

## SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE $ZnO_2$ , EMPLEANDO ULTRASONIDO: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y MORFOLÓGICA PARA APLICACIONES BACTERICIDAS

Roberto Colonia<sup>a</sup>, Vanessa C. Martínez<sup>a</sup>, José L. Solís<sup>a</sup>, Mónica M. Gómez<sup>\*a</sup>

### RESUMEN

El peróxido de zinc ( $ZnO_2$ ) fue sintetizado en forma de nanopartículas por medio de la ruta sol-gel por la que se obtuvo un gel particulado. Para la síntesis se empleó acetato de zinc dihidratado ( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30% en un medio acuoso sometido a sonicación. 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 del nanopolvo, se realizó por microscopía electrónica de transmisión y barrido. Para explorar las propiedades bactericidas del  $ZnO_2$  se realizó pruebas preliminares en las que se expuso este material a las cepas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, y se obtuvo que las nanopartículas presentan buena propiedad bactericida.

**Palabras clave:** peróxido de zinc, nanopartículas, bactericida, sonicación.

### NANOPARTICLE SYNTHESIS OF ZINC PEROXIDE: STRUCTURAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION FOR BACTERICIDAL APPLICATIONS

#### 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% in an aqueous solution with sonication. The structure of the  $ZnO_2$  nanoparticles was characterized by X-ray diffraction. While the morphology and the cluster size were determined using scanning and transmission electron microscopy. For a preliminary evaluation of the bactericidal properties of the  $ZnO_2$ , the material was exposed to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, and the nanoparticles presented good bactericidal properties.

**Key words:** zinc peroxide, nanoparticles, bactericidal, sonication.

#### 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 en 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 4,5 eV<sup>1</sup>, además, es ampliamente utilizado en la industria, tal como la del caucho<sup>2,4</sup>, el procesamiento de plásticos, como oxidante para explosivos y mezclas pirotécnicas<sup>5</sup>, y en los últimos años, en la industria cosmética y farmacéutica, como un aditivo antiséptico en el tratamiento de las enfermedades

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú  
mgomez@uni.edu.pe

de la piel<sup>6-8</sup>. También el  $ZnO_2$  puede usarse en procesos de fotocatalisis<sup>9</sup> y como precursor para la preparación de nanopartículas de  $ZnO$ <sup>10-12</sup>.

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 de 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 sonicación<sup>13</sup> durante diferentes periodos de tiempo.

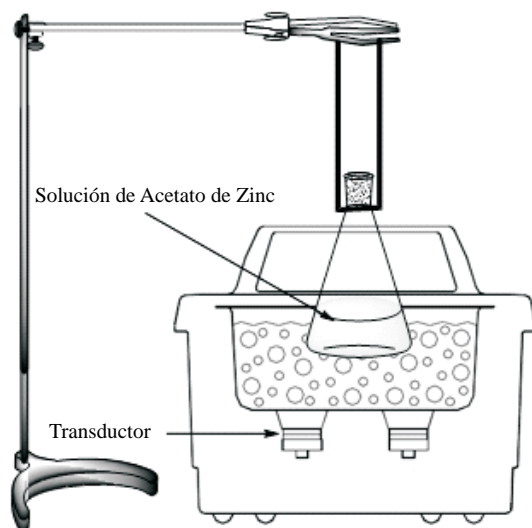
## PARTE EXPERIMENTAL

### *Síntesis de las nanopartículas de $ZnO_2$*

Para la síntesis de las nanopartículas de  $ZnO_2$  se utilizó la ruta sol-gel; para ello se preparó una solución precursora empleando 5ml de  $H_2O_2$  al 30% con 50 ml de  $H_2O$  y se dejó sonicar la solución por un periodo de 2 min. Luego se disolvió 1g de  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  en la solución de  $H_2O_2$ , e igualmente se dejó sonicar por un periodo de 5 min hasta obtener una solución homogénea. Con esta solución se procedió a la sonicación de la solución precursora; para esto se posicionó el matraz dentro del sonicador de tal forma que se genere el mayor número de implosiones (figura 1).

