

INACTIVACIÓN BACTERIANA POR EL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ AMORFO

Mónica Andrea Vargas^{1*}, Jorge Enrique Rodríguez²

1: Magister en Ingeniería Física, Grupo CYTEMAC, Departamento de física, Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.

2: Doctor en Ciencias, Grupo CYTEMAC, Departamento de física, Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.

* Contacto: monicavargas13@hotmail.com

RESUMEN

En este trabajo se utilizó el método sol-gel para sintetizar dióxido de titanio (TiO₂). Este proceso permitió obtener de manera controlada diferentes fases del TiO₂, garantizando así el control sobre la pureza del óxido y el tamaño de partícula. Los resultados de difracción de rayos X (DRX) mostraron que los polvos sintetizados eran amorfos hasta una temperatura < 350°C, y los demicroscopia electrónica (MET y MEB) indicaron que las partículas tenían un tamaño de partícula de ~50nm. Al evaluar el efecto bactericida de las partículas de TiO₂ fase amorfo, sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli*, se encontró que al activar el óxido, haciendo incidir previamente sobre él radiación UV se obtuvieron buenos resultados a los primeros 30 minutos de exposición de las bacterias al óxido.

Palabras Clave: *Amorfo, Escherichia coli, Inactivación bacteriana, TiO₂.*

ABSTRACT

In this work, the sol-gel method to synthesize titanium oxide (TiO₂) was used. With this process TiO₂ of high chemical purity were obtained, and depending of thermal treatment it showed different crystalline phase. The XRD results of ceramics powders synthesized indicated that they were amorphous up to ~ 350°C. The electronic microscopy (TEM and SEM) results showed that the particle size of amorphous – TiO₂ was ~50nm. In assessing the bactericidal effect of TiO₂ particles amorphous phase on bacterial strains of *Escherichia coli*, when the oxide is activated by impinging UV radiation, good results were obtained in the first 30 minutes of exposure of the bacteria to oxide.

Keywords: *Amorphous, Bacterial inactivation, Escherichia coli, TiO₂.*

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un creciente interés en el desarrollo de nuevos procesos para la desinfección del agua, más si se considera que en ella está presente una gran cantidad de bacterias y que con los procesos tradicionales de purificación pueden generar subproductos tóxicos. Con el fin de minimizar el riesgo para los seres humanos, por el uso de estas prácticas de desinfección se han propuesto modificaciones a las técnicas convencionales, incluyendo la eliminación de los compuestos cloro-orgánicos [1]. Una alternativa que se ha venido estudiando es el uso del dióxido de titanio, TiO₂, material de gran importancia tecnológica por sus interesantes

propiedades fisicoquímicas. El TiO₂ presenta cuatro fases cristalinas: anatasa (estructura tetragonal), rutilo (estructura tetragonal), brookita (estructura ortorrómbica) y una de alta presión tipo α -PbO₂. El TiO₂ es ampliamente utilizado como fotocatalizador (especialmente la fase anatasa con banda prohibida de $\sim 3.2\text{eV}$), así como sensor de gases, absorbente de rayos UV en productos cosméticos, y de manera general en la industria cerámica [2]. Informes recientes muestran resultados muy interesantes sobre la fotodegradación de bacterias ocasionado por el TiO₂ fase anatasa [3,4] como consecuencia de las propiedades que presenta el TiO₂. Por otro lado, algunos trabajos se han realizado para determinar la capacidad de inactivación bacteriana usando TiO₂ amorfo pero estos no han sido concluyentes.

En este trabajo se utilizó el método sol-gel para sintetizar TiO₂ amorfo, el cual se empleó para determinar su efecto de inactivación bacteriana sobre una cepa de *Escherichia coli*, usando para ello las curvas de letalidad.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Síntesis y caracterización del TiO₂ amorfo

La obtención de soles estables de TiO₂ se realizó a través de las reacciones de hidrólisis y policondensación del tetrabutoxido de titanio (TBT-Across), Ti(OBu)₄, utilizando para ello un proceso descrito previamente [5]. A la muestra sólida seca se le realizó un tratamiento térmico que involucró un incremento de la temperatura, desde temperatura ambiente hasta 150 °C, con el fin de evaporar el agua fisisorbida y el solvente adsorbido. Posteriormente, los polvos obtenidos se trataron térmicamente a diferentes temperaturas hasta una temperatura $< 350^\circ\text{C}$, durante 2 horas a cada temperatura. Se tomaron muestras solidas a las diferentes temperaturas empleadas y se caracterizaron utilizando difracción de rayos X (Philips PW1710 con la radiación $K\alpha$ del Cu ($\lambda = 1.54\text{\AA}$), en el intervalo 2θ entre 10° y 70° y a una velocidad de barrido de 0.04°s^{-1}), microscopia electrónica de transmisión (JEOL- JEM 1200 EX) y microscopia electrónica de barrido (JEOL JSM-6340F).

