



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DESARROLLO DE UN RECUBRIMIENTO ANTIMICROBIANO CON NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE ZINC SINTETIZADAS VÍA QUÍMICA VERDE COMO UNA ALTERNATIVA PARA
EL CONTROL DE *Salmonella* Enteritidis Y SU EVALUACIÓN *IN VITRO*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
MARTHA SANTANDER GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ALMA GUADALUPE VÁZQUEZ DURÁN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. PATRICIA MORA MEDINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DR. MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ FUENTES
BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias.

Amchemimami todo esto es gracias a ti.

Valentín, Valeria y Romina por su apoyo y comprensión.

Para todas las amistades que descubrí a lo largo del camino.

Dra. Alma de un cumulo de enseñanzas, aprendí que forjar la disciplina no es fácil y llegar a tu objetivo te lleva a un mejor nivel (Eg). No tengo como agradecerte todo lo que has hecho por mí.

Sinceramente

Martha Santander González

Agradecimientos.

A mi tutora Dra. Alma Vázquez Durán por ser mi factor de evolución.

Al Dr. Abraham Méndez Albores por sus valiosas aportaciones y paciencia.

Al comité tutor Dra. Patricia Mora Medina y Dr. Miguel Ángel González Fuentes por su orientación y aportaciones.

Al jurado, Dra. Inda Marcela Figueroa Ochoa y M en C. Laura Hernández Andrade y Dr. Enrique Salas Tellez por su disponibilidad, atención y aportaciones.

Al laboratorio 17 de la UIM FES-C donde se realizó la experimentación microbiológica.

Al laboratorio 13 de la UIM FES-C y al Dr. José Luis Arjona Román por facilitar el equipo y por sus palabras emotivas.

M. en C. Sofía González Gallardo por el apoyo en microscopía electrónica de barrido.

A todos quienes de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para realizar esta investigación (CB-220710).

Al programa de becas de CONACYT por el apoyo proporcionado a los estudiantes de posgrado (599388).

"No es el más fuerte de las especies el que sobrevive, tampoco es el más inteligente el que sobrevive. Es aquel que es más adaptable al cambio".

Charles Darwin

Resumen.

Entre los diversos óxidos metálicos, el óxido de zinc ha atraído recientemente una atención especial debido a las aplicaciones potenciales en los sectores de la agricultura, de los alimentos destinados al consumo animal y de los alimentos. El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades antibacterianas de un recubrimiento a base de almidón con la inclusión de nanopartículas de óxido de zinc en forma de flor contra *Salmonella* Enteritidis, uno de los patógenos transmitidos por los alimentos más importantes que contaminan los huevos y la carne de aves de corral. Hasta la fecha, se han realizado algunos trabajos para demostrar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de óxido de zinc contra los patógenos de interés en la industria avícola. En esta investigación, se sintetizaron nanopartículas de óxido de zinc con morfología tipo flor con un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 1.5 μm mediante un método de precipitación acuosa y se caracterizaron usando varias metodologías tales como: espectroscopía UV-Vis, reflexión difusa UV-Vis, microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (MET) y espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) con reflexión total atenuada (ATR). La actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxido de zinc en forma de flor se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el método de difusión en disco. Los resultados mostraron que la concentración mínima inhibitoria fue de 2400 $\mu\text{g/ml}$, y un halo de inhibición de 11.1 mm en la prueba de difusión en disco. Mientras que, el recubrimiento a base de almidón con la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc en forma tipo flor (5%, p/p) mostró una actividad antibacteriana moderada en las pruebas *in vitro*. Por lo tanto, la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc en forma de flor podría recomendarse como una medida de control para la contaminación por *Salmonella* Enteritidis en productos avícolas.

Palabras clave: nanopartículas ZnO, actividad antimicrobiana, *Salmonella* Enteritidis.

Abstract

Among several metal oxides, zinc oxide has recently attracted special attention due to the potential applications in the agricultural, feed and food sectors. The aim of this study was to evaluate the antibacterial properties of a starch-based coating with the inclusion of flower-shaped zinc oxide nanoparticles against *Salmonella* Enteritidis, one of the most important food-borne pathogens that contaminate eggs and poultry meat. To date, some works has been done to demonstrate the antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against the pathogens of concern in the poultry industry. In this research, flower-shaped zinc oxide nanoparticles with average particle size of about 1.5 μm were synthesized by an aqueous precipitation method and characterized using several methodologies such as: UV–Vis spectroscopy, diffuse reflection UV–Vis, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy with attenuated total reflection (ATR). The antibacterial activity of the flower-shaped zinc oxide nanoparticles was assessed by the minimum inhibitory concentration (MIC) and the disk diffusion method. The results showed that the minimum inhibitory concentration was 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, corresponding to an inhibition halo of 11.1 mm in the disk diffusion test. Whereas, the starch-based coating with the incorporation of flower-shaped zinc oxide nanoparticles (5%, w/w) showed a moderate antibacterial activity in the *in vitro* tests. Therefore, the application of flower-shaped zinc oxide nanoparticles could be recommended as a control measure for *Salmonella* Enteritidis contamination in poultry products.

Key words: ZnO nanoparticles, antimicrobial activity, *Salmonella* Enteritidis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. <i>Salmonella</i>	3
1.2. Incidencia de <i>Salmonella</i> en productos avícolas	5
1.3. Recubrimientos con actividad antimicrobiana	6
1.4. Nanoestructuras de ZnO	10
1.5. Actividad antimicrobiana de las nanoestructuras de ZnO	17
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo general.....	22
2.2. Objetivos específicos.	22
3. HIPÓTESIS	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Materiales	23
4.2. Métodos.....	23
4.2.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO.....	23
4.2.2. Caracterización de las nanopartículas de ZnO	24
4.2.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO	28
4.2.4. Preparación y caracterización de la película.....	32
4.2.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la película con la incorporación de nanopartículas de ZnO	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1. Caracterización de nanopartículas de ZnO	37
5.1.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	37
5.1.2. Espectroscopia UV-Vis de reflectancia difusa	38
5.1.3. Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).	41
5.1.4. Difracción de Rayos X.....	43
5.1.5. Potencial zeta (ζ) y distribución de tamaño de partícula.....	44
5.1.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	45
5.1.7. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	46

5.2.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO..	48
5.2.1.	Identificación y caracterización de la cepa.	48
5.2.2.	Concentración mínima inhibitoria (CMI).	49
5.2.3.	Ensayo de difusión en disco de las nanopartículas de ZnO.	52
5.3.	Caracterización de la película	55
5.3.1.	Propiedades físicas.....	55
5.4.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de las películas incorporadas con nanopartículas de ZnO.....	65
5.4.1.	Ensayo de difusión.	65
6.	CONCLUSIONES	73
7.	PERSPECTIVAS	74
8.	BIBLIOGRAFÍA	75

LISTA DE CUADROS.

Tabla 1. Número de casos anuales de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo según Epidemiológico de la Secretaría de Salud	5
Tabla 2. Métodos de síntesis de nanoestructuras tipo flores.....	16
Tabla 3. Volúmenes empleados para el llenado de la placa de 96 para determinar la MIC. .	31
Tabla 5. Resultado de pruebas bioquímicas realizadas a Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis ATCC 13076.	48
Tabla 5. Halo de inhibición del ensayo de difusión de disco de nanopartículas de ZnO	53
Tabla 6. Valores obtenidos de color, transparencia y transmitancia de las películas evaluadas.	56
Tabla 7. Grosor, contenido de humedad y permeabilidad al vapor del agua (PVA) en películas de almidón control y con incorporación de nanopartículas.	60
Tabla 8. Actividad antimicrobiana de películas incorporadas con nanopartículas de ZnO contra Salmonella Enteritidis.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de las diferentes formas cristalinas del ZnO, las esferas de color gris y negro representan el Zn y el O, respectivamente. Fuente: Johar et al. (2015).....	11
Figura 2. Esquema de la división de la placa de 96 pozos.	30
Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de ZnO con morfología tipo flor.	38
Figura 4. Espectro de UV-Vis por reflectancia difusa (a) y función de Kubelka-Munk para obtener la E_g de las nanopartículas de ZnO (b).	40
Figura 5. Espectro de FTIR de las nanopartículas de ZnO sintetizadas.	42
Figura 6. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de ZnO sintetizadas.	44
Figura 7. Distribución de tamaño de partícula de nanopartículas de ZnO.	45
Figura 8. Imagen de microscopia electrónica de barrido de las nanopartículas de ZnO sintetizadas con morfología tipo flor, (a) se observa uniformidad estructural (1000x) y (b) brazos con puntas romas (5000x).....	46
Figura 9. Imágenes de microscopia electrónica de barrido a diferentes magnificaciones (a) 100 x, (b) 1000x y (c) 10000x, de las nanopartículas de ZnO sintetizadas.	47
Figura 10. Espectro de transmitancia de las películas control y con incorporación de nanopartículas de ZnO	58
Figura 11. Imagen del microscopio electrónico de barrido de la película de almidón (a) y medición del grosor (b), película con incorporación de nanopartículas ZnO (ZnO-F) (c) y grosor (d).....	64
Figura 12. Ensayo de difusión de disco de la película de almidón control (a) y con la incorporación de ampicilina en la que se observa un halo de inhibición (b).	67
Figura 13. Acercamiento del disco de la película control (aumento (a) 7x y (b) 15x), se observa un crecimiento uniforme de <i>Salmonella</i> Enteritidis en la placa de agar y sobre la película control sin distinción de colonias individuales.	67
Figura 14. Inhibición de crecimiento de colonias de <i>Salmonella</i> Enteritidis en la película con incorporación de antibiótico, aumento (a) y (b) 5.8x.	68
Figura 15. (a) El ensayo de difusión de disco de las películas de almidón con incorporación de nanopartículas b) a magnificación permite observar el crecimiento irregular de las colonias de <i>Salmonella</i> Enteritidis alrededor de la película con ZnO-F (aumento 6.9x).	68
Figura 16. Gradiente de inhibición de crecimiento de colonias de <i>Salmonella</i> Enteritidis la película con ZnO-F (a) (aumento 5.8x), halo de inhibición en la periferia del disco (b) (aumento 9.7x).....	69
Figura 17. Halo de inhibición de la película de control positivo (ZnO-S), (a) (aumento 6.9x), gradiente de inhibición en la cepa (b) (aumento 5.8x).....	69