Luego de un tiempo determinado de sonicación se centrifugó el coloide para poder separar las partículas del gel formadas. El proceso de centrifugación se realizó durante 20 min a 5000 rpm. Las partículas obtenidas fueron lavadas dos veces con agua destilada. Para secar el gel se dejó a 80°C durante 12 h.

Para la síntesis de las nanopartículas de  $ZnO_2$  se utilizó el sonicador ultrasónico marca Branson Modelo MT 1510 (42kHz, 75 W).



**Figura 1.** Montaje experimental empleado para la síntesis de nanopartículas de  $ZnO_2$  usando ultrasonido.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

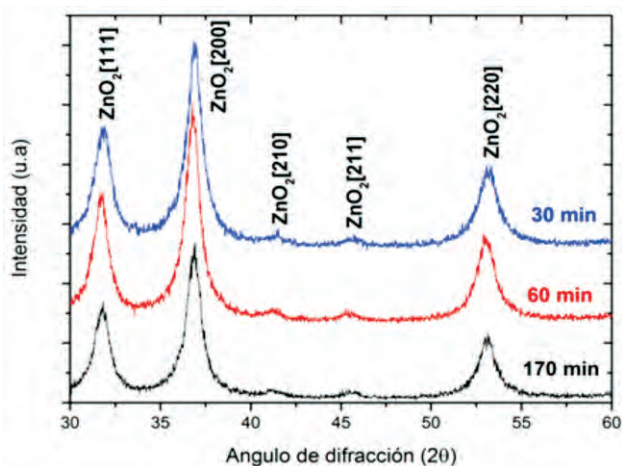
### *Análisis de las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub>*

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 proponer. A continuación presentamos la investigación estructural llevada a cabo mediante difracción de rayos-X, el estudio morfológico realizado por microscopía electrónica de transmisión (MÉT) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Finalmente se muestran las pruebas microbiológicas preliminares realizadas exponiendo las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> a tres tipos de cepas de diferentes bacterias.

### **Difracción de rayos X**

La caracterización estructural de las nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> se realizó por DRX empleando un difractómetro Rigaku Miniflex II Desktop operado con una fuente de radiación de CuK $\alpha$  ( $\lambda = 0,15045$  nm) a 30 kV, 20 mA y con una velocidad de barrido de 3°/min. La figura 2 muestra los datos obtenidos para las nanopartículas sintetizadas a diferentes tiempos de sonicación como se indica en la figura (30, 60 y 170 min). Como se puede observar, se presentan notoriamente tres picos anchos asignados a las reflexiones [111], [200] y [220] del ZnO<sub>2</sub>.<sup>1</sup> Débilmente se registran dos protuberancias que corresponderían a las reflexiones [210] y [211] también asignados al ZnO<sub>2</sub>.<sup>1</sup>

Para el análisis de los difractogramas se utilizó el programa TOPAS-Academic<sup>14</sup> 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).



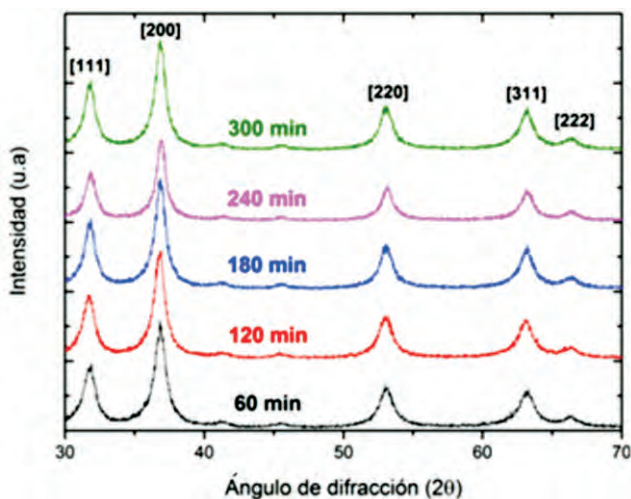
**Figura 2.** Difractograma de rayos X de nanopartículas de ZnO<sub>2</sub> sintetizadas para diferentes tiempos de sonicación.