2.2 Inactivación bacteriana

24 horas previas a la prueba de microdilución se realizó la resiembra de las cepas de *Escherichia coli* en caldo Mueller Hinton, tomándose de tres a cinco colonias bien aisladas, de tamaño y morfología similar. Este sistema se incubó por espacio de 12 horas a una temperatura de 37°C , en agitación constante, hasta alcanzar una turbiedad equivalente a la del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland. Para determinar la inactivación bacteriana del TiO₂ amorfo sobre cepas de *E. coli*, ésta se realizó mediante curvas de letalidad y para ello se consideró el efecto del tiempo de contacto de las bacterias con el TiO₂ previamente activado exponiendo el material, durante 1 hora, a la acción de la radiación UV.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de obtener los polvos cerámicos de TiO₂ amorfo, utilizando el método sol-gel, se procedió a su caracterización. Los sólidos obtenidos, al secar las muestras a 80°C , fueron sometidos a ciertos tratamientos térmicos previamente definidos con base en los resultados del

análisis térmico; las temperaturas utilizadas para el tratamiento fueron: 250, 300, 350 y 380°C, durante 2 horas. En la figura 1(a) se muestran los difractogramas de rayos X correspondientes a sólidos del sistema de titanio, los cuales indican que a una temperatura de 350°C el material sigue siendo amorfo y que entre 350 y 380°C debe ocurrir la cristalización del TiO₂ a anatasa. En la figura 1(b) se muestra la fotografía obtenida con MET del polvo cerámico sintetizado por sol-gel, tratado a 350°C durante 2 horas. Para analizar los sólidos sintetizados, mediante MET, a la muestra, se le realizó molienda por atricción, lo que permitió romper los aglomerados y las suspensiones preparadas se dispersaron mediante la aplicación de 8 minutos de ultrasonido; obteniéndose partículas primarias con un tamaño de partícula de ~100 nm.

