

SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE CUO, SNO Y SU EFECTO TOXICO EN *E. COLI* ATCC 4157

A.Chávez¹, F. Paraguay², F. Vasquez³, E. Orrantía, M.A. Luna⁵

¹CIMAV, Chihuahua, México, antonía.luna@cimav.edu.mx, ²CIMAV, Chihuahua, México, adriana.chavez@cimav.edu.mx, ³CIMAV, Chihuahua, México, francisco.paraguay@cimav.edu.mx, ⁴CIMAV, Chihuahua, México, felipe.vasquez@cimav.edu.mx, ⁵CIMAV, Chihuahua, México, erasmo.orrantia@cimav.edu.mx,

ABSTRACT

Nanomaterials(NMs) are drawing the attention of a large number of active economic sectors due to their potential in a wide range of applications. In parallel, there is a great interest to determine the toxicity of NMs, since various studies have indicated their toxic effect to biological systems. In this work CuO and SnO NPs were synthesized and they were characterized using advanced microscopic techniques, in order to evaluate the toxic effect of NPs in *E. coli* ATCC 4157. The NPs toxicity was evaluated by exposing different concentrations of CuO (10-200 ppm) and SnO (10-300 ppm) to *E. Coli*. The cell activity was determined through plate counting (Milles-Misrra technique) and minimal inhibitory concentration (MIC) assay (using resazurine as activity indicator).

The characterization results obtained by transmission and emission electronic microscopy indicated that CuO NPs had spherical morphology and size of 5-10 nm. In the case of SnO NPs, they showed a flower-type morphology (formed by rods of 50-750 nm). Toxicity assays (by plate counting) indicated that CuO NPs decreased the activity of *E. coli* (30%) at 100 ppm. In the other hand, SnO NPs showed the MIC value at 250 ppm. In conclusion, *E. coli* was more sensitive to CuO NPs. However, CuO and SnO NPs had different morphology and size.

Keywords: Toxicity, nanoparticles, *E. coli*, resazurina

RESUMEN

Los nanomateriales(NMs) están llamando la atención en diversos sectores económicos debido a su potencial de aplicaciones. Así mismo hay gran interés por conocer la toxicidad de NMs, ya que varios estudios han indicado su toxicidad en sistemas biológicos. En el presente trabajo se sintetizaron las NPs (CuO y SnO) y se caracterizaron por técnicas de microscopía de alta resolución, con el fin de evaluar su efecto tóxico en *E. coli* ATCC 4157. La toxicidad se evaluó exponiendo *E. coli* a diferentes concentraciones de NPs de CuO (10-200 ppm) y SnO (10-300 ppm). La actividad de las células se determinó por conteo en placa (técnica de Milles-Misrra) y ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) con resazurina como indicador de la actividad.

Los resultados de caracterización por microscopía electrónica de transmisión y barrido indicaron que las NPs de CuO tenían forma esférica y tamaño de 5-10 nm. En cambio las NPs de SnO tuvieron morfología tipo flor (palillos entre 50-1500 nm). Los ensayos de toxicidad (conteo en placa) indicaron que las NPs de CuO disminuyeron la actividad de *E. coli* (30%) a partir de 100 ppm. Por otro lado, las NPs de SnO mostraron una CMI a 250 ppm. En conclusión *E. coli* fue más sensible a las NPs de CuO. Sin embargo, las NPs de CuO y SnO tienen diferente morfología y tamaño.

Palabras clave: Toxicidad, nanopartículas, *E. coli*

INTRODUCCIÓN

Actualmente la nanotecnología se considera un área de gran avance en la ciencia, la cual ha tocado muchas esferas de servicios de utilidad incluyendo, productos de consumo, cuidado de la salud, transporte, energía, agricultura, medicina, etc. [6]. En los últimos 20 años se han diseñado y sintetizado gran variedad de materiales en escala nanométrica (1 a 100 nm), denominados nanomateriales (NMs). Éstos poseen características únicas como: tamaño muy pequeño, área de superficie grande, reactividad alta, etc. [7].

