

SÍNTESIS SONOQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CINC Y DE PLATA ESTABILIZADAS CON QUITOSANO. EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Ricardo Alvarado*, Federico Solera, José Vega–Baudrit

Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT). San José, Costa Rica. Correo electrónico: ricardoalvarado13@gmail.com

Recibido: Abril 2013; Aceptado: Agosto 2013

RESUMEN

La constante aparición de microorganismos multiresistentes ha elevado el esfuerzo por la búsqueda de materiales antimicrobianos efectivos para su aplicación en numerosas áreas. En el presente trabajo, se buscó lograr la síntesis sonoquímica de nanopartículas de plata (Ag–Np) y de óxido de cinc (ZnO–Np), empleando quitosano como agente estabilizante, para posteriormente evaluar sus propiedades antimicrobianas. Ambas nanopartículas formaron suspensiones coloidales estables. Las Ag–Np obtenidas resultaron esféricas de menos de 20 nm de diámetro y las ZnO–Np de menos de 100 nm. Se obtuvieron valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 6 y 38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (para Ag–Np y ZnO–Np respectivamente) en *E. coli* ATCC 25922 y de 4 y 36 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (para Ag–Np y ZnO–Np respectivamente) en *S. aureus* ATCC 25923. La concentración mínima bactericida (MBC) determinada para Ag–Np corresponde a 18 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (en *S. aureus* y *E. coli* respectivamente) mientras que en ZnO–Np se determinó superior a los 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambas bacterias. La diferencia entre ZnO–Np y Ag–Np puede deberse al efecto de tamaño. Se concluye que se logró desarrollar una metodología simple, rápida y escalable para la síntesis de nanopartículas con excelentes propiedades antimicrobianas.

Palabras claves: química verde, nanopartículas metálicas, ultrasonido, MIC, MBC

ABSTRACT

The constant appearance of multiresistant microorganisms has increased the efforts of finding effective antimicrobial materials. In this study, we aim to synthesize silver nanoparticles (Ag–NP) and zinc oxide (ZnO–NP) by sonochemistry, using chitosan as a stabilizing agent, to assess their antimicrobial properties. Both nanoparticles formed stable colloidal suspensions. The synthesized Ag–NP showed sphere-like morphology and a diameter inferior to 20 nm, while the ZnO–NP inferior to 100 nm. Both nanoparticles showed high antimicrobial activity. In the tests, values of minimum inhibitory concentration (MIC) of 6 and 38 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (for Ag–NP and ZnONp respectively) in *E. coli* ATCC 25922 were obtained; while 4 and 36 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (for Ag–NP and ZnO–NP respectively) in *S. aureus* ATCC 25923 were obtained. The minimum bactericidal concentration (MBC) for Ag–NP corresponded to 18 and 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (in *S. aureus* and *E. coli* respectively) whereas in ZnO–NP was determined above 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both bacteria. The difference between Ag–NP and ZnO–NP may be due to size effects. We conclude that a fast, simple and scalable method for the synthesis of nanoparticles with excellent antimicrobial properties was developed.

Keywords: Green chemistry, metallic nanoparticles, ultrasound, MIC, MBC

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, el uso excesivo de antibióticos ha facilitado la continua aparición y proliferación de microorganismos resistentes, propiciando que fenómenos como la multiresistencia sean cada vez más comunes [1,2].

Según menciona Taubes [3], el lapso durante el cual un nuevo fármaco es liberado y los primeros casos clínicos de resistencia microbiana son observados, no suele ser mayor a 2–4 años. Por otro lado, la situación empeora considerando que la tasa de creación y aprobación de fármacos

disminuye constantemente mientras que la tasa de aparición de microorganismos resistentes sigue en aumento [1, 2, 4].

Considerando esto, posibles estrategias para prevenir el fenómeno de resistencia podrían basarse en: (a) la sustitución/estricto control del uso de ciertos antibióticos hasta que los fenotipos resistentes hayan disminuido considerablemente; (b) el empleo de agentes sustitutos o complementarios que posean múltiples mecanismos de acción.

En este aspecto, la nanotecnología ofrece un amplio espectro de nuevas posibilidades en tanto a la elaboración de nuevos materiales con propiedades antimicrobianas [5–8]. Dentro de estos materiales las nanopartículas metálicas han resultado especialmente promisorias, en especial las nanopartículas de plata (Ag–Np) y de óxido de cinc (ZnO–Np). Ag–Np han sido extensamente estudiadas, por sus propiedades antimicrobianas, en áreas tan diversas como: la industria textil [9, 10], alimentación animal [11], aplicaciones con potencial médico [12, 13], y en el tratamiento de aguas [14–16]. Por otro lado, las ZnO–Np han sido aplicadas en revestimientos de latas de comidas y empaques de productos cárnicos [5,17] y aplicaciones en la industria médica, farmacéutica y cosmética han sido propuestas [17–18].

Numerosos métodos para la síntesis de ambas nanopartículas han sido diseñados. Sin embargo, la mayoría de estos consisten en procedimientos largos, complicados y/o tecnológicamente demandantes. Con tal superar estas limitantes, numerosas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de métodos de síntesis rápidos, ecoamigables y baratos; siendo el método sonoquímico uno de los más importantes [19–26].

En este método, las vibraciones ultrasónicas generadas provocan la compresión y relajación del líquido de manera alternativa ocasionando la aparición de microburbujas de vapor. Estas microburbujas (microcavitaciones) se expanden en la etapa de descompresión e implosionan violentamente durante la compresión generando millones de ondas de choque [19].

Por otro lado, la estabilización de las nanopartículas es un tema fundamental para muchas de sus aplicaciones. En este sentido, numerosos polímeros han sido empleados entre los que destacan: la polivinilpirrolidona (PVP) [27], polietilenglicol (PEG) [28], ácido polimetacrílico (PMMA) [29], poliacrilamida–goma guar [30], gelatina [21] y quitosano [31–33].

El quitosano es un polímero de poli(D–glucosamina) derivado de la deacetilación de la quitina (poli[N–acetil–D–glucosamina]) con propiedades de gran interés. Su capacidad antimicrobiana, antiinflamatoria, capacidad regeneradora (hueso y piel principalmente) y biocompatibilidad lo hacen un polímero sumamente atractivo [31, 32, 34]. Además, su gran abundancia natural y propiedades fisicoquímicas únicas (debido a la gran cantidad de grupos amino e hidroxilo libres) permiten su uso como agente estabilizante [33].

