

## Estudio del aprovechamiento de subproductos vegetales para la obtención de nanopartículas de ZnO

S. Castillo <sup>\*1</sup>, L.A. Hernández<sup>2</sup>, M. Bautista-Villarreal <sup>1</sup>, E. Sánchez-García<sup>1</sup>, A. Chávez Montes<sup>1</sup>, V.I. Hernández-González<sup>3</sup>, K. García-Alanís <sup>1</sup> y J. Hernández-Piñero<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. <sup>2</sup> Instituto Tecnológico Superior de Poza Rica. Tecnológico Nacional de México. <sup>3</sup> Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León. \*[sandra.castillohm@uanl.edu.mx](mailto:sandra.castillohm@uanl.edu.mx)

### RESUMEN

En la actualidad, las nanopartículas son de gran interés científico por su amplia variedad de aplicaciones en diferentes campos. Debido a los grandes avances, las nuevas necesidades y el gran número de nanomateriales utilizados en sectores industriales los estudios para su obtención mediante química verde son de vital importancia. En este estudio se obtuvieron nanopartículas de ZnO mediante el aprovechamiento de diversos subproductos vegetales, algunos con diferentes bioprocesos. A las nanopartículas obtenidas, se les determinó actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos de importancia en alimentos y salud pública. Se les midió también el tamaño de partícula mediante DLS (Dynamic light scattering) con un zetasizer y se caracterizó su morfología mediante microscopio electrónico de barrido (SEM). Los tamaños de partícula variaron entre 563 y 1314 nm dependiendo del tipo de subproducto utilizado y bioproceso aplicado. El índice de polidispersidad obtenido varió de 0.287-0.560 siendo las NPs obtenidas de subproductos de sandía y tuna con bioproceso las que presentaron homogeneidad. La actividad antimicrobiana se presentó en rangos de 0.9- 1.3 mm de inhibición en la mayoría de las nanopartículas, presentando mayor actividad en *Escherichia coli*, *Candida spp* y *Staphylococcus aureus*, mientras que *Listeria spp* y *Salmonella typhi* presentaron mayor resistencia en algunos casos.

**Palabras clave:** Antimicrobiana, economía circular, nanopartículas.

### ABSTRACT

Nowadays, nanoparticles are of great scientific interest due to their wide variety of applications in different fields. Due to the great advances, the new needs and the large number of nanomaterials used in industrial sectors, studies to obtain them using green chemistry are of vital importance. In this study, ZnO nanoparticles were obtained by taking advantage of various plant by-products, some with different bioprocesses. The nanoparticles obtained were determined antimicrobial activity against some microorganisms of importance in food and public health. The particle size was also measured by DLS (Dynamic light scattering) with a zetasizer and their morphology was characterized by means of a scanning electron microscope (SEM). The particle sizes varied between 563 and 1314 nm depending on the type of by-product used and the bioprocess applied. The antimicrobial activity was presented in ranges of 0.9-1.3 mm of inhibition in most of the nanoparticles, presenting greater activity in *Escherichia coli*, *Candida spp* and *Staphylococcus aureus*, while *Listeria spp* and *Salmonella Typhi* presented greater resistance in some cases.

