

SÍNTESIS Y CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y MORFOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO_2 ASISTIDO CON UV PARA APLICACIONES BACTERICIDAS

SYSTHESIS AND STRUCTURAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ZnO_2 ASSISTED UV NANOPARTICLES FOR BACTERICIDAL APPLICATIONS

Roberto Colonia¹, Vanessa C. Martinez², José L. Solís³, Mónica M. Gómez⁴

RESUMEN

*El peróxido de zinc (ZnO_2) fue sintetizado en forma de nanopartículas por medio de la ruta sol-gel. Para la síntesis se empleó acetato de zinc di-hidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 30% asistido de radiación UV. Las nanopartículas de ZnO_2 obtenidas fueron caracterizadas estructuralmente mediante la técnica de difracción de rayos-X. Mientras que el estudio de la morfología y tamaño de conglomerados cristalinos, se realizó por microscopía electrónica de barrido. Para explorar las propiedades bactericidas del ZnO_2 , se realizaron pruebas preliminares en las que se enfrentó este material a las cepas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), y se observó que las nanopartículas presentan una notoria propiedad bactericida.*

Palabras clave.- Peróxido de zinc, Nanopartículas, Bactericida.

ABSTRACT

*Zinc peroxide (ZnO_2) nanoparticles were synthesized by sol-gel technique. The chemicals used for the synthesis were zinc acetate di-hydrate ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) at 30% under UV radiation. The structure of the ZnO_2 nanoparticles was characterized by X-ray diffraction. While the morphology and the cluster size, were determined using scanning electron microscopy. For a preliminary evaluation of the bactericidal properties of the ZnO_2 , the material was exposed to *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and it was found that the material has notorious antibacterial activity.*

Key words.- Zinc peroxide, Nanoparticles, Bactericidal.

INTRODUCCIÓN

El ZnO_2 es un polvo sin olor, de color blanco o ligeramente amarillento, casi insoluble en agua y soluble en ácido. El ZnO_2 es un tipo de peróxido muy estable a condiciones normales, pero cuando llega a 150 °C empieza a descomponerse y generar oxígeno, para formar ZnO . El ZnO_2 es un material semiconductor con un ancho de banda prohibida

de 4.20 eV [1], además es ampliamente utilizado en la industria, tal como la industria del caucho [2-4], el procesamiento de plásticos [5], como oxidante para explosivos y mezclas pirotécnicas [6], y en los últimos años en la industria cosmética y farmacéutica, como un aditivo antiséptico en el tratamiento de las enfermedades de la piel [7-9]. También el ZnO_2 puede usarse en procesos de fotocatalisis [10] y como precursor para la

¹Ing. Físico, graduado de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, ²Estudiante de Maestría de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería. ³Dr. Investigador de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería ⁴ Dra Investigadora de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

preparación de nanopartículas de ZnO [11-13].

La preparación de ZnO_2 es producida principalmente a partir de los siguientes reactivos: ZnO , $Zn(OH)_2$, $ZnEt_2$, $Zn(NO_3)_2$, $ZnCl_2$ o $ZnCO_3$. En el presente artículo reportamos la síntesis del nanopartículas de ZnO_2 mediante la técnica de sol-gel, empleando acetato de zinc di-hidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% en un medio acuoso. Durante la síntesis, el sol fue expuesto a radiación UV a diferentes periodos de tiempo.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de las nanopartículas de ZnO_2

Para la síntesis de las nanopartículas de ZnO_2 se utilizó el método sol-gel, para ello se diluyó inicialmente 5 ml de H_2O_2 al 30 % con 50 ml de H_2O y se agitó hasta homogenizar la solución, luego se disolvió 1g de $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ en la solución antes de empezar a irradiarla con una lámpara de luz UV. La irradiación del sistema se realizó para diferentes tiempos empleando una lámpara de 300 W Ultra-Vitalux (Osram). La Figura 1 muestra el montaje empleado, todo el sistema de síntesis se colocó dentro de una cámara oscura para evitar cualquier daño ocasionado por la radiación UV. Luego de haber obtenido un gel particulado el medio se centrifuga, para separar y luego lavar, las partículas precipitadas. Las nanopartículas son secadas a una temperatura de 80°C durante 12 horas.