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar una metodología de síntesis y estabilización, para Ag-Np y ZnO-Np, de forma simple, escalable y ecoamigable. Además, la actividad antimicrobiana de ambas nanopartículas se determinó según su concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC).

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de nanopartículas. Se preparó óxido de cinc a partir de nitrato de cinc (50 mL de una solución 0,1 M) e hidróxido de sodio (50 mL de una solución 0,2 M). Se decantó el sobrenadante y el precipitado fue lavado 5 veces con agua *Milli-Q*. El precipitado se secó durante 16 horas, a 120°C, en una estufa.

Se prepararon 20 mL de una solución al 0,05% (m/v) ZnO, 0,1% (v/v) quitosano y aforado con agua *Milli-Q*. La solución fue sonicada por 90 minutos con un período de *pulse on* de 45 segundos, *pulse off* 15 segundos y una amplitud del 100%. El proceso fue realizado por triplicado. Por otro lado, las nanopartículas de plata fueron preparadas bajo un procedimiento previamente desarrollado por *Alvarado-Meza et al.* [35], su síntesis se realizó por triplicado.

Todos los procesos de sonicación se realizaron en un procesador ultrasónico *GEX 130 Cole-Parmer* (20 kHz) con una sonda de titanio de 6 mm de diámetro. Las soluciones de nanopartículas se llevaron a una concentración de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se realizaron los análisis de caracterización y se evaluó su actividad antimicrobiana.

Caracterización de las nanopartículas. Las pruebas espectrofotométricas realizadas consistieron en la verificación del ZnO sintetizado mediante FTIR (*Nicolet 6700, Thermo Scientific*) y la identificación de los picos de los plasmones de resonancia superficiales de Ag-Np mediante UV-Vis (*JascoV630*). Para obtener el espectro de Ag-Np, se diluyó la solución original en agua *Milli-Q* (1:5, Ag-Np:agua) y se observó el espectro entre los 700 y 300 nm de longitud de onda.

La distribución de tamaño se determinó mediante DLS empleando el equipo *Zetasizer Nano ZS90*, para esto se realizaron muestras “blanco” preparadas bajo el mismo procedimiento pero sin agregar AgNO_3 o ZnO (según el caso) y se les determinó la viscosidad e índice de refracción de cada una de estas con tal de hacer la corrección respectiva a los parámetros del equipo.

La visualización de las nanopartículas se realizó colocando una alícuota de una solución 1:10 (nanopartículas/agua) sobre mica. Se dejó secar y se realizó el análisis en el microscopio de fuerza atómica (*Asylum Research MFP-3DTM*).

Curvas de concentración en función de la absorbancia. Se realizó el establecimiento de las curvas de concentración en función de la absorbancia para cada microorganismos empleado. Se

emplearon las bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 (ambas provistas por el Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos, CEQIATEC). El procedimiento empleado se basó en el propuesto por Sarker et al. [36].

Determinación de la MIC. Inicialmente, se determinó el rango en el que se encontraba la concentración mínima inhibitoria. Para esto se colocaron volúmenes decrecientes de la solución de nanopartículas correspondiente ($400 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) cada uno de los pozos a excepción de los pozos entre B11 y G11 (Figura 1). Las nanopartículas de plata fueron colocadas en las filas [A, D] mientras que las de óxido de cinc de las filas [E, F].

Se agregaron $30 \mu\text{L}$ de medio *Mueller Hinton* 3,3X y $10 \mu\text{L}$ de resazurina 0,01% (m/v) a cada pozo. En las filas [B, G] agregó el respectivo microorganismos para una concentración final de $5\cdot 10^5 \text{ U.F.C mL}^{-1}$. Finalmente se llevó cada pozo a $100 \mu\text{L}$ con agua destilada estéril. En la columna 12 no se colocó ninguna solución.

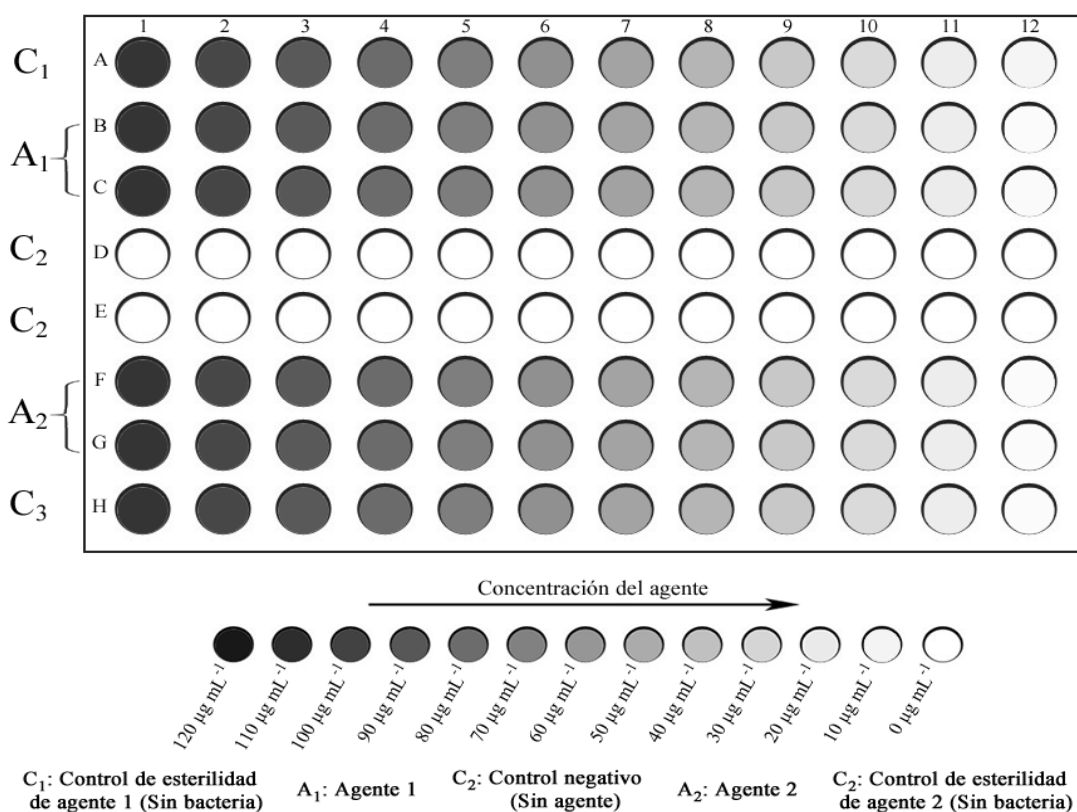


Figura 1. Diagrama de organización de los pozos en la determinación del intervalo de la MIC.