Desarrollo de un recubrimiento antimicrobiano con nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas vía química verde como una alternativa para el control de *Salmonella* Enteritidis y su evaluación *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos es una de las principales preocupaciones para el consumidor y para la industria de los alimentos. El consumo de productos avícolas y sus derivados ha sido estrechamente relacionado con la presencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's), se le ha asociado principalmente con brotes de salmonelosis en la población humana, siendo la más común por *Salmonella* Enteritidis (SE). En años recientes se ha incrementado el interés en el desarrollo de recubrimientos con agentes antimicrobianos activos para ser aplicados a productos avícolas como carne y huevo, con la finalidad de prevenir el crecimiento de microorganismos y disminuir los riesgos biológicos por la contaminación con agentes patógenos como *Salmonella* e incrementar la vida de anaquel (Xie *et al.*, 2002). Varios agentes antimicrobianos han sido utilizados para el control de bacterias, incluyendo a los óxidos metálicos, como el dióxido de titanio y óxido de zinc, los cuales han recibido gran atención en el sector agroalimentario debido a su inocuidad y bajo costo de producción. El óxido de zinc (ZnO) es uno de los cinco compuestos de zinc, que ha sido catalogado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) como una sustancia "generalmente reconocida como segura" (GRAS); y es empleado como fortificante nutricional en alimentos. Se ha reportado que el ZnO presenta un incremento en su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas cuando el tamaño de partícula se encuentra en escala nanométrica (< 100 nm). Esta característica se debe principalmente al incremento de su área superficial con respecto al volumen. Las propiedades de los nanomateriales dependen directamente del tamaño, de la morfología, de la composición, de la cristalinidad, entre otros. Con la finalidad de tener control en los parámetros antes descritos, diversos métodos de síntesis de nanopartículas de ZnO han sido desarrollados. El método de precipitación ofrece ventajas sobre otros, como su facilidad, bajo costo y la posibilidad de producir material en masa. La tendencia en el desarrollo de metodologías para la síntesis de nanopartículas de ZnO es que sean amigables con el ambiente y en ese sentido se han explorado precursores y

métodos con menor impacto. Por lo que este trabajo tiene los objetivos de desarrollar un método de síntesis de nanopartículas de ZnO con un menor impacto ambiental y la elaboración de un recubrimiento antimicrobiano con la incorporación de nanopartículas de ZnO para el control de *Salmonella* Enteritidis y su evaluación *in vitro*, todo ello con la finalidad de ofrecer un material que pueda ser aplicado a productos de origen avícola (carne y huevo).

1. ANTECEDENTES.

El amplio espectro de patógenos contaminantes en los alimentos incluye una variedad de bacterias entéricas, aerobias y anaerobias, virus, parásitos y dinoflagelados marinos. La frecuencia de infecciones específicas puede cambiar substancialmente, reflejando un balance entre la ecología que soporta las poblaciones bacterianas que contaminan al alimento, los hábitos culturales y la tecnología que limita o previene que ocurra la contaminación. Por ejemplo, antes de 1900 de una lista de trece, los cinco patógenos que causaban enfermedades por transmisión de alimentos eran *Brucella*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella Typhi*, *Trichinella* y *Vibrio colerae*. En años recientes, las principales cepas bacterianas que encabezan la lista son *Campylobacter*, *Salmonella* no tifoidea, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* O157:H7 (Tauxe, 2002). A nivel mundial la incidencia anual de salmonelosis transmitida por alimentos se estima conservadoramente en 80.3 millones de casos, aunque también se calcula que podría llegar de 200 a 1300 millones de casos, lo que la convierte en un problema de salud pública (Whiley *et al.*, 2015).

De los principales géneros de bacterias relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos son: *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* O157:H7. La infección por *Salmonella* ha sido reconocida como la principal causa de gastroenteritis en todo el mundo, debido a la ingesta de alimentos contaminados con este agente, particularmente los de origen animal (Flores *et al.*, 2005, Cao *et al.*, 2009). La incidencia de estas enfermedades es un factor indirecto de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su manejo y procesamiento.

1.1. *Salmonella*.

Los miembros del género *Salmonella* son microorganismos que miden entre 0.5 µm por 2 a 3 µm, de forma bacilar recta, Gram negativo, la motilidad es activa mediante flagelos peritricos exceptuando a *S. pollorum* y *S. gallinarum*; no poseen capsula, no forman esporas, por su tolerancia al oxígeno son anaerobios facultativos y son oxidasa negativo. Estos microorganismos crecen en un amplio rango de temperatura (7 °C – 48 °C) y a valores de pH de entre 4 y 8 (Cox *et al.*, 2000).

Su clasificación taxonómica se describe en el siguiente esquema (MacFaddin, 2003):

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacterias

Sección VII: δ -Proteobacterias

Clase: Zymobacterias

Orden XII: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Actualmente el género *Salmonella* se divide en dos especies, *enterica* y *bongori* que contiene múltiples subespecies y serotipos o serovariedades, se considera que la primera especie es la causante de la mayoría de las infecciones que afectan al hombre y se designa como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (Brooks, 2013).

Esta especie de microorganismo presenta riesgos moderados a la salud, por su distribución es de extensión amplia y se disemina por alimentos específicos; aunque pueden introducirse al alimento por contaminación ambiental o cruzada y se requiere un inóculo relativamente pequeño para provocar la enfermedad (Smoot, 1997). La infección por *Salmonella* no tifoidea se manifiesta de 6 a 48 horas después de la ingesta de alimentos contaminados o agua contaminada, cursando un cuadro gastroenteritis o enterocolitis (Rincón Acero *et al.*, 2011).

Como referencia el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos, reportó que la *Salmonella* no tifoidea es el segundo agente patógeno transmitido por alimentos en ese país, a nivel nacional con un 11% que equivale a 1,027,561 casos reportados; y ocupa el primer lugar en el número de casos que requieren hospitalización y como causante de muerte, que equivale a 19,336 pacientes y 378 decesos, respectivamente (CDC, 2011). Su periodo de transmisibilidad es sumamente variable por lo común va de unos días a varias semanas y a veces el estado del portador temporal se prolonga por varios meses, principalmente en lactantes. Según el serotipo, cerca del 1% de los adultos infectados y alrededor del 5% de los niños menores de 5 años pueden excretar el microorganismo por más de un año (Heymann, 2005).

Es importante señalar que, en México, si bien la vigilancia epidemiológica se lleva a cabo, no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por serotipos específicos de *Salmonella*, el diagnóstico se basa en el cuadro clínico del paciente y no en estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero (Zaidi *et al.*, 2006). En la Tabla 1 se resumen los casos registrados en México del año 2011 al 2018.

Tabla 1. Número de casos anuales de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo según Epidemiológico de la Secretaría de Salud

Año	Concentrado histórico	
	Paratifoidea y otras Salmonelosis	Enfermedades infecciosas intestinales ¹
2011	121,510	5,995,004
2012	128,434	6,045,506
2013	84,866	5,902,354
2014	87,289	5,461,956
2015	90,061	5,404,073
2016	86,179	4,442,717
2017	103,026	6,106,572
2018	77,559	4,878,385

¹ Se incluyen entre otras, enfermedades por *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi*, otras salmonelosis, intoxicaciones por *S. aureus*, por *C. botulinum*, amebiasis, enteritis virales y por protozoarios.

Tomado y modificado del Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud (DGE, 2018).

Las infecciones de origen alimentario están frecuentemente asociadas a dos agentes que son *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y Enteritidis, siendo a nivel mundial *Salmonella* Enteritidis la mayor causante de gastroenteritis la cual puede utilizar al huevo de gallina como vehículo (Whiley *et al.*, 2015).

1.2. Incidencia de *Salmonella* en productos avícolas

Los productos de origen animal como la carne fresca y el huevo son considerados alimentos altamente perecederos debido principalmente a su composición nutricional, la cantidad de agua y el rango de valores de pH que tienen, lo que los hace un medio de cultivo idóneo para el crecimiento de microorganismos. Por varios años la *Salmonella* ha sido asociada a los productos avícolas debido a la contaminación con materia fecal o por la insalubridad en el procesamiento y/o manejo (Acuff, 2005).