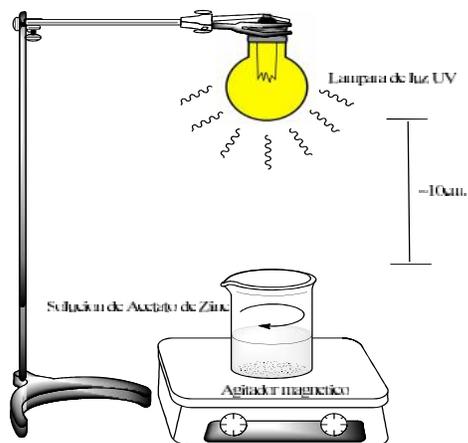


Fig. 1 Montaje de experimental empleado para la síntesis de nanopartículas de ZnO_2 usando radiación UV.

Análisis de las nanopartículas de ZnO_2

La caracterización estructural y morfológica de las nanopartículas es de gran importancia para interpretar sus propiedades tanto físicas como químicas, y también lo será para poder explorar las aplicaciones microbiológicas que se puedan estudiar.

En esta sección presentamos el estudio estructural realizado mediante Difracción de Rayos-X (DRX), el estudio morfológico realizado por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y finalmente se presentan las pruebas preliminares de microbiología realizadas exponiendo las nanopartículas de ZnO_2 a las cepas *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Difracción de rayos X

La caracterización estructural de las nanopartículas de ZnO_2 se realizó por DRX empleando un difractómetro Rigaku Miniflex II Desktop operado con una fuente de radiación de $CuK\ 1$ ($\lambda = 0.15045$ nm) a 30 kV, 20 mA y con una velocidad de barrido de $3^\circ/\text{min}$.

Para el análisis de los difractogramas se utilizó el programa TOPAS-Academic [14] que provee una aproximación general de la convolución y refinamiento de los datos con una variedad de perfiles numéricos, sin la necesidad de una convolución analítica. Esto se logra con funciones que representan, la fuente de rayos X, la aberración del difractómetro (diámetro del goniómetro, si usa monocromador, rejillas, etc.), así como la contribución de la muestra (tamaño del cristalito y microdeformación). Este método es conocido como aproximación por parámetros fundamentales (APF).

En el presente trabajo todos los difractogramas pudieron ajustarse satisfactoriamente usando una sola fase correspondiente al ZnO_2 , que posee una estructura cúbica con grupo espacial $Pa\bar{3}$ y parámetro de red de 4.874 Å, donde las posiciones del Zn y O están localizados en los sitios (0, 0, 0) y (0.413, 0.413, 0.413), respectivamente [1].

La Figura 2 muestra los difractogramas obtenidos para las nanopartículas sintetizadas con y sin radiación UV.

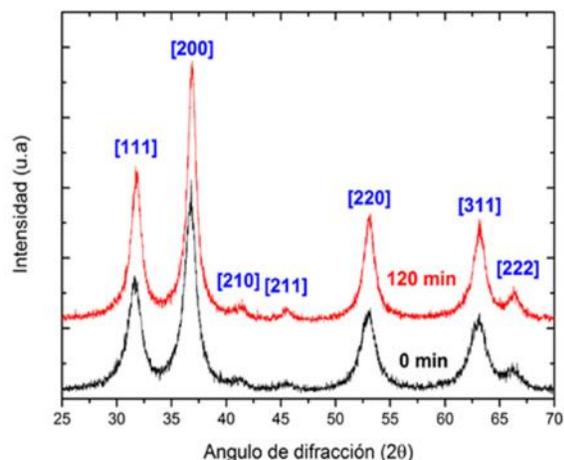


Fig. 2 Difractograma de Rayos X de nanopartículas de ZnO_2 sintetizadas con (120min) y sin irradiación UV (0 min).