**Keywords:** Antimicrobial, circular economy, nanoparticles.

**Área:** Aprovechamiento y valorización de subproductos

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nanopartículas metálicas de óxido de zinc ha llamado la atención debido a que presentan un amplio espectro para inhibir el crecimiento de algunos virus, hongos y bacterias. Los estudios sobre su potencial antimicrobiano son de gran interés teniendo en cuenta su no-toxicidad, fácil fabricación y su seguridad haciéndolas candidatas ideales para aplicaciones biológicas (Jamdagni et al, 2018), evidenciando el potencial para producir y formular nuevos e innovadores agentes antimicrobianos comerciales, que pudiesen ser aprovechados también en la inocuidad de los alimentos (Yah y Simate et al., 2015). El aprovechamiento de subproductos vegetales para la obtención de nanopartículas de ZnO (NPs-ZnO), formaría parte de una economía circular, además de contribuir a una “síntesis verde” o de bajo impacto ambiental preferible para la producción de nanopartículas, por ser una mejor técnica de síntesis debido a una cinética más lenta, lo que representa una mejor manipulación y control sobre la formación de las nanopartículas y su estabilización (Dobrucka et al 2015). La síntesis de nanopartículas que presenten forma y tamaño uniforme a través de rutas de síntesis sencillas o “verdes” representa un reto en la actualidad; Los estudios que promuevan este tipo de síntesis son gran valor debido a la tendencia a obtener productos “amigables con el planeta” y de esta forma contribuir a la generación de datos esenciales para desarrollar rutas verdes que permitan el control preciso de la morfología y el tamaño de las nanopartículas (Kwon et al., 2002); (Iravani et al., 2014). Recientemente, las nanopartículas de óxido de Zinc (NPs- ZnO) se han incorporado a diversos materiales de empaque, libres de interactuar con el alimento, proporcionando un efecto antimicrobiano lo que impacta en la preservación del producto (Jamdagni et al, 2018). La valorización de los subproductos alimentarios es una prioridad en todo el mundo. Se estima que un tercio de los alimentos producidos en el mundo se pierde o desperdicia a lo largo de la cadena de suministro de alimentos. Reducir la cantidad de residuos es fundamental para mejorar la seguridad alimentaria (HLPE 2014) alineándose con la tendencia hacia la economía circular (Morales Contreras et al, 2017).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**1. Cepas microbianas y condiciones de cultivo.** Las cepas que se utilizaron fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria spp*, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Candida albicans*, *Escherichia coli* ATCC 25922 de la colección del Laboratorio de Alimentos funcionales del Departamento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Estas se cultivaron en medio Müller Hinton ó Soya tripticasa estéril (121 °C /15min) ( Difco, BD Sparks MD, USA.), en una atmósfera aerobia y se incubaron a una temperatura de 37 °C / 24h.

**2. Obtención de los subproductos.** Las cáscaras y las semillas se lavaron con agua destilada y se secaron en un secador tipo túnel a una temperatura de 45°C con circulación de aire constante. El material deshidratado, se molió en un molino mecánico de grano. Las harinas obtenidas se guardaron en bolsas cerradas herméticamente en ausencia de luz, para su posterior utilización. Para la aplicación de los bioprocesos\* las cáscaras y semillas se utilizaron en fase húmeda, y posterior a la aplicación de cada bioproceso\* se obtuvieron de la misma manera arriba mencionada. Los bioprocesos\* fueron llevados a cabo en condiciones controladas de temperatura y en esterilidad. En esta investigación se presentan únicamente los resultados de los subproductos obtenidos mediante el bioproceso 1.

\*Las condiciones de los bioprocesos podrían ser patentadas por lo que no podrán ser revelados los detalles de los mismos.

**3. Obtención “verde” de las nanopartículas de ZnO.** El método utilizado fue de acuerdo con Ramesh et al 2015 que clasifica este método como "verde" debido a las características más amigables que un método de obtención tradicional. Los extractos utilizados para la reducción de los iones de zinc ( $Zn^{2+}$ ) a nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) se prepararon mezclando 5 gramos de subproducto en polvo en 100 mL de agua destilada, la mezcla se hirvió en constante agitación a una temperatura de 50°C durante 60 minutos y se dejó enfriar. Posteriormente se filtró (Whatman 1). Para la síntesis de nanopartículas se tomaron 50 ml de cada extracto y se hirvieron a 60-80°C, posteriormente se agregaron 5 gramos de nitrato de zinc a la solución cuando las temperaturas alcanzaron los 60°C (Se monitoreó constantemente la temperatura). Esta mezcla se hirvió para eliminar la mayor cantidad de líquidos, y obtener una pasta la cual se llevó a la mufla a 550°C durante 40 minutos. Se obtuvo un polvo de color blanco, se trituró en una maja de mortero para obtener una naturaleza más fina para su caracterización.