Se ha reportado que la contaminación del huevo y del cascarón con microorganismos patógenos como *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter spp.* y *Enterococcus* pueden convertirse potencialmente en un problema de salud pública en todo el mundo (Vinayananda *et al.*, 2017). De las enfermedades que pueden ser transmitidas por el consumo de huevo, la salmonelosis por *Salmonella* Enteritidis es sin duda la de mayor prevalencia a nivel mundial. Los cambios recientes en la preferencia de consumo han impactado a la industria del huevo, con la tendencia al consumo de productos crudos o mínimamente procesados, lo que incrementa los riesgos de contraer esta enfermedad (Whiley *et al.*, 2015).

La contaminación del huevo con *Salmonella* es un proceso complejo que está influenciado por diversos factores (procesos de producción, almacenamiento, manejo y preparación de los alimentos), lo que hace difícil la implementación de estrategias para su control. Existen dos vías principales por las cuales el huevo puede ser contaminado internamente; la directa, la cual ocurre en los órganos reproductivos durante la formación del huevo y la indirecta que se presenta después de la postura, debido a la penetración del microorganismo por las membranas del cascarón. La manipulación del producto por personas enfermas o infectadas (portadores) puede contaminarlo, ya que la excreción de microorganismos en las heces suele persistir durante varios días o semanas después de la fase aguda (Chin, 2001) y la transmisión fecal - oral puede estar presente durante el manejo del huevo fresco.

Otros productos avícolas que se ven afectados son la carne, en un estudio realizado por Dominguez *et al.* (2002) aislaron siete serotipos de *Salmonella* de piernas de pollo obtenidas de supermercados, encabezando la lista *Salmonella* Enteritidis, y la prevalencia es comparable en países europeos, así como en Estados Unidos de América. Los autores señalaron que la presencia de este microorganismo en las aves de corral puede deberse principalmente a la contaminación por las heces fecales provenientes del tracto intestinal de aves contaminadas durante el sacrificio y el procesamiento de la carne.

1.3. Recubrimientos con actividad antimicrobiana

Los requerimientos de consumo de alimentos mínimamente procesados, seguros y de alta calidad son un factor detonante para el desarrollo de nuevos materiales de envasado que se

caracterizan por ser sistemas activos, inteligentes y comestibles. Por su naturaleza, los alimentos son susceptibles al deterioro físico, químico y microbiológico durante su almacenamiento o distribución y a las condiciones ambientales a los que son expuestos; las películas y recubrimientos comestibles se han convertido en una alternativa para preservarlos, que permiten protegerlos de la contaminación microbiana, química o bien de productos adyacentes. Adicionalmente, los recubrimientos pueden prevenir la volatilización de compuestos responsables del sabor o aroma, retardar la transferencia de humedad y oxígeno, prolongando la vida de anaquel. Aunado a las ventajas antes expuestas de los recubrimientos, los de fuentes renovables pueden ser materiales biodegradables que permitan reducir los costos ambientales y los asociados a la disposición de residuos (Fang *et al.*, 2002, Xie *et al.*, 2002). Si el recubrimiento o película es de una fuente renovable como polisacáridos, este puede ser comestible y puede ser aplicado en capas, lo que ofrece ventajas sobre otros de origen sintético (Kraśniewska *et al.*, 2012). Los recubrimientos se han definido como matrices continuas que consisten en una capa delgada que se preforma o forma directamente en los alimentos como una envoltura protectora (Ramos-García *et al.*, 2010).

Hasta hace unas décadas el desarrollo de recubrimientos con aplicación en el área de alimentos estaba limitado al control en la transferencia de masa (gases, compuestos volátiles y vapor de agua). Sin embargo, en años recientes se han desarrollado empaques activos con la capacidad de mantener la calidad y la seguridad del alimento, los cuales contienen compuestos (antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes) que interactúan de manera benéfica con los alimentos o con la atmósfera interna circundante, prolongando la vida de anaquel. Dentro de las tecnologías de empaques activos, se incluyen aquellos con la incorporación de agentes antimicrobianos que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, dichos compuestos con actividad antimicrobiana generalmente son inmovilizados en la matriz polimérica del material empleado para elaborar el recubrimiento o película (Quintavalla *et al.*, 2002).

El amplio espectro de compuestos antimicrobianos de origen orgánico, como los aceites esenciales, bacteriocinas, enzimas, extractos frutales, entre otros, han mostrado un gran potencial contra el crecimiento microbiano, frente al desarrollo de microorganismos

resistentes a los antibióticos, sin embargo, los compuestos orgánicos presentan algunas desventajas como la sensibilidad a las condiciones de procesamiento como altas temperatura o presiones. Una alternativa explorada recientemente es el empleo de agentes de origen inorgánico como plata, cobre, óxido de titanio y óxido de zinc, que en escala nanométrica presentan una fuerte actividad antimicrobiana de amplio espectro (Espitia *et al.*, 2012). Particularmente el ZnO ha llamado la atención por ser una sustancia segura para animales y humanos (Nafchi *et al.*, 2012) que lo hace un candidato ideal para ser empleado como antimicrobiano.

Dentro de los materiales de fuentes renovables utilizados para recubrimientos comestibles se destaca el uso de proteínas (soya, leche, maíz), polisacáridos (celulosa, carboximetilcelulosa, gomas y almidón) y lípidos (ceras, goma laca) (Xie *et al.*, 2002). Las películas elaboradas a partir de polímeros naturales deben presentar algunas características como ser biocompatibles, biodegradables, comestibles y sostenibles, a fin de ofrecer una alternativa al uso de compuestos derivados del petróleo (Kraśniewska *et al.*, 2012).

Los recubrimientos comestibles a base de biopolímeros han sido utilizados en una gran variedad de alimentos para extender la vida de anaquel y promover la seguridad alimentaria mediante la reducción del crecimiento de microorganismos, a través del contacto directo del empaque con la superficie del alimento sólido (carne, huevo, queso, entre otros) o por su contacto con alimentos líquidos (leche, huevo fresco envasado). Los recubrimientos o películas con actividad antimicrobiana pueden ser empleados con varios propósitos: prolongar la vida de anaquel, mantener la calidad, reducir de manera potencial la contaminación del alimento, mejorar las propiedades mecánicas del alimento, entre otras (Cagri *et al.*, 2004).

Con relación a la aplicación de los recubrimientos en la industria avícola, en la literatura científica se encuentran estudios enfocados a la aplicación de recubrimientos en la carne de ave y en el huevo para mantener la calidad sanitaria del producto. Xie *et al.* (2002), evaluaron la aplicación de recubrimientos a base de proteína aislada de soya y gluteína de trigo en huevo de gallina, los autores encontraron que las propiedades de barrera física y biológica del cascarón mejoraron lo que podría disminuir la contaminación del huevo por

microorganismos. Gennadios *et al.* (1997) señalaron que entre las ventajas de utilizar recubrimientos en carne o productos cárnicos están el evitar la pérdida de humedad durante el almacenamiento de la carne congelada; ayuda a mantener el jugo de la carne fresca durante el embalaje en carne de ave y otro tipo de carnes; permite reducir la tasa de oxidación de lípidos disminuyendo la formación de olores y sabores no deseados en el producto y el cambio a color marrón por la oxidación de la mioglobina; reduce la carga de microorganismos y patógenos en la superficie de la carne recubierta; asimismo restringe la volatilidad del sabor y previene la absorción de olores extraños.

En la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana se pretende eliminar la posibilidad de adaptación o resistencia de patógenos, procurando que sean inocuos en los organismos superiores y menos tóxicos al ambiente; por lo que surge la necesidad de explorar nuevas alternativas que presenten las características antes mencionadas (Mirhosseini *et al.*, 2013).

El uso de agentes antimicrobianos de origen inorgánico como los metales y óxidos metálicos han atraído la atención para el control de microorganismos, y la década pasada fue testigo de una expansión de una investigación sin precedentes, debido a los avances en la nanotecnología. Se ha reportado que los compuestos inorgánicos a escala nanométrica presentan una fuerte actividad antibacteriana a bajas concentraciones en comparación con el material de tamaño micrométrico, esto es debido a su gran área superficial con respecto al volumen (Espitia *et al.*, 2012).

Al desarrollo de películas con incorporación de un antimicrobiano o antifúngico, que permita mejorar la preservación de los alimentos y reducir el uso de conservadores químicos, se les ha denominado películas activas (Aider, 2010). En este sentido, algunos estudios que resultan novedosos son la incorporación de nanopartículas de ZnO para la formación de empaques o recubrimientos, como es el caso de la evaluación de empaques activos, para el control de *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus* en carne de ave (Akbar *et al.*, 2014); el trabajo realizado por Jin *et al.* (2011) fue evaluado el efecto antimicrobiano y sinérgico de un recubrimiento con alil isotiocianato y nanopartículas de ZnO en envases para almacenar albúmina de huevo, contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Enteritidis*. Al-Naamani *et al.*

(2016), desarrollaron empaques de polietileno y quitosano con incorporación de nanoestructuras de ZnO, enfrentados contra *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* y *S. aureus*. Así también la incorporación de nanopartículas de ZnO en películas de quitosano y su efecto antimicrobiano con el modelo bacteriano *E. coli* (Bajpai *et al.*, 2010).

