en la micrografía tomada a la muestra del tercer lavado donde son evidentes partículas aciculares, con baja aglomeración (fig. 2.12c). Finalmente, después del cuarto lavado, las partículas mostraron, preferencialmente, una morfología tipo acicular (fig. 2.12d). Lo común en las micrografías de la figura 2.12 son las partículas con morfología acicular, del

orden de los nanómetros en una de sus dimensiones (<40nm) y con menos de 400 nm en su longitud, y algunos aglomerados de partículas esféricas, pero las partículas con morfología acicular predominan en la muestra del cuarto lavado donde, por los resultados de espectroscopia IR (figura 2.11), se debería tener ZnO como fase mayoritaria.

❖ Difracción de rayos X (DRX)

En la figura 2.13 se muestran los difractogramas de rayos X correspondientes a sólidos obtenidos de los polvos cerámicos sintetizados por precipitación controlada, usando como solvente agua. Se observa que, al igual que en la muestra sintetizada por el método sol-gel (figura 2.8), la muestra obtenida por precipitación controlada presenta como única fase cristalina predominante el óxido de cinc (ZnO), una estructura cristalina hexagonal tipo wurtzita. Los espectros indican las direcciones preferenciales a lo largo de los planos (100), (002) y (101) según la base de datos (JCPDS 36-1451). Y se evidencia la presencia de los planos (102), (110), (103) y (112) que corresponden a la misma fase wurtzita del ZnO, (PDF 36-1451).

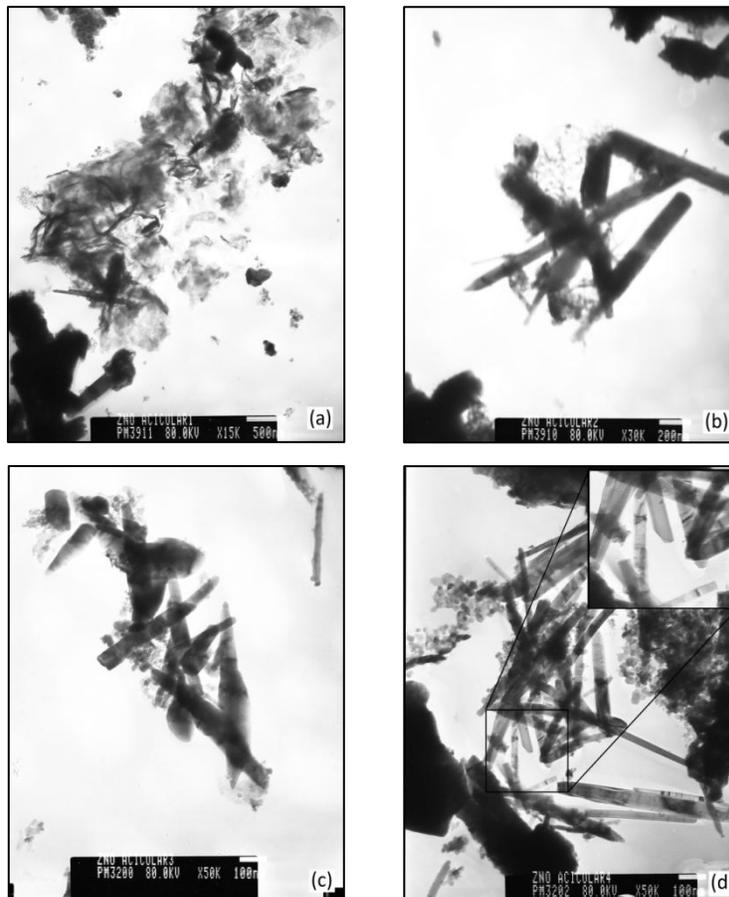


Figura 2.12 Micrografías obtenidas con MET de sólidos obtenidos en diferentes etapas de lavado, en el proceso de precipitación controlada: (a) primer, (b) segundo, (c) tercero y (d) cuarto lavado.

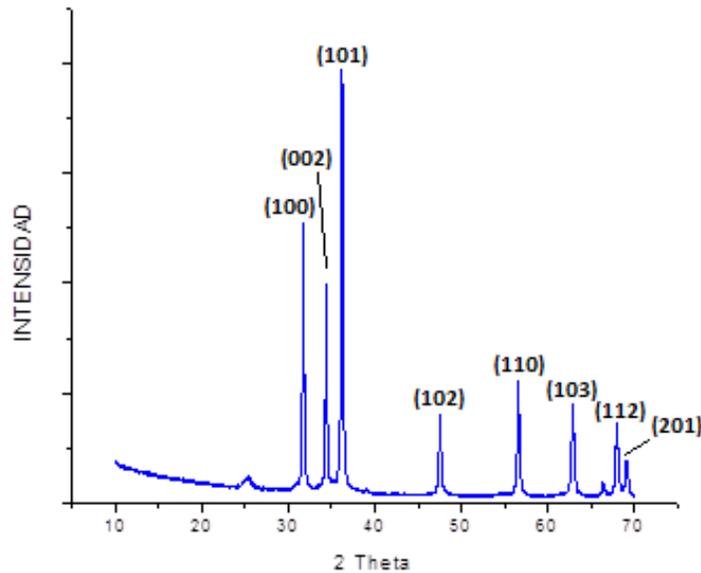


Figura 2.13 Difracción de rayos X de la muestra sintetizada por la metodología de Precipitación controlada.

2.6 ANÁLISIS

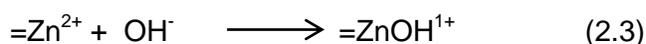
Con el desarrollo del trabajo se evidenció el gran efecto que tiene el método de síntesis, con sus diferentes etapas, sobre las características microestructurales del producto final, en este caso ZnO. Para la obtención de los polvos cerámicos de óxido de zinc (ZnO) con morfología esférica se empleó un surfactante en el medio de reacción con el fin de retardar el crecimiento exagerado de los núcleos, formados en el seno del solvente a través de los procesos de hidrólisis y condensación, considerando un efecto estérico más que por la formación de microreactores en el solvente (proceso de micela inversa) [20,21]. Este proceso favoreció la formación de pequeñas partículas nanométricas al aumentar el pH en la mezcla, tal que al alcanzar una condición básica en el sistema se observó turbidez dentro de él, la cual aumentó gradualmente hasta llegar a un pH 8.5 [26-28].

Para la obtención del óxido de zinc (ZnO) con morfología acicular se empleó, tratamiento de lavado, en donde a través del proceso de lavado se favorece la morfología acicular de las nanopartículas así como los cambios químicos en el sistema, con la eliminación de la fase orgánica en el sistema e intermediarios formados en el desarrollo de la síntesis, así como la consolidación de los enlaces Zn-O, evidenciando que el sistema es dinámico posterior a la adición del agente precipitante y proceso de lavado [31-33].

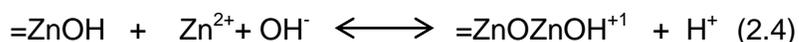
Tanto al utilizar como solvente de síntesis etanol para el método sol-gel o agua para el método de precipitación controlada, en el seno de los mismos ocurrieron reacciones de hidrólisis y condensación con ciertas peculiaridades, durante el desarrollo de los procesos, determinadas por la naturaleza del solvente. Mientras el agua es un líquido polar con valor de constante dieléctrica 78.5, esta molécula (H₂O) presenta un momento dipolar de 1.85 D (1 D = 3.336 x 10⁻³⁰ C m) [44], la constante dieléctrica del etanol es de 24.3 y su molécula presenta un momento dipolar de 1.7 D, estas características del solvente afectaron tanto la interacción solvente-soluto (acetato de cinc) como el desarrollo de las reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren al interior de cada sistema.

❖ Mecanismo propuesto para explicar la formación de las Nanopartículas de ZnO

Para dar una explicación de la formación de los cristales en el seno de la solución, durante la síntesis del ZnO, se debe tomar como referente la teoría básica del crecimiento de partículas y las reacciones químicas que propician la formación de los núcleos a través del proceso de hidrólisis del acetato de cinc y posterior condensación de las especies químicas generadas. Al aumentar la concentración de iones OH⁻, tras la adición de hidróxido de amonio, una de las primeras reacciones que deberían ocurrir en la solución, concretamente sobre la superficie de los compuestos de cinc que se generan, se indica en la ecuación (2.3).

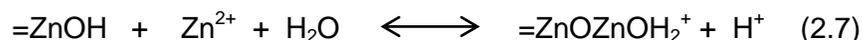
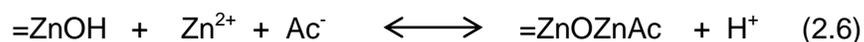
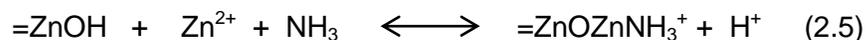


Donde la notación =Zn²⁺ de la ecuación (2.3) representa al Zn que se encuentra ligado al núcleo de la partícula en formación ubicado en la superficie del mismo. Dicho núcleo es muy estable y la única parte del mismo que participaría en los fenómenos de intercambio iónico e incorporación de las unidades de crecimiento (complejos de cinc en solución) sería su superficie, procesos responsables del crecimiento de la partícula. Considerando la acidez de Lewis de los iones Zn²⁺ en solución, tras la adición del hidróxido de amonio se podría generar el equilibrio indicado en la ecuación (2.4):

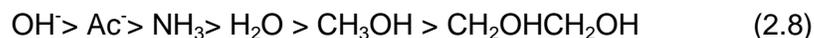


La especie =ZnOZnOH⁺¹ seguiría reaccionando de acuerdo a la cinética básica de la reacción indicada en la ecuación 2.4; el protón generado en el equilibrio sería eliminado rápidamente por el medio básico de la solución, formando agua, desplazando dicho equilibrio hacia la derecha. Tomando como base la ecuación 2.4, cualquier sustancia

aniónica de carácter nucleofílico, podría generar un equilibrio de ese tipo, tal como se ilustra con las ecuaciones (2.5), (2.6) y (2.7).

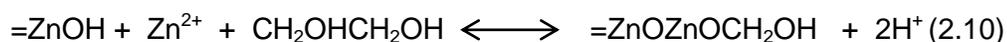


Para determinar cuál de las ecuaciones (2.4), (2.5), (2.6) y (2.7) es la que controla el proceso de nucleación de la fase sólida en el sistema, es necesario considerar las actividades de las especies participantes en dichos equilibrios. Las sustancias de carácter nucleofílico presentes en la mezcla de reacción, podrían aumentar en concentración si se considera el aporte del solvente utilizado, y para determinar la importancia de las mismas, en las reacciones, es necesario tener en cuenta la serie de poder nucleofílico que se indica a continuación [31].



Si el medio fuera lo suficientemente básico sería altamente probable que predominara el equilibrio (Ec. 2.4) ya que, de todos los nucleófilos presentes en la mezcla de reacción, es el ion OH^- el que presenta mayor carácter nucleofílico, ya que tiene carga y bajo impedimento estérico (ver Ec.2.8).

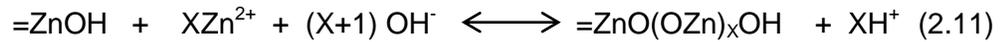
Los equilibrios generados por los solventes orgánicos, usados en este trabajo, se pueden representar como se indica en las ecuaciones (2.9) y (2.10).



Como se indicó anteriormente, un equilibrio prevalecerá frente a otro dependiendo de las actividades de los nucleófilos participantes. Las especies químicas producidas por las reacciones (2.9) y (2.10) se adicionarían a las generadas por las reacciones (2.4) y (2.7), y como en el procedimiento experimental, todas las soluciones se llevaron a un pH de 8.5, sería el equilibrio (Ec. 2.4) el predominante en el proceso.

Un parámetro importante a tener en cuenta, durante el crecimiento de las partículas, es la concentración de Zn^{2+} presente en la solución, ya que ésta contribuiría a un

desplazamiento del equilibrio hacia la derecha en todas las reacciones propuestas: si la concentración fuera baja la partícula detendría su crecimiento de forma más rápida que a concentraciones mayores, acción que se podría justificar considerando la siguiente reacción.



El valor de X dependerá principalmente de la concentración de Zn^{2+} en el sistema, tal que entre mayor sea su valor, se esperaría un mayor tamaño de la partícula final. Este efecto, también va a estar determinado por el número de núcleos formados en la solución (cantidad de $=ZnOH$), obteniéndose bajos valores de X ya sea por las concentraciones bajas del precursor de cinc de partida, el AcZN que era la fuente del ión Zn, como por el alto número de núcleos formados en la solución durante el proceso (cantidad de $=ZnOH$ en el sistema).

2.7. CONCLUSIONES

- ❖ Utilizando las metodologías propuestas, proceso sol-gel y precipitación controlada, se pudo obtener óxido de cinc de tamaño nanométrico (< 100 nm), con dos morfologías diferentes: esferoidal y acicular. Los métodos empleados son reproducibles y se pueden controlar garantizando la obtención de unas características predeterminadas en el producto final, tanto en tamaño, morfología, pureza química de las partículas, condición importante si se considera las potenciales aplicaciones tecnológicas del ZnO.
- ❖ El solvente utilizado durante la síntesis del óxido de cinc afectó considerablemente la morfología que presentó el ZnO sintetizado. En el método Sol-gel utilizando etanol, en presencia del surfactante, el crecimiento de los núcleos fue lento y muy uniforme en todas las direcciones, lo que llevó a la morfología esferoidal de las nanopartículas de ZnO obtenidas. Por otro lado, al utilizar agua como solvente de síntesis, por el método de precipitación controlada, se favoreció el crecimiento de la partícula en una dirección, efecto que se acentuó con el proceso de lavado, y que condujo a la obtención de nanopartículas de ZnO con morfología acicular.
- ❖ Específicamente, el proceso de lavado con agua, etapa del método de precipitación controlada, fue importante tanto para favorecer una cierta morfología de las nanopartículas como ciertos cambios químicos en el sistema. Como lo indicaron los

resultados de espectroscopia IR, el precipitado sin lavar presento una fase orgánica asociada al precursor, acetato de cinc, que se modificó durante el proceso de lavado, consolidándose los enlaces Zn-O y, adicionalmente, la morfología acicular; este resultado pone en evidencia que el sistema, después de terminar la adición de hidróxido de amonio, sigue siendo muy dinámico en sus reacciones químicas internas.

REFERENCIAS

- [1] Fecht H.J. Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications, Edited by A.S. Edelstein and R. C. Cammarata, *Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia*, 1996, p 89-110.
- [2] Cruz C; Orante V.R; Grijalva H; Castaño V.M; Bernal R. Thermally stimulated luminescence of new ZnO–CdSO₄ exposed to beta radiation, *Materials Letters*, 2007 Vol. 61, p 1097–1100.
- [3] Tena R. El óxido de zinc: crecimiento cristalino mediante transporte en fase gaseosa y caracterización de propiedades físicas. Tesis doctoral en física. Universidad de Valencia-España, 2004, 181 p.
- [4] Andrade E.J; Aristizabal H; Rodríguez J.E. Síntesis de óxido de cinc (ZnO) con morfología acicular para ser utilizado como refuerzo de elastómeros. *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*, 2006 Vol. 45, Nº. 4, p 283-288.
- [5] Moezzi A; Mc Donagh A. M; Cortie M.B. Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. *Chemical Engineering Journal*, 2012 Vol. 185, p 1–22.
- [6] Le T.H; Bui A.T; Le T.K. The effect of Fe doping on the suppression of photocatalytic activity of ZnO nanopowder for the application in sunscreens, *Powder Technology*, 2014 Vol. 268, p 173–176.
- [7] Ávila H; Cruz A; Villegas M; Caballero A; Rodríguez, J. Estudio comparativo de dos mecanismos de síntesis para la obtención de polvos cerámicos de ZnO - Pr₂O₃ - CoO, *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2004 Vol. 43, p 740-744..
- [8] Alvarez O; Chávez J.A.; Aguilar H; Díaz H.M. Elaboración y caracterización de varistores cerámicos, *Superficies y Vacío*, 1991 Vol. 3, p 73-77.
- [9] Kołodziejczak-Radzimska A; Jesionowski T. Zinc Oxide-From Synthesis to Application: A Review, *Materials*, 2014 Vol. 7, p 2833-2881.
- [10] Zanella R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño, *Mundo.Nano*, 2012 Vol. 5, No. 1, p 69-81.
- [11] Lu Shi; Zhen-Hua L; Wei Z; Yi-Fan Z. Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: A review. *Food Additives and Contaminants Part A*, 2014 Vol 31, No. 2, p 173–186.
- [12] Pechini M.P. US Patent No. 3330697, July 11, 1967.
- [13] Mota M.L; Osuna J.G; Navarro D; Carrillo A. Desarrollo de sustratos transparentes a base de óxido de lantano por el método de Pechini, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2013 Vol.14, No1. P 50-57.