Se pueden observar notoriamente cinco picos anchos asignados a las reflexiones [111], [200], [220], [311] y [222] del ZnO_2 [1]. Débilmente se registran dos protuberancias que corresponderían a las reflexiones [210] y [211] también correspondientes al ZnO_2 [1]. Mediante el Refinamiento de Rietveld [15] y el APF se obtuvo para las dos muestras analizadas con y sin radiación UV que el tamaño de cristalito promedio es de 6 nm y 9 nm, además poseen una microdeformación de 0.24 y 0.22, respectivamente. La Figura 3 muestra los difractogramas obtenidos para las nanopartículas sintetizadas para diferentes tiempos de irradiación UV (30, 60, 120 min). De manera análoga a la figura anterior se presentan notoriamente los cinco picos anchos y las dos pequeñas protuberancias antes identificados y asignados al ZnO_2 . Mediante el Refinamiento de Rietveld se obtuvo, para las tres muestras analizadas (30, 60 y 120 min) los siguientes tamaños de cristalito con los respectivos valores de microdeformación indicados en paréntesis: 6 nm (0.19), 7 nm (0.19) y 8 nm (0.12).

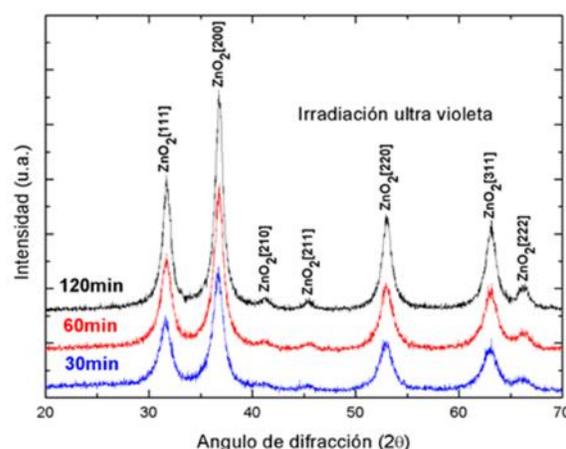


Fig. 3 Difractograma de Rayos X de nanopartículas de ZnO_2 sintetizadas para diferentes tiempos de irradiación UV.

Microscopía electrónica de barrido

El análisis morfológico de las nanopartículas de ZnO_2 se realizó mediante microscopía electrónica de barrido usando un microscopio electrónico marca Jeol JSM-6300 operado con una aceleración de electrones de 5 kV.

La Figura 4 muestra las imágenes de las nanopartículas obtenidas para 30 min de irradiación UV.

Las Figuras 4a y 4b muestran dos magnificaciones diferentes (100 KX y 200 KX respectivamente).

Las nanopartículas son conglomerados esféricos de entre 80 y 100 nm, de una apariencia racimosa (similar al que en la naturaleza se observa en la frambuesa).

Las pequeñas nanopartículas que constituyen cada uno de los conglomerados son cristalitos, que en tamaño no se pueden resolver por esta técnica.

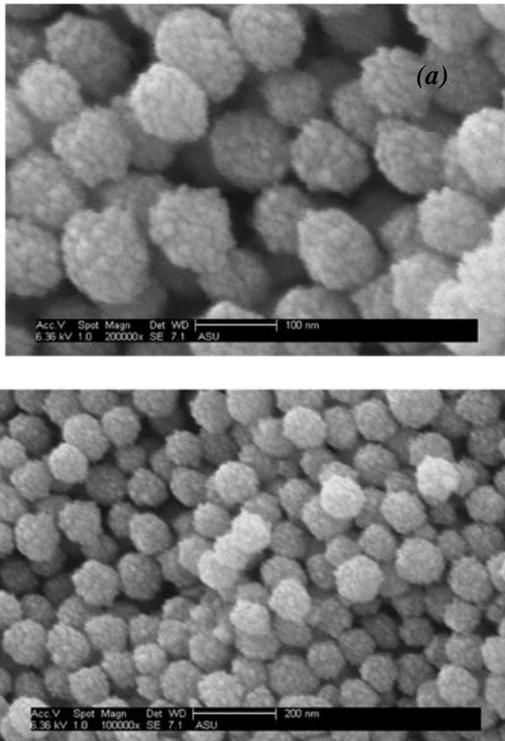


Fig. 4 Micrografías electrónicas de barrido para nanopartículas obtenidas mediante 30 min de irradiación UV, tomadas a diferentes magnificaciones (a) 100 kX y (b) 200 kX.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