1.4. Nanoestructuras de ZnO

La nanotecnología ha sido definida como el estudio y la manipulación de la materia a escala atómica y molecular (Chellaram *et al.*, 2014), en un rango que va de 1 a 100 nanómetros. Uno de los principales objetivos de la nanociencia y la nanotecnología son la comprensión de los efectos debidos a la miniaturización, su influencia en las propiedades de los materiales y la explotación de estos efectos para el diseño de estructuras, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones (Polarz *et al.*, 2005).

Una de las ramas importantes en la nanotecnología es la referente a la síntesis de materiales. En general, los métodos de síntesis de nanomateriales han sido clasificados en dos aproximaciones: “top down” que es el desgaste del material por medios físicos o químicos para obtener partículas con tamaño nanométrico (Cushen *et al.*, 2012); y “bottom up” en el cual la síntesis de nanoestructuras se realiza a partir de átomos o moléculas, entre los métodos empleados son extracción/evaporación con disolventes, cristalización, autoensamblado, deposición capa por capa y métodos químicos como el hidrotérmico, sonoquímico, química húmeda (Brody *et al.*, 2008).

La importancia de los métodos de síntesis deriva en el control de la morfología, tamaño, composición y microestructura, ya que las propiedades de los nanomateriales están en función de sus características. El principal distintivo de los nanomateriales es su tamaño (0.1 a 100 nm) y su relación área superficial/volumen, que les permite tener un comportamiento diferente en sus propiedades mecánicas, biológicas, estéricas, catalíticas, conductividad térmica y eléctrica, absorción óptica y punto de fusión comparadas con las de tamaño másico (Iravani, 2011).

Desde hace algunos años se ha reportado que los materiales inorgánicos concretamente los óxidos metálicos como el TiO_2 , ZnO , MgO , CaO , CuO , Al_2O_3 , Ag_2O , y CeO_2 tienen mayor actividad antimicrobiana a escala nanométrica; entre las ventajas principales de su aplicación es el requerimiento de bajas concentraciones, tienen propiedades físicas y químicas únicas y son estables a altas temperaturas y presiones. Algunos óxidos inorgánicos como el CaO , MgO y ZnO son minerales esenciales para el cuerpo humano por lo que son considerados no tóxicos (Raghupathi *et al.*, 2011, Espitia *et al.*, 2013b, Padmavathy *et al.*, 2016).

El óxido de zinc (ZnO) es un compuesto inorgánico con un peso molecular de 81.379 g/mol y un punto de fusión de 1975 °C (NCBI, 2005). De los tres polimorfismos (Figura 1) que presenta, la wurtzita con estructura hexagonal es la más común y estable en condiciones ambientales (Johar *et al.*, 2015).

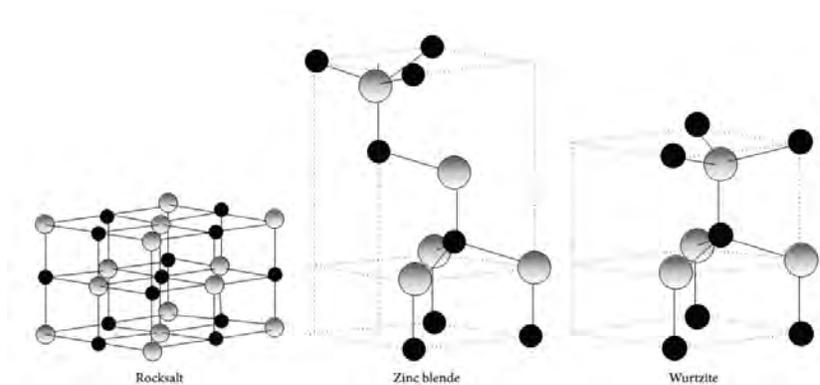


Figura 1. Representación de las diferentes formas cristalinas del ZnO , las esferas de color gris y negro representan el Zn y el O, respectivamente. Fuente: Johar *et al.* (2015).

De los cinco compuestos del zinc, el óxido de zinc (código de regulación federal 182.8991) ha sido clasificado como una sustancia “generalmente reconocida como segura” (GRAS) por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés). Por considerarlo como un micronutriente es utilizado en la fortificación de cereales procesados y por su actividad antimicrobiana ha sido incorporado en empaques para alimentos para su conservación, o bien como ingrediente activo para aplicaciones dermatológicas en cremas y lociones (Xie *et al.*, 2011, Mirhosseini *et al.*, 2013).

En el área de los materiales, es considerado uno de los mejores óxidos metálicos por sus propiedades semiconductoras, fotocatalíticas, ópticas y eléctricas. Tiene una energía del ancho de banda prohibida de 3.37 eV, que lo convierte en un material comercialmente importante, empleado en la industria de la pintura, de las gomas, del concreto, de la electrónica, la cosmética, de la biomedicina y la industria alimentaria. Se ha reportado que sus propiedades y aplicaciones se ven potencializadas a escala nanométrica (An *et al.*, 2009).

Para la síntesis de las nanoestructuras de ZnO se han desarrollado diversos métodos, como la deposición química en fase vapor, evaporación térmica, deposición por erosión catódica, evaporación física a alta temperatura; sin embargo, los procedimientos son largos y complicados, que requieren equipo sofisticado o rigurosas condiciones de experimentación como por ejemplo altas temperaturas, lo que restringen severamente su aplicación a nivel industrial a gran escala. En contraste, la síntesis vía química húmeda ofrece condiciones fácilmente controladas, bajo consumo de energía y la obtención de producción en masa de ese material. Los procesos vía química húmeda que se han reportado son el proceso por sol-gel, el crecimiento por microemulsiones, el método hidrotérmico, la síntesis por radiación de microondas, el método de precipitación, entre otros.

El método de síntesis hidrotérmico se lleva a cabo en sistemas cerrados, en reactores tipo autoclave para generar altas presiones e incrementar la temperatura de manera importante durante el proceso, lo que mejora la reactividad de las especies químicas (Lu *et al.*, 2000); sin embargo, entre sus desventajas, utiliza un rango de temperaturas (80 °C a 200 °C) que debe mantenerse a lo largo del tiempo de síntesis, lo que genera un uso continuo de energía, se requiere el uso de surfactantes y aditivos, que algunos de ellos son subproductos, que pueden ser tóxicos al ambiente (Ahsanulhaq *et al.*, 2008).

La síntesis por radiación de microondas ha sido recientemente explorada, entre sus ventajas permite una fricción intensa y colisión de las moléculas creadas en ellas, requiere de un equipo sencillo, no se requieren de catalizadores de crecimiento, tiene una mayor eficiencia en la producción de partículas más pequeñas, uniformidad a gran escala y principalmente se emplean bajas temperaturas (90 °C) y que el calentamiento de la muestra es rápida y uniforme (Kajbafvala *et al.*, 2009, Vijayalakshmi *et al.*, 2015). Entre las desventajas de este

método es que previamente se debe realizar la reacción entre reactivos, algunos sistemas requieren agitación previa, no se puede tener control de temperatura menores a 90°C, el rápido calentamiento de la solución puede provocar la proyección de la muestra y para evitar esto hay que establecer tiempos definidos para continuar con la reacción en el microondas además que el uso de algunos reactivos es restringido como compuestos que son fácilmente inflamables.

Finalmente, el método de precipitación es un método sencillo que es considerado también un método de síntesis verde, que ha sido ampliamente utilizado para obtención de diferentes tipos de morfologías de ZnO a bajo costo, presentan buen rendimiento y además se puede tener control sobre los parámetros de síntesis, la temperatura que se utiliza es relativamente baja, se pueden ajustar el valor de pH durante la reacción, así como la velocidad de adición de los reactivos, además de que no requiere de equipo complicado (Raoufi, 2013). Estas ventajas permiten que sea una de las mejores opciones en la síntesis de nanopartículas.

La síntesis de nanopartículas por vía química verde surge como una opción que propone la capacidad creativa para innovar métodos químicos tradicionales para obtener rentabilidad económica y ambiental. El término “química verde” fue acuñado a principios de los años 90’s por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, (EPA por sus siglas en inglés). La EPA define que la *“Química verde, también conocida como química sustentable, es el diseño de productos y procesos que reducen o eliminan la generación de sustancias peligrosas”*. La química verde se aplica al ciclo de vida de los productos químicos, incluyendo el diseño, manufactura y uso. Prácticamente la química verde se basa en el empleo de nueva tecnología y hardware, como son los reactores de flujo o microondas; también el uso de bajas temperaturas, la disminución de los tiempos de reacción, incremento del rendimiento, y la disminución del consumo de energía y la generación de residuos (Clark *et al.*, 2012). Todos los criterios antes mencionados forman parte de los 12 principios de la química verde, que proporcionan el marco para un diseño experimental sostenible (Anastas *et al.*, 2010).