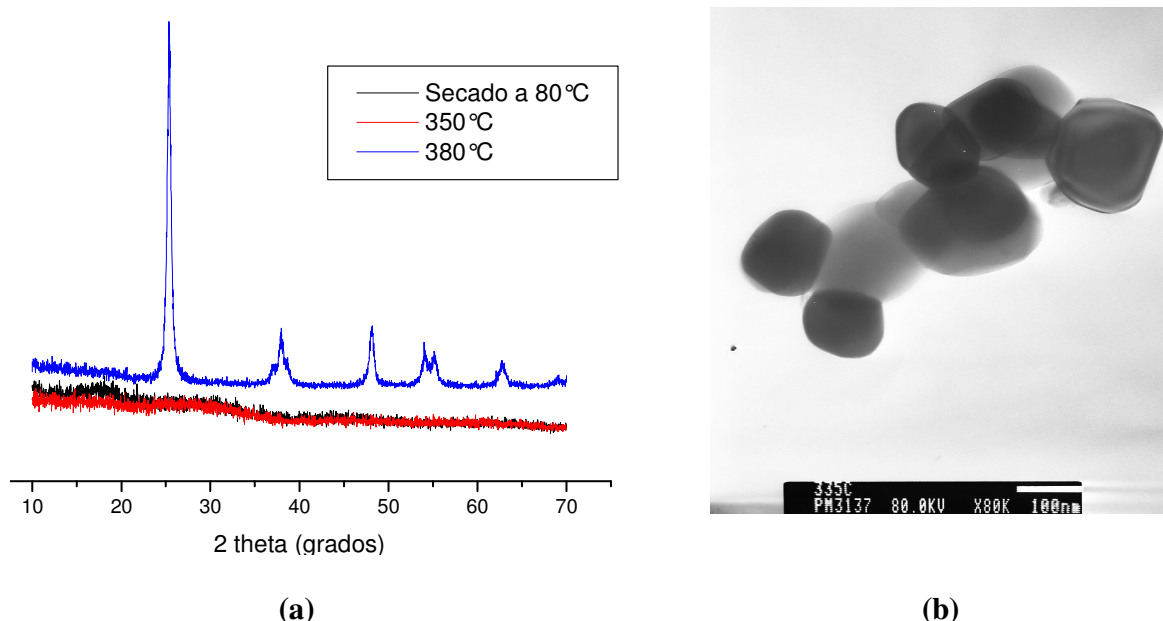


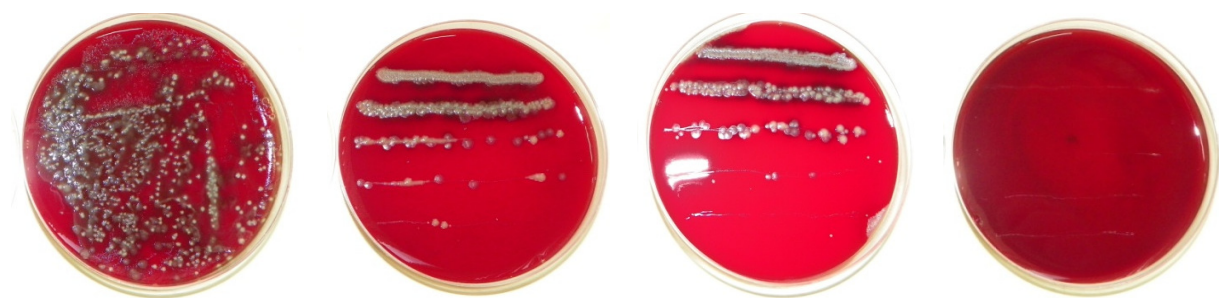
Figura 1. Difractogramas de rayos X de los sólidos del sistema de titanio tratados térmicamente a diferentes temperaturas, por 2 horas, donde se destacan que hasta 350 °C la muestra es amorfa.

3.1 Ensayo de viabilidad celular de la cepa de *Escherichia coli*

Para la realización de este ensayo se utilizó el TiO₂ amorfo, sintetizado mediante el método sol gel. La fase amorfa del TiO₂ presentó una superficie específica de 17.445±0.03 m²/g y un tamaño de partícula primario de ~100 nm. Para determinar el efecto de la actividad fotocatalítica de este TiO₂, sobre el crecimiento bacteriano, el óxido fue sometido a la acción de radiación UV, durante 1 hora, colocándolo sobre el agitador orbital que se encontraba dentro de una cabina de flujo laminar la cual tenía en su parte superior, las lámparas de UV (λ ~254 nm). La intensidad de la luz, que alcanzaba la superficie de la suspensión de TiO₂, fue de aproximadamente 30 Wm⁻².

La pérdida de viabilidad bacteriana fue examinada por el procedimiento de recuento viable de colonias. En esta investigación, las bacterias se suspendieron con el TiO₂ amorfo previamente activado, tal como se indicó anteriormente, para determinar solamente el efecto del TiO₂ activado y no de la superposición simultánea de los dos efectos: presencia del TiO₂ y de la radiación, sobre las cepas bacterianas. En la gran mayoría de investigaciones [4, 6,7], la suspensión bacterias - TiO₂ (P25, Degussa AG, Alemania) se expone continuamente a la irradiación con luz UV,

dificultando la determinación del efecto, independiente, de la radiación y de la actividad fotocatalítica del TiO₂. Además, en este trabajo, se conformó una suspensión de *E. coli*, sin TiO₂, la cual se iluminó con luz UV para determinar el efecto de la radiación, y otra sin TiO₂ para estudiar la proliferación de las bacterias en la oscuridad; esta última suspensión se tomó como referente de crecimiento de la población de células. De todas las suspensiones se tomaron muestras a los 30, 60 y 150 minutos. El conteo viable de colonias se realizó en placas de agar, base sangre, después de diluciones seriadas de la muestra en caldo MH. Todas las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La suspensión de bacterias, de partida, se conformó a una concentración de 2.7x 10⁶ UFC/ml. En la figura 2 se muestran las fotografías obtenidas de los cultivos utilizados en el método de curvas de letalidad de cepas de *Escherichia coli*. En ellas se observa el efecto de las diferentes condiciones establecidas en este ensayo, a los 30 minutos, sobre el crecimiento de las bacterias.



Lectura a tiempo cero Crecimiento a 30 min. Efecto de la radiación a 30 min Efecto del TiO₂ (amorfo activado) a 30 min.