**4. Determinación del tamaño de partícula** El tamaño de partícula y la polidispersidad se determinaron mediante espectroscopía de correlación de fotones **DLS (Dynamic light scattering)**, utilizando un Zetasizer Nano ZS90. Se diluyó una alícuota de cada lote de NPs-ZnO en agua bidestilada. Se obtuvo tamaño medio y polidispersidad.

**5. Morfología de las NPs-ZnO.** Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar la morfología de las NPs-ZnO y confirmar su tamaño. Las muestras se prepararon esparciendo suspensiones de NPs-ZnO concentradas sobre losas y luego secándolas al vacío. A continuación, las muestras se recubrieron en un evaporador catódico con una fina capa de oro y se observaron mediante SEM usando un microscopio electrónico de barrido LEO-435VP.

#### **6. Determinación de la actividad antimicrobiana.**

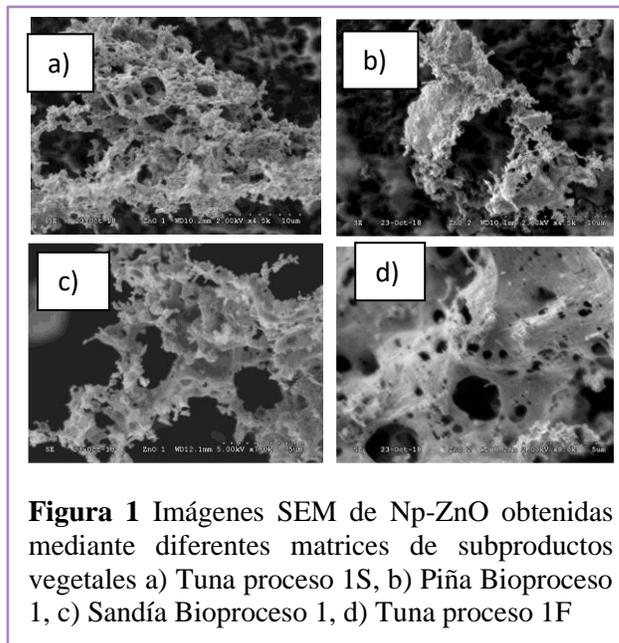
Para evaluar en forma preliminar el efecto antimicrobiano de Las NPs-ZnO obtenidas, se utilizó el método de difusión de papel en agar (Torres-Alvarez et al 2016), el cual consistió en inocular 100 µl de la cepa activada (24h), sobre placas Petri con agar Mueller Hinton (MH) ó Soya tripticasa. Después de sembrar por extensión con un asa de Driglasky, se colocaron discos de papel de 6mm con 50 µl de las nanopartículas (75% p/v en Dimetil sulfóxido, DMSO) sobre agar; como controles se utilizaron discos con DMSO estéril. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. El efecto de las NPs-ZnO se determinó mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del papel del cual se midió su diámetro en centímetros (Fig. 2).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Al finalizar el proceso de obtención de NPs-ZnO en las diferentes matrices de subproductos, se obtuvo un polvo blanco que fue recolectado cuidadosamente para su posterior caracterización. El tamaño de partícula de acuerdo con el zetasizer varió

entre 536.7 -1314 nm, siendo las partículas más pequeñas las obtenidas de la cáscara de piña sin bioproceso. Está reportado que a mayor tamaño de la nanopartícula, mayor aglomeración en las mismas (Precious et al 2019) por lo que es posible obtener partículas aglomeradas en el material recolectado. El índice de polidispersidad mostró que podría existir homogeneidad en aquellas partículas obtenidas de sandía con bioproceso (0.380) y tuna con proceso 2-F (0.287), mientras que en los demás subproductos fueron polidispersas ya que presentaron índices mayores a 0.4 (Tabla 1).