Se recubrieron los bordes con parafilm con tal de evitar la deshidratación de los pozos y se incubó durante 24 horas, a 37°C . Una vez transcurrido el período de incubación, se observaron cambios en la coloración de los pozos a simple vista. Se consideró como crecimiento microbiano todo cambio de color de azul a rosado, dado que se realizaron tres réplicas el estado (positivo o

negativo) fue determinado según el estado más frecuente dentro de las réplicas.

En la determinación real de la concentración mínima inhibitoria se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente pero empleando en la columna 1 la concentración mínima a la que el agente surtió efecto como inhibitorio del crecimiento, en las filas siguientes se emplearon diluciones en un gradiente de $-2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respecto a la columna anterior. Los ensayos se realizaron por triplicado en distintos períodos de tiempo para comprobar la repetibilidad del método.

Determinación de la MBC. Se tomaron 50 μL de dos pozos de una misma concentración y se cultivaron en una placa con *agar Mueller Hinton*. Esta determinación también fue realizada por triplicado para cada prueba.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

CARACTERIZACIÓN

Microscopía de fuerza atómica. La visualización de una muestra de la solución de nanopartículas de plata sonicada bajo el método diseñado por *Alvarado-Meza et al.* [35] demostró la presencia de partículas con una altura inferior a 10 nm. Por otro lado, se observó una menor cantidad de ZnO-Np respecto a Ag-Np, y un tamaño mayor de las partículas de ZnO. Cabe mencionar que en ninguna de las partículas se observaron agregadas o aglomeradas entre sí (Figuras 2 y 3).

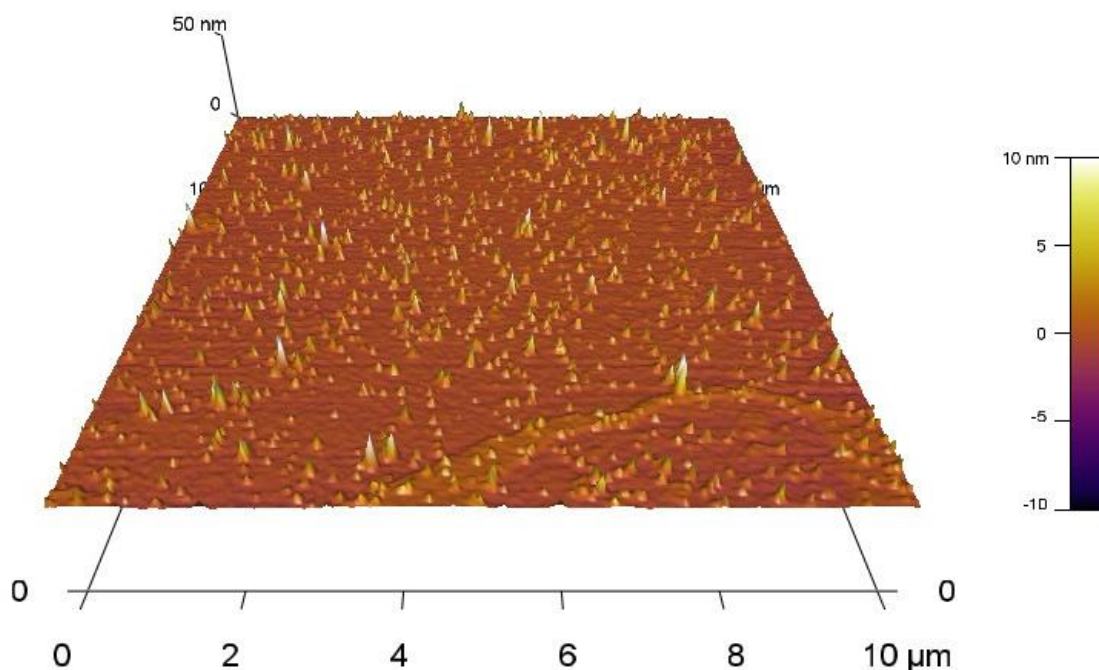


Figura 2. Imagen de microscopía de fuerza atómica de la solución de Ag-Np.

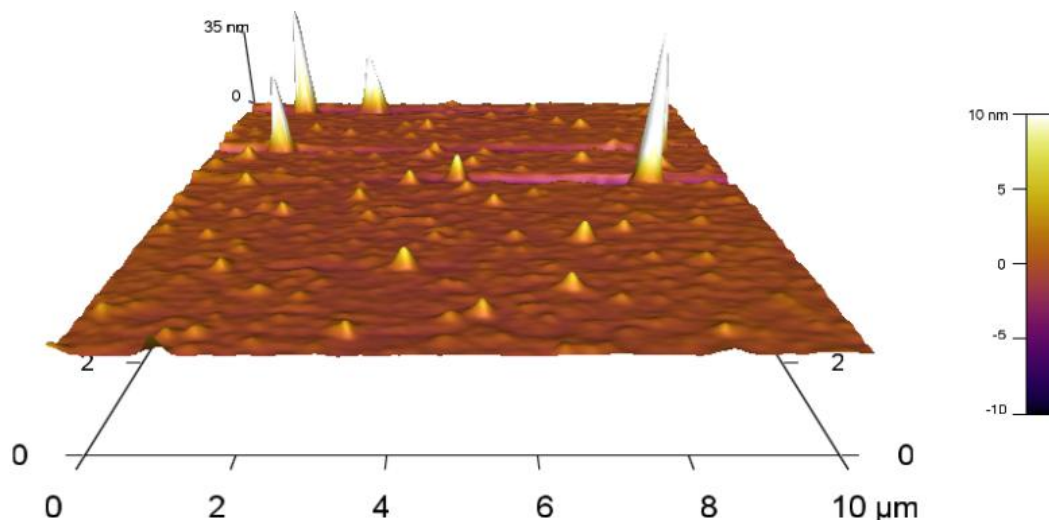


Figura 3. Imagen de microscopía de fuerza atómica de la solución de ZnO-Np.