Figura 2. Resultados obtenidos de la evaluación del efecto de la radiación y de la presencia del TiO₂ fase amorfa, con activación previa, sobre cepas de *Escherichia coli*, después de 30 minutos de iniciados los ensayos.

En estas fotografías, figura 2, se puede observar la cantidad de unidades formadoras de colonias UFC/ml en el cultivo de partida, lectura a tiempo cero, y como fue el desarrollo poblacional de las mismas, a los 30 minutos, al encontrarse en un medio adecuado para su crecimiento. Además, se ilustra el desarrollo de las mismas al ser sometidas a la acción de la radiación y a la presencia del TiO₂ amorfo activado previamente. En la figura 2 se observa que en el cultivo inicial se presentó una gran cantidad de UFC/ml de *E. coli* y que éste fue sufriendo cambios apreciables, a simple vista, al considerar las diferentes variables de análisis. Por otro lado, cuando el óxido fue expuesto previamente a la acción de la radiación UV, antes de adicionarlo a la suspensión de bacterias, éste produjo una inactivación bacteriana total después de los 30 minutos de contacto con las bacterias. Estos resultados reiteran la gran importancia de las reacciones, superficiales, superficie del TiO₂-membrana de la bacteria, y la gran acción bactericida que tiene el efecto fotodegradante del TiO₂, activado previamente, sobre la proliferación del *E. coli*.

Para completar el protocolo establecido para este análisis, se observaron los sistemas a los 60 y 150 minutos de iniciados los ensayos, en ellos se observa un comportamiento similar a los cultivos tratados a 30 minutos (figura 2): eliminación total de las bacterias en el cultivo que contenía el TiO₂ fase amorfo activado.

La pérdida de viabilidad de las células de *E. coli* por la acción de la radiación UV y por la presencia del TiO₂ (amorfo) activado, se determinó haciendo el recuento del número de colonias presentes en los cultivos después de 24 horas de incubación. Las curvas de UFC/ml en función del tiempo, para las diferentes condiciones de cultivo, se muestran en la figura 3. En la figura 3(a) se muestra el crecimiento normal bacteriano, partiendo de aproximadamente de 2.7×10^6 ufcml⁻¹, así como el efecto sobre su proliferación, con el tiempo, al aplicarle un antibiótico, Trimetroprima, y someterlas a la radiación. Cuando las bacterias se sometieron a la acción del antibiótico, durante 30 minutos, se presentó una disminución en su viabilidad pero que con el paso del tiempo se volvió a incrementar levemente su proliferación. Por otro lado, cuando las células de *E. coli* se sometieron a la acción de la radiación UV, durante 30 minutos, se disminuyó considerablemente su población y ésta siguió disminuyendo de forma lenta hasta los 150 minutos de exposición, sin alcanzar la completa eliminación de las bacterias. En la figura 3(b) se muestra que las bacterias de *E. coli* en presencia de 1 mgml⁻¹ [1000 ppm] de TiO₂ amorfo activado, todas las bacterias perdieron su viabilidad después de 30 minutos y este resultado se mantuvo todo el tiempo que duró el ensayo.

Los resultados indicados en las figuras 2 y 3, sobre la inactivación de las bacterias, confirman que al iluminar inicialmente el TiO₂ amorfo para activarlo, éste ejerce una fuerte acción biocida sobre el *E. coli* [8]. En el mecanismo que justifique la acción bactericida del TiO₂ amorfo activado se debe considerar el ataque de las especies de oxígeno altamente reactivas (ROS), provenientes de las partículas de TiO₂, generadas por la acción de la radiación que se hace incidir previamente sobre ellas, acción que afectaría la permeabilidad de la membrana de las bacterias, y por lo tanto de su actividad respiratoria, tal que si esta función se pierde llevaría a la muerte de las mismas; esta condición ha sido ya estudiado por diferentes investigadores [7,9]; los daños en la pared celular ocurren cuando se ponen en contacto las bacterias de *E. coli* con el TiO₂ y esto puede suceder debido a que la barrera impuesta por la membrana externa de lípidos (entre 6 y 18 nm de espesor) y la capa de peptidoglicano se avería severamente por las reacciones fotocatalíticas y/o superficiales, propiciadas por la presencia del TiO₂, durante los primeros 30 minutos de los ensayos, generando, a continuación, un daño progresivo de la membrana citoplasmática [7], ocasionando que la bacteria se torne permeable incluso a las moléculas grandes. Al ocurrir lo anterior, la membrana citoplasmática se vería severamente afectada causando la pérdida irreversible de la viabilidad tal como lo muestra la figura 3(b).