- [14] Vargas M.A; Franco Y; Ochoa Y; Ortegón Y; Rodríguez J.E. TiO₂ sintetizado por el método de precursor polimérico (Pechini): estructura de la resina intermedia. *Bol. Rev. Española de Cerámica y Vidrio*, 2011 Vol 50, No 5, p 267-272.
- [15] Montenegro H. A; Ceron M; Rodríguez J.E. Uso de métodos químicos para sintetizar nanopartículas de SnO₂ -TiO₂, *Rev. fac. ing. universidad Antioquia*, 2008 Vol. 44, p 43-51.
- [16] Aruna S.T., Mukasyan A.S. Combustion synthesis and nanomaterials, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2008 Vol.12, p 44–50.
- [17] Sherly E.D; Vijaya J.J; Selvam C.S., Kennedy L.J. Microwave assisted combustion synthesis of coupled ZnO–ZrO₂ nanoparticles and their role in the photocatalytic degradation of 2,4-dichlorophenol, *Ceramics International*, 2014 Vol. 40, p 5681-5691.
- [18] Baláz P. “Mechanochemistry in nanoscience and minerals engineering”, *Springer-Verlag*, Berlin, 2008.p 103-132.
- [19] Beyer M.K; Clausen H. Mechanochemistry: The Mechanical Activation of Covalent Bonds, *Chem. Rev.*, 2005 Vol.105, No 8, p 2921–2948.
- [20] Brinker C.J; Sherer G.w. Sol-gel Science: The physics and chemistry of sol-gel processing. Academic Press, Inc New York, 1990, 908 p.
- [21] Kakihana M. Sol-Gel preparation of high temperature superconducting oxides”, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 1996 Vol. 6, p 7-55.
- [22] Pierre A.C; “Introduction to sol-gel processing”, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1998, 9 p.
- [23] Jolivet J.P. “Metal oxide chemistry and synthesis: from solutions to solid state”, John Wiley & Sons, LTD, New York, 2000.
- [24] Livage J; Henry M; Sanchez C. Sol-gel chemistry of transition metal oxides, *Progress in Solid State Chemistry*, 1988 Vol. 18, No 8, p 259-341.
- [25] Brayner R; Ferrari R; Brivois, N; Djediat S; Bebedetti M.F; Fievet F. Toxicology impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 2006 Vol. 6, No 4, p 866–870.
- [26] Wang Y.D; Ma C.L; Sun X.D; Li H.D. Preparation of nanocrystalline metal oxide powders with the surfactant – mediated method, *Inorganic Chemistry Communications* 5, 2002 Vol.5, No 10, p 751–755.
- [27] Salem J. K; Hammad T. M. The effect of surfactants on the particle size and optical properties of precipitated ZnO nanoparticles, *Journal of Materials Science and Engineering*, 2009 Vol. 3, No 12, p 38-43.

- [28] Wang J; Yang J; Li X; Feng B; Wei B; Wang D; Zhai H; Song H. Effect of surfactant on the morphology of ZnO nanopowders and their application for photodegradation of Rhodamine B, *Powder technology*, 2015 Vol. 286, p 269-275.
- [29] Ochoa Y; Ortegon Y. Pigmentos funcionales utilizando el sistema dióxido de titanio (fase anatasa) y óxido de hierro. Tesis de pregrado en Ingeniería Física. Universidad del Cauca-Colombia. 2010
- [30] Lee J. ,Easteal A. J., Pal U., Bhattacharyy D. Evolution of ZnO nanostructures in sol-gel synthesis, *Current Applied Physics*. 2009 Vol. 9, p 792-796.
- [31] Rodríguez - Páez. J. E. Estudio de los mecanismos de formación de partículas de ZnO con diseño morfológico y dimensiones obtenidas por el método de precipitación controlada. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España. 1999.
- [32] Campo E.J.A; Peiteado M; Caballero A.C; Villegas M; Rodríguez J.E. Room temperature synthesis of high purity 2D ZnO nanoneedles, *Journal of Ceramic Processing Research*, 2009 Vol. 10, No. 4, p 477~481.
- [33] Rodríguez J.E. Síntesis de polvos cerámicos por el método de precipitación controlada, *Bol. Soc. Española de. Cerámica y Vidrio*, 2001 Vol.40, No 3, p 173-184.
- [34] Palacios Z.E. Síntesis de fosfatos ácidos de aluminio mediante precipitación. Aplicación en sistemas retardantes de llama, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2012.
- [35] Atkins P.W; De Paula J. *QUIMICA FISICA*, 8ª Ed. (en castellano), Editorial Panamericana, 2008.
- [36] Andrade C. E. Síntesis de ZnO con morfología acicular por el método de precipitación controlada (MPC) y su uso como refuerzo de elastómeros. *Bol. Soc. Española de. Cerámica y Vidrio*, 2006 Vol. 45, No 4, p 283-288.
- [37] Montenegro A; Ponce M; Castro M.S; Rodríguez J. E. Uso de métodos químicos en la obtención de SnO₂ empleado como sensor de gases, *Dyna*, 2007 Vol. 151, p 97-105.
- [38] Ararat C; varela J.A; Rodriguez J.E. Uso de métodos químicos para obtener polvos cerámicos del sistema (Sn, Ti)O₂. *Bol. Soc. Española de. Cerámica y Vidrio*, 2005 Vol. 44, No 4, p 215-222.
- [39] Rodriguez J.E; Ahumada L.M; Bustamante J.M. Synthesis of hydrated calcium silicate using the controlled precipitation method, *Bol. Soc. Española de. Cerámica y Vidrio*, 2005 Vol. 44, No 6, p 421-426.
- [40] Rodriguez J.E; Caballero A.C; villegas M. Controlled precipitation methods: formation mechanism of ZnO nanoparticles, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2001 Vol. 21, No 7, p 925-930.
- [41] Rodríguez J.E. "Síntesis de óxidos de interés industrial", SAMAVA Impresiones (ISBN 978-958-46-2311-9), Popayán, 2013.

[42] Sócrates G. Infrared Characteristics Group Frequencies. John Wiley & Sons. Chisheter, 1994, p188-194.

[43] Farmer V.C. The Infrared Spectra of Minerals. *Mineralogical Society*, London (Ed.) (1974)

[44]. Israelachvili J. N., "Intermolecular and surface forces", Third Edition, *Academic Press* as imprint of Elsevier, San Diego, 2011.

Capítulo 3

EI ZnO COMO BACTERICIDA

3.1 BACTERIAS

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos y pueden crecer hasta en las condiciones más extremas, son microorganismos celulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5 μm) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos) [1]. Todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y procariotas. Las bacterias integran el reino procariota (pro de primitivo y cariota de núcleo). Los organismos multicelulares, animales y plantas, están constituidos por células eucariotas (eu de verdadero). Tienen estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética [2].

Como característica principal, los procariotas no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear, a diferencia de los eucariotas. También es importante destacar que el ADN procariota es circular y cerrado, mientras que el eucariota se organiza en cromosomas individuales. Mientras las células eucariotas se reproducen por mitosis, las células procariotas lo hacen por fisión binaria. En dicho proceso la célula crece, se forma un tabique y finalmente se desprenden dos células nuevas. En este proceso se produce también la replicación del ADN, de forma que las células hijas contienen cada una, un duplicado idéntico del genoma de la progenitora [2].

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología, debe su nombre a quién la describió en 1884. Es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en gram-positivas o gram-negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo. La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células [2].

La cantidad de péptidoglicano presente en una bacteria es una de las características que le permite su clasificación. En las bacterias Gram negativa (figura 3.1a) la capa de péptidoglicano es relativamente fina (1-2 capas y entre 2 y 6 nm) que contiene 50% de lipopolisacáridos, 35% de fosfolípidos y 15% de lipoproteínas; En el caso de las Gram positivas, la pared celular está constituida por una capa gruesa (hasta 40 capas y 80 nm) de péptidoglicano [2]. La pared celular bacteriana está formada por un polímero de dos derivados del azúcar: el NAG (ácido N-acetilglutámico) y el NAM (ácido

N-acetilmurámico), que le confiere rigidez y da forma a las células bacterianas y actúa como una barrera selectiva frente a diferentes moléculas.

Para este trabajo la *Escherichia coli*, bacilo Gram negativo (figura 3.1b), es la bacteria de interés, la cual reside en el intestino del ser humano. La mayoría de las *E. Coli* son inofensivas, sin embargo, algunos tipos de esta bacteria pueden producir enfermedades y causar molestias estomacales [3]. El tipo más agresivo de *E. coli* puede causar insuficiencia renal y hasta la muerte, problemas que son más frecuentes en niños y en adultos con sistemas inmunológicos debilitados. Se pueden adquirir infecciones por *E. coli* al consumir alimentos que contienen esta bacteria o al tomar agua contaminada con materia fecal humana [2].

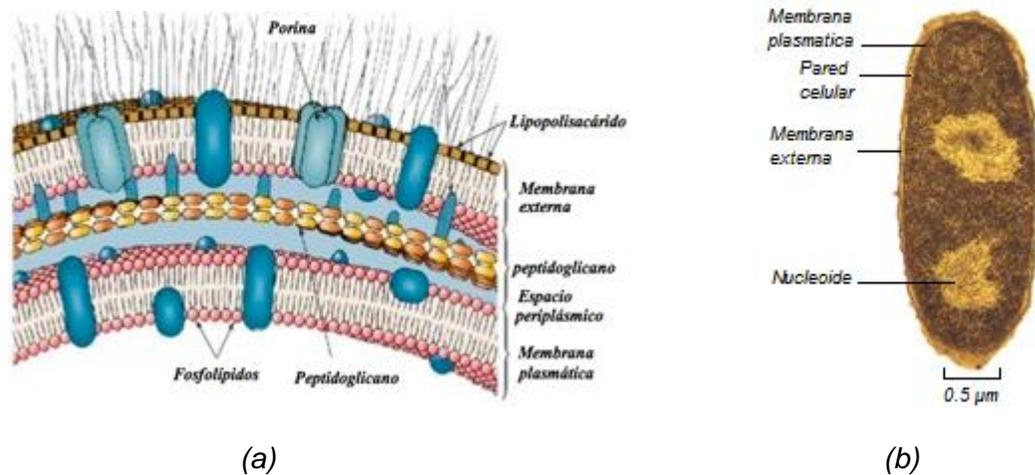


Figura 3.1 (a) Pared celular de la bacteria Gram-negativa y (b) Bacteria *E. coli*.

3.2 ASPECTOS GENERALES DE LOS BACTERICIDAS

Un compuesto bactericida es aquel que produce la muerte a una cepa de bacterias. El efecto bactericida es producido por sustancias que son secretadas por los organismos para defenderse de las bacterias. Los antimicrobianos de efecto lísico o lítico (Lisis) provocan una reducción en la población bacteriana, en el huésped, o en la sensibilidad microbiana. La aparición de patógenos resistentes a los antibióticos se ha convertido en un problema grave de salud, lo que ha llevado a que se desarrollen numerosos estudios con el fin de mejorar las terapias antimicrobianas actuales; se sabe que más del 70% de las infecciones bacterianas son resistentes a uno o más de los antibióticos que se utilizan, generalmente, para erradicarlas [3]. Por otro lado, la actividad antimicrobiana de metales como la plata (Ag), cobre (Cu), oro (Au), titanio (Ti), y cinc (Zn), teniendo cada uno

diferentes propiedades, potencias y espectros de actividad, se conoce y se ha venido aplicando durante siglos [4].

Las enfermedades infecciosas bacterianas son un grave problema de salud que ha llamado la atención de profesionales e investigadores, en todo el mundo, por la amenaza que representa para la salud humana, generando, además, inconvenientes económicos y complicaciones sociales. El aumento de brotes e infecciones con cepas patógenas y de la resistencia bacteriana a los antibióticos, así como la aparición de nuevas mutaciones bacterianas, falta de vacunas adecuadas principalmente en los países subdesarrollados y las infecciones hospitalarias asociadas, son un peligro para la salud humana, en particular para los niños [5].

Entre las bacterias resistentes a los antibióticos, las más comunes aisladas en los hospitales, se encuentran las siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y más recientemente, *Acinetobacter* [6]. Una Cepa resistente es aquella cuyo fenotipo silvestre le permite "resistir", de modo natural, a un determinado antibiótico; la base de dicha resistencia suele ser alguna estructura de la bacteria que actúa como barrera [7].

Uso de las nanopartículas de ZnO como bactericida

El estudio del ZnO como un agente antibacterial comenzó en la década de 1950, sin embargo, una investigación sistemática, se inició en 1995 [8]. Algunos investigadores informaron que los polvos de MgO, CaO y ZnO tenían actividades antibacterianas contra algunas cepas bacterianas. En los últimos años, el desarrollo de la nanotecnología ha promovido el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos debido a que, cuando el tamaño de los materiales disminuye desde el rango micrométrico hacia el nanométrico en comparación con los materiales convencionales, estos presentan un mejor rendimiento, entre ellas: una mejora en la difusividad, incremento de la resistencia mecánica y/o la reactividad química, y propiedades biológicas mejoradas [8].

Recientes estudios sobre el uso de nanopartículas en aplicaciones bactericidas mostraron que el ZnO presentaba efecto bactericida sobre algunos microorganismos. Estos trabajos indicaban la capacidad del ZnO para eliminar un amplio rango de bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas [9]. El mecanismo de acción antibacterial, de las nanopartículas de ZnO, aún no está completamente dilucidado aunque algunos autores señalan que la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS por su sigla en inglés) es el principal mecanismo [9-13]. De sus resultados se puede inducir que el mecanismo

de inactivación involucra, principalmente, la degradación de la pared celular y membrana citoplasmática, de las bacterias, debido a los ROS producidos por el ZnO, tales como radicales hidroxilo y peróxido de hidrogeno. Lo anterior conduciría, en principio, a la pérdida de contenido celular y la posterior lisis celular, procesos que pueden llevar a la completa mineralización del organismo [12], así como a la producción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ion hidroxilo (OH^-), y anión peróxido (O_2^{2-}), que también afectarían la permeabilidad de la membrana. Esto permitiría la internalización de las NPs en la bacteria, debido a la pérdida de la fuerza motriz de protones, y la absorción de iones tóxicos de cinc disuelto (Zn^{2+}), a partir de concentraciones de nanopartículas de ZnO, que contribuiría a la citotoxicidad de las NPs de ZnO [14,15].

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento se realizó de acuerdo a lo establecido por el instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI) en la norma de métodos de Dilución para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias (norma aprobada 2010). Los ensayos se realizaron en el laboratorio de biología celular y molecular (CELMOLEC) de la Facultad de Ciencias Exactas y de la Educación de la Universidad del Cauca, bajo una cabina de bioseguridad LABCONCO. Se emplearon los equipos y reactivos listados en la tabla 3.1, donde se indica su pureza y marca.

Tabla 3.1 Equipos y reactivos usados para para determinar la capacidad bactericida de las nanopartículas de ZnO.

REACTIVO	MARCA	PUREZA
sulfato de bario	Merck	99 %
cloruro de bario	Merck	99 %
ácido sulfúrico	Merck	40 %
Caldo nutritivo Mueller Hinton	Thermo Scientific	-----
agar nutritivo sólido <i>MacConkey</i>	Thermo Scientific	-----
cajas de Petri	Senna	-----
Tubos tapa rosca	falcón	-----
Agitador Vortex	Thermo Scientific	-----
agitador orbital SHKE416HP	Thermo Scientific	-----
Incubadora ref 14802261	Thermo Scientific	-----

3.3.1 Curvas de crecimiento

Para evaluar la actividad de las nanopartículas de ZnO, como agente bactericida, se requieren métodos de análisis en los que se pueda medir el comportamiento de los microorganismos luego de su exposición a las NPs. Esta determinación, en general, se realiza empleando los métodos de evaluación y los criterios estándar usados para analizar los antibióticos en la práctica microbiológica, tales como: discos de difusión o halo de inhibición y dilución en caldo [16]. El método de dilución en caldo es uno de los métodos más frecuentemente utilizados, cuyos medios de cultivo de diluciones seriadas contendrían las nanopartículas de ZnO y la bacteria incubada en medio líquido, bajo condiciones adecuadas. En la suspensión celular, la turbidez observada es generada por la luz dispersada por las células cuando ésta atraviesa la suspensión. Por lo tanto, el determinar la turbidez de una suspensión sería un método adecuado para relacionar la cantidad de biomasa de una población con una magnitud física, la dispersión de la luz. Estas medidas se realizan empleando un espectrofotómetro en el cual la radiación de una determinada longitud de onda se hace incidir sobre una cubeta, que contiene el cultivo bacteriano y se mide la densidad óptica (DO) o la absorbancia (A) a 600 nm. La absorbancia no dan una medida directa del número de células, para ello es necesario obtener una curva de calibración que relacione el número de bacterias presentes en el cultivo y la absorbancia, para ciertas condiciones de trabajo que consideren las que se van a utilizar durante el ensayo [17].