En el caso particular de las nanoestructuras de ZnO, diversos métodos han sido desarrollados para su síntesis, con la finalidad de controlar su morfología y tamaño, para su aplicación en diferentes áreas del conocimiento. De este material se han logrado sintetizar estructura con

morfologías como peines (Hashimoto *et al.*, 1996), anillos (Kong *et al.*, 2004), hélices, cinturones (Pan *et al.*, 2001), hojas (An *et al.*, 2009), bastones, tubos, dendritas y flores (Xie *et al.*, 2009). De todos los tipos de nanoestructuras de ZnO que se han sintetizado, se ha reportado que las de tipo flor o erizo tienen mayor actividad fotocatalítica, esta actividad está relacionada a la formación de especies altamente oxidantes, lo que puede representar un aumento en actividad antimicrobiana (Ahsanulhaq *et al.*, 2008). En la síntesis típica de nanoestructuras de ZnO por el método de química húmeda (hidrotérmico, precipitación), los precursores utilizados para la reacción son una sal metálica y una base para el control del valor de pH.

Se ha reportado que el hábito de crecimiento del ZnO está fuertemente influenciado por los parámetros de síntesis, como la temperatura de reacción, el valor del pH de la solución, la concentración de los reactivos, entre otros. En la

Tabla 2 se presenta un condensado de los métodos que han sido reportados para la síntesis de nanoestructuras tipo flor o estrella, en la cual se observa que uno de los precursores más utilizado es el nitrato de zinc y para el control del valor de pH el hidróxido de sodio. Algunos métodos contemplan la adición de un agente surfactante o estabilizante, para el control de la morfología y prevención de la aglomeración de las nanoestructuras.

Teniendo en cuenta la necesidad de generar protocolos de síntesis que incluya algunos principios de la química verde, es importante considerar los subproductos de la reacción, y explorar condiciones de síntesis con bajo impacto ambiental. De los métodos reportados pocos utilizan como precursor el nitrato de zinc en combinación con el hidróxido de potasio como agente precipitante, el subproducto de la reacción es nitrato de potasio (KNO₃). Este compuesto se utiliza como fertilizante de suelos y como agente remediador de suelos contaminados con hidrocarburos según lo reportado por Amadi *et al.* (1993). También es utilizado como agente antimicrobiano (E252) en embutidos, quesos y carnes (Honikel, 2008), o bien como agente desensibilizador en pasta dental (Wara-aswapati *et al.*, 2005).

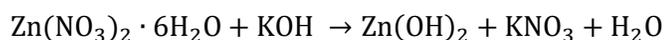


Tabla 2. Métodos de síntesis de nanoestructuras tipo flores.

Precursor	Reductor/ surfactante	Método de síntesis	Condiciones de síntesis	Tamaño de nanostruct uras (µm)	Referencia
Zn(NO ₃) ₂	NH ₃ ·H ₂ O	Precipitación	Estabilización de la sal precursora por 10 min. El experimento se realizó a 60°C en agitación constante por 24 horas. Lavados con etanol.	1 - 2.5	(Liu <i>et al.</i> , 2006)
Zn(NO ₃) ₂	NaOH	Precipitación	Temperatura a 90 °C con reflujo hasta de 11 horas, secado a 60 °C por 12 horas.	2.5 a 3.5	(Ahsanulhaq <i>et al.</i> , 2008)
ZnCl ₂	NaOH/SDS	Precipitación	Reacción a 3 °C, agitación a temperatura ambiente por 1.5 horas y se dejó envejecer a 85 °C /5h.	3 a 10	(Xie <i>et al.</i> , 2009)
ZnO	NaOH	Hidrotérmico	Estabilización de la reacción 90 °C por 10 horas, secado a 65 °C por 48 horas.	3	(Ma, Xue-Yong <i>et al.</i> , 2009)
ZnCl ₂	NaOH	Precipitación	Sin agitación a 80 °C por 24 horas, secado a 80 °C por 12 horas	1.5	(Li <i>et al.</i> , 2009)
ZnCl ₂	NaOH	Precipitación	Estabilización de la sal precursora a 65 °C con agitación por 1 hora, adición de base por 10 horas con agitación y 2 horas más al finalizar la reacción. Secado a 70°C/6 horas. Calcinado de 200 a 1000 °C/ 2 h.	2.45	(Ashar <i>et al.</i> , 2016)
Zn(CH ₃ COO) ₂	NaOH	Hidrotérmico	Se emplea autoclave a 120 °C hasta por 6 horas.	2.6 a 5.6	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
Zn(CH ₃ COO) ₂	NaOH	Precipitación	Reflujo por 30 minutos a 90 °C. Lavado con metanol.	5 a 6	(Wahab <i>et al.</i> , 2007)
Zn(CH ₃ COO) ₂	CTAB NaOH	Hidrotérmico	Autoclave a 120 °C por 20 horas.	5	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
Zn(CH ₃ COO) ₂	KOH	Microondas	Empleo de un microondas doméstico a 180 W por 20 min. Lavado con agua desionizada y etanol absoluto. Secado a 80 °C /24h	2 – 4	(Phruangrat <i>et al.</i> , 2009)
Zn(NO ₃) ₂	NaOH	Precipitación	Solución mantenida en baño de aceite en un rango de 60 a 80 °C en agitación constante por 3 horas.	0.5 – 1	(Sepulveda-Guzman <i>et al.</i> , 2009)

Precursor	Reductor/ surfactante	Método de síntesis	Condiciones de síntesis	Tamaño de nanostruct uras (μm)	Referencia
Zn(SO ₄) ₂	NaOH N ₂ H ₄ ·H ₂ O	Hidrotérmico	Agitación por 20 minutos para llevar a cabo la reacción. Se empleó autoclave a 90 °C/ 5 h. Lavado con agua y etanol. Secado a 60 °C/4 h	5 – 6	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
Zn(CH ₃ COO) ₂	NaOH	Semillas - hidrotérmico	Se realizó una primera síntesis para obtención de semillas. Después se realizó un crecimiento con un método hidrotérmico.	1.8 a 2.4	(Baruah <i>et al.</i> , 2009)
Zn(NO ₃) ₂	(Hexametileno-tetramina)				
Zn(NO ₃) ₂	PVP N ₂ H ₄ ·H ₂ O	Microondas	Radiación de microondas por 10 min. Lavado con agua y etanol. Secado a 80 °C por dos horas.	1 -1.5	(Krishnakumar <i>et al.</i> , 2011)
Zn(NO ₃) ₂	NaOH	Microondas	Agitación por 30 min. y radiación de microondas a 180 W por 20 min. Lavado con agua y etanol. Secado a 80 °C /24 h	1.5	(Thongtem <i>et al.</i> , 2010)

1.5. Actividad antimicrobiana de las nanoestructuras de ZnO

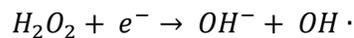
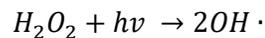
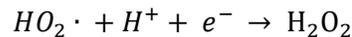
Tres son los mecanismos que se han propuestos para explicar la actividad antimicrobiana del ZnO: 1) daño por contacto directo de las nanopartículas destruyendo la integridad de la membrana y la pared celular, 2) la liberación de iones de zinc y 3) la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) por irradiación de luz ultravioleta o en condiciones de oscuridad (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

En relación al primer mecanismo se ha propuesto el daño a la membrana celular por las nanopartículas podrían deberse por interacciones electrostáticas y moleculares (como la carga negativa de grupos carboxilo y la carga positiva del ZnO) provocando la desestabilización de la membrana e incrementando su permeabilidad, causando cambios en su estructura como invaginación, perforación o deformación y provocar la internación de las nanopartículas dañando la producción de adenosín trifosfato (ATP), daño en la replicación del ácido desoxirribonucleico (DNA) o bien la liberación del contenido intracelular. Aunque también se le ha relacionado a las propiedades abrasivas del ZnO, como defectos de superficie como bordes y esquinas que podrían causar un daño mecánico, disgregación de la matriz de

exopolisacáridos, elongación y deformación de la pared celular (Díaz *et al.*, 2011, Sirelkhatim *et al.*, 2015).

