



Caracterización de nanomateriales de Ag, ZnO, y Ag/ZnO y su evaluación de propiedades antimicrobianas en *S. typhimurium*, *B. cereus*, *S. aureus* y *E. coli*

J. Aguilar-Reyes¹, D.S. García-Zaleta^{1*}, N.C. Aguilar-Sánchez¹,
J.R. Velázquez-Martínez², M.G. Hernández-Cruz¹, Z. Martínez-Corona³

¹ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. DAMJM. Carretera Estatal Libre Villahermosa-Comalcalco Km. 27+000 s/n Ranchería Ribera Alta C.P. 86205, Jalpa de Méndez, Tabasco, México

² Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. DACA. Km. 25. Carretera Villahermosa-Teapa, Teapa, Tabasco, México

³ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. DAIA. Carretera Cunduacán-Jalpa Km 1. Col. La Esmeralda C.P. 86690, Cunduacán, Tabasco, México

davidsalvador79@hotmail.com

Resumen

En este trabajo se sintetizaron nanomateriales de plata (Ag), óxido de zinc (ZnO) y microestructuras de ZnO decoradas con Ag (Ag/ZnO) mediante el método Pechini, para determinar sus propiedades antimicrobianas. Las muestras fueron caracterizadas por Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y fisisorción de nitrógeno. Los resultados de DRX revelaron una sola fase cristalina para la muestra de Ag, la fase zincita en el espécimen de ZnO, así como una combinación de ambas fases en los materiales de Ag/ZnO. Los resultados de MEB indican aglomerados con morfologías granuladas en la muestra de Ag y estructuras semilaminares en el espécimen de ZnO. Además, se evaluó del

efecto antimicrobiano de los nanomateriales y se seleccionaron las concentraciones a evaluar mediante pruebas de difusión en disco (prueba de Kirby-Bauer) y Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Los resultados revelaron que los diversos nanomateriales presentan actividad bacteriostática y/o bactericida, destacando los materiales de Ag/ZnO (efecto bactericida) con una eficiencia de ~75 % en *Escherichia coli* (ATCC 108412) y ~89 % en *S. aureus* (ATCC 25923).

Palabras clave

Ag/ZnO, bacterias, Prueba de Kirby-Bauer

Introducción

Durante las últimas tres décadas, un gran número de bacterias han desarrollado resis-

tencia al efecto de los antibióticos, estas se adaptaron a sus condiciones ambientales, generando enfermedades infecciosas cada vez más difíciles [1-3] de tratar. En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un informe de urgencia sobre “12 familias de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos”, ya que estas bacterias son letales para la salud humana [4]. En esta clasificación se encuentran bacterias multi-resistentes, tales como: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *E. coli* y *Proteus spp*. En el grupo de prioridad media se encuentra: *Streptococcus pneumoniae*, *Hamphilus influenzae* y *Shigella spp*. Finalmente, en el grupo de prioridad elevada se encuentran: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp*, *Salmonella* y *Neisseria gonorrhoeae* [4]. Es importante mencionar que existen otras bacterias genéticamente diversas, como la *Bacillus cereus* o la *Salmonella typhimurium*, que son patógenos microbianos en alimentos que han sido reconocidos como causantes de enfermedades, así como graves intoxicaciones alimentarias, generando un gran impacto sobre la salud pública [5-7].

Por lo anterior, los nanomateriales han surgido como una posibilidad para abordar la problemática de la resistencia a los antibióticos a través de mejorar la potencia de los antibióticos existentes o generar mecanismos antibacterianos completamente nuevos [8]. La escala nanométrica de estos materiales permite el ensamblaje de un gran número de moléculas para una interacción dinámica con el patógeno, generando daños letales a estos mediante procesos predominantes físicos o bioquímicos, como por ejemplo, al interactuar con los lípidos de membrana, rompiendo su integridad [8].

Algunas nanopartículas, tales como plata (Ag) [9-10], óxido de zinc (ZnO) [11-12], oro (Au) [13-14], cobre (Cu) [15-16] o compuestos de plata/óxido de zinc (Ag/ZnO) [17-18] han demostrado tener una adecuada actividad antimicrobiana. El propósito de esta investigación fue demostrar el comportamiento de las nanopartículas de plata (Ag), óxido de zinc (ZnO) y materiales de plata/óxido de zinc (Ag/ZnO) en presencia de bacterias Gram negativas (*Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*), así como Gram positivas (*Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*).