1. Se obtuvo, inicialmente, la curva de calibración ajustada al estándar de McFarland midiendo la absorbancia a 600 nm de una serie de celdas herméticamente cerradas, previamente calibrados y con una densidad óptica diferente originada por la aparición de un precipitado de sulfato de bario (BaSO_4) resultante de la reacción entre el cloruro de bario (BaCl_2) al 1,175% (0,048 M), y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (0,36N) [18,19].
2. La turbidez se midió, en el modo absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, con un espectrofotómetro del laboratorio CELMOLEC de la Universidad del Cauca. En la figura 3.2 se muestra la curva de calibración de McFarland obtenida, que se utilizó para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) existentes en un cultivo, es decir la cantidad de bacterias *E. coli* por mililitro de medio de cultivo, mediante la medida de la absorbancia. La ecuación lineal ajustada a la recta fue $A = 9,6667 \times 10^{-10} (\text{UFC/mL}) + 0,0186$ ($R^2 = 0,976$).

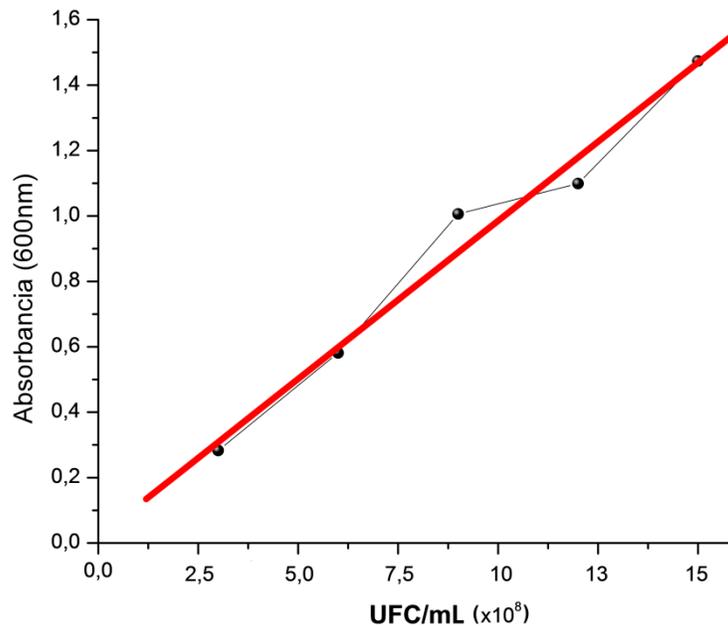


Figura 3.2 Curva de calibración de absorbancia vs UFC/mL para cultivo de *E. coli*.

3. La colonia de bacterias se cultivó, primero, en medio agar nutritivo sólido *MacConkey*, en cajas de Petri, desde las placas de agar de cultivo primario. Las colonias frescas fueron inoculadas en 50 mL de caldo nutritivo y posteriormente se registraron las curvas de crecimiento de los diferentes cultivos de *E. coli* en el medio de cultivo, para las diferentes concentraciones de ZnO-NPs; este procedimiento se monitoreo midiendo la densidad óptica (absorbancia a 600 nm) de cada sistema, en un intervalo de una hora.
4. El inóculo se preparó de una suspensión de bacterias de la especie *Escherichia Coli* (ATCC 25922), transcurridas 24 horas de su cultivo. De ésta se retiró una pequeña parte de las colonias de bacterias con un asa de alambre estéril y se transfirió a un tubo de ensayo tapa rosca que contenía medio de cultivo. La suspensión bacteriana contenida en el tubo se homogenizó con un vortex y se ajustó a una concentración 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), utilizando los datos del espectrofotómetro con base en la curva de calibración (figura 3.2), es decir una absorbancia de 0,1636.
5. La suspensión así conformada se utilizó para realizar las pruebas antibacteriales, manteniéndola en constante agitación; tras incubar 100 μ L en las celdillas de 1 mL la cual contenía 0,9 ml de medio de cultivo (dilución 1:10), la concentración final de las bacterias, en cada celdilla fue de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL (Figura 3.4)

❖ PREPARACION DE LOS TRATAMIENTOS

Para evaluar la capacidad antibacterial de las Nanopartículas (NPs) de ZnO, considerando las dos morfologías elegidas: esférica y acicular, se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones o tratamientos.

1. Se pesaron 100 mg de ZnO, y se agregaron en 50 mL de medio de cultivo, en un tubo Falcón, homogeneizando la suspensión con un vortex para obtener una concentración de 2,0 mg de ZnO/mL de medio de cultivo. De esta suspensión con esta concentración, se toman 6,5 mL y se mezcló con el medio de cultivo, para obtener 13 mL de una concentración 1,0 mg ZnO/mL.
2. Dado que para la realización del ensayo antibacterial se tomaron datos con el espectrofotómetro y que las ZnO-NPs usadas en los tratamientos pueden también contribuir a la turbidez de la muestra a una longitud de onda de 600nm, a la cual se evaluaron los crecimientos bacterianos, fue necesario registrar la absorción a 600 nm de cada uno de los tratamientos para considerar esta información en el momento de hacer los cálculos. Para ello se tomó una muestra de cada uno de los tratamientos sin inocular bacterias, y se registró su valor de absorbancia a 600 nm, dato que se utilizó como blanco de muestra de cada uno de los tratamientos.
3. Las diluciones seriadas se prepararon a partir de esta suspensión (1,0 mg ZnO/mL) de la cual se tomó 9,75 mL y se mezcló con medio de cultivo hasta obtener 13 mL, para garantizar una concentración de 0,75 mg/mL y de ella se tomó una muestra para registrar el valor de la absorbancia con el espectrofotómetro. Este valor se registró como la absorbancia del blanco de muestra de 0,75 mg/mL; De la concentración anterior se tomó 10,4 mL y se mezcló con medio de cultivo hasta 13 mL, para garantizar así una concentración 0,65 mg/mL y se midió su absorbancia, valor que se registró como blanco de muestra para esta concentración.
4. De manera similar y sucesiva, a partir de esta concentración, se tomaron alícuotas adecuadas para obtener las concentraciones 0,55, 0,45, 0,35, y 0,15, mg/mL, como se ilustra en la figura 3.3, y se registraron los respectivos valores de la absorbancia para cada blanco de muestra. Este procedimiento se realizó para las dos morfologías del ZnO evaluadas (Figura 3.4). Estos valores de absorbancia (blancos de las muestras) correspondientes a las diferentes concentraciones, se emplearon para obtener los datos correctos, de los diferentes ensayos realizados, tales como: curvas de crecimiento y concentración mínima inhibitoria (CMI).

❖ Procedimiento en las celdas de crecimiento bacteriano

Después de preparar los diferentes tratamientos con las nanopartículas de ZnO en los medios de cultivo, considerando las dos morfologías, del tratamiento preparado con 2,0 mg de ZnO/mL se tomaron 0,5 mL y se depositaron en una celda que contenía 0,4 mL de medio de cultivo. Posteriormente, al agregar 0,1 mL del inoculo de bacterias ajustado al estándar 0,5 de McFarland en la celda de incubación, se garantizó 1 mL de concentración de 1,0 mg/mL con bacterias incubadas en cada una de las tres celdas. Del tratamiento de 1,0 mg/mL se toman 0,75 mL y se transfieren a las celdas donde se enraso hasta 0,9 mL con medio de cultivo con el objetivo de que al agregar los 0,1 mL del inoculo de bacterias, se garantice 1 mL de concentración 0,75 mg/mL con las bacterias inoculadas.

Considerando la concentración de nanopartículas en el tratamiento 0,75 mg/mL, sin inocular bacterias, se calculó la siguiente muestra de 0,65 mg/mL. De manera similar, y considerando los tratamientos sucesivos, se calcularon los volúmenes requeridos en las celdas a incubar, así sucesivamente hasta una concentración de 0,15 mg/mL, con volúmenes de 0,9 mL, para inocular en ellos 0,1 mL de la suspensión bacteriana, por triplicado a cada una de las celdas, con el fin de asegurar una cantidad de 1 mL en todas las celdas de incubación, tal como se ilustra en la figura 3.3.

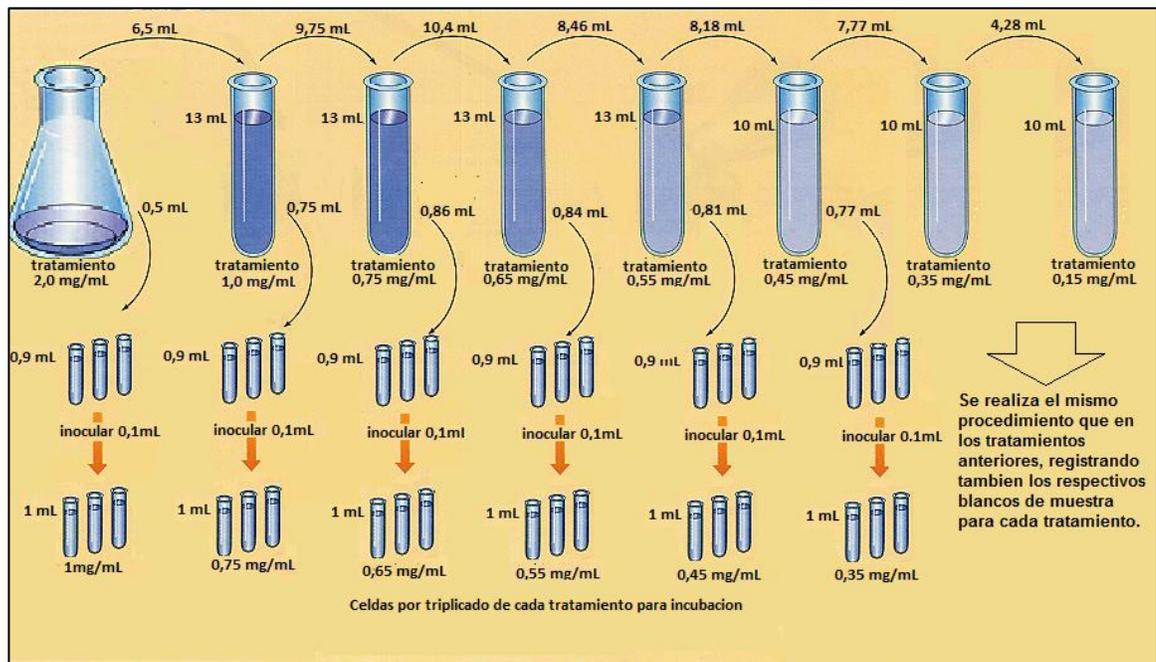


Figura 3.3. Procedimiento para preparar los tratamientos de ZnO.

Estas celdas se incubaron simultáneamente, a 37°C por 12 horas, colocándolas sobre un agitador orbital, a 130 rpm. Para evitar la deshidratación de las celdas, estas fueron selladas con papel parafilm garantizando un buen cierre. El crecimiento bacteriano fue monitoreado, tomando intervalos de 1 hora, midiendo por triplicado la absorbancia de los medios de cultivo a una longitud de onda de 600 nm, datos que fueron registrados como valores de densidad óptica (Figura 3.4). En forma independiente y con estos valores, se obtuvieron las desviaciones estándar de cada punto de crecimiento.

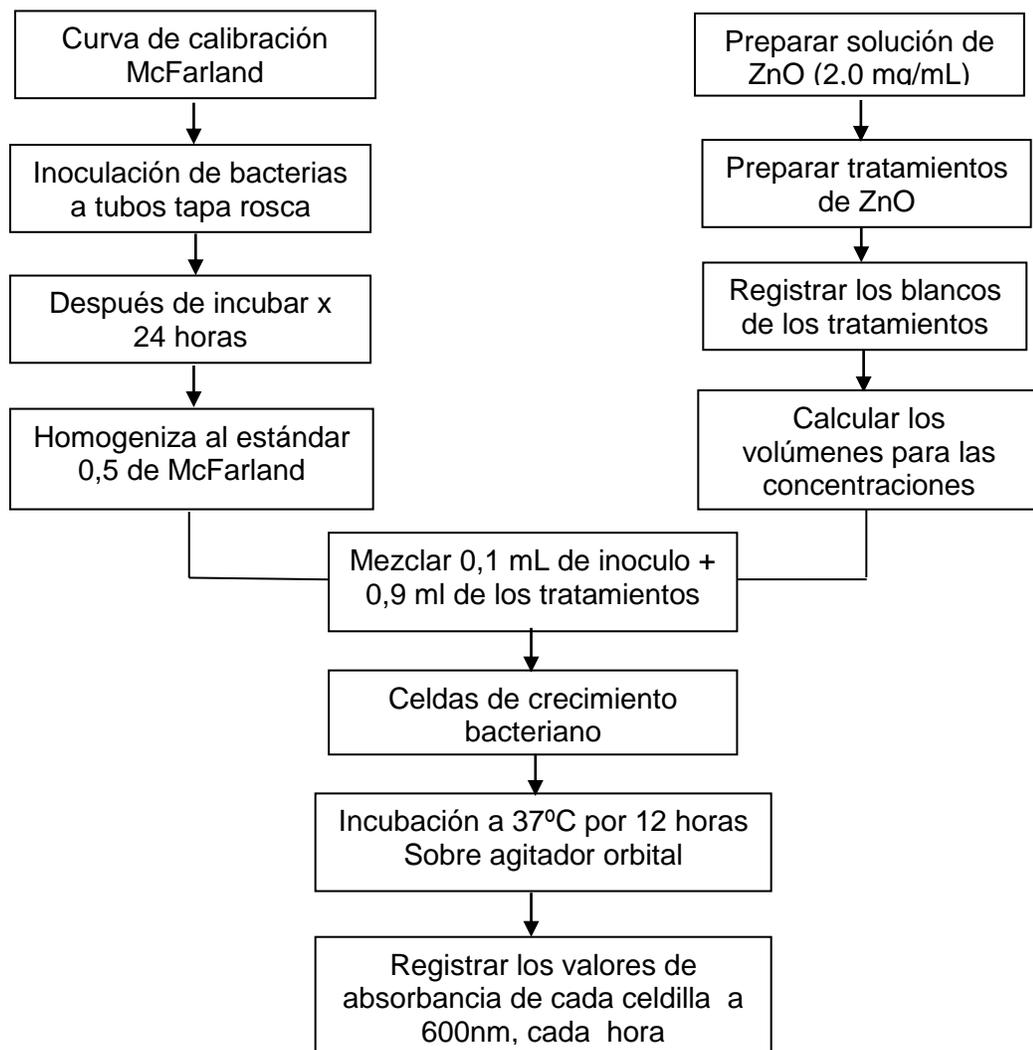


Figura 3.4 Esquema para la construcción de las curvas de crecimiento bacteriano.

❖ Protocolo para determinar las curvas de crecimiento de bacterias

Para evaluar el crecimiento celular fue necesario tener en cuenta los valores de Absorbancia de los blancos de las muestras de cada uno de los tratamientos con ZnO, considerando las dos morfologías de interés; por lo tanto, la densidad bacteriana real fue obtenida de la siguiente manera:

$$A_{real} = A_{600\text{ nm}} \text{ medida con NPs y bacterias} - A_{600\text{ nm}} \text{ medida con NPs}$$

Es decir, la Absorbancia real es la diferencia entre el valor de medido de los medios que contenían el cultivo de bacterias y el obtenido de los blancos de la muestra, consignados en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Valores de absorbancia correspondientes a los blancos de las muestras de NPs de ZnO en los medios de cultivo, acicular y esférico, para las diferentes concentraciones de NPs.

(mg ZnO/mL de MC)	0,15	0,35	0,45	0,55	0,65	0,75	1,00
ESFERAS	0,011	0,030	0,043	0,077	0,107	0,115	0,157
AGUJAS	0,082	0,164	0,210	0,292	0,364	0,416	0,537

El valor de absorbancia calculado, tras la corrección de la absorbancia considerando los blancos de muestra, se graficó obteniendo las curvas de crecimiento bacteriano, figuras 3.5 y 3.6.