Otro probable mecanismo es la disolución de iones Zn^{2+} , este elemento es esencial para el metabolismo de los microorganismos y cuando la biodisponibilidad rebasa la capacidad homeostática de la cepa bacteriana pueden producir citotoxicidad. Se ha propuesto que el ácido teicoico y la capa de peptidoglicanos en bacterias Gram positivas y los lipopolisacáridos en la membrana externa de la bacteria Gram negativas, pueden contribuir a la disolución del ZnO y facilitar la formación de sales iónicas con iones Zn^{2+} así como generar sitios de unión por la carga externa de la pared celular debido a la existencia de aniones en los polifosfatos y así el ácido teicoico o las lipoproteínas. El mecanismo preciso del transporte de iones metálicos a través de la membrana externa o de la capa de peptidoglicanos no es claro, sin embargo, se ha propuesto que estos iones son transportados a través de metaloproteínas específicas presentes en la membrana, que son miembros de la familia de transportadores dependientes de ATP (ATP-binding cassette (ABC)) y la familia de las proteínas asociada a la resistencia natural a macrófagos (natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP)). En condiciones normales, las metaloproteínas bacterianas restringen la adherencia a metales basados en la afinidad de enlace de metales de transición, conocida como la serie de metales de Irving-Williams donde la afinidad de los metales divalentes que sigue el siguiente un orden (Mg^{2+} y $Ca^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+}, < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$). Los exportadores de metaloproteínas son relativamente competitivos en metales divalentes como Ni^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} que mantiene la homeostasis interna del metal en la membrana interna, pero por el contrario suelen ser deficientes para metales no competitivos como son Ca^{2+} y Mg^{2+} que tiene una unión más débil. Bajo condiciones normales, los transportadores de eflujo de Zn^{2+} , reducen su exceso cuando su concentración en el citoplasma excede niveles tóxicos. En condiciones anormales y altas concentraciones de iones de Zn^{2+} , los transportadores de influjo para metales no competitivos pueden perder su selectividad crítica y eventualmente transportar los iones Zn^{2+} en lugar de iones metálicos no competitivos (Joe *et al.*, 2017). De esta manera el efecto antimicrobiano de la disolución de iones Zn^{2+} se ha relacionado con la inhibición del transporte activo, así como la afectación en el metabolismo de los aminoácidos y sistema enzimático (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

La principal causa de la toxicidad en bacterias se atribuye a la generación fotocatalítica de especies reactivas de oxígeno debido a su alta reactividad y propiedades oxidantes, y son los óxidos metálicos los que contribuyen con esta actividad antibacteriana (Sirelkhatim *et al.*, 2015). En este sentido, la generación de especies reactivas como OH^\cdot , H_2O_2 , y $\text{O}_2^{\cdot-}$; ocurre en la fotocatalisis ($h\nu$) cuando el fotón del ZnO activado permite la promoción de un electrón desde la banda de valencia produciendo un par electrón hueco (e^-h^+). Los huecos en moléculas de H_2O (en la suspensión del ZnO) se dividen en OH^\cdot y H^+ . Las moléculas de oxígeno disueltas son transformadas a radicales aniónicos superoxidados ($\cdot\text{O}_2^-$) las cuales reaccionan con H^+ para generar radicales (HO_2^\cdot), que colisionan con los electrones produciendo aniones peróxido de hidrógeno (HO_2^-), que reaccionan con iones hidrógeno para producir moléculas de H_2O_2 que pueden penetrar a la membrana celular y destruir a la bacteria.



Así, los radicales hidroxilo y superóxidos son partículas negativamente cargadas que no pueden entrar a la membrana celular y permanecen en contacto directo con otras superficies de las bacterias. Sin embargo, el H_2O_2 puede penetrar dentro de la célula causando la muerte de la bacteria. Además, los radicales peróxido reaccionan en la solución acuosa formando algunos radicales intermediarios los cuales forman finalmente radicales hidroxilos (Parida *et al.*, 2006, Padmavathy *et al.*, 2016).

Sin embargo, esta actividad también puede generarse aun en condiciones de oscuridad, ya sea por la vía de ROS o debido a otros mecanismos como a la presencia de defectos presentes en la superficie del cristal del ZnO, cuatro de los cuales tres son por vacancia de oxígeno (V_o) como las estancias de carga como son vacancia neutral (V_o^0), simple ionizado (V_o^\cdot) y doble ionizado ($\text{V}_\text{o}^{\cdot\cdot}$), y el cuarto corresponde a iones Zn^{2+} intersticial (Zn_i), los defectos son responsables de la captura de electrones mismos que son liberados y reducen el oxígeno, lo

que genera las especies reactivas aun en oscuridad, sin embargo, cabe resaltar que la concentración de radicales hidroxilo es mucho menor en oscuridad que en presencia de luz (Kumar *et al.*, 2017).

El efecto antimicrobiano de las nanopartículas del ZnO, también está en función de la concentración y del tiempo de exposición, a bajas concentraciones desencadena en algunos organismos una alta tolerancia o el crecimiento de los microorganismos porque el zinc actúa como nutriente o cofactor de procesos celulares; mientras que a mayores concentraciones hay inhibición o bien efectos bacteriostáticos, que dependen de las características intrínsecas de cada microorganismo. La inactivación de las bacterias, involucra la interacción directa entre las nanopartículas y la superficie celular, las cuales afectan la permeabilidad de la membrana por la entrada de las nanopartículas e inducción del estrés oxidativo en la célula bacteriana, lo que genera inhibición del crecimiento y eventualmente muerte celular (Xie, 2011). Tayel *et al.* (2011) señalaron que la actividad antibacteriana también está en función del tamaño de partícula, siendo mayor con tamaños de partícula menores, debido al aumento en el área superficial y por ende a la reactividad en la superficie de la partícula.

Diversas han sido las investigaciones realizadas acerca del empleo de las nanopartículas de ZnO como antimicrobiano, Gunalan *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la concentración de nanopartículas de ZnO en cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii*) y en hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma harzianum*, y *Rhizopus stolonifer*), los autores reportan que a mayor concentración de nanopartículas (11 mM para bacterias y 21 mM en hongos) la eficacia antimicrobiana aumentó. Los estudios realizados por el grupo de Zhang *et al.* (2008), sugieren que la efectividad de las nanopartículas de ZnO contra *E. coli* expuesta en condiciones de luz, es debida a la actividad fotocatalítica del material. En relación a los hongos filamentosos, la literatura señala que entre los mecanismos involucrados para el efecto antifúngico están la liberación de iones Zn^{2+} así como las interacciones electrostáticas de las nanopartículas, lo que puede provocar la afectación de la dinámica de compartimentos vesiculares (vacuolas y zincosomas) (Espitia *et al.*, 2013b), la falta del desarrollo de micelio y formación de esporas (Pasquet *et al.*, 2014) debido a la inhibición o deformación de hifas y conidias por la afectación

de funciones celulares causado por el aumento en el contenido de DNA y carbohidratos en respuesta al estrés de las hifas (He *et al.*, 2011).

Se ha reportado que nanoestructuras de ZnO con morfología tipo flor o estrella presentan absorción en la region visible del espectro electromagnético (400 nm), con mejor actividad fotocatalítica, la cual se relaciona directamente con la actividad antimicrobiana. Con la finalidad de aprovechar estas cualidades del ZnO nanoestructurado y de ofrecer una alternativa para el control de microorganismos patógenos de interes en la industria avícola y de los alimentos, el presente trabajo, tiene como objetivo evaluar a nivel *in vitro* la actividad antimicrobiana de un recubrimiento elaborado con almidón de maiz y con la incorporación de nanopartículas de ZnO contra *Salmonella* Enteritidis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Desarrollar un recubrimiento antimicrobiano con la incorporación de nanopartículas de ZnO sintetizadas vía química verde y evaluar su actividad *in vitro* para el control de *Salmonella* Enteritidis.

2.2. Objetivos específicos.

Establecer los parámetros óptimos de síntesis con la aplicación de algunos principios de la química verde para obtener nanoestructuras de ZnO con forma de flor.

Caracterizar a las nanopartículas de ZnO sintetizadas mediante las técnicas de espectroscopia UV-Vis (absorción y reflectancia difusa), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, microscopia electrónica de barrido, microscopia electrónica de transmisión, difracción de rayos X, dispersión de luz dinámica y potencial Z, para conocer sus propiedades de energía de la banda prohibida, forma, tamaño, composición y carga superficial.

Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de ZnO contra *Salmonella* Enteritidis para conocer su actividad como agente antimicrobiano.

Desarrollar un recubrimiento a base de almidón de maíz con la incorporación de nanopartículas de ZnO.

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana del recubrimiento contra la *Salmonella* Enteritidis por el método de difusión en disco.

3. HIPÓTESIS

La incorporación de nanopartículas de ZnO con estructura tipo flor en un recubrimiento a base de almidón presentará actividad antibacteriana contra la cepa de *Salmonella* Enteritidis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Los materiales utilizados para la síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc fueron: nitrato de zinc hexahidratado $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, hidróxido de potasio (KOH) (Sigma-Aldrich). Para los estudios *in vitro* se utilizaron: nutritivo caldo (Ref 275730), agar Mueller Hinton (Ref 225250) y agar Nutritivo (Ref 213000) grado bacteriológico de Difco - Becton Dickinson. Como indicador de crecimiento bacteriano se empleó cloruro de iodonitro-tetrazolium ($C_{19}H_{13}ClIN_5O_2$; Número CAS 146-68-9) adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La cepa como modelo microbiológico fue *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076™. El antibiótico utilizado como control positivo fue ampicilina trihidratada, como testigo se emplearon nanopartículas de ZnO (nanopolvo; tamaño de partícula <50 nm; pureza >97%, Número CAS 1314-13-2) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para preparar la suspensión formadora de películas y recubrimientos se utilizó almidón de maíz adquirido en Ingredion México S.A. de C.V. (Tlalnepantla, Estado de México, México), el agente plastificante fue glicerol ($C_3H_8O_3$; pureza $\geq 99.5\%$; número CAS 56-81-5) grado analítico adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). En todo el experimento se utilizó agua desionizada como disolvente.

4.2. Métodos.

4.2.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO.