En particular, las nanopartículas (NPs) inorgánicas están adquiriendo gran interés en una amplia gama de aplicaciones industriales, manufactura, cuidado personal, ambiental, etc. [8]. Las NPs de CuO se han utilizado como agentes antimicrobianos, preservadores de madera, en pinturas anti-incrustantes, etc. [3]. Por su parte las NPs de SnO se han evaluado como sensores de gases, en especial aquellas con morfologías tipo flor debido a su alta sensibilidad [9]. El uso extenso de NMs conlleva su liberación en el ambiente, lo cual ha generado gran preocupación a nivel público, académico y científico en relación al potencial de toxicidad en sistemas biológicos y salud humana. De hecho, estudios previos han indicado el efecto tóxico de los NMs en células humanas, bacterias y organismos acuáticos [4]. La magnitud de la toxicidad depende de muchos factores, como tipo de nanomaterial, tamaño, composición y carga en la superficie, morfología, etc. En este sentido, varios científicos coinciden en destacar la gran importancia de la caracterización apropiada de los NMs en estudios de toxicidad [1].

Actualmente hay técnicas de alta resolución para la caracterización de NMs, como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido acopladas a detectores de energías de rayos x (EDS, EDX), útiles en la determinación de la morfología, tamaño de partícula primario y composición elemental. Otras técnicas útiles son difracción de rayos x, microscopía electrónica confocal, etc. [7].

En este trabajo se evaluó la toxicidad de NPs de CuO (esféricas) y SnO (tipo flor) en *E. coli*, la cual es una bacteria relevante del ambiente. Ambas NPs se sintetizaron y caracterizaron para conocer la morfología, tamaño y composición. Estudios con organismos simples tienen la ventaja de efectuarse en forma rápida y sencilla comparado con estudios con células humanas. Además las bacterias son organismos que estarían sujetos a exposiciones primarias de NPs (disposición o descargas accidentales), por lo que son un buen modelo en estudios ecotoxicológicos.

OBJETIVO

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de CuO y SnO, con el fin de evaluar su efecto tóxico en el modelo biológico *E. coli*.

METODOLOGIA

SINTESIS DE NANOPARTICULAS

Las NPs de CuO se sintetizaron mediante el método de precipitación alcalina [5], a partir de una solución de acetato de cobre 0.02 M (300 mL) adicionada con 1 ml de ácido acético glacial. Esta mezcla se llevó a 100°C con agitación constante y se le añadieron 0.4 g de NaOH. La agitación se mantuvo por 30 min y después se enfrió (temperatura ambiente). Las NPs se separaron por centrifugación (10,000 rpm, 30 min) y se le hicieron dos lavados con agua destilada. Las NPs lavadas y libres de agua se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en un recipiente seco. La síntesis de NPs de SnO se realizó por un método hidrotérmico, partiendo de una solución con 0.5 g de SnCl₄ y 0.18 g de NaOH en 15 ml de agua tridestilada. La mezcla se mantiene en agitación constante y se le agrega etanol. Posteriormente se realizó el tratamiento hidrotérmico en una autoclave a 200°C durante 48 h. Finalmente, las NPs de SnO se recuperaron por secado 80°C

CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs

La morfología, tamaño primario y composición de las NPs se caracterizó por microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB) acoplada a espectrometría de energía de dispersión (EDS). Los patrones de cristalinidad de las NPs se obtuvieron por difracción de rayos X (DRX).

EFFECTO TOXICO DE LAS NPs DE CuO EN *E. coli*

La evaluación del efecto tóxico de las NPs se realizó mediante la exposición de *E. coli* a varias concentraciones de las NPs. Para lo cual, las células (1×10^9 células/mL, obtenidas de un cultivo incubado por 12 h) se incubaron en tubos de ensayo con medio LB (diluido, 0.1X) y con diferentes concentraciones de las NPs, a 200 rpm y 37 °C. La viabilidad de las células se determinó mediante el conteo en placa de muestras que se tomaron a diferentes tiempos de

incubación (0, 2, 6 y 25 h). El conteo en placa se realizó en base a la técnica de Milles-misrra. El porcentaje de la actividad de las células expuesta a NPs se estimó en base al control (células sin exponer a las NPs). Justo un momento antes de realizar los ensayos de toxicidad, se prepararon las dispersiones stock de las NPs en buffer de fosfatos (5 mM) a pH 7 y se sonicaron durante 15 min en un sonicador de baño.

ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA PARA NPs DE SnO

El ensayo para estimar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se basó en el uso del indicador resazurina, el cual en su forma oxidada presenta un color azul y en su forma reducida cambia a color rojo fluorescente. Los ensayos con células activas reducen el colorante, notándose un cambio de azul a rojo en el medio de cultivo. Los ensayos de CMI se realizaron en placas de 96 pozos con medio LB (0.1X diluido) inoculados con *E. coli* (1×10^7 células/mL) y con diferentes concentraciones de las NPs. También se incluyeron controles positivos (células sin exposición a NPs) y controles negativos (medio con NPs sin células). Las placas de los ensayos se incubaron 24 h a 37°C, pasado este tiempo se adicionó las resazurina para determinar la actividad de las células. La concentración mas baja de NPs que no causó un cambio de color azul a rojo en el medio de cultivo se consideró como la CMI. EL control con NPs solas, se incluyó para descartar cualquier reacción de las NPs con el indicador resazurina.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs DE CuO y SnO

La caracterización de las NPs se llevó a cabo por MEB y MET. En la Figura 1a se muestra la imagen MET de las NPs de CuO en donde se observa un tamaño de 5-10 nm y con forma esférica. Tanto la morfología como el tamaño de las NPs de CuO fueron muy similares a lo que se indicó en el reporte que tomamos como referencia para la síntesis [5]. En el caso de las NPs de SnO se presenta una imagen de MEB, donde se observa una morfología tipo flor con tamaños de 100-500 nm. Estas estructuras de tipo flor de NPs de SnO son morfologías nuevas que se están estudiando por su alta sensibilidad para sensar gases [9].

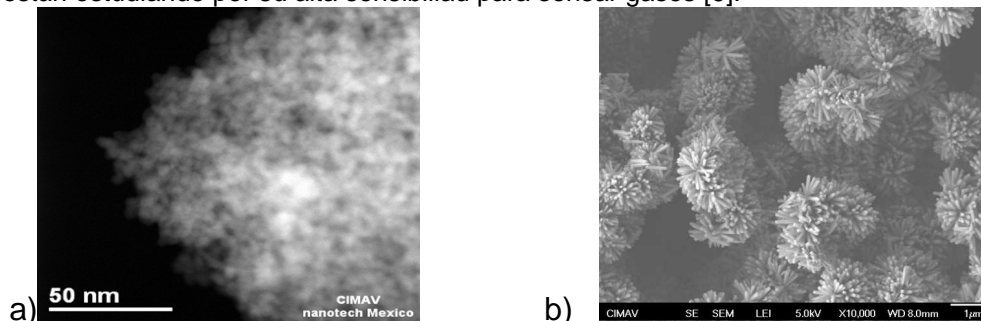


Figura 1 Imagen MET de NPs de NPs de CuO(a) y NPs de son (b)

EFEECTO TOXICO DE LAS NPs DE CuO EN *E. coli*

En este ensayo se usó como modelo biológico las bacteria *E. coli* ATCC 4157, la cual se expuso a diferentes concentraciones de NPs de CuO (10, 100 y 200 ppm). En la Figura 2 se muestra el porcentaje de actividad de *E. coli* (en base al control, células sin exponer a NPs) en los tratamientos a diferentes concentraciones de NPs de CuO. Notándose que hubo una disminución en la actividad celular (30%) a partir de 100 ppm con 24 h de exposición. En el caso de la exposición de las células a 200 ppm de NPs de CuO, se notó un inhibición de la actividad en un tiempo de exposición más corto (2 h). En estudios previos de toxicidad de NPs de CuO con tamaños similares, se ha reportado que *E. coli* resiste altas concentraciones de NPs de CuO. Lo cual se atribuye a que esta bacteria activa su sistema de defensa a metales pesados-efflux para bombear extracelularmente el cobre citoplasmático a través de la activación secuencial de las proteínas multinivel tipo-Cpx (ATPasa y RND) [3]. Sin embargo, en otros estudios se ha reportado inhibición considerable (50%) de *E. coli* a partir de 28.6 ppm de NPs de CuO [2]. Aunque en ese estudio las NPs eran de diferente tamaño (20-30 nm), con morfología irregular y

fueron adquiridas comercialmente (usualmente tienen impurezas del proceso de síntesis). Lo cual puede influir en los resultados de toxicidad.