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 los átomos de  $Zn$  y  $O$  están localizados en las posiciones (0, 0, 0) y (0,413; 0,413; 0,413), respectivamente.<sup>1</sup>

Mediante el refinamiento de Rietveld<sup>15</sup> y el APF se obtuvo para las tres muestras analizadas (30, 60 y 170 min) que el tamaño de cristalito promedio para las tres muestras fue de 10 nm, y la microdeformación fue 0,35; 0,27 y 0,25, respectivamente.

La figura 3 muestra los difractogramas obtenidos para las nanopartículas sintetizadas para los tiempos de sonicación indicados (60, 120, 180, 240 y 300 min). De manera análoga a la figura anterior se presentan notoriamente los tres picos anchos antes identificados y asignados al  $ZnO_2$ , pero además, como las muestras fueron analizadas hasta  $2\theta$  igual a 70, también se pueden identificar las reflexiones [311] y [222] correspondientes al  $ZnO_2$ . Débilmente también se identifican las dos pequeñas protuberancias que corresponderían a las reflexiones [210] y [211] asignadas al  $ZnO_2$ .

Mediante el Refinamiento de Rietveld se obtuvo, para las cinco muestras analizadas (60, 120, 180, 240 y 300 min), los siguientes tamaños de cristalito con sus respectivos valores de microdeformación indicados en paréntesis: 9 nm (0,31), 10 nm (0,32), 13 nm (0,28), 12 nm (0,23) y 14 nm (0,18), respectivamente.