No se conoce una metodología para la evaluación de las propiedades bactericidas de los materiales semiconductores nanoestructurados. El método más comúnmente utilizado en laboratorio por su sencillez y rapidez, es el de difusión por discos en agar, que es utilizado para generar datos cualitativos [16]. Mediante este método se realizaron los estudios preliminares de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO_2 , para lo cual se emplearon 3 cepas bacterianas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Todas las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron incubando las cepas con pequeñas cantidades de las nanopartículas de ZnO_2 , a una temperatura de 37°C en una estufa por un tiempo de 24 h, luego de ese tiempo se procedió a medir los halos de inhibición correspondientes.

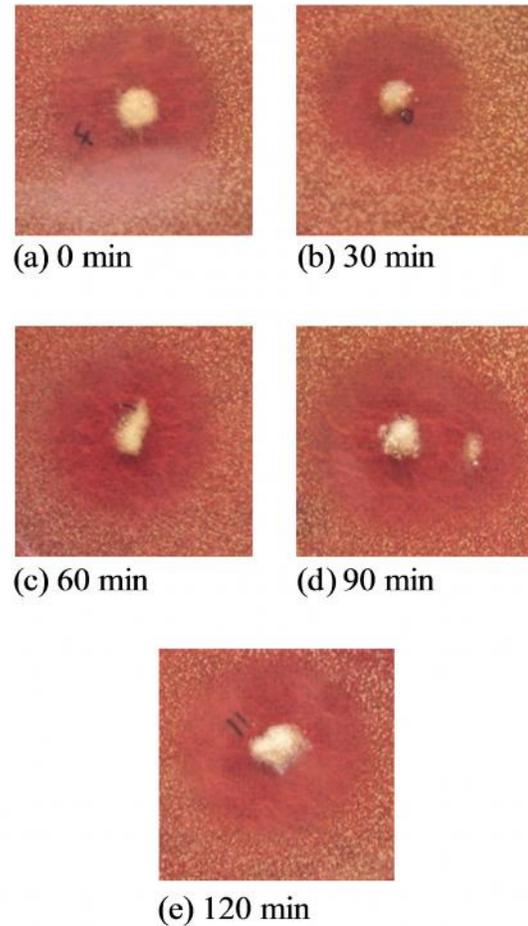


Fig. 5 Análisis de la actividad antimicrobiana de las muestras de ZnO_2 en cepas de *Bacillus subtilis*. Las muestras corresponden a diferentes tiempos de irradiación UV.

Las Figuras 5 y 7 muestran las imágenes de los análisis microbiológicos realizados para diferentes cepas. Para cada uno de los cultivos se colocaron muestras de nanopartículas de ZnO_2 obtenidas a diferentes tiempos de irradiación UV: (a) 0 min, (b) 30 min (c) 60 min y (d) tiene 120 min respectivamente.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos para las partículas de ZnO_2 en cepas de *Bacillus subtilis*. Se pueden observar en todas las muestras halos ligeramente opacos y grandes (entre 5 y 7 mm). La opacidad es indicativa de un crecimiento parcial de bacterias dentro del halo.

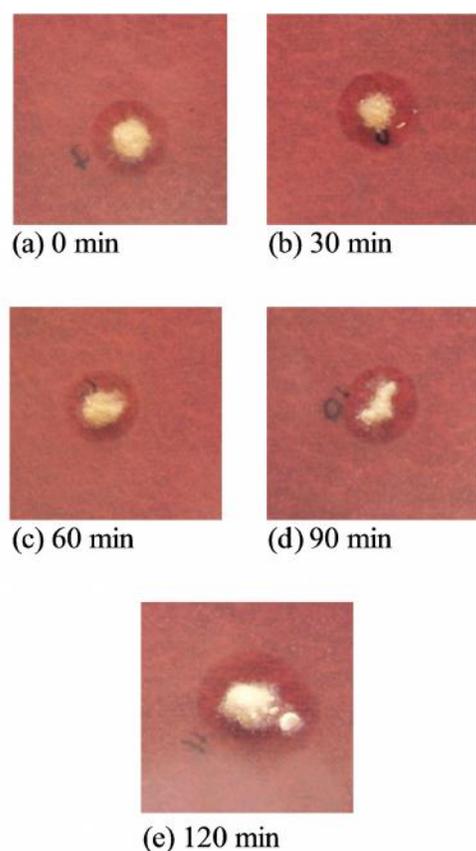


Fig. 6 Análisis de la actividad antimicrobiana de las muestras de ZnO_2 en cepas de *Escherichia coli*. Las muestras corresponden a diferentes tiempos de irradiación UV.