Estos resultados son consistentes con Jamdagni et al (2018) quienes obtuvieron mediante el extracto de flor *Nyctantes arbor-tristis* partículas de ZnO polidispersas con valores arriba de 0.488 Pdl. En el caso de los valores del potencial Z indican la repulsión o atracción entre las nanopartículas, la estabilidad y las tendencias a separarse ó aglomerarse (Precious et al 2019). En este estudio el potencial Z varió de -12.9 a -15.6; De acuerdo con este mismo autor, estos valores se consideran incipientemente inestables. En este estudio se presentaron diferencias en el tamaño de partícula y el potencial Z dependiendo del tipo de suproducto utilizado, estas variaciones pueden atribuirse a la diferente composición de cada uno de los subproductos utilizados que puede tener influencia en el tamaño de partícula (Dobrucka et al 2015).



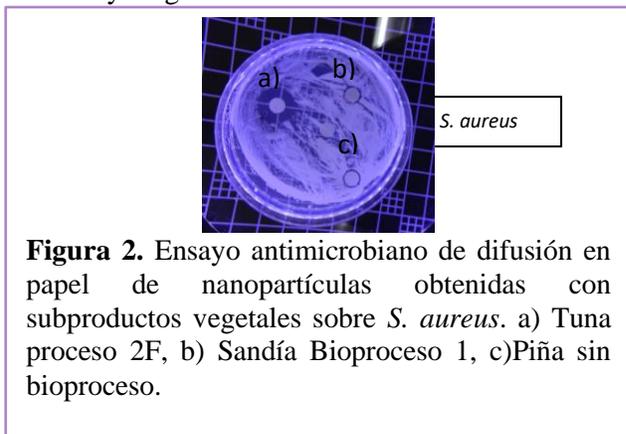
**Figura 1** Imágenes SEM de Np-ZnO obtenidas mediante diferentes matrices de subproductos vegetales a) Tuna proceso 1S, b) Piña Bioproceso 1, c) Sandía Bioproceso 1, d) Tuna proceso 1F

**Tabla I.** Análisis DLS con Zetasizer de las nanopartículas obtenidas a partir de subproductos vegetales.

Muestra de NPs-ZnO obtenida de: (cáscaras o semillas)	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad (Pdl)	Potencial Z (mV)
Tuna proceso 1-S	1314	0,560	-15.4
Tuna proceso 2-F	1286	0,287	-12.9
Semilla de tuna	739.8	0,502	-14.7
Piña bioproceso 1	968.7	0,543	-13.9
Piña sin bioproceso	563.7	0,412	-13.4
Sandía bioproceso 1	1227	0,380	-14.2
Sandía sin bioproceso	1239	0,504	-15.6

El análisis de morfología mediante SEM arrojó nanopartículas amorfas y aglomeradas (Fig. 1). Este resultado es congruente con los resultados obtenidos del análisis DLS en donde se evidenciaron

partículas grandes, polidispersas e incipientemente inestables, por lo que la aglomeración y las formas amorfas pueden presentarse. Estos resultados son similares a los reportados por Dobrucka et al (2015), Ramesh et al (2014), Sangeetha et al (2011) quienes obtuvieron mediante síntesis verde, nanopartículas amorfas y/o aglomeradas.



Después de realizarse los análisis antimicrobianos (Fig. 2), se determinó que las nanopartículas en su mayoría presentaron inhibición contra los microorganismos probados (Tabla II). En el caso particular de las nanopartículas obtenidas de subproductos de piña y sandía no presentaron inhibición contra *Listeria spp* y *S. typhi*. Estos resultados coinciden con algunos ya reportados (Precious et al 2019, Ramesh et al 2015), en donde nanopartículas de ZnO presentaron actividad antimicrobiana y ésta varió de acuerdo con tipo de matriz en donde fueron obtenidas. Ellos obtuvieron rangos entre 0.7-1.7 cm variando

entre bacterias Gram + y Gram -; nuestros resultados variaron de 0.7 a 1.3 cm, variando la susceptibilidad entre las cepas probadas (Tabla II).

**Tabla II.** Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO obtenidas mediante diferentes subproductos vegetales. Halos de inhibición en centímetros (cm).