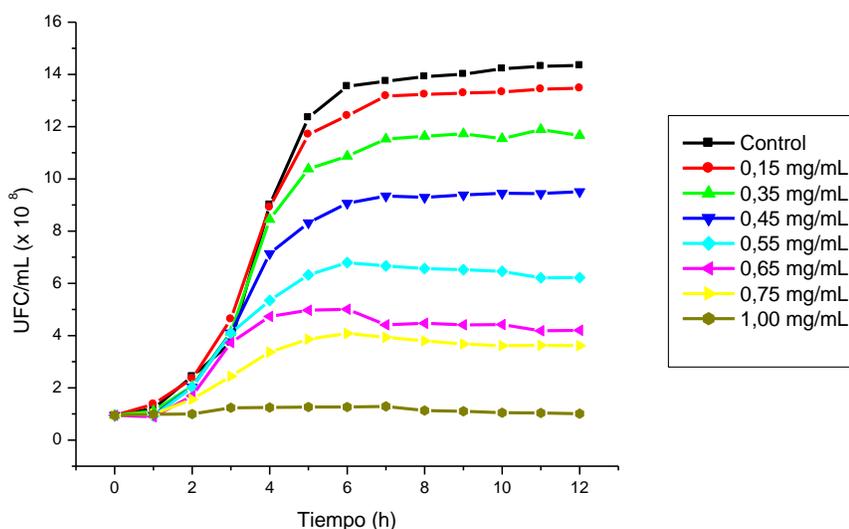


Figura 3.5 Curvas de crecimiento *E. Coli* sometido al tratamiento con ZnO-NP esférico.

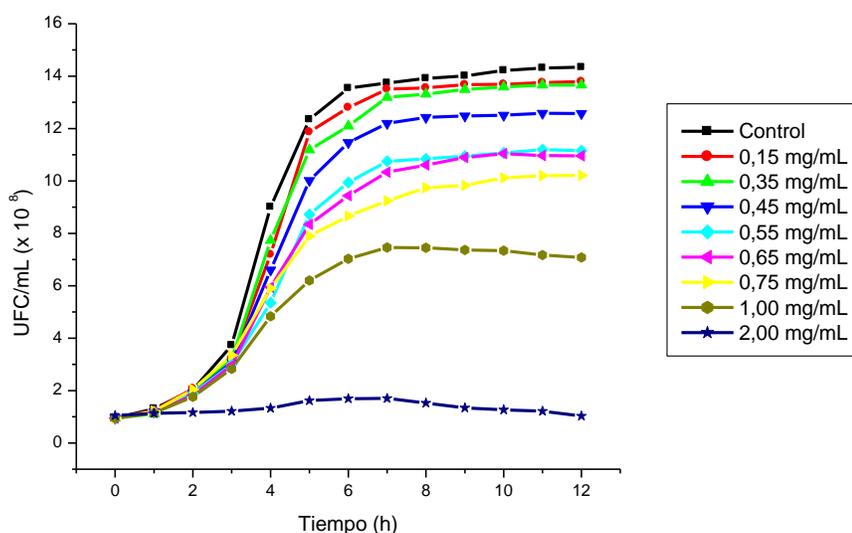


Figura 3.6 curva de crecimiento *E. coli* sometido al tratamiento con ZnO-NP acicular.

En las figuras 3.5 y 3.6 se muestran las distintas etapas de crecimiento del *E. coli* donde se compara el comportamiento de la cepa control con la de las cepas sometidas a los diferentes tratamientos, diferentes concentraciones de ZnO-NP para partículas con morfología esférica (figura 3.5) y acicular (figura 3.6). Para la cepa control (sin tratamiento), la fase de latencia (periodo de transición para los microorganismos transferidos a una nueva condición) duró 1h y la fase exponencial de crecimiento del microorganismo finalizó a las 10 horas, en esta fase cada 20 minutos la población de bacterias se duplicó. Luego de este tiempo, comenzó la fase estacionaria en la cual el número de células se mantiene aproximadamente constante.

En este estudio se trabajó con poblaciones de bacterias de *E. coli* que se encontraban al final de la fase exponencial, o sea a las 12 horas de incubación. Con el fin de obtener más información sobre el crecimiento bacteriano, se realizó un tratamiento estadístico con los datos del ensayo. El análisis estadístico permitió determinar si los datos de crecimiento bacteriano presentaban una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk), para cada una de las morfologías estudiadas, y además se realizó una prueba "t Student" para muestras independientes con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$ porcentaje de variación de resultados), prueba de comparación de medias, que ayudó a establecer si existían diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias expuestas al ZnO, considerando las dos morfologías. En la tabla 3.3 y 3.4 se muestran los promedios de los crecimientos del *E. coli* para cada una de las concentraciones de ZnO, considerando las

dos morfologías de interés. Los datos obtenidos en el ensayo se introdujeron en la ecuación de la recta McFarland ($A = 9,6667 \times 10^{-10} \text{ (UFC/mL)} + 0,0186$) y se determinó la cantidad de UFC/mL al final de la fase de crecimiento (12 horas de incubación).

Tabla 3.3 Crecimientos del *E. coli* sometido a dosis incrementales de ZnO esférica, después de 12 horas de incubación.

Concentración de NPs de ZnO (mg/mL) con morfología esférica	Promedio de crecimiento de <i>E. coli</i> (DO)	Desviación estándar	UFC/mL
Control	1,406	0,015	$1,435 \times 10^9$
0,15	1,321	0,013	$1,347 \times 10^9$
0,35	1,146 X	0,023	$1,166 \times 10^9$
0,45	0,938 X *	0,023	$9,511 \times 10^8$
0,55	0,620 X *	0,011	$6,221 \times 10^8$
0,65	0,425 X *	0,005	$4,204 \times 10^8$
0,75	0,368 X *	0,003	$3,614 \times 10^8$
1,0	0,116 X *	0,002	$1,007 \times 10^8$

X. Concentraciones que difieren significativamente respecto al Control (sin NPs de ZnO)

* Concentraciones que más difieren respecto al Control

Tabla 3.4 Crecimientos del *E. coli* sometido a dosis incrementales de ZnO acicular, después de 12 horas de incubación.

Concentración de NPs de ZnO (mg/mL) con morfología acicular	Promedio de crecimiento de <i>E. coli</i> (DO)	Desviación estándar	UFC/mL
Control	1,406	0,015	$1,435 \times 10^9$
0,15	1,352	0,033	$1,379 \times 10^9$
0,35	1,339	0,025	$1,366 \times 10^9$
0,45	1,234 X	0,021	$1,257 \times 10^9$
0,55	1,097 X	0,025	$1,115 \times 10^9$
0,65	1,078 X *	0,026	$1,095 \times 10^9$
0,75	1,006 X *	0,002	$1,021 \times 10^9$
1,0	0,702 X *	0,014	$7,069 \times 10^8$

X. Concentraciones que difieren significativamente respecto al Control (sin Nps de ZnO)

* Concentraciones que más difieren respecto al Control

3.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

Para obtener mayor información sobre la capacidad bactericida de las NPs, como agentes antimicrobianos, se determinó la concentración necesaria para inhibir o eliminar el microorganismo de manera eficiente.

Con la metodología empleada en las curvas de crecimiento bacteriano, se pudo determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), a condiciones estándar. El valor de la CMI corresponde a aquella dosis para la cual se inhibe al menos el 50 % del crecimiento de los microorganismos, *in vitro*, en las celdas de dilución con respecto al control (cepa sin tratamiento) después de 12 horas de incubación. La CMB se determinó después de establecer la CMI sembrando en agar solido a partir del punto de corte para CMI. El valor de la CMB correspondió a aquella dosis para la cual se inhibió el 100% del crecimiento, con respecto al control (sin tratamiento) [19], cuantificando las bacterias vivas después de 12 horas de incubación haciendo un recuento, de las mismas, en la placa (figura 3.7).

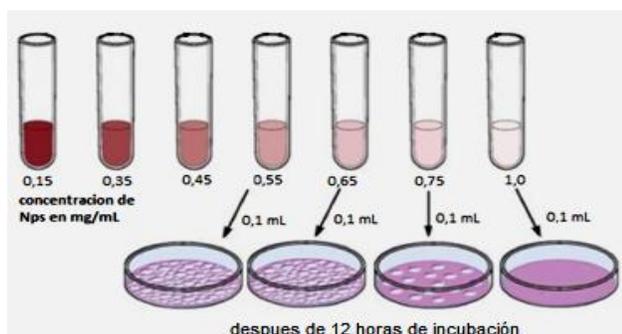


Figura 3.7 Esquema de la determinación de la concentración mínima bactericida CMB para los tratamientos de las cepas de *E. Coli* con ZnO-NP esférica.

La CMI se determinó considerando el 50 % del valor de la absorbancia (600nm) de la fase de registro del control ($A=1,406$), es decir una absorbancia menor o igual a 0,700. Para la determinación del CMB, una vez establecido el valor de CMI, a partir de estos tratamientos se transfirió una alícuota de 0,1 mL, de cada celda de incubación, y se realizó una siembra en una caja de Petri que contenía agar solido MacConkey, La cual se incubo a 37 °C, por 12 horas para corroborar el efecto bactericida de los tratamientos, como se indicó en la figura 3.7; Durante el ensayo y pasado ese tiempo, no se registró crecimiento de colonias en el agar sólido. Realizado el ensayo, se obtuvo como resultado

para el CIM un valor de 0,50 mg ZnO/mL, para el cultivo de *E. coli* expuesto a ZnO-NPs esféricas, y de 1 mg ZnO/mL para el medio de cultivo que contenía al ZnO-NP acicular. Realizado los ensayos se obtuvo como resultado una CMB de 1,0 mg/mL, para los medio de cultivo donde la cepas de *E. coli* fue expuesta a ZnO-NPs esféricas, y de 2,1 mg/mL para las tratadas con ZnO-NPs acicular. Los resultados obtenidos para el CMI y el CMB, realizados los ensayos respectivos, se indican en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Valores de CMI y CMB para los cultivos de *E. coli*, después de 12 horas de incubación, al ser expuestos a la acción de las ZnO-NPs que presentaban las morfologías de interés.

Morfología NPs ZnO	CIM (mg/mL)	CMB (mg/mL)
Esférica	0,5 (7,080 x10 ⁸ UFC/mL)	1,0 (0 UFC/mL)
Acicular	1,0 (7,069 x10 ⁸ UFC/mL)	2,1 (0 UFC/mL)

En las curvas de crecimiento (figuras 3.5 y 3.6) y en la determinación de la CMI y CMB (tabla 3.5), se puede apreciar que el efecto inhibitorio de las ZnO-NPs, con las morfologías elegidas, es dependiente de la dosis ya que a medida que se aumentó la concentración de las mismas, mayor fue el efecto inhibitorio del crecimiento del *E. coli* en el cultivo. Además, presentaron una mayor actividad antibacteriana las ZnO-NPs esféricas, sintetizadas por el método de sol-gel, que las ZnO-NPs aciculares sintetizadas por el método de precipitación controlada.

3.4 ULTRAESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS DE *E. coli* SOMETIDAS A LA ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ZnO

Las muestras de los diferentes tratamientos, para ambas morfologías, fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, del producto resultante de la centrifugación, se obtuvieron los “pellets” o sedimento que se analizaron, a través de micrografías obtenidas de las mismas, para conocer más sobre el sistema. El proceso de centrifugación permitió separar el sobrenadante para determinar el efecto ocasionado por las NPs, específicamente por los ROS generados y/o propiciados por las mismas, en el medio de cultivo. Los pellets obtenidos se colocaron en una solución de glutaraldehído, para su conservación, y luego, para fijar la muestra en la resina, se siguió el protocolo que, normalmente, se utiliza con este fin [22].

Después de fijar la muestra a la resina, se realizaron cortes de la misma, de 70 nm de grosor, con la ayuda del ultramicrotomo (Ultracut Leica), los cortes se recogieron en las

rejillas metálicas empleadas en microscopia electrónica de transmisión, las cuales contenían una película Formvar, y las muestras se contrastaron usando citrato de uranilo y acetato de plomo, sumergiéndolas en cada solución, durante 20 min; la muestra, finalmente, se introdujo en el porta-muestra del microscopio y se observó considerando el esquema de la figura 3.8 [23], empleando el microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1.200 EX a 80 kev).

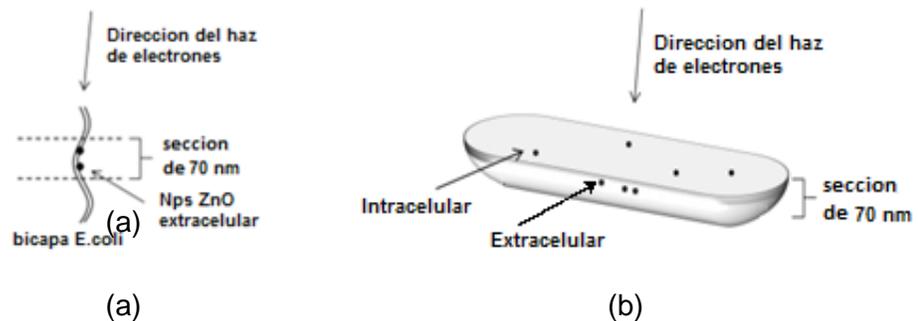


Figura 3.8 Esquema que representa cómo podrían disponerse las nanopartículas en las secciones de los cortes transversales para TEM: (a) nanopartículas sobre la cara extracelular de la doble capa de la bacteria o (b) nanopartículas dentro del citosol y sobre la superficie celular.

Una micrografía típica del *E. coli*, sin exposición a NPs, se muestra en la figura 3.9 (a). En ella se observa que las bacterias tienen un tamaño del orden de las micras ($0,5 - 3 \mu\text{m}$). Además, en la figura 3.9, se observan las micrografías de las muestras tratadas con NPs esferoidales (figura 3.9 (b)), en donde se identifican distintos momentos de la interacción de las ZnO-NP con las bacterias *E. coli*. En ella se observa el daño de la membrana lipídica, propiciado por posible contacto de las nanopartículas a la pared celular de la bacteria lo que se podría justificar considerando la presencia de lipopolisacáridos, con abundantes grupos fosfato y pirofosfato localizados en la superficie de la membrana bacteriana, proporcionándole una carga negativa a la membrana externa [24], y debido a que las nanopartículas de ZnO deberían poseer una carga superficial positiva como lo indica la literatura [25], ocasionaría una atracción electrostática entre las ZnO-NPs y la bacteria en los lugares donde las lipoproteínas están intercaladas con proteínas de membrana [26]; Ya que hay una variedad de proteínas propias de la membrana del *E. coli*, la interacción de las nanopartículas dependerá de la carga eléctrica específica y la topología de cada proteína tal que, en general, las proteínas más grandes favorecerían la interacción ZnO-NP - membrana por tener un mayor área de contacto y mayor carga [25].

En las micrografías también se observa un cambio en la estructura de la bacteria (figura 3.9 (c)); estos cambios en la morfología de la membrana celular podrían producir un incremento significativo en su permeabilidad, afectando el transporte de nutrientes y la salida de desechos procedentes del metabolismo a través de la membrana plasmática, lo que llevaría a que las bacterias fueran incapaces de regular adecuadamente el transporte de sustancias a través de la membrana plasmática, lo que finalmente ocasionaría la muerte celular [9-12] figura 3.9 (d).

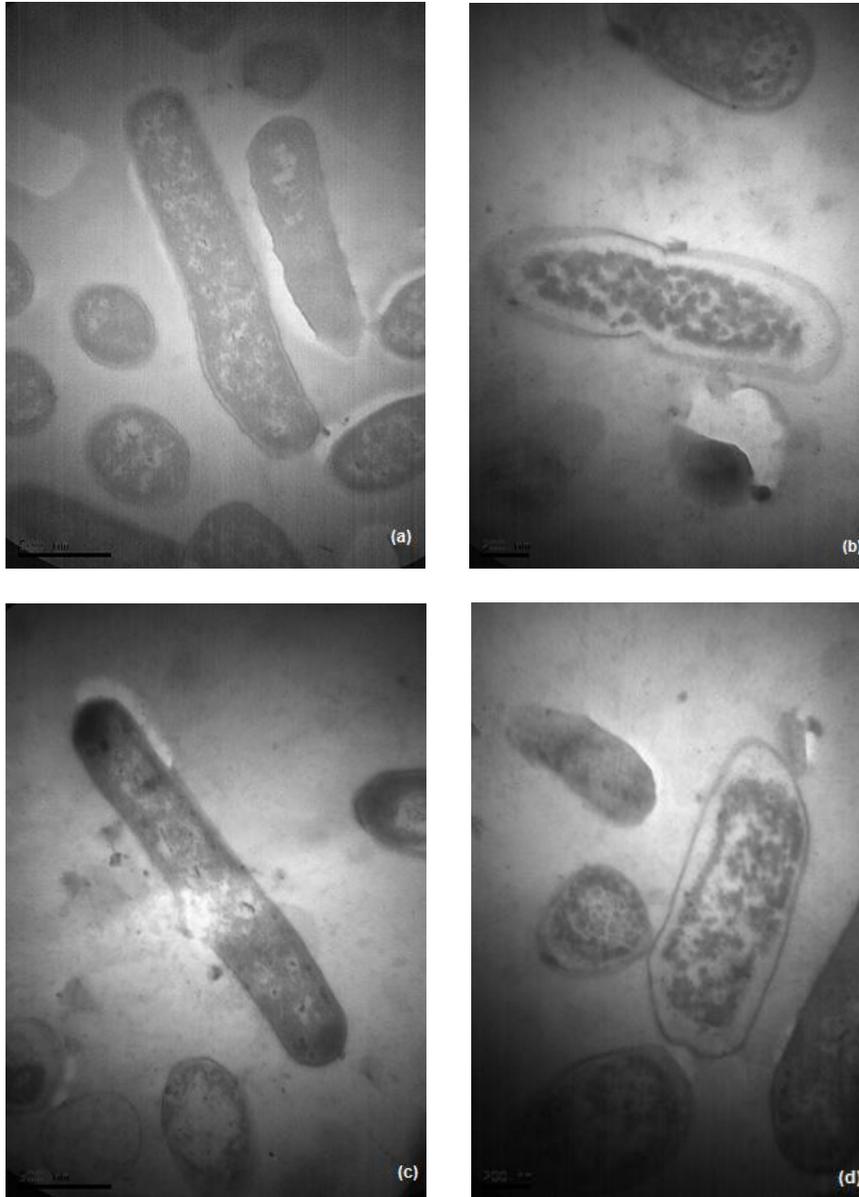


Figura 3.9 Micrografías de *E. coli* posterior al tratamiento con NPs de ZnO morfología esferoidal, (a) tratamiento sin NPs, (b) ataque sobre la superficie e inflamación, (c) cambio estructural de la membrana y (d) muerte de la bacteria.