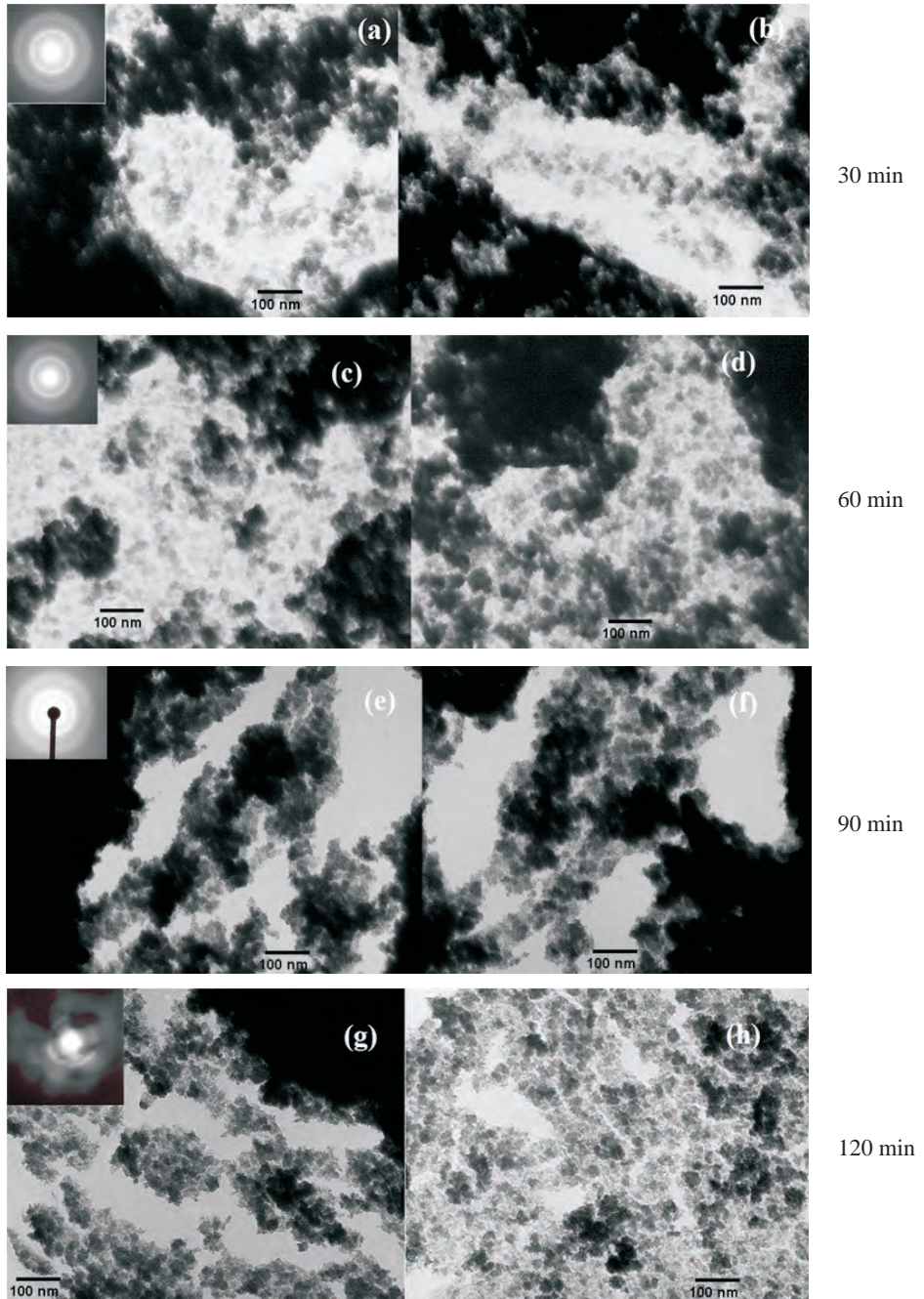


**Figura 3.** Difractograma de rayos X de nanopartículas de  $ZnO_2$  sintetizadas para diferentes tiempos de sonicación

### Microscopía electrónica de transmisión

La morfología y también la estructura de las nanopartículas fueron estudiadas por MET empleando un microscopio Philips EM 400 operando a 80 kV en los modos imagen y difracción. Para su análisis, las nanopartículas fueron dispersadas en agua destilada.

La figura 4 muestra las micrografías de las muestras de nanopulvos sintetizados para diferentes tiempos de sonicación. Para cada una de las muestras se presenta en la esquina izquierda superior, el patrón de difracción obtenido. De esta información y luego de indexar los anillos, se obtuvo que todas las muestras corresponden al  $ZnO_2$ .

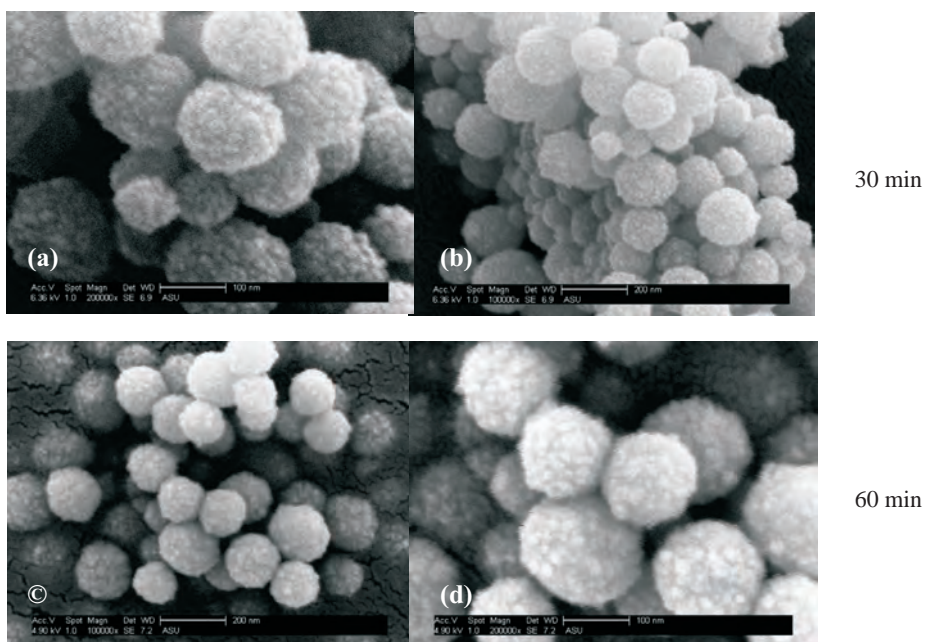


**Figura 4.** Micrografías electrónicas de transmisión para nanopartículas de  $ZnO_2$  sintetizadas empleando los tiempos de sonicación indicados.