Para la síntesis de las nanopartículas se prepararon 25 mL de una solución acuosa de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 M y 50 mL de una solución acuosa de KOH 0.6 M. En un vaso de precipitado se colocaron los 25 mL de la solución de nitrato de zinc y se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos a temperatura ambiente, enseguida se adicionaron 23 mL de la solución de hidróxido de potasio y la mezcla se agitó de manera constante durante 2 horas, una vez transcurrido el tiempo, la reacción se dejó en reposo por 24 horas. El precipitado se lavó por triplicado mediante ciclos de centrifugado (5000 rpm/5 minutos) y resuspendido en agua

desionizada. Finalmente, las nanopartículas fueron secadas a 120 °C durante una hora y sometidas a tratamiento térmico a 600 °C por dos horas.

4.2.2. Caracterización de las nanopartículas de ZnO

4.2.2.1. Espectroscopia de absorción ultravioleta visible (UV-Vis)

La espectroscopia de ultravioleta-visible (UV-Vis), es una técnica que se basa en la medición de la absorción o transmisión de la luz en función de la longitud de onda, la cual proporciona información sobre las transiciones electrónicas que se produce en el material, en el caso de los semiconductores esta técnica de caracterización ofrece un método conveniente para estimar la energía de la banda prohibida (E_g), ya que detecta las transiciones electrónicas de la banda de valencia a la banda de conducción (Chen *et al.*, 2013). Para determinar el espectro de absorción de las nanopartículas de ZnO, 2 mg de la muestra se redispersaron en 1.5 mL de agua desionizada y se sometieron a ultrasonido durante 10 minutos a 25 KHz de frecuencia en un equipo Transsonic TI-H-5 Elma. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de UV-Vis Cary 8454 de Agilent Technologies de un solo haz, con detector de arreglos de diodos, el rango de lectura del espectro fue de 200 a 1100 nm, la lectura se realizó a temperatura ambiente y como blanco se empleó agua desionizada.

Del pico máximo de absorción del espectro de absorción UV-Vis se determinó la energía de la banda prohibida (E_g) utilizando la ecuación de la relación de Plank:

$$E_g = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

E_g = energía de la banda prohibida

h = constante de Planck

c = velocidad de la luz

λ = longitud de onda del pico máximo de absorción (nm)

4.2.2.2. Espectroscopia de ultravioleta-visible por reflectancia difusa (UV-Vis-ERD).

El análisis de polvos de materiales por espectroscopia de absorción UV-Vis requiere de la preparación de la muestra, que generalmente debe ser dispersada en algún disolvente, el cual puede influir en el análisis. La técnica de reflectancia difusa es utilizada usualmente para obtener los espectros de muestras en polvo con un mínimo de preparación de la muestra, esto permite discriminar las interferencias cuando la muestra se encuentra en una dispersión acuosa (Vera *et al.*, 2005). La teoría que hace posible el uso de la reflectancia difusa para determinar la energía de la banda prohibida es la función de Kubelka-Munk, que permite describir el comportamiento de la dispersión de la luz a través de espécimen, y calcular el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión y medir de esta forma las propiedades ópticas del material (Morales *et al.*, 2007). La obtención del espectro de reflectancia difusa de las nanopartículas de ZnO sintetizada se realizó en un espectrofotómetro Lambda 365 Perkin Elmer de doble haz equipado con una esfera de integración, con una velocidad de escaneo de 600 nm/min, los barridos fueron en un rango de longitud de onda de 300 a 800 nm a temperatura ambiente. La muestra en polvo fue depositada en un vial de cristal con fondo plano para su lectura, el blanco empleado fue sulfato de bario (BaSO₄).

La energía de la banda prohibida fue obtenida de los datos del espectro de reflectancia difusa utilizando la función de Kubelka-Munk (Ecuación 2):

$$\frac{K}{S} = \left[\frac{(1-R_{\infty})^2}{2 R_{\infty}} \times hv \right]^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde:

K = coeficiente de absorción molar

S= factor de dispersión

R_{∞} = reflectancia difusa a una longitud de onda dada

$h = \text{constante de Plank}$

$\nu = \text{frecuencia}$

4.2.2.3. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro electromagnético del infrarrojo abarca el intervalo de la región visible ($\lambda=780$ nm) hasta las microondas ($\lambda=1$ mm) en el que se encuentran tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano; la unidad que comúnmente se emplea es el inverso de la longitud de onda ($1/\lambda$), llamada número de onda ($\tilde{\nu}$) con la unidad recíproca en centímetros (cm^{-1}). Particularmente en la región del infrarrojo medio el rango de energía del fotón se extiende entre 0.05 eV a 0.5 eV, la cual se ajusta a las transiciones vibratorias cuantificadas en enlaces intra e intermoleculares de átomos unidos en moléculas; la absorción de la radiación por la muestra a la frecuencia cuando coincide con la frecuencia de vibración entra en un estado de vibración resonante, por lo que la espectroscopia de infrarrojo mide la pérdida de radiación infrarroja transmitida de la muestra a través de un intervalo de frecuencias del espectro electromagnético. El espectro de infrarrojo refleja el número de componentes detectables de la muestra, la intensidad de las bandas detecta la cantidad de absorción de los diferentes enlaces moleculares que están en relación con la abundancia relativa de los constituyentes de la muestra. Para el análisis de las nanopartículas de ZnO se utilizó un espectrofotómetro Frontier FTIR MIR/NIR de Perkin Elmer, con acoplamiento de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante. La muestra en polvo fue colocada en la ventana de diamante y prensada con el brazo del (ATR), el análisis se realizó en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} con 16 barridos y la lectura se realizó a temperatura ambiente.

4.2.2.4. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X un método de caracterización muy importante en el campo de los materiales que permite obtener información a partir de compuestos de composición química definida y de disposición atómica ordenada. La interacción de los rayos X con la muestra produce un diagrama de difracción, pudiendo ser usado para la identificación del compuesto,

conocer la estructura cristalina, determinar los parámetros de red o bien calcular el tamaño de cristal (Benavente *et al.*, 2012).

La difracción de Rayos X se realizó en un difractómetro Siemens D5000 con una radiación Cu ($K\alpha$) ($\lambda=0.1542$ nm) equipado con filamento de wolframio, que operó a 40 kV y 30 Å con un rango de 2θ de $10^\circ - 90^\circ$. Para el análisis, una muestra en polvo de nanopartículas de ZnO fue colocada en el portamuestras y fijado en el goniómetro para su análisis que fue realizado a temperatura ambiente.

4.2.2.5. Potencial zeta (ζ) y distribución de tamaño de partícula.

El potencial zeta es una medida de magnitud de la repulsión entre las partículas debido a la carga de su capa Stern y la capa difusa, lo que indica la dispersión electrostática de la muestra y su estabilidad. La distribución del tamaño de partícula se llevó a cabo por dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés), el análisis se obtiene a través del movimiento aleatorio de las partículas suspendidas o dispersas en un medio líquido en el que se hace incidir un láser que es dispersado en diferentes intensidades por las partículas, con las fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad de dicho movimiento y puede obtenerse el tamaño de partícula mediante la relación Stokes- Einstein. El análisis del potencial zeta y la distribución del tamaño de partícula se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) a temperatura ambiente. Para tal efecto se preparó una dispersión de nanopartículas en agua desionizada y se sometió a ultrasonido por 10 minutos en operación estándar a una potencia de 100% y 25 KHz de frecuencia. Para el análisis del potencial zeta se utilizó una celda capilar plegable con electrodos y para la distribución de tamaño de partícula la muestra fue depositada en una celda de vidrio. La determinación se realizó por triplicado.

4.2.2.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB).

La microscopía electrónica de barrido es una de las técnicas más versátiles para el análisis de la morfología, el tamaño y la composición química de los materiales. El microscopio electrónico de barrido emplea un haz de electrones generado por un filamento de tungsteno para formar una imagen amplificada de la superficie de un material. El equipo cuenta con

varios detectores los que incluyen el de electrones secundarios que permite obtener imágenes con alta resolución, un detector de electrones retrodispersados para el análisis de la topografía de la superficie y un detector de energía dispersiva de rayos X el cual recolecta los rayos X generados por la muestra que permite el análisis de la composición química. Para su observación en el MEB las nanopartículas de ZnO fueron dispersadas uniformemente en una cinta de carbono fijada en el portamuestras de cobre y recubiertas con una capa fina de oro para mejorar su conductividad. Se utilizó un microscopio JEOL JSM 6010 con filamento de tungsteno, con voltaje de aceleración de 20 kV al vacío.

4.2.2.7. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica ampliamente usada para conocer el tamaño y la morfología de muestras con un grosor menor a 200 nm. Para la formación de la imagen se emplean electrones acelerados generados por un cambio de potencial dentro de un cañón al vacío los cuales son focalizados por lentes electrónicas. El haz de electrones generados irradia una muestra delgada por una de sus caras, obteniendo una imagen formada por los electrones que emergen por la cara contraria. Para su observación en el MET las muestras fueron dispersadas en agua desionizada y sonicadas durante 10 minutos a 25 kHz de frecuencia (Transsonic TI-H-5 Elma), enseguida se colocó una gota de la dispersión en una rejilla de cobre recubierta con carbono, las rejillas fueron secadas a punto crítico. El equipo utilizado fue un microscopio marca JEOL JEM 12000 EXII equipado con filamento de tungsteno y un voltaje de aceleración de 60 kv al vacío.