Metodología

Síntesis de nanomateriales

Los nanomateriales de este estudio se realizaron utilizando el método Pechini. Como precursores se emplearon nitrato de plata (AgNO_3) y acetato de zinc di-hidratado ($\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2$). Además, como agente quelante se utilizó ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) y como disolvente etilenglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) en una relación molar metal/ácido/etilenglicol igual a 2:8:32. De manera general, la síntesis inició con la mezcla de etilenglicol y ácido cítrico en agitación constante por 30 min. a una temperatura de $\sim 60^\circ\text{C}$. Posteriormente, se agrega el precursor metálico a una agitación constante por 30 min. Una vez realizada la mezcla, se procede a un secado de 100°C por 48 h, seguido de un tratamiento térmico de 350°C en aire por una hora para la muestra de Ag, así como, un tratamiento térmico de 600°C en aire por tres horas para los especímenes de ZnO y Ag/ZnO.

Caracterización de las muestras

La estructura cristalina de los polvos fue obtenida en un difractómetro Bruker D2 phaser usando una radiación $\text{CuK}\alpha$ a 30 Kv y 25 mA. La información fue recolectada en un rango de 25° a 90° en 2θ con

un tamaño de paso de 0.02° y un tiempo de 1.5 s utilizando un detector Lynxeye. La morfología de los materiales fue obtenida utilizando un microscopio electrónico de barrido de la marca JEOL modelo JSM-6010LA equipado con detector EDS. Las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno de las muestras fueron obtenidas en un equipo marca Quantachrome modelo Autorosb iQ₂; las muestras fueron desgasificadas en vacío a 300°C por 13 h antes de las mediciones.

Pruebas de inhibición y determinación de concentración

En este trabajo se utilizaron las cepas: *Salmonella entérica subsp. entérica serovar Typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 108412) obtenidas del cepario del laboratorio de productos bióticos.

El método de difusión de disco (Kirby-Bauer) se empleó para realizar las pruebas de inhibición en caldo infusión cerebro-corazón (BDBIOXON®) adicionado con agar bacteriológico al 2 % (DIBICON®). Para cada una de las cepas se utilizaron cajas Petri donde se colocaron 100 μL de inóculo. Posteriormente, se colocaron los discos de difusión (papel filtro Ahlstrom No. 40), un control positivo (amikacina 500 mg/ml), un control negativo (agua desionizada) y las diferentes nanopartículas a diferentes concentraciones (12, 25 y mg/ml). Cada una de las cepas cultivadas en caldo fueron plaqueadas en el agar de infusión cerebro-corazón, se situaron los discos de los distintos tratamientos y se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente, las zonas de inhibición fueron medidas y se realizó el registro de evidencia.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de las nanopartículas se determinó mediante el método de microdilución. Se evaluó el efecto de los nanomateriales a diferentes concentraciones utilizando como control positivo un antibiótico de amplio espectro: amikacina. Las bacterias se inocularon y se evaluó el cambio de color para la determinación del efecto bacteriostático y bactericida, empleando Thiazolyl Blue Tetrazolium (MTT) (SIGMA) incubando la placa a 37°C por 24 h. Basado en la reducción del MTT mediante enzimas deshidrogenasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), un cambio de color amarillo (soluble en agua), a cristales de formazán de color púrpura (insoluble en agua), permite diferenciar entre células vivas y células muertas. Al finalizar la prueba, la muestra de cada pocillo de la placa en amarillo fue reinoculado e incubado para determinar el efecto bacteriostático (con crecimiento) o bactericida (sin crecimiento).