### Microscopía electrónica de barrido

Para el análisis morfológico de los nanopolvos de ZnO<sub>2</sub> se utilizó microscopía electrónica de barrido usando un microscopio electrónico marca Jeol JSM-6300 operado con una aceleración de electrones de 5 kV.

La figura 5 muestra las imágenes para las partículas obtenidas para diferentes tiempos de sonicación. Las figuras 5a y 5b muestran dos magnificaciones diferentes (100 KX y 200 KX) que corresponden a un tiempo de sonicación del coloide de 30 min, mientras que análogamente las figuras 5c y 5d muestran las imágenes correspondientes a un coloide sonificado durante 60 min. Ambos materiales muestran conglomerados cristalinos esféricos de entre 100 y 200 nm, de una apariencia racimosa (similar al que en la naturaleza se observa en la frambuesa). Dichos conglomerados cristalinos están constituidos a su vez por nanopartículas mucho más pequeñas, que para la resolución de su tamaño, por este técnica no se puede determinar. Esta información es complementaria a la obtenida por DRX y MET, donde se determina el promedio y el tamaño directamente de cristalitas que conforman los conglomerados cristalinos que por MEB se puede apreciar claramente.



**Figura 5.** Micrografías electrónicas de barrido para nanopartículas obtenidas de coloides sonicados durante los tiempos indicados a 60°C.

### Evaluación de la actividad antimicrobiana

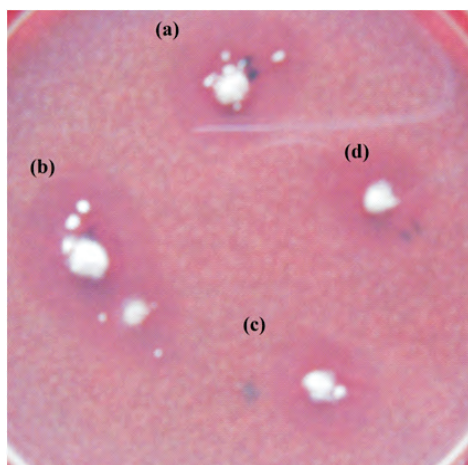
No se conoce una metodología para la evaluación de las propiedades bactericidas de los materiales nanoparticulados. El método más comúnmente utilizado en laboratorio por su sencillez y rapidez, es la técnica de difusión por discos en agar, que es utilizada para generar datos cualitativos.<sup>16</sup> Esto se fundamenta en la inhibición del crecimiento bacteriano mediante

la difusión de las nanopartículas de  $ZnO_2$ , en un medio de cultivo sólido, el mismo que se evidencia con la formación de zonas claras o halos de inhibición.

Mediante esta técnica se realizó los estudios preliminares de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de  $ZnO_2$ , para lo cual se empleó 3 cepas patógenas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Todas las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron incubando 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 correspondientes.

Las figuras 6-8 muestran las imágenes de los análisis microbiológicos realizados para diferentes cepas. Para cada uno de los cultivos se colocó muestras de nanopartículas  $ZnO_2$  obtenidas a diferentes tiempos de irradiación ultrasónica: (a) 60 min, (b) 120 min (c) 180 min y (d) 240 min, respectivamente.

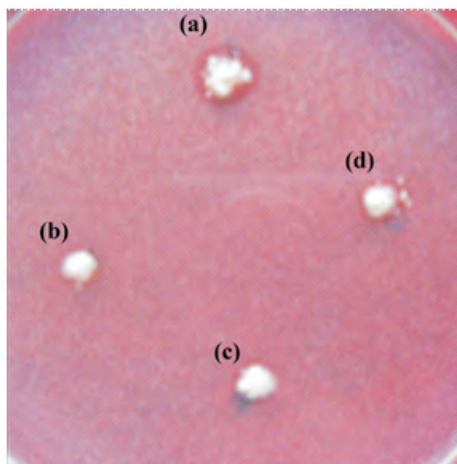
La figura 6 muestra los resultados obtenidos para las partículas de  $ZnO_2$  con cepas de *Bacillus subtilis*. Se puede observar en todas las muestras halos grandes (~ 10 mm) y opacos. La opacidad de los halos sería indicativo de un proceso parcial de crecimiento microbiano dentro de ellos, dado a que hay colonias resistentes al producto.