Otro proceso que no hay que descartar es la posibilidad de que las partículas de TiO₂ inicialmente se adsorban sobre la superficie de las bacterias, acción propiciada por interacciones de atracción electrostática ya que el punto de carga cero para el *E. coli* está en pH 2-3 y para el TiO₂ en pH 3.56, para luego ingresar al interior de la bacteria. Trabajos recientes sobre este tema, utilizando células eucariotas [10,11], indican que la absorción de las partículas de TiO₂ puede ser resultado de la fagocitosis [11]. Una vez que las partículas de TiO₂ entren en las células, y la membrana citoplasmática se deteriore, los componentes intracelulares estarían más expuestos a un ataque directo. Trabajos previos indican que el TiO₂ no presenta una selectividad para atacar los componentes celulares [12], por lo tanto, al ingresar, atacaría indistintamente a todos los componentes intracelulares presentes.

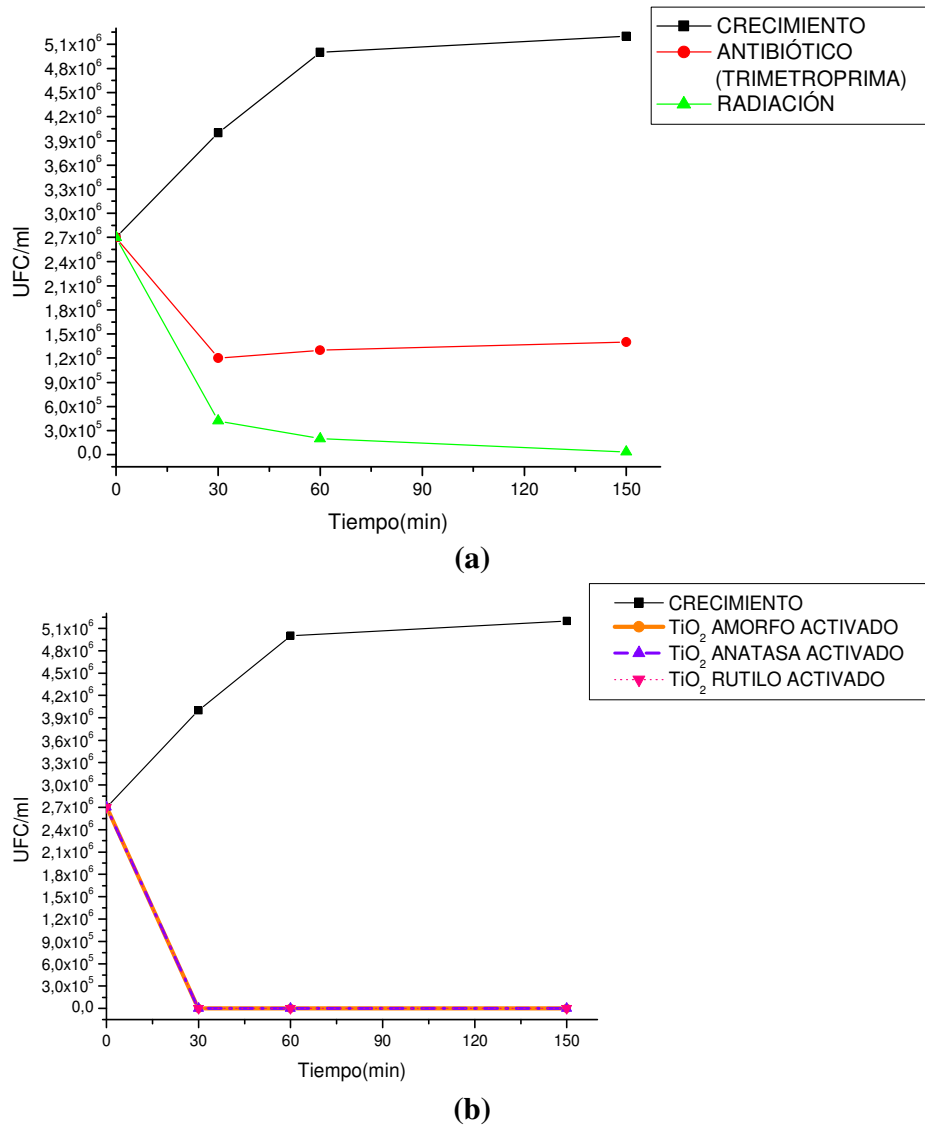


Figura 3. Curvas de número de unidades formadoras de colonias en función del tiempo que indican como varía la población del E. coli al someter los cultivos a la acción de un antibiótico (Trimetoprima) y radiación UV (a), a la exposición de TiO₂ activado previamente, utilizando radiación UV durante 1 hora (b), considerando diferentes fases presentes en el óxido. La concentración inicial de células en la suspensión fue de 2.7x10⁶ ufcml-1.