Resultados y discusión

La Figura 1 presenta los resultados de DRX de las muestras sintetizadas. En el difractograma de la muestra de Ag (Figura 1a) se observan picos definidos en $\sim 38^\circ$, $\sim 44^\circ$, $\sim 64^\circ$, $\sim 77^\circ$ y $\sim 82^\circ$ en 2θ , los cuales coinciden con el compuesto Ag de estructura cristalina cúbica, de acuerdo a la carta ICDD 004-0783. En el caso del difractograma de la muestra ZnO (Figura 1b), se observaron reflexiones en $\sim 32^\circ$, $\sim 35^\circ$, $\sim 36^\circ$, 48° , 57° , 63° y 68° en 2θ , los cuales coincidieron con la fase zincita, con una estructura cristalina hexagonal de acuerdo a la carta ICDD 082-9745.

Finalmente, en el difractograma de la muestra de Ag/ZnO (Figura 1c) se pueden observar los picos de las fases plata y zincita. Sin embargo, esta última presenta una

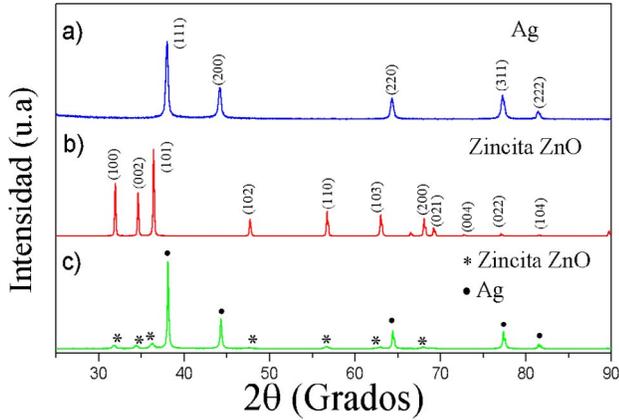


Figura 1. Difractograma de Rayos X de las muestras de (a) Ag, (b) ZnO y (c) Ag/ZnO

disminución en la intensidad de los picos, posiblemente a que la plata puede estar recubriendo al ZnO. Es importante mencionar que no se observan otros picos correspondientes a óxidos o del precursor (AgNO_3), indicando que la síntesis fue exitosa para la formación de las fases cristalinas deseadas.

El tamaño de cristal fue calculado por la ecuación de Sherrer [19-20] (Ecuación 1). Indicando que los tamaños de los materiales se encuentran en el orden nanométrico (Tabla I).

$$\text{Ecuación 1.} \quad D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Donde: k es el factor de forma (0.89), λ longitud de onda de la radiación, β el ancho medio del pico y θ el ángulo de incidencia.

Muestra	Tamaño de cristal (nm)
Ag	~70
ZnO	~22
Ag/ZnO	~32

Tabla I. Tamaños de cristallita obtenidos por la ecuación de Sherrer

En la Figura 2 se presentan las micrografías de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y el análisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS). La Figura 2a corresponde a la muestra

de Ag, donde se aprecian partículas con morfología irregular y tamaños de grano hasta 5 μm . En la Figura 2c se observan morfologías tipo laminar, de longitudes y anchuras diversas y espesores aproximados entre 1 y 3 μm . Los espectros de EDS confirman la presencia únicamente de Ag (Figura 2b) y Zn (Figura 2d) en los especímenes. Por otro lado, la Figura 2e corresponde a las microestructuras de ZnO decoradas con Ag (Ag/ZnO) donde se aprecia un cambio en la morfología en comparación con las muestras individuales. Las estructuras laminares observadas en el material de ZnO (Figura 2c) fueron reducidas en tamaño y forma, además, las partículas ostentan una decoración de partículas semiesféricas de ~363 nm, así como aglomerados correspondientes a nanopartículas de Ag. El análisis por EDS confirmó la presencia de Ag y Zn en la muestra (Figura 2f).