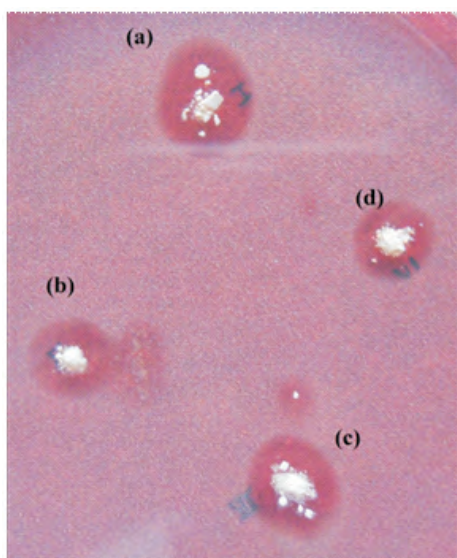
**Figura 6.** Análisis de la actividad antimicrobiana de las muestras de  $ZnO_2$  en cepas de *Bacillus subtilis*. Las muestras (a), (b), (c) y (d) corresponden a diferentes tiempos de sonicación: 60 min, 120 min, 180min y 240 min, respectivamente.

La figura 7 presenta la imagen del análisis obtenido para las partículas de  $ZnO_2$  con cepas de *Escherichia coli*. En este caso se observa anillos muy pequeños (~ 1-2 mm) pero limpios. Lo que sería indicativo de un débil proceso bactericida del producto.

Finalmente, la figura 8 muestra la imagen del análisis realizado para las partículas de  $ZnO_2$  en cepas de *Staphylococcus aureus*. En este caso se observa anillos muy grandes (~ 10 mm) y limpios. Lo que claramente mostraría una muy buena propiedad bactericida de las nanopartículas de  $ZnO_2$  ante estas cepas.



**Figura 7.** Análisis de la actividad antimicrobiana de las muestras de  $ZnO_2$  en cepas de *Escherichia coli*. Las muestras (a), (b), (c) y (d) corresponden a diferentes tiempos de sonicación: 60min, 120min, 180min y 240min, respectivamente.

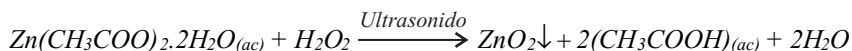


**Figura 8.** Análisis de la actividad antimicrobiana de las muestras de  $ZnO_2$  en cepas de *Staphylococcus aureus*. Las muestras (a), (b), (c) y (d) corresponden a diferentes tiempos de sonicación: 60 min, 120 min, 180min y 240 min, respectivamente.

Según los análisis de DRX y MET se tiene que las nanopartículas sintetizadas por sonicación corresponden a una sola fase y es el  $ZnO_2$ .



La síntesis de las nanoestructuras de  $ZnO_2$  debe proceder por medio de la siguiente reacción rédox:



Según los resultados de DRX, las dimensiones promedio de los cristalitas de  $ZnO_2$  está entre 9 y 14 nm; el tamaño se incrementa conforme se incrementa el tiempo de sonicación, mientras que la microdeformación disminuye. Según las micrografías SEM de las nanopartículas (figura 5) se observa que la distribución de los tamaños de los aglomerados es más uniforme a mayor tiempo de sonicación, pero a menor tiempo de sonicación se tiene conglomerados muy pequeños (~30 nm) y algunos de mayor tamaño (~200 nm).

Todas las nanopartículas de  $ZnO_2$  tienen actividad antimicrobiana; sin embargo se puede observar que las nanopartículas de  $ZnO_2$  obtenidas con tiempo de sonicación de 60 min son las que presentan la mejor actividad antimicrobiana, la cual se hace cada vez menor conforme el tiempo de sonicación se incrementa. Es posible que esto se deba a que el tamaño promedio de los cristalitas se incrementa a mayor tiempo de sonicación y la microdeformación disminuye. La disminución de la microdeformación está relacionada a que el material tiene menos defectos; lo que sería un indicativo de que el tamaño y los defectos del material son muy importantes para la determinación de su propiedad bactericida.