La Figura 6 presenta la imagen del análisis obtenidos para las nanopartículas de ZnO_2 en cepas de *Escherichia coli*.

En este caso se observan anillos muy pequeños (~ 2 mm) pero límpidos y transparentes. Lo que sería indicativo de un débil proceso bactericida del producto.

Finalmente la Figura 7 muestra la imagen de los análisis realizados para las nanoestructuras de ZnO_2 en cepas de *Staphylococcus aureus*. En este caso se observan halos de inhibición transparentes y muy grandes (~ 10 mm), lo que claramente mostraría la propiedad bactericida de las nanopartículas de ZnO_2 ante estas cepas.

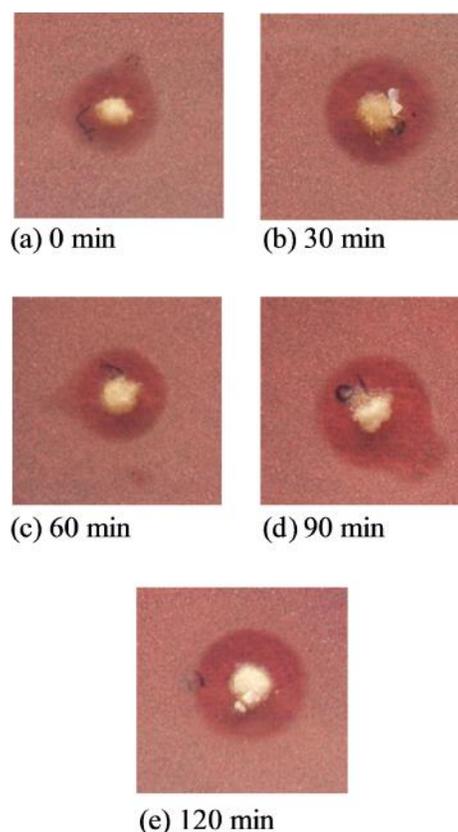


Fig. 7 Análisis de la actividad antimicrobiana de las muestras de ZnO_2 en cepas de *Staphylococcus aureus*. Las muestras corresponden a diferentes tiempos de irradiación UV.

DISCUSIONES

De los estudios de rayos X se observa que conforme se incrementa el tiempo de irradiación UV el tamaño promedio de cristalito se incrementa y, la microdeformación disminuye. Por otro lado las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran que esta técnica produce una distribución de nanopartículas uniforme.

Si bien es cierto que los análisis microbiológicos, se han desarrollado considerando una evaluación cualitativa y no se ha estandarizado la metodología para el estudio de las nanopartículas para agentes patógenos; se tiene que las nanopartículas de ZnO_2 estudiadas, presentan una buena actividad bactericida.

No se observa una relación entre el tiempo de irradiación UV y su propiedad bactericida, solo hay una diferencia entre las muestras obtenidas sin irradiar UV y las irradiadas, la muestra obtenida sin irradiar tiene un halo de inhibición con bordes irregulares no muy definida, mientras que las muestras obtenidas con irradiación UV presentan halos con bordes irregulares y más límpidos. Aún desconocemos cuales son los sitios activos, que debido a la radiación UV, se generan en las nanopartículas. Y estas a su vez presentan mayor carácter bactericida Este tema es en definitiva de gran interés para un estudio posterior.