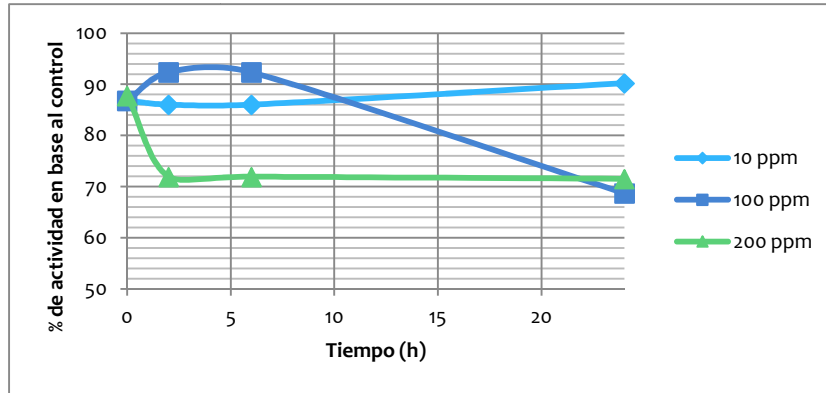


Figura 2 Porcentaje de la actividad de *E. coli* ATCC 4157 en respuesta a diferentes tiempos y concentraciones de exposición de NPs de CuO

CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA

En el ensayo de CMI se probaron diferentes concentraciones de las NPs de SnO (10 a 3000 ppm). En este caso se incluyeron concentraciones altas, ya que en la literatura hay antecedentes de que este tipo de NPs no son muy reactivas. Por lo que se espera obtener inhibición de la actividad de *E. coli* a concentraciones más altas que las NPs de CuO. En la figura 3 se muestran los resultados de cambio de color de la resazurina oxidada (azul) y forma reducida (rojo) en ensayos de exposición de *E. coli* a varias concentraciones de NPs de SnO. Ahí se nota claramente que a partir de 250 ppm de NPs de SnO, las bacterias pierden actividad, ya que no son capaces de reducir la resazurina (se mantiene el color azul correspondiente a la resazurina oxidada). Indicando que la resazurina no se reduce completamente por las células expuestas. En base a lo anterior, la CMI de NPs de SnO en *E. coli* fue de 250 ppm con un inóculo de 1×10^7 UFC/ml.

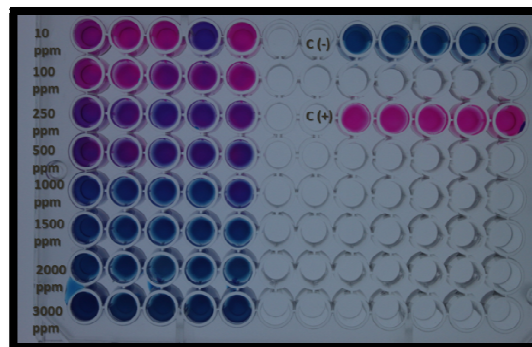


Figura 3 Ensayo de CMI con *E. coli* expuesta a varias concentraciones de NPs. El ensayo se realizó en placa de 96 pozos, incluyendo control positivo (células sin exponer a NPs) y negativo (NPs solas). El indicador utilizado para detectar la actividad de células fue resazurina.

CONCLUSIONES

La bacteria *E. coli* ATCC 4157 mostró inhibición considerable en su actividad cuando se expuso a concentraciones altas de NPs de CuO (>100 ppm) y SnO (>250 ppm). Notándose que *E. coli* tuvo mayor sensibilidad a las NPs de CuO. Sin embargo, las NPs de CuO y SnO tienen diferente

morfología y tamaño.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACyT por el apoyo con la beca de doctorado a A. Chávez y F. Vázquez. También se agradece el apoyo a Wilber Antunez F. por su apoyo en los análisis de SEM y TEM.

REFERENCIAS

- [1] Arora S *et al* (2012) Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 258, 151-165.
- [2] Baek Y & An Y (2011) Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Streptococcus aureus*, *Sci. Total Environ.*, 409, 1603 – 608.
- [3] Gunawan C *et al* (2011) Cytotoxic origin of copper(II) oxide nanoparticles: Comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts, *ACS Nano*, 5, 7214-7225.
- [4] Kahru A & Dubourguier HC (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology, *Toxicol.*, 269, 105-119.
- [5] Lanje AS *et al* (2010) Synthesis and optical characterization of copper oxide nanoparticles, *Advances Appl. Sci. Research*, 1, 36-40.
- [6] Ju-Nam Y & Lead J (2008) Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications, *Sci. Total Environ.*, 400, 396–414.
- [7] Marquis B *et al* (2009) Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *The Royal Society of Chemistry*, 134, 425-439.
- [8] Schrand AM *et al* (2010) Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment, *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnol.*, 2, 544-568.
- [9] Zhang J *et al* (2009) Facile synthesis of highly ethanol-sensitive SnO₂ nanoparticles, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 139, 369-374.