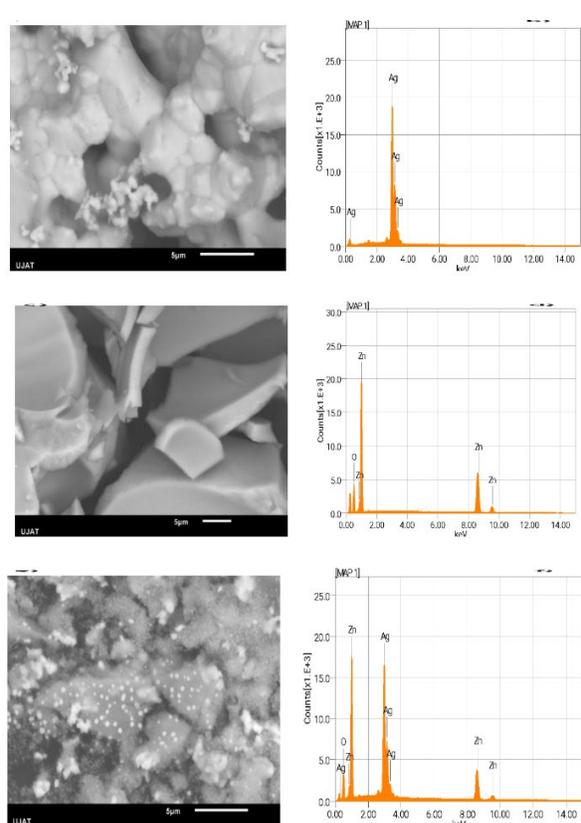


Figura 2. Micrografías de MEB y espectros de EDS de las muestras (a)(b) Ag, (c)(d) ZnO y (e)(f) Ag/ZnO

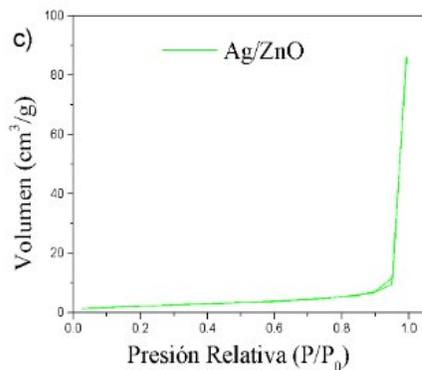
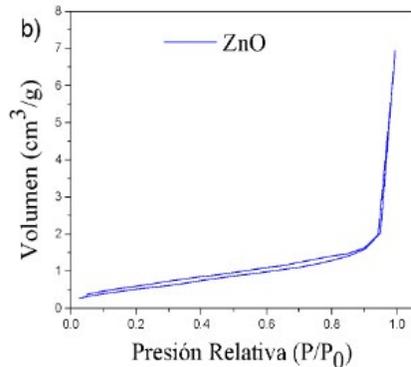
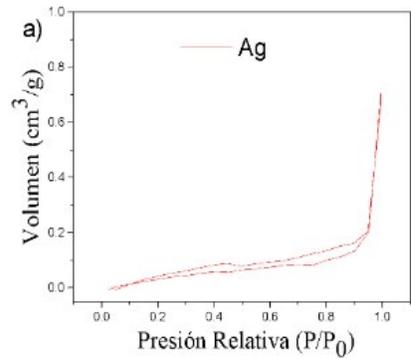


Figura 3. Isothermas de adsorción/desorción de N₂ de las muestras (a) Ag, (b) ZnO y (c) Ag/ZnO

La Figura 3 presenta los resultados de las isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno de las muestras sintetizadas de (a) Ag, (b) Zn y (Ag/ZnO). Los diversos nanomateriales presentaron una curva de histéresis tipo H1 de acuerdo a la clasificación de la IUPAC. Este tipo de isothermas son características de materiales microporosos con una superficie pequeña (Tabla II).

Muestra	Área Superficial Específica (BET) (m ² /g)	Volumen de poro (B J H) (cm ³ /g)	Tamaño del poro (BJH) (nm)
Ag	0.400	---	---
ZnO	1.956	0.010	3.802
Ag/ZnO	8.061	0.132	3.062

Tabla II. Resultados de fisisorción de nitrógeno de los nanomateriales

En la prueba de difusión de disco (Kirby-Bauer) se logró observar que los compuestos presentan halos de inhibición. Estos halos fueron medidos y su promedio en consideración de la concentración es registrado en las Tablas III-V.