CONCLUSIONES

Nanopartículas de ZnO₂ fueron sintetizadas por la ruta sol-gel empleando como agente externo radiación UV. El tamaño de los cristallitos determinado por DRX fue entre 6 y 9 nm con una presencia de microdeformación entre 0.19 y 0.24. Los nanocristales se encuentran conglomeradas en esferas que muestran una apariencia racimosa, que presentan tamaños entre 80 y 100 nm. Las nanopartículas evaluadas cualitativamente ante las cepas bacterianas seleccionadas presentaron una gran actividad antimicrobiana para omitir el *Staphylococcus aureus*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la bióloga Kety León por los análisis microbiológicos y al Dr. Alec Fischer por los análisis de microscopía electrónica de barrido. Uno de nosotros (R.C.) agradece al Instituto General de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (IGI-UNI) por la beca otorgada. El presente trabajo fue desarrollado bajo el auspicio del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnología del Perú (CONCYTEC) y del Instituto General de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (IGI).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Chen, W., et al.**, "Synthesis, Thermal Stability and Properties of ZnO₂ Nanoparticles". *J. Phys. Chem. C.*, 2009. **113**: p. 1320-1324.
2. **Ibarra, L., Alzorriz, M.**, "Effect of Temperature on the Crosslink Densities of Nitrile Rubber and Carboxylated Nitrile Rubber with Zinc Peroxide". *Journal of Applied Polymer Science*, 2002. **86**: p. 335-340.
3. **Ibarra, L., Marcos-Fernández, A., Alzorriz, M.**, "Mechanistic approach to the curing of carboxylated nitrile rubber (XNBR) by zinc peroxide/zinc oxide". *Polymer*, 2002. **43**: p. 1649-1655.
4. **Ibarra, L., Alzorriz, M.**, "Ionic Elastomers Based on Carboxylated Nitrile Rubber (XNBR) and Zinc Peroxide: Influence of Carboxylic Group Content on Properties". *J. of Appl. Polymer Science*, 2002. **84**: p. 605-615.
5. **Ohno, S., Aburatani, N., Ueda, N.**, "Blowing Composition". 1981: U.S.
6. **Hagel, R.**, "Verwendung von Zinkperoxid als Oxidationsmittel für Sprengstoffe und Pyrotechnische Gemische E". *Patentschrift*, Editor. 1984.
7. **Meleney, F. L., Harvey, H. D.**, "The Combined use of zinc peroxide and sulfanilamide in the treatment of chronic, undermining, burrowing ulcers due to the micro-Aerophilic Hemolytic Streptococcus". *Annals of Surgery* 1939: p. 1067-1094.
8. **Meleney, F. L.**, "Zinc Peroxide in Surgical Infections". *The American Journal of Nursing*, 1941. **41**(6): p. 645-649.
9. **Johnson, B. A., Meleney, F. L.**, "The antiseptic and detoxifying action of zinc peroxide on certain surgical aerobic, anaerobic and micro-Aerophilic Bacteria". *Annals of Surgery*, 1939. **109**(6).
10. **Hsu, C.-C., Wu, N. L.**, "Synthesis and photocatalytic activity of ZnO/ZnO₂ composite". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2005. **172**: p. 269-274.
11. **Sun, M., et al.**, "A simple and green approach for preparation of ZnO₂ and ZnO under sunlight irradiation". *Chemical Physics Letters*, 2007. **443**: pp. 342-346.
12. **Uekawa, N., et al.**, "Synthesis of ZnO Nanoparticles by Decomposition of Zinc Peroxide". *Chemistry Letters*, 2001: pp. 606-607.
13. **Uekawa, N., et al.**, "Nonstoichiometric properties of zinc oxide nanoparticles prepared by decomposition of zinc peroxide". *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2003. **5**: pp. 929-934.

14. **Cheary, R. W., Coelho, A.,** "A Fundamental Parameters Approach to X-ray Line-Profile Fitting". *J. Appl. Cryst.*, 1992. **25**: p. 109-121.
15. **Young, R. A.,** "The Rietveld Method". 2002, United States: Oxford University Press.
16. **Chapman, J., Sullivan, T., Regan, F.,** "Nanoparticles in Anti-Microbial Materials"

2012, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.

Correspondencia: mgomez@uni.edu.pe

Recepción de originales: marzo 2013

Aceptación de originales: junio 2013