3.5 ANALISIS

Observando los datos de las tablas 3.3 y 3.4 se puede decir que el efecto antibacteriano de ZnO-NPs sobre el *E. coli* es evidente, tal que para la morfología esférica es mayor que para el ZnO-NPs acicular. Esta diferencia comenzó a hacerse más evidente para la concentración 0.45 mg/mL de nanopartículas donde la UFC/mL fue de $9,511 \times 10^8$, para las esféricas, y de $1,257 \times 10^9$ para las aciculares, mientras que para la cepa control fue de $1,435 \times 10^9$. A medida que se aumentó la concentración de ZnO-NPs, en el tratamiento de la cepa, mayor fue el efecto antibacteriano que presentó este óxido metálico nanoparticulado; estos resultados se podrían justificar considerando las características físicas de las NPs ya que las esféricas tienen menor tamaño, lo que hace predecir una mayor superficie específica para su interacción con la superficie de la membrana de las bacterias, lo que podría generar una alteración de algunas de las funciones primarias de esta última, como su función de barrera osmótica y permeabilidad selectiva de nutrientes y la salida de desechos por mecanismos de transporte activo y pasivo.

Según la literatura, el tamaño de partícula y el área superficial afecta también la generación de los ROS y el estrés oxidativo, generado por la citotoxicidad de las nanopartículas de ZnO [9,13,19-21]. Aunque la mayoría de las ZnO-NPs esféricas sintetizadas en este trabajo tenían un tamaño de ~20 nm, no se puede descartar la posibilidad de que ellas se hayan disueltas, a través de un desgaste químico de su superficie reduciendo su tamaño, y que estas muy pequeñas partículas, de ~5nm (denominados puntos cuánticos), hubieran ingresado en las bacterias por difusión a través de los poros o las proteínas de la membrana.

En el *E. coli* la proteína secA, que hace parte de un complejo de secreción de proteínas a través de la membrana celular, puede formar un poro en la membrana plasmática de hasta 6 nm [27], que permitiría el ingreso de NPs de tamaños menores a 6 nm al interior de la bacteria o por medio del daño en la membrana lipídica, el cual fue evidenciado en las micrografías, donde se observa el daño de la membrana lipídica, propiciado por contacto de las nanopartículas a la pared celular de la bacteria lo que se podría justificar considerando la presencia de lipopolisacáridos, con abundantes grupos fosfato y pirofosfato localizados en la superficie de la membrana bacteriana, proporcionándole una carga negativa a la membrana externa, atraída por la carga que las nanopartículas de ZnO deberían poseer una carga superficial positiva como lo indica la literatura [25].

Una variedad de proteínas propias de la membrana del *E. coli*, la interacción de las nanopartículas dependerá de la carga eléctrica específica y la topología de cada proteína tal que, en general, las proteínas más grandes favorecerían la interacción con ZnO-NP por tener un mayor área de contacto y mayor carga, lo que promueve alteraciones en las funciones propias de la membrana y el paso de nutrientes hacia el interior, produciendo la muerte celular [24,25].

3.6 CONCLUSIONES

- Los resultados mostraron que la actividad antibacteriana de las ZnO-NPs variaron con la concentración de ZnO utilizado y con su morfología, afectando, principalmente, la pared celular. Se puede predecir que la acción antibacteriana de las ZnO-NPs se atribuye, en parte, a los ROS generados por las nanopartículas presentes en los medios de cultivo, que contribuyen al mecanismo de acción antibacterial.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), obtenidas como resultado de los ensayos, evidenciaron que las nanopartículas de ZnO con morfología esférica, sintetizadas por la metodología sol-gel, mostraron mayor actividad bacteriostática y bactericida que las NPs de ZnO con morfología acicular sintetizadas por el método de precipitación controlada.
- Las micrografías indican que se presentaron alteraciones en la morfología de la membrana externa de las bacterias *E. coli* expuestas a las nanopartículas de ZnO, ocasionando daño a la pared celular, además de daños hacia el lado citosólico de la doble membrana de las bacterias *E. coli*, sin embargo las NPs en el citosol sólo se observaron en una pequeña proporción de bacterias expuestas a nanopartículas esféricas.
- El mecanismo antibacteriano para las nanopartículas de ZnO no está claro y por ello se requiere de más estudios al respecto, sin embargo los resultados obtenidos fortalecen la hipótesis de que las nanopartículas de ZnO en suspensión y en contacto con la membrana bacteriana, generarían especies reactivas de oxígeno (ROS) comprometiendo directamente la envoltura celular, propiciando finalmente la muerte bacteriana. Esta hipótesis se discute ampliamente en el siguiente capítulo.

REFERENCIAS

- [1] Prescott L.M; Harley J.P; Klein D.A. Microbiology, 5 ed., Editorial the McGraw-Hill Companies. 2002, 1147 p.
- [2] Pérez M; Mota M. Temas de Bacteriología y Virología Médica: morfología y Estructura Bacteriana. 2ed. Montevideo (Uruguay): Universidad de la República, Departamento de Bacteriología y Virología, Oficina del libro FEFMUR, 2006, p 26-27.
- [3] Patzi S; Zaidi M.B; Perez L; León M; Michel A; Chaussabel D; Estrada T. Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015 Vol.9 ,No 3, p 1-18.
- [4] Dizaja S. M; Lotfipoura F; Barzegar M; Hossein Z. M; Adibkiab K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles, *Materials Science and Engineering*, 2014 Vol. 44, p 278–284.
- [5] Kotloff K.L; Winickoff J.P; Clemens J.D; Swerdlow D.L; Sansonetti P.J; Adak G.K; Levine M.M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ*, 1999 Vol. 77, No 8, p 651–666.
- [6] Ayala N.V. 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, universidad autónoma de nuevo león, Mexico, 2010.
- [7] Hoyle B.D; Costerton J.W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms, *Prog Drug Res*, 1991 Vol.37, p 91-105.
- [8] Shia L.E; HuaLia Z; Zhenga W; Zhaoa Y; Yong J; Tangabc Z. Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review , *Taylor & Francis*, 2014.
- [9] Sirelkhatim A; Mahmud S; Seeni A; Haida N; Ling C.A; Bakhori S; Hasan H; Dasmawati M. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism, *Nano-Micro Letters*, 2015 Vol. 7, No 3, p 219-242.
- [10] Tian X; Kovochich M; Brant J; Hotze M; Sempf J; Oberley T; Sioutas C. Joanne I. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Lett.*, 2006 Vol. 6, No 8, p 1794–1807
- [11] Applerot G; Lipovsky A; Dror R; Perkas N; Nitzan Y; Lubart R; Gedanken A. Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS - Mediated Cell Injury. *Advanced Functional Materials*, 2009 Vol. 19, p 842–852.
- [12] Altunbek M. , Baysal A., Mustafa C. Influence of surface properties of zinc oxide nanoparticles on their cytotoxicity, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* , 2014 Vol.121, p 106-113.

- [13] Hong Y; Philip S.C; McCall M.J. Surface Modifications of ZnO Nanoparticles and Their Cytotoxicity. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010 Vol. 10, No 11, p 7565-7570.
- [14] Pasquet J; Chevalier Y; Pelletier J; Couval E; Bouvier D; Bolzinger M.A. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014 Vol. 457, p 263–274.
- [15] Buerki T; Xiao L; Diener L; Arslan O; Hirsch C; Maeder; Grieder K; Wampfler B; Mathur S; Wick P; Krug H.F. In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity, *Nanotoxicology*, 2013 Vol. 7, No 4, p 402-416.
- [16] Punam V. Methods for Determining Bactericidal Activity and Antimicrobial Interactions, in Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. *CRC Press*, 2007 p 275-298.
- [17] Madigan M.T; Martinko J.M; Parker J; Fernández M.G; Pérez M.S. Biología de los microorganismos: Brock, Pearson, Préntice Hall, 2003.
- [18] Mc Farland, J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspension used for calculating. 1907.
- [19] Mu Q; Calin A; Galceran D; Rey C; Krzeminski L; Wallace R; Bamiduro F. Systematic Investigation of the Physicochemical Factors That Contribute to the Toxicity of ZnO Nanoparticles ,*Brown Chem. Res. Toxicol.* 2014 Vol. 27, p 558 –567.
- [20] Punnoose A; Dodge K; Rassmussen J; Chess J; Wingett D; Anders C. Cytotoxicity of ZnO nanoparticles can be tailored by modifying their surface structure: A green chemistry approach for safer nanomaterials, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014 Vol. 2, No 7, p 1666–1673.
- [21] Mu Q; David C. A; Galceran J; Rey C; Krzeminski R. W; Bamiduro F; Hondow R; Vizcay-Barrena G; Routledge M. N; Jeuken L.J; Brown A.P. Systematic Investigation of the Physicochemical Factors That Contribute to the Toxicity of ZnO Nanoparticles, *Chem. Res. Toxicol.* 2014 Vol. 27, p 558–567.
- [22] Bozzola J.J; Russel L.D. Electron Microscopy: Principles and techniques for Biologists, 1992, p 14-37.
- [23] Akarat A; Witoon T; Mungcharoen T; Limtrakul J. Development of synthetic CaO sorbents via CTAB-assisted sol–gel method for CO₂ capture at high temperature. *Rev. Chemical Engineering Journal*, 2014 Vol. 237, p 189-198.
- [24] Schletter, J; Heine H; Ulmer A.J. Rietschel E.T. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Archives of Microbiology*, 1995, Vol.164, No 6, p 383-389.
- [25] Hsiao I.L; Huang Y.J. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ*, 2011 Vol. 409, p 1219-1228.

[26] Kefala G; Ahn C; Krupa M; Esquivies L; Maslennikov I Kwiatkowski W; Choe S. Structures of the Omp F porin crystallized in the presence of foscholine-12. *Protein Sci.*, 2010 Vol.19, No 5, p. 1117-1125.

[27] Wang H.W; Chen Y; Yang H; Chen X; Duan M; Tai P. Ring-like pore structures of SecA: Implication for bacterial protein-conducting channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003 Vol. 100, No 7, p. 4221-4226.

Capítulo 4

MECANISMO ANTIBACTERIAL DE LAS NANOPARTICULAS

4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO – ROS

Las características de las nanopartículas (NPs), como su pequeño tamaño y gran área superficial, dan origen a propiedades completamente diferentes a su contraparte de tamaño micro, propiciándoles unas características químicas superficiales bien desarrolladas y una estabilidad química que les permitiría interactuar más fácilmente, y de manera especial, con los microorganismos [1,2]. Una disminución en el tamaño de la partícula puede conducir a un aumento en el número de defectos estructurales, así como a la alteración de la configuración electrónica del “bulk” del material, lo que podría establecer grupos superficiales específicos que funcionen como sitios reactivos [3]. Además de estas propiedades superficiales, las propiedades químicas específicas de los iones metálicos permitirían a las NPs su difusión a través de los canales que existen en la membrana celular [4,5], fenómeno importante a considerar en este trabajo. Por otro lado, se ha demostrado que las sales de metales e iones metálicos, así como ciertas NPs con sitios reactivos en su superficie, pueden inducir estrés oxidativo por la existencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) [6–14].

El término ROS es utilizado para denominar a diferentes moléculas reactivas y radicales libres derivados del oxígeno molecular (O_2). Los ROS más comunes incluyen al anión superóxido (O_2^-), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^\bullet) y al oxígeno singlete (1O_2), los cuales tienen mayor reactividad que el oxígeno (O_2). El mecanismo de generación de los ROS, inducido por la incidencia de luz, podría ser explicado de la siguiente manera y expresado por las reacciones que al final de este párrafo se indican. Considerando las NPs de ZnO, que poseen defectos superficiales, en ellas se pueden generar pares electrón-hueco ($e^- - h^+$) irradiándolas con luz UV y/o con luz visible (paso 1) [15,16]. Posterior a la quimisorción disociativa de las moléculas de H_2O en OH^- y H^+ , en una suspensión de ZnO o en una atmósfera húmeda, el ión hidroxilo atraparía el H^+ (paso 2). Por otro lado, las moléculas de oxígeno, disueltas en el medio, se transformarían, al interactuar con el H^+ , en el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (paso 3), que a su vez podría reaccionar con el H^+ para generar radicales hidropéroxilo (HO_2^\bullet) (paso 4). Este radical, tras la subsiguiente colisión con electrones, podría producir aniones peróxido de hidrógeno (HO_2^-) que al reaccionar con iones de hidrógeno generaría moléculas de H_2O_2 [10,11, 17]



El H₂O₂ generado, a través del esquema descrito, podría penetrar la membrana celular y matar a las bacterias. Puesto que los radicales hidroxilo y superóxido son especies cargadas negativamente, no podrían penetrar en la membrana celular y permanecerían en contacto directo con la superficie exterior de la célula de las bacterias, lo que no sucedería con el H₂O₂ [18-21]. Algunos estudios han demostrado que la generación de ROS podría darse incluso en ausencia de luz, donde los defectos superficiales jugarían un papel importante en la generación de los mismos; tanto estos ROS como la densidad de carga superficial tendrían una participación muy importante en la actividad antibacteriana de las NPs [22-23].

Considerando lo mencionado anteriormente, la superficie catalíticamente activa de la NP podría propiciar un aumento del nivel de ROS como un efecto de respuesta rápida. En una condición normal, a bajos niveles de producción de ROS las células inician una respuesta protectora, que aumentan la defensa antioxidante de las células para promover su supervivencia, llevando a la eliminación del exceso de ROS y de ese modo a la desintoxicación [11,23]. Los bajos niveles generados de ROS, en algunos procesos, son fácilmente neutralizados por las defensas antioxidantes, tales como el glutatión (GSH), Superóxido dismutasa (SOD) y demás enzimas antioxidantes, las cuales regulan la eliminación de ROS generados. Por otro lado, cuando las especies reactivas oxidantes superan las defensas antioxidantes se produce un desbalance hacia el estado prooxidante, fenómeno denominado estrés oxidativo [24,16]. En la figura 4.1 se muestra un esquema de la citotoxicidad inducida por las nanopartículas sobre sistemas biológicos considerando, principalmente, la acción de los ROS.

En condiciones de exceso de producción de ROS, las defensas antioxidantes naturales se podrían ver superadas y en los niveles más altos de ROS la respuesta protectora sería superada por la apoptosis y la citotoxicidad. La apoptosis o muerte celular programada en células eucariotas tiene como sus características específicas la fragmentación del ADN y despolarización de la membrana, en *E. coli* no se puede descartar la muerte celular programada, como ya ha sido reportada por algunos investigadores [25], esta es mediada

por el sistema toxina-antitoxina mazEF, el mazEF se desencadena por varias condiciones de estrés, incluyendo graves daños en el ADN, Por lo tanto un mayor nivel de ROS puede ser directamente genotóxico. Además, se ha reportado que mayores niveles de ROS liberados conducen a un ataque directo sobre los constituyentes celulares, tales como membranas, proteínas, lípidos, etc. [25].