Espectrofotometría. El análisis espectrofotométrico de las muestras de Ag-Np mostró un pico de absorción a los 414 nm de longitud de onda y una intensidad de 1,33 a los 5 días posteriores a su síntesis. A las cuatro semanas luego de su síntesis mostró un pico a los 434 nm de longitud de onda y con una intensidad de 2,09 mientras que la muestra analizada 8 semanas luego de su síntesis mostró su pico de absorción a 432 nm con una intensidad de 2,97 (Figura 4).

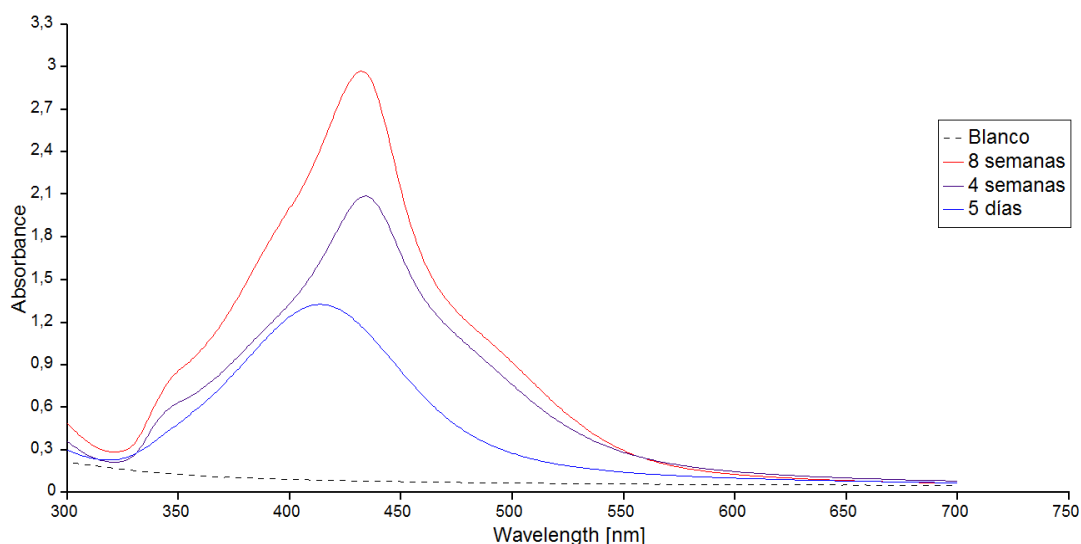


Figura 4. Espectros de absorción de las repeticiones del mejor método evaluado de Ag-NP. Línea punteada corresponde a solución blanco. Línea roja a repetición analizada a las 8 semanas de su síntesis. Línea morada a la repetición analizada a las 4 semanas de su síntesis. Línea azul repetición analizada 5 días de su síntesis.

El análisis del óxido de cinc sintetizado a partir de nitrato de cinc e hidróxido de sodio mostró

el típico pico cercano a los 500 nm correspondiente al enlace Zn–O (Fig. 5).

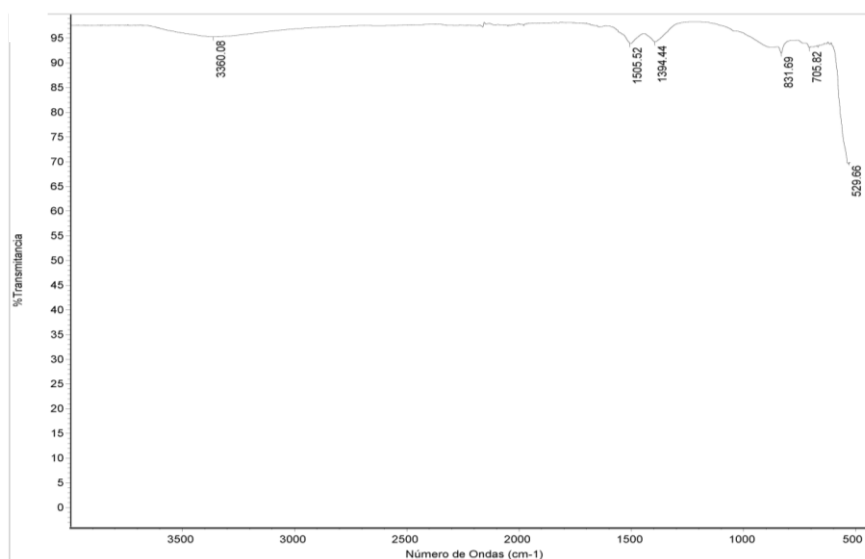


Figura 5. Espectro FTIR de la muestra de ZnO preparado.

DLS. Ag–Np mostraron un índice de polidispersión de 0,539 con diversos picos en el gráfico de intensidad. Debido a la presencia de múltiples poblaciones se realizaron análisis basados en el porcentaje del número total de partículas (evitando que se oculte la señal de las partículas más pequeñas). Se observó que el $(98 \pm 1)\%$ de las Ag–Np poseía un diámetro igual o inferior a los 20 nm. En el caso de ZnO–Np, se empleó el gráfico de intensidad debido a la presencia de un único pico en la gráfica. Según los datos obtenidos, el $(89 \pm 8)\%$ de las partículas poseían un tamaño inferior a los 100 nm.

Determinación de la MIC. En la determinación del intervalo de la MIC, en el caso de las Ag–Np se observó que era inferior a los $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tanto para *E. coli* ATCC 25922 como para *S. aureus* ATCC 29523. Las ZnO–Np mostraron una MIC inferior a los $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambas bacterias. Una vez determinado el intervalo se realizaron pruebas en un intervalo más estrecho con tal de identificar el valor real de la MIC. En el caso de *E. coli* ATCC 25922, no se observó crecimiento microbiano en concentraciones mayores o iguales a $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ag–Np, por lo que se determinó que la MIC se encuentra en el intervalo 4 a $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por otro lado, la MIC de las ZnO–Np se determinó entre 36 y $38 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Con respecto a *S. aureus* ATCC 25923, se determinó una MIC entre 2 y $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para Ag–Np y 32 a $34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ZnO–Np (Figura 6).