Promedio de diámetro de halos de inhibición (mm)				
Concentración de Ag (mg/ml)				
<i>Amikacina</i>				
Bacteria	50	25	12.5	
<i>S. typhimurium</i>	0	0	0	15.49
<i>B. cereus</i>	1.69 (± 1.46)	0	0	15.49
<i>S. aureus</i>	5.96 (± 1.46)	4.23 (± 3.87)	4.23 (± 3.87)	15.49
<i>E. coli</i>	2.54 (± 2.27)	0	0	15.49

Tabla III. Promedio de diámetro de halos de inhibición de compuestos de Ag

El mejor resultado de las muestras de Ag fue observado en la bacteria *S. aureus* (Gram positiva) alcanzando halos de inhibición de diámetro de ~5.96 mm (Tabla III).

De igual forma, los especímenes de ZnO presentaron la mejor inhibición en la bacteria *S. aureus* (Gram positiva) alcanzando halos de inhibición de diámetro de ~ 6.77 mm (Tabla IV).

Promedio de diámetro de halos de inhibición (mm)				
Concentración de ZnO (mg/ml)				
Amikacina				
Bacteria	50	25	12.5	
<i>S. typhimurium</i>	0	0	0	15.49
<i>B. cereus</i>	0	0	0	15.49
<i>S. aureus</i>	5.08 (± 3.39)	6.77 (± 4.86)	5.92 (± 3.28)	15.49
<i>E. coli</i>	0	0	0	15.49

Tabla IV. Promedio de diámetro de halos de inhibición de compuestos de ZnO

Promedio de diámetro de halos de inhibición (mm)				
Concentración de Ag/ZnO (mg/ml)				
Amikacina				
Bacteria	50	25	12.5	
<i>S. typhimurium</i>	3.38 (± 1.93)	3.38 (± 1.93)	3.38 (± 1.93)	15.49
<i>B. cereus</i>	0	0	0	15.49
<i>S. aureus</i>	5.08 (± 3.39)	5.08 (± 3.39)	0	15.49
<i>E. coli</i>	3.38 (± 1.93)	3.38 (± 1.93)	3.38 (± 1.93)	15.49

Tabla V. Promedio de diámetro de halos de inhibición de los materiales de Ag/ZnO

Finalmente, los materiales de Ag/ZnO tuvieron una respuesta de inhibición en las bacterias *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. aureus*, siendo esta última bacteria la que presentó mayor sensibilidad a los nanomateriales con halos de inhibición de ~ 5.08 mm (Tabla V). En la Tabla V se aprecia que valores obtenidos en los halos de inhibición para las bacterias *S. typhimurium* y *E. coli* son similares, posiblemente a que las concentraciones utilizadas desde 12.5 mg/ml lograron el máximo de inhibición. Por otro lado, en la bacteria *S. aureus* se encontró el halo de inhibición en 25 mg/ml. Finalmente, la bacteria *B. cereus* no mostró halo de inhibición incluso a concentraciones de 50 mg/ml.

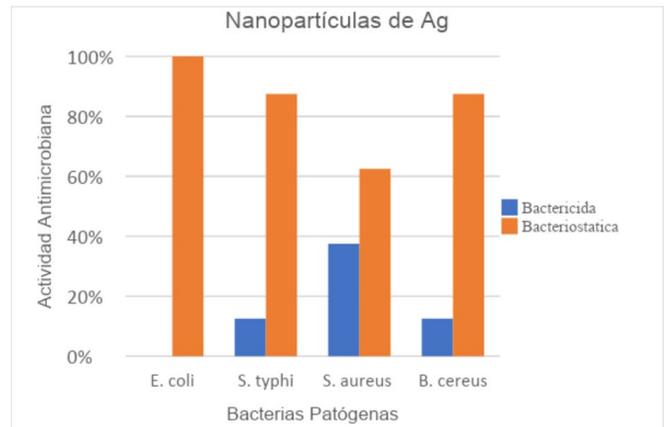


Figura 4. Actividad antimicrobiana de los nanomateriales de Ag (12.5 mg/ml)

Los resultados de la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se pueden observar en las Figuras 4, 5 y 6. Los nanomateriales de Ag a concentraciones de 12 mg/ml presentaron actividad bacteriostática en todas las bacterias, destacando en *S. typhimurium*, *B. cereus* y *E. coli* con valores mayores del 80 % de actividad. Además, estos nanomateriales presentaron actividad bactericida para la bacteria *S. aureus* a una concentración de 50 mg/ml (Figura 4).