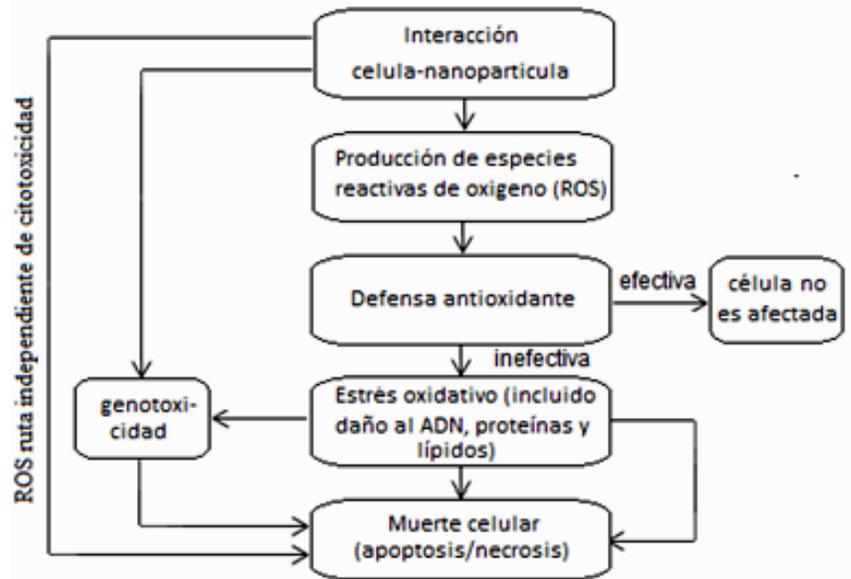


Figura 4.1 Interacciones célula-nanopartícula con un papel central para las especies reactivas de oxígeno (ROS). Resumen de las posibles reacciones celulares que tienen lugar después de interactuar nanopartículas (NPs) con sistemas celulares.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL SISTEMA DE CULTIVO *E. Coli*-ZnO.

La peroxidación lipídica (LPO por su sigla en inglés) está asociada al deterioro oxidativo de los lípidos de la membrana celular y se ha utilizado, ampliamente, como un marcador del estrés oxidativo [27]. La LPO es un proceso mediado por ROS en el que los ácidos grasos poli-insaturados se someten a peroxidación, produciéndose aldehídos α -beta insaturados, como el malondialdehído (MDA) por ejemplo, uno de los principales productos de descomposición de lípidos [28]; Es por esto que la LPO se estima midiendo el contenido de MDA en el sistema de interés, ya que la sobreacumulación de MDA puede dañar las células y provocar la apoptosis [29]. En contraste con otros ensayos de barrido de radicales, el ensayo de la peroxidación de lípidos permite evaluar los compuestos, en ensayo, aún en presencia de otros antioxidantes, hierro y radicales [30], y es por ello que la peroxidación lipídica es uno de los indicadores más utilizados para obtener información

de la formación de radicales libres. Algunos ensayos miden directamente los radicales libres mientras que en el ensayo de la peroxidación lipídica se determina la cantidad de ácidos grasos oxidados que existen en el sistema, información que permite calcular la correspondiente cantidad de radicales libres. La medición de la peroxidación lipídica se realiza, generalmente, detectando la presencia del MDA generado como resultado de la descomposición de los productos de la peroxidación de lípidos [31].

4.2.1 Metodología

El método espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (TBA) es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA. En la reacción que ocurre, por el ataque del MDA al grupo metileno activo del TBA, un mol de MDA reaccionaría con dos moles de TBA, en medio ácido y a alta temperatura, para formar el aducto MDA-TBA (figura 4.2) [10] y la velocidad de esta reacción dependería de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento MDA-TBA generado, a través de esta reacción, posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm [24,32]. En la figura 4.2 se ilustra la reacción entre el MDA y el TBA.

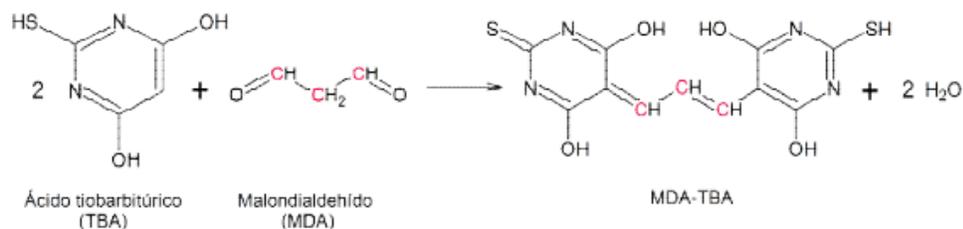


Figura 4.2 esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico.

En este trabajo se midieron las sustancias producto de la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) determinando los productos de la peroxidación lipídica como una medida del estrés oxidativo inducido por las NPs de ZnO; la concentración de MDA se midió al final de la fase de crecimiento de la cepa de bacterias, tras 12 horas de incubación [10].

En la figura 4.3 se muestra la curva de calibración de MDA obtenida, expresada como (nmol/mL), y que se utilizó para determinar la cantidad de MDA en los diferentes tratamientos realizados en este trabajo. La expresión, para la ecuación lineal ajustada a la recta, estaría dada por $A=0,0866 \text{ (nmol/mL)} + 5,01 \times 10^{-3}$, ($R^2= 0,999$).

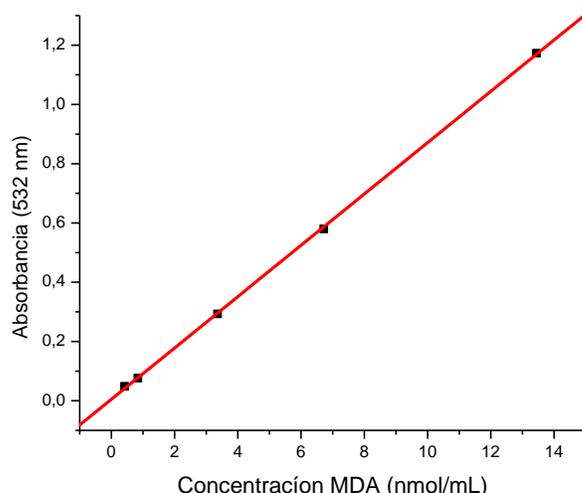


Figura 4.3. Curva de calibración de absorción vs concentración de MDA utilizada para analizar los cultivos de *E. coli* estudiados en este trabajo.

4.3 Procedimiento experimental

Para llevar a cabo este procedimiento se tomaron las muestras incubadas al final de la fase exponencial, tras 12 horas de incubación, esto se llevó a cabo en una cabina de seguridad, y se emplearon los equipos y reactivos listados en la tabla 4.1, donde se indica su pureza y marca.

Tabla 4.1 Equipos y reactivos usados para determinación de la peroxidación lipídica en el sistema de cultivo *E. Coli*-ZnO.

REACTIVO	MARCA	PUREZA
Ácido tricloroacético	Merck	99 %
Ácido tiobarbitúrico	Panreac	0,98 %
Etanol absoluto	Merck	99 %
1,1,3,3-tetrametoxipropano	Panreac	99 %
centrifuga	Thermo Scientific	-----
baño termostático	Polystat	-----
Espectrofotómetro	Shimadzu UV-180	-----

1. Se tomó 1,0 mL de cada uno de los tratamientos de cultivo con ZnO de ambas morfologías y se transfirieron a un vial, al cual se le agregó 1,0 mL de ácido tricloroacético (7%) a cada sistema y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm, durante 20 min, en una centrifuga para garantizar que las nanopartículas, células, y proteínas precipitadas se sedimentaran completamente.

2. El sedimento se desechó y el sobrenadante resultante se utilizó de inmediato para realizar el ensayo bioquímico, agregándole 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico TBA (0,65 % p/v) recién preparado. Todas las muestras se incubaron a 90 °C en un baño termostático, durante una hora, manteniendo las muestras en la oscuridad debido a la inestabilidad del aducto coloreado formado (Figura 4.4)
3. Después de enfriar se midió la absorbancia a 532 nm (longitud de onda de absorción del aducto formado) en un espectrofotómetro [32,33]. Las mediciones se realizaron por triplicado para todos los grupos experimentales y los valores se expresaron como nanomoles de MDA por mililitro de medio de cultivo (nmol/mL).
4. A partir de las mediciones del ensayo con TBA, los niveles correspondientes de MDA fueron determinados usando una curva de calibración trazada, previamente obtenida, entre la absorbancia medida a 532 nm y diferentes concentraciones de MDA sintetizadas a través de la hidrólisis ácida del 1,1,3,3-tetrametoxipropano, en un intervalo de concentración de 0,42 nmol/mL a 13,44 nmol de MDA/mL [10].

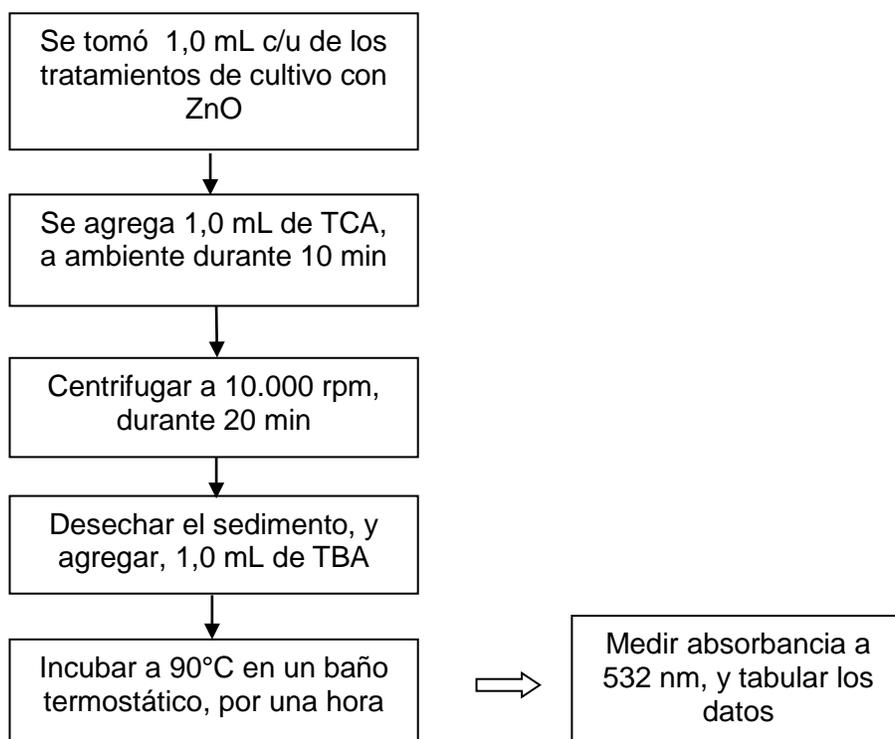


Figura 4.4 Esquema del procedimiento para medición de la peroxidación lipídica.

El tratamiento de los cultivos de cepas de *E. coli* con NPs de ZnO mostró una importante liberación de MDA en el medio, indicando un aumento continuo de la actividad MDA hasta el tratamiento máximo experimental. En la tabla 4.2 se registró el promedio de los valores de absorbancia para cada uno de los tratamientos con las dos morfologías de ZnO, así como para el control (sin tratamiento de ZnO), al final de la fase de crecimiento de las cepas (pre-determinado a 12 horas). Como se observa en la tabla 4.2, los niveles de MDA en los cultivos, después de la exposición a las NPs de ZnO para las dos morfologías estudiadas, mostraron grandes diferencias, tal que las suspensiones con cantidades bajas de ZnO presentaron bajos niveles de MDA, los cuales aumentaron a medida que se incrementó la concentración de ZnO-NPs en los tratamientos; en general, los tratamientos con NPs aciculares mostraron una menor cantidad de MDA, en los sistemas, que los registrados para la morfología esférica, resultado que se corresponde, es coherente, con las curvas de crecimiento que se mostraran más adelante donde se presentó una mayor inhibición del crecimiento de las cepas de *E. coli* para la morfología esférica, evidenciando que los ROS generaron la peroxidación lipídica y la presencia de MDA, influyendo en la citotoxicidad de las NPs de ZnO ya que, al existir una acumulación adecuada de MDA, podría atacar las células y provocar la apoptosis [29].

Tabla 4.2 promedio de los valores de absorbancia para diferentes tratamientos De NPs de ZnO utilizando el ensayo de liberación de MDA

Tratamiento con ZnO (mg/ml)	ZnO Acicular (Abs)	ZnO Esferoidal (Abs)
Control	0,037	0,037
0,15	0,038	0,043
0,35	0,043	0,055
0,45	0,047	0,059
0,55	0,049	0,064
0,65	0,056	0,065
0,75	0,062	0,072
1,0	0,067	0,078

Interpolando los valores de absorbancia de la tabla 4.2 en la curva de calibración para MDA (figura 4.3), y teniendo en cuenta el factor de disolución en los ensayos por la adición de TCA y TBA, se obtuvieron los resultados consignados en la tabla 4.3. En esta tabla se puede observar que la cantidad de MDA medida en los medios de cultivo con NPs de ZnO con morfología esférica fue mayor que los registrados para la morfología acicular, resultado coherente como ya se indicó, con lo que muestran las curvas de crecimiento registradas para ambas morfologías, que se encuentran más adelante, es

decir para un menor crecimiento de la población de bacterias de *E. coli* mayor fue la cantidad de MDA presente en el cultivo.

Tabla 4.3 Cantidad de MDA presente en los medios de cultivo de *E. coli* que contenían diferentes tratamientos ZnO-NPs, para las dos morfologías de interés.

Concentración de ZnO (mg/ml)	ZnO acicular nmol/ml	ZnO Esferoidal nmol/ml
Control	1,1082	1,1082
0,15	1,1428	1,3160
0,35	1,3160	1,7317
0,45	1,4546	1,8703
0,55	1,5239	2,0435
0,65	1,7664	2,0782
0,75	1,974	2,3207
1,0	2,1475	2,5285

Trasladando los datos de la tabla 4.3 a un histograma (figura 4.5), para hacer más gráfica la diferencia del efecto de las NPs de ZnO con morfología esférica con las de morfología acicular frente a la cantidad de MDA en los cultivos, se observa que para el tratamiento con 0,15 mg/ml de ZnO acicular no se presentó un incremento significativo en la cantidad de MDA, con respecto al control (sin tratamiento de ZnO), mientras que para el mismo tratamiento (0,15 mg/ml), pero con ZnO-NP esférica, hubo un incremento significativo, >5%, en la cantidad de MDA con respecto al mismo control. De igual manera, mientras la cantidad de MDA registrada para el tratamiento 0,75 mg/ml con ZnO-NPs morfología acicular fue del 78,1 % para la morfología esférica fue mayor al 100% respecto al control.

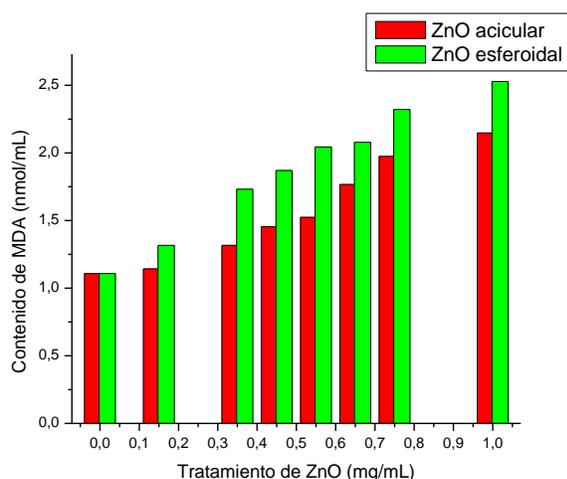


Figura 4.5 Cantidad de MDA en los medios de cultivo considerando el efecto de las ZnO-NPs, diferentes morfologías, presentes en los cultivos de *E. Coli*.

En general se observa una marcada diferencia entre el MDA registrado para el ZnO esferoidal, que para el registrado para la morfología acicular donde, posiblemente, el menor tamaño relativo de las ZnO-NPs [34,35], así como la morfología que ellas presentan [36,37] podrían propiciar un mayor número de defectos superficiales capaces de generar una mayor cantidad de especies oxidantes en el medio [15,16].

4.4 EFECTO DE LA PRESENCIA DE UN ANTIOXIDANTE EN EL SISTEMA

Los estudios de citotoxicidad con tratamientos de NPs de ZnO sobre medios de cultivos de bacterias de *E. coli*, considerando la cantidad de malondialdehído (MDA) liberado en ellos (figura 4.5 y tablas 4.2 y 4.3), mostraron citotoxicidad severa sobre las mismas, acción que se reiteró con la obtención de las curvas de crecimiento. Haciendo uso del ácido ascórbico 0,2 mM (35 µg/ml), se propició una protección significativa contra la producción de la peroxidación de lípidos en cultivos pre-determinados, reduciendo así esta respuesta citotóxica por el favorecimiento de la actividad antioxidante, que se deriva del desplazamiento de ácido L-ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico (Figura 4.6); lo cual permite su acción contra radicales oxidativos ($O_2^{\bullet -}$ y OH^{\bullet}) y los radicales acuosos, como el oxígeno singlete [33]. Lo anterior sugiere que la citotoxicidad en los cultivos de *E. coli*, estudiados en este trabajo y sometidos a la acción de las ZnO-NPs, se debe en parte a la liberación de ROS, ya que estas especies fueron neutralizadas con la presencia del antioxidante en aquellos cultivos dispuestos para tal fin; por lo tanto, la presencia de ácido ascórbico (antioxidante), en el medio donde ocurría la oxidación, evitó que los ROS generados pudieran reaccionar con la membrana celular y las proteínas intracelulares, y causar citotoxicidad [38,39]. Las otras contribuciones, al proceso de oxidación, podrían provenir del mecanismo de oxidación directa por parte de los huecos que pudieran existir en las ZnO-NPs sintetizadas (existencia que a futuro hay que verificar) que, como se menciona para otros semiconductores [40,41], sería un mecanismo a tener en cuenta, y por último la disolución de las ZnO-NPs, proceso que se discutirá más adelante. En conclusión, así como se plantea en la literatura científica, es posible que los diferentes mecanismos mencionados actúen simultáneamente en los procesos de degradación propiciados por los semiconductores [42-44], y es lo que posiblemente está sucediendo en el proceso de degradación de las ZnO-NPs sobre las cepas de *E. coli* estudiado en el presente trabajo.