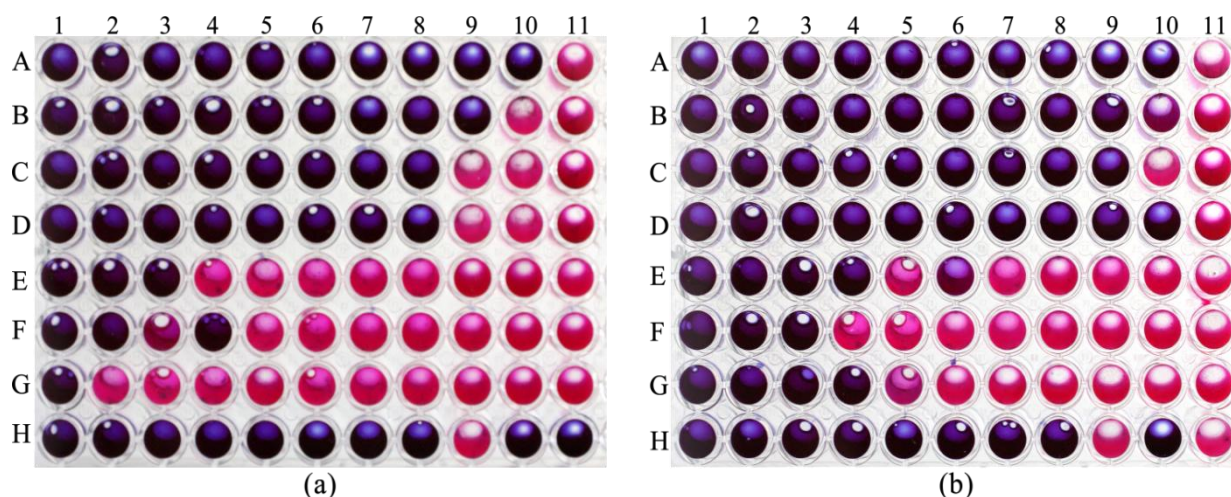


Figura 6. Muestra de la determinación de la MIC de Ag-Np y ZnO-Np. (a) Placa del cultivo de *E. coli* ATCC 25922, (b) Placa correspondiente al cultivo de *S. aureus* ATCC 25923 (a y b) En las filas A-D se agregó Ag-Np, se emplearon concentraciones de 20 a 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un gradiente de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre columnas (columna 1 máxima concentración, columna 11 concentración mínima); mientras que en las filas E-H se agregó ZnO-Np en concentraciones de 40 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un gradiente de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre columnas (columna 1 máxima concentración, columna 11 concentración mínima).

Por otro lado, en las pruebas de MBC para Ag-Np se obtuvo un valor de 18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en *S. aureus* ATCC 25923 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en *E. coli* ATCC 25922. ZnO-Np requieren concentraciones superiores a los 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para poseer actividad bactericida en ambos casos.

DISCUSIÓN

Síntesis de nanopartículas. En la síntesis de Ag-Np, la presencia del pico del plasmón superficial en el espectro UV-Vis se encuentra en el intervalo previamente reportado [6, 21, 37]. Considerando la intensidad de absorción y las imágenes de AFM, es posible afirmar que el quitosano, bajo las condiciones empleadas en el método, es un efectivo agente reductor.

La ausencia de precipitados en las soluciones de nanopartículas, a pesar de la gran energía cohesiva del agua [38], indica su adecuada estabilización por el quitosano. No obstante, considerando los resultados del espectro UV-Vis, se observa una clara tendencia de incremento en la longitud de onda a la cual se encuentra el pico de absorbancia. Lo anterior posiblemente se deba a agregación entre las partículas; sin embargo, al mantenerse como una solución coloidal es posible que el efecto de agregación se derive de la alta concentración y no a ineficiencia del agente estabilizante.

Dado que el número de picos de absorbancia en el espectro UV-Vis se ve afectado por la simetría de las nanopartículas [39-41]. Al observarse un único pico en el espectro UV-Vis se confirmó que las Ag-Np sintetizadas eran esféricas, sustentando los resultados obtenidos por

DLS (que se asume una morfología esférica en el análisis).

La morfología de las ZnO–Np no fue confirmada con otras técnicas por lo que los resultados obtenidos por DLS no se consideran del todo confiables. No obstante, su visualización en AFM muestra un tamaño considerablemente mayor al de Ag–Np.

Actividad antimicrobiana de Ag–Np. En las pruebas realizadas, las Ag–Np mostraron una elevada actividad antimicrobiana tanto contra bacterias Gram negativas como positivas. Dicha eficiencia puede atribuirse a los múltiples mecanismos de acción que presenta [42–45]:

a) Liberando de Ag^+ que interacciona con tioles en proteínas inactivando su función o formando conjugados tóxicos, así como interacciones con bases nitrogenadas del ADN,

b) Causando pérdida del gradiente protónico en la membrana celular lo cual inhibe el proceso respiratorio. Al desencadenar un aumento en la tasa respiratoria (con tal de mantener el gradiente de protones) se generan compuestos tóxicos como radicales superóxido e hidroxilo,

c) Generando especies reactivas de oxígeno (ROS) en su superficie con el oxígeno disuelto en el medio, y

d) Ocasionando daños mecánicos a la membrana celular.

Sin embargo, el aporte de individual de cada uno de los mecanismos de acción varía según propiedades de las partículas sintetizadas (tamaño, morfología, recubrimientos), condiciones experimentales (luminosidad, temperatura, pH, concentración de oxígeno) y tipos de microorganismos empleados. Por ejemplo, algunos autores señalan que la liberación de ROS es el mecanismo principal [6, 13], en otro estudio se observó que la liberación de Ag^+ resultaba determinante [7], mientras que en algunos casos el daño a la membrana se determinó como la causa principal [13, 46].

Con tal de establecer un marco de comparación adecuado, se seleccionó el estudio de *Fernández et al.* [47] los cuales emplearon condiciones experimentales similares a las realizadas en este trabajo. Este grupo de investigadores obtuvo una MIC de $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tanto para *E. coli* ATCC 25922 como para *S. aureus* ATCC 25923 con nanopartículas de 10 nm de diámetro; por otro lado, el acercamiento propuesto en este trabajo se alcanzó una MIC de $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el caso de *E. coli* ATCC 25922 y $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus* ATCC 25923 demostrando una actividad antimicrobiana superior a pesar de no tener una población uniforme de nanopartículas.