En el presente trabajo se ha demostrado que las bacterias de *E. coli* expuestas a la acción de TiO_2 amorfo, previamente activado con luz UV, pierden su viabilidad degradándose completamente. Un resultado similar han obtenido otros investigadores [4, 6] trabajando con el TiO_2 , principalmente en su fase anatasa, irradiado continuamente con UV. Esta última metodología genera la duda de cuál de los dos efectos, el de la radiación y el de la exposición al TiO_2 activado, es el más importante en la inactivación bacteriana. Con la metodología desarrollada en el presente trabajo se puede determinar el efecto real de la radiación, figura 3(a), y de las partículas de TiO_2 amorfo, activado previamente utilizando radiación UV, figura 3(b).

4 CONCLUSIONES

En este trabajo se sintetizó TiO_2 amorfo, con un tamaño de partícula ~ 50 nm, usando el proceso sol-gel, a una temperatura < 350 . Este óxido activado presentó inactivación bacteriana ya que el número de unidades formadoras de colonias presentes en los cultivos se redujo apreciablemente. Esto pone en evidencia el desarrollo de ciertas reacciones superficiales, propiciadas principalmente por la acción fotocatalítica del TiO_2 , entre la superficie de las nanopartículas de TiO_2 y la pared de la membrana de las bacterias, reacciones que afectarían la permeabilidad de esta última y el proceso de “respiración” de los microorganismos, ocasionando su muerte. Con la metodología desarrollada en este trabajo fue posible distinguir, de manera precisa, la acción de la radiación y el de la capacidad fotocatalítica del TiO_2 amorfo, separación de acciones que permitiría actuar más sobre la última, con los conceptos de la ciencia de los materiales, para optimizarla.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blake, D.M., Maness, P., Huang, Z., Wolfrum, E. J., Huang J. and Jacoby W. A. “Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells”. Separation and Purification Methods, Vol. 28, 1, pp. 6-9, 1999.
2. Parra, R., Goes, M. S., Castro, M. S., Longo, E., Bueno, P. R., Varela, Y J. A., “Reaction Pathway to the Synthesis of Anatase via the Chemical Modification of Titanium Isopropoxide with Acetic Acid”, Chem. Mater., vol. 20, pp. 143–150, 2008.
3. Saito, T., Iwase, T., Horie, J. and Mrioka, T. “Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO_2 on mutans streptococci”. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., Vol.14, pp.369-379, 1992.
4. Sunada, K., Watanabe, T., Hashimoto, K. “Studies on photokilling of bacteria on TiO_2 thin film”. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 156, pp. 227–233, 2003.
5. Vargas Urbano, M. A., Ochoa Y., Ortegón Y., Mosquera, P., Rodríguez Páez, J., Camargo, R. “Nanopartículas de TiO_2 , fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos” Ingeniería & Desarrollo. Universidad del Norte. 29(2), pp.186-201, 2011.

6. Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T., Wake, H. "Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders". *FEMS Microbiol.Lett.*29, pp. 211-214, 1985.
7. Huang, Z., Maness,P.C., Blake,D. M., Wolfrum, E. J., Smolinski,S., Jacoby, W. "Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 130, pp.163–170, 2000.
8. Bekbölet, M., Araz, C. "Inactivation of Escherichia coli by photocatalytic oxidation" *Chemosphere.* 32, pp. 959, 1996.
9. Maness, P.C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby W.A. "Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward and understanding of its killing mechanism". *Appl. Environ. Microbiol.*65, pp. 4094, 1999.
10. Sakai, H., Ito, E., Cai, R., Yoshioka, T., Kubota, Y., Hashimoto, K., Fujishima, A., "Biochim. Biophys", *Acta* 1201, pp. 259, 1994.
- 11.Cai, R., Hashimoto, R.K., Itoh, K., Kubota, Y., Fujishima, A. *Chem Soc. Jpn.* 64, pp.1268,1991.
12. Hidaka, H., Horikoshi, S., Ajisaka, K., Zhao, J., Serpone N. J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 108, pp. 197, 1997.