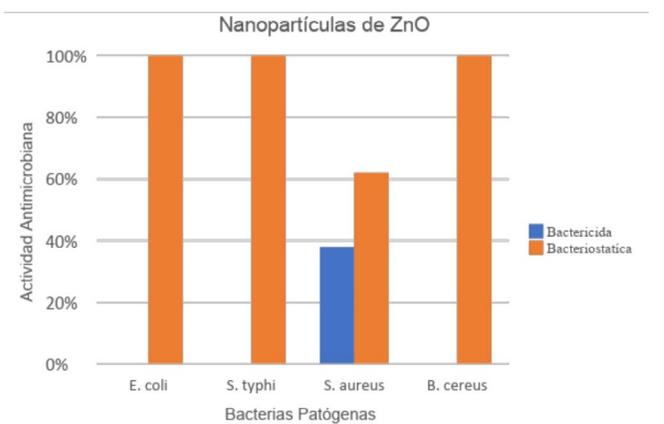


Figura 5. Actividad antimicrobiana de los nanomateriales de ZnO (50 mg/ml)

Los nanomateriales de ZnO presentaron actividad bacteriostática a concentraciones de 12 mg/ml en todas las bacterias, destacando en *S. typhimurium*, *B. cereus* y *E. coli* con valores del 100 % de actividad. Sin

embargo, únicamente presentó actividad bactericida en la bacteria *S. aureus* a 50 mg/ml (Figura 5).

Finalmente, en los nanomateriales de Ag/ZnO (Figura 6) se observa actividad bacteriostática únicamente para la bacteria *S. typhimurium* a una concentración de 12 mg/ml. Sin embargo, es importante destacar que la actividad bactericida se presenta en las bacterias *S. aureus*, *B. cereus* y *E. coli*, incluso con valores casi del 90 % de actividad a la misma concentración.

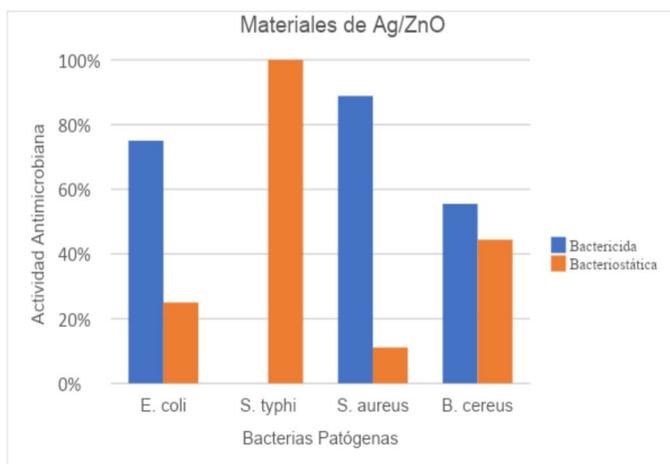


Figura 6. Actividad antimicrobiana de los materiales de Ag/ZnO (12.5 mg/ml)

Conclusiones

En este trabajo se obtuvieron exitosamente nanomateriales de Ag, ZnO y Ag/ZnO por el método Pechini. Los resultados de caracterización estructural (DRX y MEB) permitieron atribuir la respuesta de actividad antimicrobiana a la fase cristalina detectada. La mayoría de los materiales presentaron actividad bacteriostática, destacando los nanomateriales de ZnO. Por otra parte, los nanomateriales con mejor respuesta bactericida son Ag/ZnO, al efecto sinérgico de las fases cristalinas, así como a la mejor distribución de sus partículas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los laboratorios de la DAMJM-UJAT, DAIA-UJAT y DACA-UJAT por el apoyo brindado.