La diferencia en actividad podría deberse al agente estabilizante, *Fernandez et al.* [47] no emplearon ningún agente mientras que en el presente trabajo se utilizó quitosano (brindando una carga neta positiva a la superficie de las nanopartículas). En el caso de *E. coli*, la membrana externa posee una carga negativa, debido a la presencia de lipopolisacáridos con abundantes grupos fosfato y pirofosfato, permitiendo que nanopartículas cargadas positivamente puedan adherirse por

atracciones electrostáticas Sanpui et al. [48]. En *S. aureus* los ácidos teicoicos de la pared celular y los lipoteicoicos de la membrana le dan una carga neta negativa también Harris et al. [49]. La carga neta negativa de la superficie de ambas bacterias permitiría a las Ag-Np acumularse más fácilmente en la pared y membrana celular para posteriormente ocasionar la muerte de las bacterias por cualquiera de los mecanismos ya expuestos.

Por otro lado, el valor de MBC reportado por Fernández et al. [47] para *S. aureus* también resulta mucho mayor que el obtenido en estas pruebas. Estos autores reportan una MBC de $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en este Gram positivo mientras que en las pruebas realizadas se observó un valor de $18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando que las Ag-Np son más efectivos como agentes bacteriostáticos y bacteriocidas contra esta bacteria. Por otro lado, la MBC para *E. coli* reportada en la literatura es de $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ la cual es inferior a la obtenida en este trabajo ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Actividad antimicrobiana de ZnO-Np. Las nanopartículas de óxido de cinc sintetizadas también demostraron potencial como agentes antimicrobianos. Tal propiedad se debe a tres mecanismos de acción principales: (a) generación de ROS; (b) liberación de iones Zn^{2+} y (c) acumulación de ZnO-Np en la membrana celular [43, 50, 51].

La liberación de ROS en soluciones acuosas es desencadenada por la luz (tanto ultravioleta como visible) que genera pares electrón-hueco en la superficie de las ZnO-Np [51]. Lipovsky et al. [52] notaron que estos huecos en la capa de valencia de los átomos superficiales ocasionan la formación de radicales hidroxilo, oxígeno singlete o anión superóxido e incluso peróxido de hidrógeno. Por otro lado, Hirota et al. [53] notaron que incluso bajo condiciones de oscuridad las ZnO-Np son capaces de detener el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* lo cual lo atribuyen principalmente a la liberación del anión superóxido o a modos de acción alternativos de las ZnO-Np.

Las especies reactivas de oxígeno generadas ocasionan una fuga de contenido intracelular debido al daño oxidativo a las proteínas y lípidos de la membrana celular bacteriana, conllevando a una eventual muerte celular [43]. Aunado a esto, se ha determinado que dicho estrés oxidativo posee un débil potencial mutagénico en los microorganismos [45].

Algunos consideran además que tanto las Ag-Np como ZnO-Np deben parte de su acción antimicrobiana a la liberación de iones (Ag^+ y Zn^{2+} respectivamente). Ohira et al. [50] reportan que la cantidad de iones Zn^{2+} liberada por nanopulvos de ZnO es muy superior que la liberada por partículas de mayor tamaño de este mismo compuesto. Sin embargo, múltiples estudios realizados [18, 45, 52, 54], mencionan que su toxicidad no es significativa debido a que las nanopartículas no liberan gran cantidad de los mismos. Asimismo, se considera a los iones Zn^{2+} como agentes bacteriostáticos y no como bacteriocidas ya que estos suelen unirse a la membrana bacteriana

prolongando su fase *lag* a elevadas concentraciones, pero a bajas concentraciones son metabolizados dado que este es un ion metálico esencial en todo organismo.

Daños mecánicos debido a la superficie abrasiva de ZnO–Np también han sido reportados [45]. Xie et al. [17] demostraron que la exposición a ZnO–Np provoca cambios morfológicos incluyendo irregularidades superficiales y el fenómeno de *membrane blebbing*. Sin embargo, este estudio el recubrimiento con quitosano posiblemente redujo la capacidad abrasiva.

La actividad antimicrobiana observada en las ZnO–Np sintetizadas, al igual que en el caso de las Ag–Np, fue superior a la reportada en la literatura [55]. En el trabajo realizado por Emami–karvani et al. [55], la MIC determinada para *E. coli* fue de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y para *S. aureus* $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ mientras que en presente estudio se obtuvo a los 38 y $34 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (*E. coli* y *S. aureus*, respectivamente). La MBC reportada por estos autores también es considerablemente elevada, $16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin embargo, en el presente estudio no se logró obtener un valor exacto para esta. No obstante, considerando datos preliminares, se presume que se encuentra por debajo de los $60 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Emami–karvani et al. [55] no emplearon ningún recubrimiento sobre sus nanopartículas, por lo que es probable que la disminución en la MIC en el presente estudio se deba a las mismas razones, expuestas anteriormente, en el caso de Ag–Np.

Comparación Ag–Np y ZnO–Np. Se observó que los valores de MIC y MBC en ambas nanopartículas fueron mayores para *E. coli* que para *S. aureus* lo cual resultó inesperado. La pared de las Gram positivas constituye una mejor barrera ante agentes externos, dado su grosor y falta de regiones periplasmáticas, en comparación a la delgada capa de peptidoglicano de las Gram negativas [42]. Además, la presencia de porinas en la membrana externa facilita la entrada de partículas pequeñas y/o iones [56]. Aunado a lo anterior, *S. aureus* posee un mejor sistema de defensa contra daño oxidativo. Esto debido a una mayor producción de carotenoides y a un repertorio más amplio de genes activados bajo este tipo de estrés como lo son: superóxido dismutasas (sodA y sodM), catalasa (katA), tioredoxina reductasa (trxB), tioredoxina (trxA), alquil hidroxil peróxido reductasa (ahpCF) y endopeptidasa (clpC) mientras que *E. coli* cuenta únicamente con katA y ahpC Manna [57].

Por otro lado, multitud de estudios de Ag–Np muestran una mayor efectividad de Ag–Np contra Gram negativas respecto a Gram positivas [6, 47, 58–61] mientras que son pocas las investigaciones que muestran lo contrario y no mencionan posibles factores que produjeran dicha diferencia [62]. Mientras tanto, una mayor actividad de las ZnO–Np sobre las Gram positivas respecto a las Gram negativas sí ha sido reportada [45, 53, 54, 63]; sin embargo, tampoco hacen referencia a qué se debe tal selectividad.