### CONCLUSIONES

Nanopartículas de  $ZnO_2$  fueron sintetizadas por la ruta sol-gel empleando como agente externo radiación sonoquímica. El tamaño de los cristalitas determinado por DRX fue entre 9 y 14 nm con una presencia de microdeformación que disminuye a medida que el tiempo de sonicación aumenta. Las partículas se encuentran conglomeradas en esferas que muestran una apariencia racimosa con tamaños entre 100 y 200 nm. Las nanopartículas evaluadas cualitativamente ante las cepas patógenas seleccionadas presentaron una gran actividad antimicrobiana para el *Staphylococcus aureus*.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la bióloga Kety León por los análisis microbiológicos, al Dr. Alcides López por los análisis de microscopía electrónica de transmisión 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. W. Chen, Y.H. Lu, M. Wang, L. Kroner, H. Paul, Synthesis, Thermal Stability and Properties of  $ZnO_2$  Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*. 2009; 113: 1320-1324.
2. Ibarra, L., Alzoriz, M. Effect of Temperature on the Crosslink Densities of Nitrile Rubber and Carboxylated Nitrile Rubber with Zinc Peroxide. *J. Appl. Polym. Sci* 2002; 86: 335–340.

3. L. Ibarra, A. Marcos-Fernández, M. Alzorriz, Mechanistic approach to the curing of carboxylated nitrile rubber (XNBR) by zinc peroxide/zinc oxide, *Polymer* 2002; 43: 1649-1655.
4. L. Ibarra, M. Alzorriz, Ionic Elastomers Based on Carboxylated Nitrile Rubber (XNBR) and Zinc Peroxide: Influence of Carboxylic Group Content on Properties, *J. Appl. Polym. Sci* 2002; 84: 605-615.
5. R. Hagel, Verwendung von Zinkperoxid als Oxidationsmittel für Sprengstoffe und Pyrotechnische Gemische 1984.
6. F. L. Meleney, H. D. Harvey, 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; 1067-1094.
7. F.L. Meleney, Zinc Peroxide in Surgical Infections. *The American Journal of Nursing* 1941; 41: 645-649.
8. B.A. Johnson, F.L. Meleney, The antiseptic and detoxifying action of zinc peroxide on certain surgical aerobic, anaerobic and micro-Aerophilic Bacteria. *Annals of Surgery* 1939; 109.
9. C.-C. Hsu, N. L.Wu, Synthesis and photocatalytic activity of ZnO/ZnO<sub>2</sub> composite. *J. Photochem. Photobiol.* 2005; A 172: 269-274.
10. M. Sun, W. Hao, C. Wang, T.A. Wang, Simple and green approach for preparation of ZnO<sub>2</sub> and ZnO under sunlight irradiation. *Chem. Phys. Lett.* 2007; 443: 342-346.
11. N. Uekawa, J. Kajiwara, N. Mochizuki, K. Kakegawa, Y. Sasaki, Synthesis of ZnO Nanoparticles by Decomposition of Zinc Peroxide. *Chem. Lett.* 2001; 606-607.
12. N. Uekawa, N. Mochizuki, J. Kajiwara, F. Mori, Y.J. Wu Jun, K. Kakegawa, Nonstoichiometric properties of zinc oxide nanoparticles prepared by decomposition of zinc peroxide. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003; 5: 929-934.
13. C. N. R. Rao, A. Müller, A. K. Cheetham, *The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, Wiley-VCH, 2004.
14. R. W. Cheary, A. A. Coelho, A Fundamental Parameters Approach to X-ray Line-Profile Fitting. *J. Appl. Cryst* 1992; 25: 109-121.
15. R. A. Young, *The Rietveld Method*, Oxford University Press, 2002.
16. J. Chapman, T. Sullivan, F. Regan, *Nanoparticles in Anti-Microbial Materials*, The Royal Society of Chemistry, 2012.