Referencias

1. J. González Mendoza, C. Maguiña Vargas, F. González-Ponce. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peruana* (2019). 36,2, 145-51.
2. L.M. Cabrera Castro, P.J. González Martell. Efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de Óxido de Zinc sobre la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida en Bacterias Gram positivas y Gram negativas. Tesis (2017). Universidad Nacional de Trujillo.
3. J. Oromi Durich Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral* (2000) 36,10, 367-369.
4. Organización Mundial de la Salud. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. (2017) Fecha de Consulta 15/11/2022. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
5. J. M. Gamboa-Anticona, M.N. Vásquez Valles. Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. *REOBIOLEST* (2015) 1,3, e42.
6. J. Sánchez, M. Correa, L.M. Castañeda-Sandoval. *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* (2016) 34,2, 230-242.
7. C. Yang, H. Li, T. Zhang, Y. Chu, J. Zuo, D. Chen. Study on antibiotic susceptibility of *Salmonella typhimurium* L forms to the third and fourth generation cephalosporins. *Scientific Reports* (2020) 10, 3042.
8. L. Gao W, L. Zhang. Nanomaterials arising amid antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* (2021) 19, 5-6.
9. S. Zinjarde. Bio-inspired nanomaterials and their applications as antimicrobial agents. *Chronicles Young Sci.* (2012) 3
10. S. Egger, R.P. Lehmann, M.J. Loessner, M. Schuppler. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Applied and Environmental Microbiology* (2009) 75, 2973-2976.
11. J. Wang, X. Zhu, W. Pei, L. Zhou, L. Cai, H. Jiang, J. Chen. ZnO nanocluster loaded superparamagnetic iron oxide nanocomposites as recyclable antibacterial agent. (2021) *Colloid and Interface Science Communications* (2021) 45,100510.
12. A.M. Ismail, A.A. Menazea, H.A. Kabary, A.E. El-Sherbiny, A. Samy. The influence of calcination temperature on structural and antimicrobial characteristics of Zinc Oxide nanoparticles synthesized by Sol-Gel method. *Journal of Molecular Structure* (2019) 1196, 15, 332-337.
13. N. Rabiee, S. Ahmadi, O. Akhavan, R. Luque. Silver and Gold Nanoparticles for antimicrobial purposes against multi-drug resistance bacteria. *Materials* (2022) 15, 1799.
14. E. Piktel, L. Suprewics, J. Depciuch, S. Chmielewska, K. Sklodowki, T. Daniluk, G. Krol, P. Kolat-Brodecka, P. Bijark, A. Pajor-Swierzy, K. Fiedoruk, M. Parlinska-Wojtan, R. Bucki.

- Variied-shaped gold nanoparticles with nanogram killing efficiency as potential antimicrobial surface coatings for the medical devices. *Scientific Reports* (2021)11, 12546.
15. S.I. Ekonomou, S. Soe, A. Stratakos. An explorative study on the antimicrobial effects and mechanical properties of 3D printed PLA and TPU surfaces loaded with Ag and Cu against nosocomial and foodborne pathogens. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (2023).137, 105536.
16. CH. Gkanatsiou, K. Karamanoli, U. Menskissoglu-Spirou-di, C. Dendrinou-Samara. Composition effect of Cu-based nanoparticles on phytopathogenic bacteria. Antibacterial studies and phytotoxicity evaluation. *Polyhedron* (2019) 170, 15, 395-403.
17. D. Da Silva, A. Duran, A. Cabral, F. Fonseca, F. Bueno, D. Sosa. Questioning ZnO, Ag and Ag/ZnO nanoparticles as antimicrobial agents for textiles: Do they guarantee total protection against bacteria and SARS-CoV-2? *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* (2022) 234, 112538.
18. L. Burlibasa, C. Chifiriuc, V. Lungu, E. Marius-Lungulescu, S. Mitrea, G. Sbarcea, A. Hermenean. Synthesis, physico-chemical characterization, antimicrobial activity and toxicological features for Ag-ZnO nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* (2020) 13, 4180-4197.
19. R.L. Liu, Y. Ren, J. Wang, Y. Wang, J. Jia, G Zhao, Preparation of Nb-doped TiO₂ films by sol-gel method and their dual-band electrochromic properties. *Ceramics International* (2021) 47, 22, 31834-31842
20. M. Lal, P. Sharma, C. Ram. Synthesis and photocatalytic potential of Nd-doped TiO₂ under UV and solar light irradiation using a sol-gel ultrasonication method. *Results in Materials* (2022) 15, 100308.