Las Ag–Np demostraron una capacidad antimicrobiana muy superior respecto a ZnO–Np bajo las condiciones evaluadas. No obstante, esto podría deberse únicamente al *efecto tamaño*, considerando que las Ag–Np son más pequeñas, por lo que es necesario optimizar el proceso de síntesis de ZnO–Np. Además, es posible que la efectividad de las ZnO–Np se vea incrementada al exponerlas a luz debido a su acción fotocatalítica. Condiciones de moderada–alta exposición lumínica son frecuentes en las aplicaciones en donde dichas nanopartículas podrían ser empleadas, por lo que las ZnO–Np podrían resultar una alternativa mucho más barata y con una eficiencia similar a Ag–Np.

CONCLUSIONES

Se logró diseñar un procedimiento para la síntesis de nanopartículas de plata y de óxido de cinc empleando un acercamiento sonoquímico y estabilizándolas con quitosano. El acercamiento diseñado ofrece una alternativa rápida, ecoamigable y barata para la elaboración de dichos nanomateriales.

Las pruebas realizadas demuestran una fuerte actividad antimicrobiana de ambas nanopartículas tanto contra la bacteria *Gram negativa E. coli* ATCC 25922 como para la *Gram positiva S. aureus* ATCC 25923 siendo que los valores de MIC y MBC determinados en ambos modelos son considerablemente menores a los reportados en la literatura para nanopartículas de plata y de óxido de cinc bajo condiciones experimentales similares a las desarrolladas en este trabajo.

Agradecimientos. Los autores desean agradecer al Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) por brindar las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* empleadas. Y al Centro de Investigaciones en Biotecnología (CIB) y al Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC), ambos del ITCR, por facilitar el uso de equipos, materiales y reactivos así como la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Silbergeld EK, Graham J, Price LB "Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health", *Annu. Rev. Public Health*, **29**, 151 (2008)
- [2] Nikaido H "Multidrug resistance in bacteria", *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 119 (2009)
- [3] Taubes G "The bacteria fight back", *Science*, **321(5887)**, 356 (2008)
- [4] Lenski RE "Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance", *Int. Microbiol.*, **1(4)**, 265 (1998)
- [5] Yamamoto O, Komatsu M, Sawai J, Nakagawa ZE "Effect of lattice constant of zinc oxide on antibacterial characteristics". *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **15(8)**, 847 (2004)
- [6] Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH "Antimicrobial effects of silver nanoparticles", *Nanomedicine*, **3(1)**, 95 (2007)
- [7] Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM "Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities". *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12(4)**, 527 (2007)
- [8] Rajendra R, Balakumar C, Ahammed HAM, Jayakumar S, Vaideki K, Rajesh E "Use of zinc oxide nano particles for production of antimicrobial textiles", *IJEST*, **2(1)**, 202 (2010)

- [9] Tang B, Wang J, Xu S, Afrin T, Xu W, Sun L, Wang X "Application of anisotropic silver nanoparticles: multifunctionalization of wool fabric". *J. Colloid Interface Sci.*, **356**(2), 513 (2011)
- [10] Zhang F, Wu XL, Chen YY, Lin H "Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabric as an Antibacterial Textile Finish". *Fibers and Polymers*, **10**(4), 496 (2009)
- [11] Fondevila M, Herrero R, Casallas MC, Abecia L, Duchá JJ "Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs". *Animal Feed Science and Technology*. **150**(3–4), 259 (2009)
- [12] Lara HH, Ayala–Núñez NV, Ixtapan–Turrent L, Rodríguez–Padilla C "Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV–1". *J. Nanobiotechnology*, **8**, 1 (2010)
- [13] Xu H, Qu F, Xu H, Lai W, Andrew Wang Y, Aguilar ZP, Wei H "Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7". *Biometals*, **25**(1), 45 (2012)
- [14] Dror–Ehre A, Adin A, Markovich G, Mamane H "Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles". *Water Research*. **44**(8), 2601 (2010)
- [15] Sheng Z, Liu Y "Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms". *Water Res.*, **45**(18), 6039 (2011)
- [16] Lv YH, Liu H, Wang Z, Liu SJ, Hao LJ, Sang YH, Liu D, Wang JY, Boughton RI "Silver nanoparticle–decorated porous ceramic composite for water treatment". *J. Membrane Science*, **331**(1–2), 50 (2009)
- [17] Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi X "Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against Campylobacter jejuni". *Appl Environ Microbiol.*, **77**(7), 2325 (2011)
- [18] Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC "Size–dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles". *Langmuir*, **27**(7), 4020 (2011)
- [19] Mănoiu VS, Aloman A "Obtaining Silver Nanoparticles by Sonochemical Methods". *U.P.B. Bulletin Stiintific. Series B*, **72**(2), 179 (2010)
- [20] Zhu YP, Wang XK, Guo WL, Wang JG, Wang C, "Sonochemical synthesis of silver nanorods by reduction of silver nitrate in aqueous solution". *Ultrason Sonochem.*, **17**(4), 675 (2010)
- [21] Darroudi M, Zak AK, Muhamad MR, Huang NM, Hakimi M, "Green synthesis of colloidal silver nanoparticles by sonochemical method". *Materials Letters*, **66**(1), 117 (2012)
- [22] Yadav RS, Mishra P, Pandey AC "Growth mechanism and optical property of ZnO nanoparticles synthesized by sonochemical method". *Ultrason Sonochem.*, **15**(5), 863 (2008)
- [23] Pholnak C, Sirisathitkul C, Harding DJ "Characterizations of octahedral zinc oxide synthesized by sonochemical method". *J. Physics and Chemistry of Solids*, **72**(6), 817 (2011)
- [24] Lu XY, Liu ZY, Zhu Y, Jiang L "Sonochemical synthesis and photocatalytic property of zinc oxide nanoparticles doped with magnesium(II)". *Materials Research Bulletin*. **46**(10), 1638 (2011)
- [25] Ranjbar ZR, Morsali A "Sonochemical synthesis of a novel nano–rod two–dimensional zinc(II) coordination polymer; preparation of zinc(II) oxide nanoparticles by direct thermolyses". *Ultrason Sonochem.*, **18**(2), 644 (2011)
- [26] Banerjee P, Chakrabarti S, Maitra S, Dutta BK "Zinc oxide nano–particles—sonochemical synthesis, characterization and application for photo–remediation of heavy metal". *Ultrason Sonochem.*, **19**(1), 85 (2012)
- [27] Wang HS, Qiao XL, Chen JG, Wang XJ, Ding SY "Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles". *Materials Chemistry and Physics*, **94**(2–3), 449 (2005)
- [28] Luo C, Zhang Y, Zeng X, Zeng Y, Wang Y "The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles". *J. Colloid Interface Sci.*, **288**(2), 444 (2005)
- [29] Torres–Cisneros M, Yanagihara N, Gonzalez–Rolon B, Meneses–Nava MA, Ibarra–Manzano OG, May–Arriola DA, Sanchez–Mondragon J, Aguilera–Gomez E, Aguilera–Cortes LA "Synthesis and nonlinear optical behavior of Ag nanoparticles in PMMA". *Microelectronics J.*, **40**(3), 621 (2009)
- [30] Abdel–Halim ES, El–Rafie MH, Al–Deyab SS "Polyacrylamide/guar gum graft copolymer for preparation of silver nanoparticles". *Carbohydrate Polymers*, **85**(3), 692 (2011)
- [31] Twu YK, Chen YW, Shih CM "Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions". *Powder Technology*, **185**(3), 251 (2008)
- [32] Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X "The synthesis of chitosan–based silver nanoparticles and their antibacterial activity". *Carbohydr Res.*, **344**(17), 2375 (2009)
- [33] Tran HV, Tran LD, Ba CT, Vu HD, Nguyen TN, Pham DG, Nguyen PX "Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan– based silver nanoparticles". *Colloids Surf A*, **360**(1–3), 32 (2010)
- [34] Rodríguez–Argüelles MC, Sieiro C, Cao R, Nasi L "Chitosan and silver nanoparticles as pudding with raisins with antimicrobial properties". *J. Colloid Interface Sci.*, **364**(1), 80 (2011)