Muestra de NPs-ZnO obtenidas de:	<i>Listeria spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Candida spp</i>
Tuna proceso 1-S	1.1±0.1* <sup>a</sup>	1±0.1 <sup>a</sup>	1.0 ±0.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.9 ±0.1 <sup>ab</sup>
Tuna proceso 2-F	1.3± 0.3 <sup>a</sup>	1±0.1 <sup>a</sup>	1.3 ±0.0 <sup>c</sup>	1.0 ±0.1 <sup>a</sup>	0.8 ±0.0 <sup>b</sup>
Semilla de tuna	1±0.1 <sup>a</sup>	0.7±0.0 <sup>d</sup>	1.0 ±0.1 <sup>a</sup>	0.9 ±0.0 <sup>a</sup>	0.7±0.0 <sup>d</sup>
Piña Bioproceso 1	NI	0.8 ±0.0 <sup>b</sup>	1.0 ±0.0 <sup>a</sup>	0.9 ±0.0 <sup>a</sup>	1.0 ±0.1 <sup>a</sup>
Piña s/ bioproceso	NI	0.9 ±0.0 <sup>a</sup>	0.9 ±0.0 <sup>a</sup>	NI	0.9 ±0.1 <sup>ab</sup>
Sandía bioproceso 1	NI	0.8 ±0.0 <sup>b</sup>	0.8 ±0.0 <sup>b</sup>	0.8 ±0.0 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>
Sandía s/bioproceso	NI	0.9 ±0.0 <sup>a</sup>	0.9 ±0.0 <sup>a</sup>	NI	0.9 ±0.1 <sup>ab</sup>

NI= No inhibición. \* Halos de inhibición en cm. Promedio de tres repeticiones por duplicado ±desviación estándar. Diferentes letras (a,b,c,d,) entre columnas y renglones representan diferencia significativa.

La obtención de nanopartículas de ZnO a partir de síntesis verde, es una alternativa viable para contribuir hacia una economía circular. La actividad antimicrobiana varió entre las nanopartículas, lo que evidencia la influencia de la matriz de donde fueron obtenidas. Estudios deben ir dirigidos hacia una caracterización más profunda de las nanopartículas, además de la modificación de las vías de obtención para disminuir el tamaño de las mismas para obtener índices de polidispersión más bajos así como el potencial Z.

### BIBLIOGRAFÍA

- Dobrucka, R., & Długaszewska, J. (2016). Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), 517–523.
- HLPE. 2014. Food losses and waste in the context of sustainable food systems. A report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security, Rome. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i3901e.pdf>.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406
- Jamdagni, P., Khatri, P., & Rana, J. S. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 168–175.
- Kwon, Y., Kim, K., Lim, C., y Shim, K., Characterization of ZnO nanopowders synthesized by the polymerized complex method via an organochemical route. *Journal of Ceramic Processing Research*, 3, 146- 149. Obtenido de: <http://wenku.baidu.com/view/da2f7b3767ec102de2bd8970>
- Morales-Contreras, B. E., Contreras-Esquivel, J. C., Wicker, L., Ochoa-Martínez, L. A., & Morales-Castro, J. (2017). Husk Tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) Waste as a Promising Source of Pectin: Extraction and Physicochemical Characterization. *Journal of Food Science*, 82(7), 1594–1601.
- Precious Ayanwale, A., & Reyes-López, S. Y. (2019). ZrO<sub>2</sub>-ZnO Nanoparticles as Antibacterial Agents. *ACS Omega*, 4(21), 19216–19224. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02527>
- Ramesh, M., Anbuvaran, M., & Viruthagiri, G. (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136(PB), 864–870.
- Torres-Alvarez C., Núñez González A., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos-Rivas C., Báez- González J. (2016). Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *CyTA - Journal of Food*, 00(00), 1–7.
- Sangeetha, G., Rajeshwari, S., & Venkatesh, R. (2011). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin*, 46(12), 2560–2566.
- Yah, C. S., Simate, G. S. (2015). Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*.