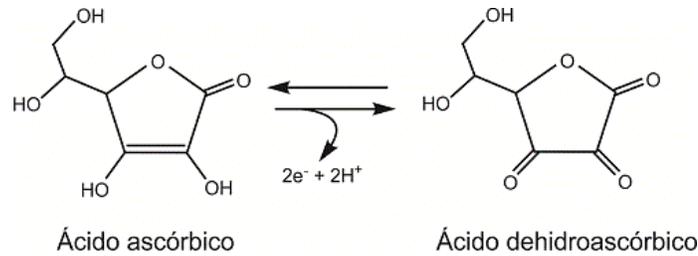


Figura 4.6 Oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico.

Como se puede observar en la figura 4.7, las curvas de crecimiento obtenidas graficando la cantidad de UFC/mL, después de realizar las correcciones considerando los respectivos blancos, la respuesta citotóxica en los cultivos de *E. coli* que contenían NPs de ZnO con morfología esférica, muestras que presentaron una mayor capacidad antibacterial frente a las NPs de ZnO con morfología acicular, y disminuyó al incorporar al medio de cultivo el ácido ascórbico (antioxidante) en una concentración 0,2 mM.

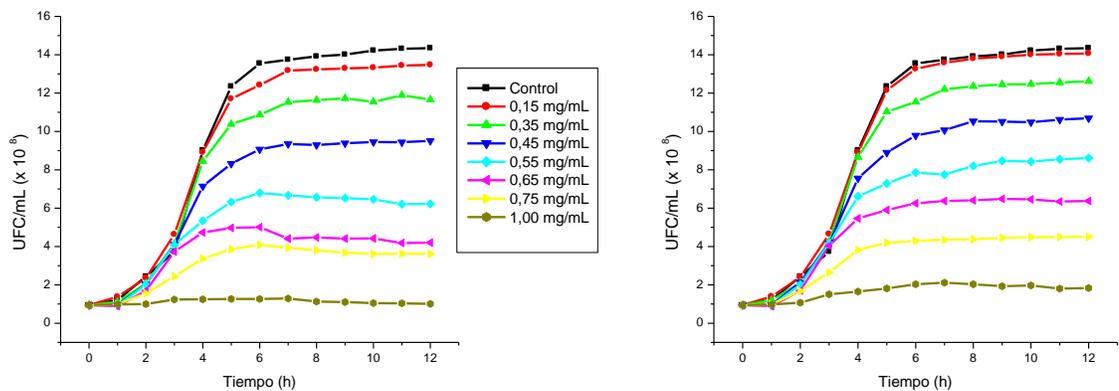


Figura 4.7. Curvas de crecimiento del *E. coli* en cultivos con presencia de ZnO-NPs esféricas: (a) sin ácido ascórbico y (b) suplementado con ácido ascórbico 0,2 mM (35 µg/ml).

Finalmente, la tabla 4.4 muestra los niveles de MDA en los cultivos de *E. coli* con ZnO-NPs esféricas al Interpolarse los datos obtenidos de absorbancia a 600 nm (DO), figura 4.7, en la curva de calibración para MDA, figura 4.3, teniendo en cuenta el factor de dilución en los ensayos por la adición de TCA y TBA; los datos indican que el contenido de MDA en el cultivo fue menor cuando estaba presente el ácido ascórbico (antioxidante). Adicionalmente, la figura 4.8 reitera que el suplemento antioxidante dio lugar a una protección significativa contra la producción de la peroxidación de lípidos, liberando una menor cantidad de MDA en el medio de cultivo bacteriano [38].

Tabla 4.4 Cantidad de MDA presente en los cultivos de *E. coli* que contenían ZnO-NPs esféricas, sin y con ácido ascórbico suplementado de en los mismos.

Concentración de ZnO	ZnO esférico nmol/ml	ZnO esférico + Ascórbico nmol/ml
Control	1,1082	1,1082
0,15	1,3160	1,2814
0,35	1,7317	1,4200
0,45	1,8703	1,6625
0,55	2,0435	1,7317
0,65	2,0782	1,9050
0,75	2,3207	2,0782
1,0	2,5285	2,3553

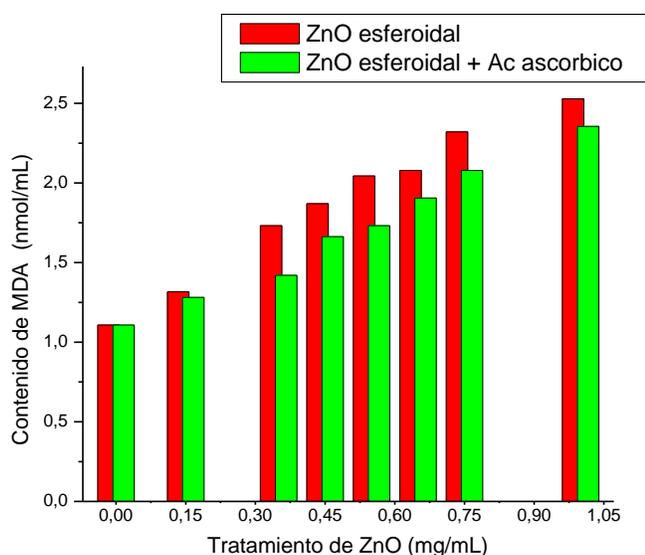


Figura 4.8 Niveles de MDA como una medida de la peroxidación lipídica en los medios de cultivo de *E. coli* que contenían ZnO-NPs esféricas sin y con suplemento de ácido ascórbico (antioxidante).

4.5 ANALISIS

Los tratamientos con NPs aciculares mostraron una menor cantidad de MDA, en los sistemas, que los registrados para la morfología esférica, resultado que es coherente y corresponde con las curvas de crecimiento donde se presentó una mayor inhibición del crecimiento de las cepas de *E. coli* para la morfología esférica, evidenciando que los ROS generados por los defectos superficiales de las ZnO-NPs propiciaron la peroxidación lipídica y promovieron la presencia de MDA en los medios de cultivo, como principal producto de descomposición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), influyendo en la

citotoxicidad de las NPs de ZnO ya que, al existir una alta acumulación de MDA, este promueve citotoxicidad en células bacterianas y provocar la apoptosis o muerte celular.

Además se puede observar en la figura 4.7, que las curvas de crecimiento obtenidas graficando la cantidad de UFC/mL a lo largo de las 12 horas de incubación; que la respuesta citotóxica en los cultivos de *E. coli* que contenían NPs de ZnO con morfología esférica, presentaron una mayor capacidad antibacteriana frente a las NPs de ZnO con morfología acicular, y que esa inhibición en el crecimiento de las bacterias disminuyó al incorporar al medio de cultivo el antioxidante, lo que evidenciaría la acción antioxidante del ácido ascórbico, el cual actúa como un barreador (scavenger) de especies ROS en una concentración 0,2 mM. Evitando la oxidación de ácidos grasos insaturados y de algunas proteínas de membrana, compuestas por aminoácidos oxidables con dobles enlaces carbono-carbono, aminoácidos que además promueven atracción electrostática con la superficie catalíticamente de las ZnO-NPs. El antioxidante se puede consumir a lo largo de las 12 horas del proceso de incubación, razón por la cual las curvas de inhibición de crecimiento no son muy significativas respecto al control (sin NPs)

4.6 DISOLUCIÓN DE LAS NPS Y SU APORTE AL MECANISMO ANTIBACTERIAL

Algunos estudios han demostrado que además de los ROS generados por las NPs, se pueden generar especies iónicas de cinc disueltas (Zn^{2+}) que participarían y contribuirían a la citotoxicidad, considerando las concentraciones de nanopartículas de ZnO utilizadas en este trabajo [33,46]

Algunos factores que determinan la disolución parcial de ZnO son: el tiempo, la concentración y el tipo de ZnO nanoparticulado usado, tal que la cinética de disolución es más lenta para las concentraciones más bajas de ZnO-NP. Por otro lado, la forma de las partículas influyen en la disolución tal que las NPs de ZnO esféricas deberían presentar mayor velocidad de disolución que las partículas con forma de varilla [45,46], por ejemplo. Adicionalmente, el cinc disuelto no solo provendría de la disolución de las ZnO-NP, también podría generarse por la descomposición de quelatos que se formarían por la coordinación de átomos de cinc con las proteínas, lo que destruiría, en gran medida, las funciones que mantienen los procesos normales de la fisiología de los microorganismos.

Las NPs pueden interactuar directamente con orgánulos oxidativos, tales como las mitocondrias y proteínas, estimulando la producción de ROS así como de iones Zn^{2+} en las células, ocasionando un aumento en la concentración local de Zn^{2+} intracelular y por lo tanto un desequilibrio de la actividad de las proteínas dependientes de Zn^{2+} , que utilizan el

ion calcio (Ca^{2+}) como señal intracelular activadora. Esta acción causaría desbalances en la autorregulación homeostática celular de los diferentes cationes metálicos, hacia el exterior celular, causando efectos pro-inflamatorios [9,47].

4.7 PROPUESTA DE MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS NPS DE ZNO SOBRE LA CEPA DE *E. coli*

Como se ha indicado previamente, existen varios enfoques sobre el mecanismo que permitiría explicar la acción antibacteriana de NPs de ZnO siendo la producción de radicales libres uno de los principales mecanismos de toxicidad de las nanopartículas, éste generaría estrés oxidativo, inflamación y consecuentes daños a las proteínas, la membrana y el ADN.

Aunque el mecanismo de acción aún no está completamente entendido y estructurado, tres diferentes mecanismos de acción han sido propuestos en la literatura: (i) La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a propiedades semiconductoras del ZnO [10,11], (ii) La desestabilización de la membrana microbiana por el contacto directo de partículas de ZnO con la pared celular y consecuente penetración a través de la pared celular [23,48], y (iii) Las propiedades antimicrobianas intrínsecas de los iones Zn^{2+} generados [49,50]. Algunos autores reportan que hay otros aspectos a tener en cuenta, por ejemplo el uso de surfactantes durante el proceso de síntesis de las Nanopartículas, los cuales pueden tener efectos bactericidas debido a una mayor interacción con la pared celular (por atracción electrostática) de las NPs de ZnO. Ya que en el presente trabajo se utilizó el surfactante CTAB para controlar la morfología y el tamaño de las ZnO-NPs, se indagó sobre la presencia de este compuesto en las nanopartículas obtenidas al final del proceso y se encontró que los espectros infrarrojo de las NPs con morfología esférica, no mostraron bandas características del surfactante (ver figura 2.5), lo que indica que el tratamiento térmico realizado fue muy efectivo y evito la presencia de alguna fase orgánica en el sólido sintetizado.

El mecanismo para la generación de ROS por luz visible está bien documentada [10,11,17], tal que los pares electrón-hueco ($e^- - H^+$), que propiciarían su producción, se generarían en el semiconductor de ZnO por la excitación de electrones de la banda de valencia a la banda de conducción por la absorción de la luz (UV o visible); estos pares electrón-hueco producirían los ROS en la interacción con el agua. Por otro lado, el mecanismo para la producción de ROS en la oscuridad, con la participación de la especie superóxido generada, principalmente, por la acción de los defectos superficiales

presentes en las ZnO-NPs (vacancias de oxígeno ionizadas, por ejemplo), a través de las reacciones que se indican en el esquema de la figura 4.9.

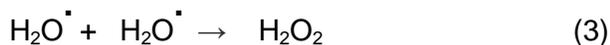
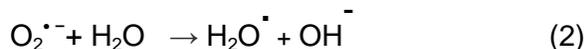
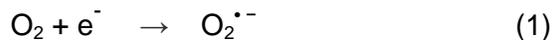


Figura 4.9. Esquema que indica el mecanismo de generación de ROS a partir del superóxido.

El oxígeno de la atmósfera puede reaccionar con electrones de la superficie del ZnO para formar el radical superóxido (paso 1), el cual, en presencia de agua, es solvatado formando radicales hidroperoxilo (paso 2). Estos radicales hidroperoxilo pueden recombinarse para formar H_2O_2 (paso 3) y el H_2O_2 puede reaccionar con el radical superóxido para formar iones hidroxilo y radicales hidroxilo (paso 4). No se puede excluir la posibilidad de formación de oxígeno singlete, en el desarrollo de este proceso, ya que si existen huecos en las ZnO-NPs sintetizadas este se podría formar [22].

En el presente estudio, las ZnO-NPs con morfología esférica mostraron mayor actividad antibacteriana que las NPs con morfología acicular, resultado que se podría atribuir tanto al menor tamaño relativo de las partículas con forma esférica, y por lo tanto una mayor área específica para generar los ROS, así como a su morfología, efecto que ya ha sido analizado en otros sistemas por otros investigadores [49,50]. Además, se verificó la presencia de ROS en los cultivos de *E. coli*, que contenían las ZnO-NPs, registrando el efecto de la presencia de un antioxidante natural (vitamina C) y su capacidad de reducir estas especies reactivas pro-oxidantes, lo que ocasiono la regulación del efecto del estrés oxidativo y por lo tanto una menor inhibición del crecimiento bacteriano; estas especies reactivas de oxígeno (ROS) se pueden generar debido a las propiedades semiconductoras del ZnO [15,16], que aun en ausencia de luz son generadas [22].

En la figura 4.10 se indica el esquema de un posible mecanismo que generaría los ROS y que colaborarían en la degradación de las bacterias de *E. coli*. El Trabajo de Prasanna y Vijayaraghavan [22] puso en evidencia la importancia que tienen los defectos superficiales que existen en las ZnO-NPs en la producción de los ROS; específicamente proponen que en la oscuridad, en ausencia de radiación, el radical superóxido mediaría en la generación de los ROS a través de las vacancias de oxígeno mono-ionizadas, propuesta

que ellos confirmaron con resonancia paramagnética electrónica (EPR) y estudios de barrido de radicales.

Además, la presencia de cargas eléctricas tanto en la pared celular como sobre la superficie de las ZnO-NPs podría propiciar atracción electrostática entre ellas y por lo tanto la adhesión de las NPs a la superficie bacteriana. Debido a que la superficie catalíticamente activa de las NPs, principalmente por los defectos superficiales que en ella existen, ella podría generar especies ROS pero algunas de estas especies con carga negativa, como los radicales hidroxilo y superóxido, no podrían penetrar la membrana celular y permanecerían en contacto directo con la superficie exterior de las bacterias, debilitando la pared celular y generando peroxidación lipídica LPO (Figura 4.10 (a)). Este proceso, en principio, facilitaría la penetración de las NPs hacia el interior de la célula, acción que también se podría dar a través de los canales de iones y proteínas transportadoras, lo que permitiría el paso de las NPs hacia la membrana plasmática. Estando las ZnO-NPs allí su interacción sería directa con los orgánulos oxidativos, como las mitocondrias, estimulando la producción de ROS en el interior celular (Figura 4.10 (b)) [9].

Los ROS en pequeñas cantidades serían fácilmente neutralizados por las defensas antioxidantes, entre ellas el glutatión (GSH), superóxido dismutasa (SOD) y las demás enzimas antioxidantes. Pero, cuando la defensa antioxidantes es insuficiente, se puede producir un desbalance hacia el estado pro-oxidante [1,9,16] (Figura 4.10 (c)) debido a la alta concentración de ROS. Por otro lado, los iones de Zn^{2+} disueltos tendrían la capacidad de formar quelatos con las biomoléculas o desalojar a los iones metálicos de las metaloproteínas específicas, lo que podría ocasionar la inactivación de las proteínas [24,45]. Los ROS también podrían inactivar los procesos de autorregulación homeostática de los iones hacia el exterior celular, los cuales utilizan el Ca^{2+} como señal intracelular activadora [16]. Además, los ROS podrían inducir ruptura en la cadena de ADN afectando la expresión génica (Figura 4.10(d)), sin descartar la muerte celular programada, mediada por el sistema toxina-antitoxina mazEF [25], desencadenada por varias condiciones de estrés oxidativo incluyendo graves daños en el ADN, Conllevando a la Muerte celular [9,20-22].