- [35] Alvarado–Meza R, Solera–Jiménez F, Vega–Baudrit JR "Evaluation of a sonochemical method for the synthesis of silver nanoparticles using alkali treated chitosan as a coating agent" Laboratorio Nacional de Nanotecnología: Datos no publicados
- [36] Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y "Microtitre plate–based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals". *Methods*, **42**(4), 321 (2007)
- [37] Wei D, Qian W "Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent". *Colloids Surf B*, **62**(1), 136 (2008)
- [38] Ramsden J *Essentials of Nanotechnology*. Ventus Publishing ApS. 126 (2009)
- [39] Sosa IO, Noguez C, Barrera RG "Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes". *J. Physical Chemistry B*, **107**(26), 6269 (2003)
- [40] Hutter E, Fendler JH "Exploitation of localized surface plasmon resonance". *Advanced Materials*. **16**(19), 1685 (2004)
- [41] Pal S, Tak YK, Song JM "Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram–negative bacterium *Escherichia coli*". *Appl Environ Microbiol.*, **73**(6), 1712 (2007)
- [42] Rai M, Yadav A, Gade A "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials". *Biotechnol Adv.*, **27**(1), 76 (2009)
- [43] Huh AJ, Kwon YJ "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era", *J. Control Release*. **156**(2), 128 (2011)
- [44] Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK "Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug–resistant bacteria". *J. Appl Microbiol.*, **112**(5), 841 (2012)
- [45] Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, de Larramendi IR, Rojo T, Serpooshan V, Parak WJ, Mahmoudi M "Antibacterial properties of nanoparticles", *Trends Biotechnol*. **30**(10), 499 (2012)
- [46] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ "The bactericidal effect of silver nanoparticles". *Nanotechnology*, **16**(10), 2346 (2005)
- [47] Fernandez EJ, Garcia–Barrasa J, Laguna A, Lopez–de–Luzuriaga JM, Monge M, Torres C "The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach". *Nanotechnology*, **19**(18), 185602 (2008)
- [48] Sanpui P, Murugadoss A, Prasad PV, Ghosh SS, Chattopadhyay A "The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag–nanoparticle composite". *Int J. Food Microbiol.*, **124**(2), 142 (2008)
- [49] Harris LG, Foster SJ, Richards RG "An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review", *Eur Cell Mater.*, **4**, 39 (2002)
- [50] Ohira T, Yamamoto O "Correlation between antibacterial activity and crystallite size on ceramics". *Chemical Engineering Science*, **68**(1), 355 (2012)
- [51] Wang Y, Zhang Q, Zhang CL, Li P "Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano–ZnO composite nanofibrous membranes". *Food Chemistry*, **132**(1), 419 (2012)
- [52] Lipovsky A, Tzitrinovich Z, Friedmann H, Applerot G, Gedanken A, Lubart R "EPR Study of Visible Light–Induced ROS Generation by Nanoparticles of ZnO", *J. Phys. Chem. C.*, **113**(36), 15997 (2009)
- [53] Hirota K, Sugimoto M, Kato M, Tsukagoshi K, Tanigawa T, Sugimoto H "Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions", *Ceramics International*, **36**(2), 497 (2010)
- [54] Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A "Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems", *Appl. Phys Lett.*, **90**(213902), 2139021 (2007)
- [55] Emami–karvani Z, Chehrizi P "Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram–positive and Gram–negative bacteria". *African J. Microbiology Research*, **5**(18), 1368 (2012)
- [56] Brocklehurst KR, Morby AP "Metal–ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene–array technology", *Microbiology*, **146**(9), 2277 (2000)
- [57] Manna AC "Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles". En: *Nano–Antimicrobials*, N. Cioffi M. Rai (eds). Springer–Verlag Berlin Heidelberg 2012
- [58] Jung WK *et al.* "Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*". *Appl Environ Microbiol.*, **74**(7), 2171 (2008)
- [59] Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttgupta SP, Mukherji S "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles", *Acta Biomater.*, **4**(3), 707 (2008)
- [60] Esteban–Tejeda L, Malpartida F, Esteban–Cubillo A, Pecharroman C, Moya JS "Antibacterial and antifungal activity of a soda–lime glass containing copper nanoparticles", *Nanotechnology*, **20**(50), 505701 (2009)

- [61] Nithya R, Ragunathan R "Synthesis of Silver Nanoparticle Using Pleurotus Sajor Caju and Its Antimicrobial Study", *Dig J. Nanomater Bios.*, **4(4)**, 623 (2009)
- [62] Cho KH, Park JE, Osaka T, Park SG "The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient", *Electrochimica Acta*, **51(5)**, 956 (2005)
- [63] Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G "Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation", *Nanomedicine*, **7(2)**, 184 (2011)