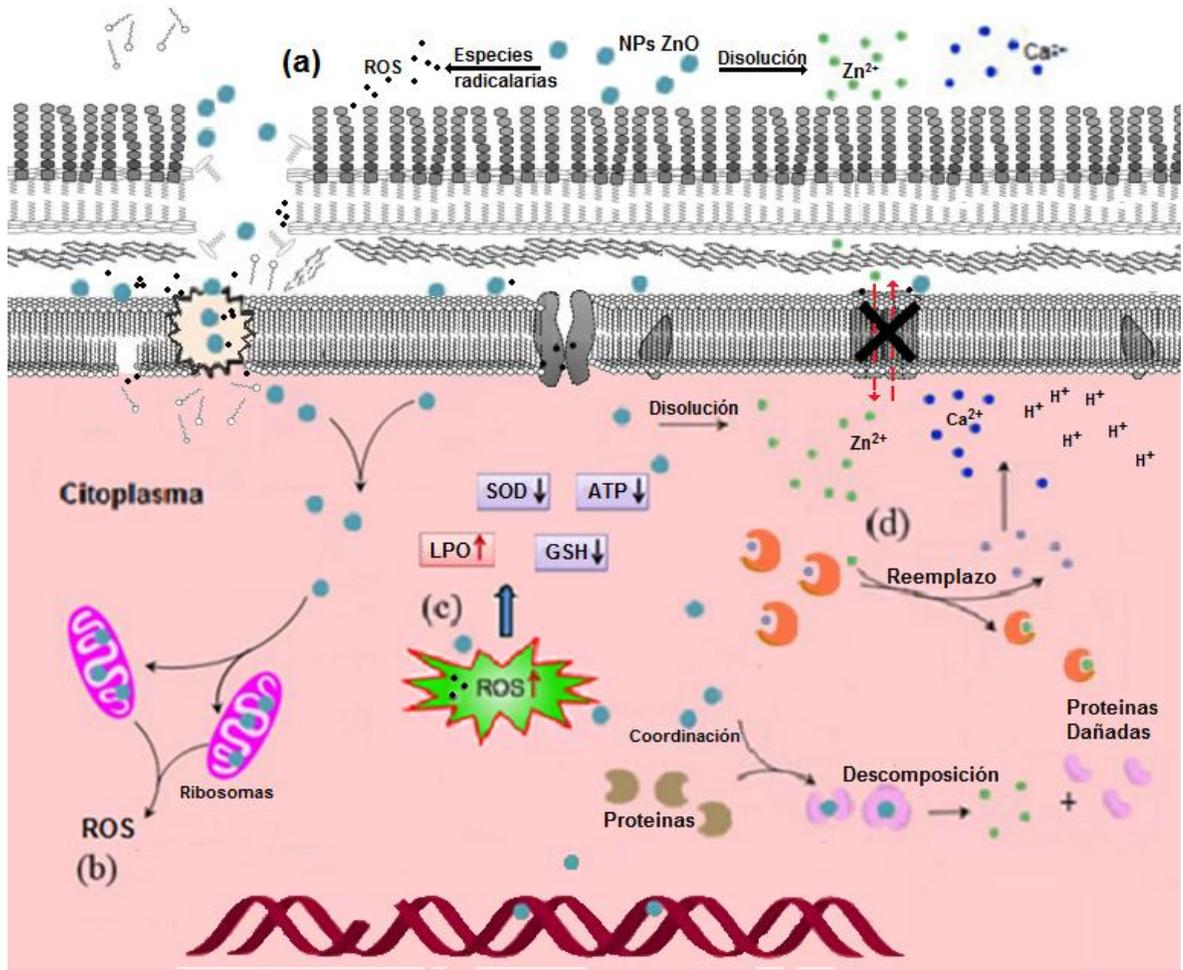


Figura 4.10 Representación esquemática de algunos eventos clave de toxicidad de ZnO en células bacterianas, inducida por las NP_s de ZnO. (a) Los posibles mecanismos de entrada de NP_s de ZnO; (b) efectos de ROS intracelulares por NP_s de ZnO; (c) estrés oxidativo generado por ROS y (d) Efectos de coordinación de Zn²⁺ liberado de las NP_s en la célula; incluyendo inhibición en efectos de homeostasis.

4.8 CONCLUSIONES

- Se comprobó la acción antibacteriana de las ZnO-NP_s sintetizadas sobre cepas de *E. coli* y características fisicoquímicas de las Nanopartículas obtenidas, concretamente su morfología, las cuales tienen un efecto importante sobre esta funcionalidad. En el presente caso las ZnO-NP_s con morfología esférica presentaron mayor actividad antibacteriana que las NP_s con morfología acicular. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de los métodos de síntesis utilizados para obtener las ZnO-NP_s y sus características fisicoquímicas.

- En este Trabajo se confirmó la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos de *E. coli* y ZnO-NPs, durante el estudio de la acción antibacteriana de las ZnO-NPs sobre las cepas de bacterias, en ausencia de luz, sobre los cultivos, considerando una menor inhibición del crecimiento bacteriano, al suplementarles ácido ascórbico (antioxidante). Los resultados mostraron una evidente reducción de los niveles de malondialdehído (MDA) en estos cultivos.
- Uno de los mecanismos que justifica el efecto antibacteriano de las ZnO-NPs, sobre las cepas de *E. coli*, es un proceso de oxidación lipídica que experimentaría la membrana, ocasionado por los ROS generados por las NPs; Estos ROS se generarían partiendo de la formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), debido a la reacción del O_2 con electrones ubicados en la superficie del ZnO y mediado por los defectos superficiales, que posteriormente propiciaría la generación de radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La oxidación de los lípidos de la membrana podría ocasionar la ruptura de la pared celular permitiendo así el ingreso de las ZnO-NPs al citoplasma de la bacteria, facilitando la acción antibacteriana de las mismas a través de los ROS que ellas generan.
- Los resultados de reducción de los niveles de malondialdehído (MDA) en los cultivos de *E. coli* con ZnO-NPs, a los que se les adicionó el ácido ascórbico, indican que el mecanismo de inactivación de las bacterias a través de los ROS actuó, pero no fue el único, ni el más importante, por lo que se deberían considerar, para justificar los resultados obtenidos, otros mecanismos como: el efecto de los iones de cinc (Zn^{2+}) disueltos, tanto en el medio de cultivo como en el citoplasma, y la oxidación directa a través de los huecos que puedan existir en la superficie de las ZnO-NPs. Estos dos mecanismos, así como la mediación de los defectos superficiales que presenten las nanopartículas en los procesos de oxidación, se deberían estudiar con mayor cuidado en futuros trabajos.

REFERENCIAS

- [1] Yin H; Casey P; McCall M. Surface Modifications of ZnO Nanoparticles and Their Cytotoxicity, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2010 Vol. 10, p 7565–7570.
- [2] Nirmala G.A; Kannaiyan P. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nano particles a brief study, *Colloids and Surfaces a: Physicochem. Eng. Aspects*, 2007 Vol. 297, p 63–70.

- [3] Nel A.; Xia T; Madler L; Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006 Vol. 311, p 622–627.
- [4] Le Ouay B; Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nano Today*, 2015 Vol.10, p 339-354.
- [5] Fabrega J; Luoma S.N; Tyler C.R; Galloway T; Lead J.R. Silver nanoparticles: Behavior and effects in the aquatic environment, *Environ. Int.*, 2011 Vol. 37, p 517-531.
- [6] Xia T; Kovochich M; Brant J; Hotze M; Sempf J; Oberley T; Sioutas C; Yeh J. I; Wiesner M.R; Nel A.E. Ros Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm, *nanoletters*, 2006 Vol. 6, No. 8, p 1794-1807.
- [7] Chang Y.N; Zhang M; Xia L; Zhang J; and Xing G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles, *Materials*, 2012 Vol. 5, p 2850-2871.
- [8] Aruoja V; Dubourguier H.C; Kasemets K; Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Sci. Total Environ.* 2009 Vol. 407, p 1461–1468.
- [9] Vyom Sharma BSc. An investigation into the mechanism of toxicity of zinc oxide nanoparticles, submitted for the degree of Doctor of Philosophy, United Kingdom, University of Bradford, 2011, 197 p.
- [10] Dutta R.K; Bhavani P.N; Mahesh K.G; Reddy A.V.R. Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012 vol. 94, p143-150.
- [11] Applerot G; Lipovsky A; Dror R; Perkas N; Nitzan Y; Lubart R; Gedanken A. Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury . *Adv. Funct. Mater.*, 2009 vol. 19, p 842–852.
- [12] Heng B.C; Zhao X; Tan E.C; Khamis N; Assodani A; Xiong S; Ruedl C; Loo J.S. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Arch. Toxicol.*, 2011 vol. 85, p 1517-1528.
- [13] Karlsson H.L; Cronholm P; Gustafsson J; Moller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.*, 2008 Vol. 21, p 1726-1732.
- [14] Kim J.S; Kuk E; Yu K.N; Kim J.H; Park S.J; Lee H.J; Kim S.H; Park Y.K; Park Y.H; Hwang C.Y. Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine*, 2007 Vol. 3, p 95-101.
- [15] Pujalte I; Passagne I; Brouillaud B; Treguer M; Durand E; Ohayon C; L'Azou B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part. Fibre Toxicol.*, 2011 Vol 8, No 10. p 1-16.
- [16] Roesslein M; Cordula J.P; Kaiser H.F; Wick P. Comparability of in Vitro Tests for Bioactive Nanoparticles: A Common Assay to Detect Reactive Oxygen Species as an Example, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013 Vol. 14, p 24320-24337.
- [17] Vijayaraghavan R. Zinc oxide based Inorganic Antimicrobial agents, *International Journal of Science Research*, 2012 Vol. 01, No 02, p 35-46.
- [18] Blake M.D; Maness P; Huang Z; Wolfrum E.J; Huang J; Jacoby W.A. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells, *Sep. Purif. Methods*, 1999 Vol. 28, No 1, p 1 -50.

- [19] Latella L; Sacco A; Pajalunga D; Tiainen M; Macera D; D'Angelo M; Felici A; Sacchi A; Crescenzi M. Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle. *Mol. Cell Biol.*, 2001 Vol. 21, p 5631-5643.
- [20] Johnston H.J; Hutchison G.R; Christensen F.M; Peters S; Hankin S; Aschberger K; Stone V.A. Critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. *Nanotoxicology*, 2010 Vol. 4, p 207–246.
- [21] Donaldson K; Brown D.M; Mitchell C; Dineva M; Beswick P.H; Gilmour P; Mac W. Free radical activity of PM10: Iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ. Health Perspect.*, 1997 Vol. 105, p 1285–1289.
- [22] Prasanna V.L; Vijayaraghavan R. Insight Into the Mechanism of Antibacterial Activity of ZnO - Surface Defects mediated Reactive Oxygen Species even in Dark. *Langmuir*, 2015 Vol. 31, No 33, p 9155-9162.
- [23] Sirelkhatim A; Mahmud S; Seeni A; Kaus N.H.M; Chuo L; Mohd S; Hasan H; Mohamad D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism, *Nano-Micro Letters*, 2015 Vol. 7, p 219-242.
- [24] Kumar A; Alok K.P; Shashi S.S; Shanker R; Dhawan A. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*, *Free Radical Biology & Medicine*, 2011 Vol 51, p 1872-1881.
- [25] Erental A; Sharon I; Engelberg H. Two Programmed Cell Death Systems in *Escherichia coli*: An Apoptotic-Like Death Is Inhibited by the maz EF Mediated Death Pathway, *PLoS Biology*, 2012 Vol. 10, No 3, p 1-13.
- [26] Held P. An Introduction to Reactive Oxygen Species: measurement of ROS in cells (white Paper) BioTek instruments, Inc.: Winooski, VT, USA, 2012. 14 p.
- [27] Sayeed I; Parvez S; Pandey S; Bin-Hafeez B; Haque R; Raisuddin S; Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channapunctatus Bloch*, *J. Ecotoxicol. Environ. Safety*, 2003 Vol. 56, p 295–301.
- [28] Hodges D.M; DeLong J.M; Forney C.F; Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999 Vol. 207, p 604–611.
- [29] Kong X.H; Wang G.Z; Li S.J. Antioxidation and ATPase activity in the gill of mud crab *Scylla serrata* under cold stress, *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2007 Vol. 25, p 221–226.
- [30] Van Acker S.A; van den Berg D.J; Tromp M.N; Griffioen D.H; Van Bennekom W.P; van der Vijgh W.J; Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996 Vol. 20, p 331–342.
- [31] Byrdwell W.C; Neff W.E. Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002 Vol. 16, p 300–319.
- [32] Thabitha P.D; Kavitha P; Huey-Min H. Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co₃O₄ and TiO₂) to *E. coli* bacteria, *Journal of Environmental Sciences*, 2013 Vol. 25, No 5, p 882–888.

- [33] Kumar A; Pandey A.K; Singh S.S; Shanker R; Dhawan A. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*, *Free Radical Biology & Medicine*, 2011 Vol. 51, p 1872–1881.
- [34] Padmavathy N; Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles an antimicrobial study, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2008 Vol. 9, 7 p.
- [35] Yang H; Liu Ch; Yang D; Zhang H; Xi Zh. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition, *J. Appl. Toxicol.*, 2009 Vol. 29, p 69–78.
- [36] Wang X; Yang F; Yang W; Yang X. A study on the antibacterial activity of one-dimensional ZnO nanowire arrays: effects of the orientation and plane surface, *Chem. Commun (Camb)*., 2007 Vol. 42, p 4419–4421.
- [37] Ramani M; Ponnusamy S; Muthamizhchelvan C; Marsili E. Amino acid-mediated synthesis of zinc oxide nanostructures and evaluation of their facet-dependent antimicrobial activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014 Vol. 117, p 233-239.
- [38] Brabu B; Haribabu S; Revathy M.S; Thangapandiyan M; Navaneethakrishnan K. R; Gopalakrishnan C; Murugana S.S; Kumar T.S. Biocompatibility studies on lanthanum oxide nanoparticles, *Toxicology Research*, 2015 Vol. 4, p 1037-1044.
- [39] Buerki T; Xiao, L; Diener L; Arslan O; Hirsch C; Maeder-Althaus X; Grieder K; Wampfler B; Mathur S; Wick P. In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*, 2013 Vol. 7, p 402–416.
- [40] Draper R. B; Fox M. A. Titanium Dioxide photosensitized Reactions Studied by Diffuse Reflectance Flash Photolysis in Aqueous Suspensions of TiO₂ Powder, *Langmuir*, 1990 Vol. 6, p 1396-1402.
- [41] Ishibashi K.I; Fujishima A; Watanabe T; Hashimoto K. Quantum yields of active oxidative species formed on TiO₂ photocatalyst, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2000 Vol. 134, p 139–142.
- [42] Ma H; Williams P.L; Diamond S. A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles: a review, *Environmental Pollution*, 2013 Vol. 172, p 76-85.
- [43] Richard C. Regioselectivity of oxidation by positive holes (h⁺) in aqueous transformations, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1993 Vol. 72, p 179-182.
- [44] Balcerski W; Ryu S. Y; Hoffmann M.R. Gas-Phase Photodegradation of Decane and Methanol on TiO₂: Dynamic Surface Chemistry Characterized by Diffuse Reflectance FTIR, *International Journal of Photoenergy*, 2008 Vol. 2008, 9 p.
- [45] Pasquet J; Chevalier Y; Pelletier J; Couval E; Bouvier D; Bolzinger M.A. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014 Vol. 457, p 263–274.
- [46] Borm P; Klaessig F.C; Landry T.D; Moudgil B.M; Pauluhn, J., Thomas, K., Trottier, R., and Wood, S. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicological sciences*, 2006 Vol. 90, p 23–32.
- [47] Cho W.S; Duffin, R; Poland C.A; Duschl A; Oostingh G.J; MacNee W; Bradley M; Megson I.L; Donaldson K. Differential proinflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*, 2012 Vol. 6, p 22–35.

[48] Brayner R; Ferrari-Iliou N; Brivois S; Djediat M.F; Benedetti F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium, *Nano Letters*, 2006 Vol. 6, p 866-870.

[49] Peng X; Palma S; Fisher N.S; Wong S.S. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae, *Aquatic Toxicology*, 2011 Vol. 102, p 186–196.

[50] Mu Q; David C.A; Rey-Castro C; Krzemiński L; Wallace R; Bamiduro F; Milne S.J; Hondow N.S; Brydson R; Vizcay-Barrena G; Routledge M.N; Jeuken L.J; Brown A.P. Systematic Investigation of the Physicochemical Factors That Contribute to the Toxicity of ZnO Nanoparticles”, *Chem. Res. Toxicol.*, 2014 Vol. 27, p 558–567.