4.2.3. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO se realizó empleando el método de microdilución en placa para determinar la concentración mínima inhibitoria y el método de difusión en disco de acuerdo con lo señalado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute por sus siglas en inglés).

4.2.3.1. Reconstitución e identificación de la cepa.

La reconstitución de la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la guía de cultivos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Colección American Type Culture Collection por sus siglas en inglés) (ATCC, 2015). La cepa se sembró en caldo y agar nutritivo se incubó a una temperatura de 37 °C por 24 horas. El procedimiento fue realizado en el laboratorio de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CDBB) del CINVESTAV.

La identificación del género y especie de la cepa de *Salmonella* Enteritidis se realizó a través de pruebas bioquímicas primarias y secundarias. Las técnicas empleadas fueron tinción de Gram, descripción de la morfología de la colonia, oxidasa y catalasa; características enzimáticas a través de medios diferenciales y selectivos, entre ellos rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP), citrato de Simmons, triple hierro y azúcar (TSI), urea, fermentación de azúcar (ramnosa), agar xilosa, lisina y desoxicolato (XLD) y finalmente ácido sulfhídrico, indol y motilidad (SIM) (Vinayananda *et al.*, 2017).

4.2.3.2. Concentración mínima inhibitoria.

El método de microdilución en placa de 96 pozos fue empleado para determinar la concentración mínima inhibitoria (por sus siglas en inglés MIC, minimum inhibitory concentration) de las nanopartículas de ZnO con estructura tipo flor. El método se realizó de acuerdo a lo señalado por el método M07-A8 y M100-S25 del CLSI bajo el esquema de antimicrobianos insolubles en agua (CLSI, 2012a; 2015). Se empleó este esquema debido a la insolubilidad del ZnO en agua, es importante resaltar que no se utilizó DMSO como disolvente para evitar cambios morfológicos en la estructura de las nanopartículas de ZnO, cambios de pH o solubilidad del compuesto. El solvente utilizado para dispersar las nanopartículas de ZnO fue agua desionizada.

Para las diluciones de las nanopartículas de ZnO, se preparó una dispersión stock de 12,800 µg/mL en agua desionizada estéril, que fue sometida a ultrasonido durante 10 minutos en operación estándar a una potencia de 100% y 25 KHz de frecuencia. De la dispersión stock se

prepararon diluciones dobles seriadas en caldo Müller-Hinton que corresponden a las concentraciones de 12800, 6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 y 25 µg/mL.

Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo fresco de 24 horas de *Salmonella* Enteritidis, que fue ajustado a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland que corresponde a 1×10^8 UFC/mL. Del inóculo se tomó una alícuota de 100 µL y se transfirió a un volumen de 9.9 mL de solución salina esterilizada. En la prueba se utilizaron las nanopartículas de ZnO con estructura tipo flor (**ZnO-F**), un control positivo (nanopartículas de ZnO < 50 nm de Sigma-Aldrich (**ZnO-S**), el control negativo (caldo e inóculo) y un testigo (ampicilina trihidratada a partir de una concentración de 400 µg/mL).

La placa de 96 pozos para el ensayo de microdilución fue dividida en 5 secciones considerando los diferentes tratamientos (Figura 2). Para la prueba, en cada pozo se depositó un volumen de 200 µL de acuerdo con lo indicado en la Tabla 3, y la placa fue incubada a 37°C por 24 horas en condiciones de oscuridad.

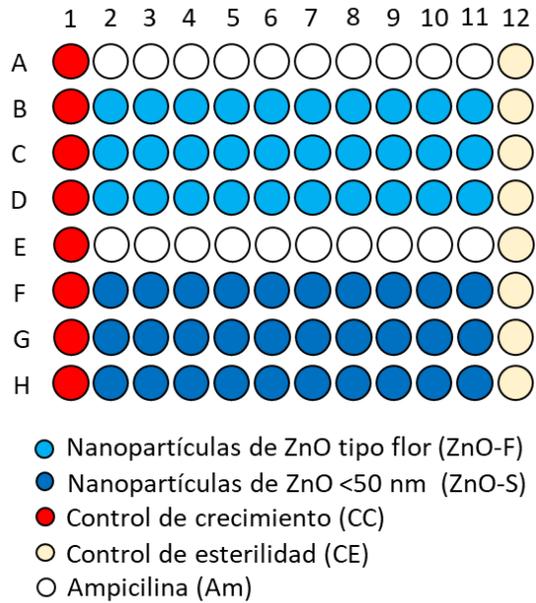


Figura 2. Esquema de la división de la placa de 96 pozos.

Tabla 3. Volúmenes empleados para el llenado de la placa de 96 para determinar la MIC.

Condición	Caldo M-H (μL)	Antimicrobiano (μL)	Inóculo (μL)
CC	100	-	100
CE	200	-	-
Am	-	100	100
ZnO-F	-	100	100
ZnO-S	-	100	100

El pozo de la MIC se identificó empleando cloruro de iodonitro-tetrazolium (INT) como indicador de crecimiento bacteriano debido a la dificultad de la lectura de la placa por la precipitación de las nanopartículas de ZnO. A cada pozo se le añadieron 40 μL del indicador al 2% (peso/volumen), la presencia de una coloración rojiza (formazan) es indicativo de la actividad biológica de las bacterias (Patil *et al.*, 2017) y la MIC se determinó para aquel pozo con ausencia de coloración.

Para confirmar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de ZnO-F y ZnO-S, se tomaron 10 μL del pozo donde se identificó la CMI, los cuales fueron depositados en una placa de agar *Salmonella Shigella* para identificar las colonias características de *Salmonella* Enteritidis y se incubó por 24 horas a 37°C, las placas libres de crecimiento validaron el método de la MIC.

4.2.3.3. Ensayo de difusión en disco de las nanopartículas de ZnO.

Para determinar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de ZnO-F y ZnO-S se realizó el ensayo de difusión en disco con algunas modificaciones de acuerdo con lo reportado a Xu *et al.* (2013) y siguiendo las recomendaciones del método M02-A11 del CLSI (2012b). Brevemente, se pesaron 500 μg de nanopartículas tanto de ZnO-F y ZnO-S (control positivo) y se formó un comprimido de 6 mm de diámetro con ayuda de una prensa hidráulica con una presión de 20 MPa. Como control se utilizaron discos de papel Whatman impregnado con

agua desionizada y como testigo se utilizó una dilución 10 µg/mL de Ampicilina trihidratada en discos de papel Whatman.

Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo fresco de *Salmonella* Enteritidis que fue ajustado a una concentración estándar de 0.5 de McFarland en solución salina esterilizada. En la solución ajustada se sumergió un hisopo estéril que fue rotado varias veces y presionado firmemente en las paredes del tubo para remover el exceso de líquido. La inoculación del medio se realizó en placas de agar Mueller Hinton a través de sembrado masivo y se permitió secar de 3 a 5 minutos.

Los comprimidos y los discos fueron colocados cuidadosamente sobre el agar inoculado que fue incubado a 37 °C por 16 a 20 horas. Pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición del comprimido.

4.2.4. Preparación y caracterización de la película

4.2.4.1. Preparación de la película

La solución formadora de película se preparó a partir de una dispersión acuosa con almidón al 4% de almidón (peso/peso), nanopartículas ZnO al 5% (peso/peso) y glicerol al 40% (peso/peso, con relación al total de sólidos). La dispersión fue calentada a 85 °C por 30 minutos con agitación constante (Nafchi *et al.*, 2012). La formación de la película se realizó por el método de vaciado, depositando 8 mL de la suspensión en cajas de Petri de poliestireno de 80 mm de diámetro. El secado de las películas se realizó a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 24 horas y a una humedad relativa del 35 %. Las películas fueron removidas de las cajas y almacenadas en bolsas de polietileno con cierre hermético a temperatura ambiente para su posterior caracterización. Como control, se elaboró una película sin nanopartículas de ZnO. Para su caracterización las películas fueron acondicionadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y una humedad relativa del 75 % durante 48 horas (Sánchez *et al.*, 2015).

4.2.4.2. Caracterización de la película incorporada con nanopartículas de ZnO

Las películas fueron caracterizadas por métodos físicos (color, contenido de humedad, transparencia, grosor, permeabilidad) y la morfología por microscopía de barrido.

Color de la película: El color de la película se determinó con un colorímetro marca Konica Minolta CR-410, la calibración del equipo y la lectura de las películas se realizaron con la placa blanca estándar. Con los datos de L, a y b se calculó la diferencia total de color entre la muestra y la referencia o ΔE , la saturación o croma (C^*) y el tono o ángulo Hue con las siguientes ecuaciones:

$$\Delta E = [\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$C^* = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Hue} = \tan^{-1} \left(\frac{b}{a} \right) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

ΔE = Diferencia de color total

Δ = diferencia entre el estándar y la muestra

L= luminosidad

a= escala de color del rojo al verde

b= escala de color del amarillo al azul

C^* = croma

Hue = ángulo del tono o matiz

Transparencia: La transparencia de la película se realizó empleando el espectrofotómetro Lambda 365 de Perkin Elmer de doble haz con el acoplamiento de la esfera de integración, en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm a temperatura ambiente. La película se colocó en el puerto de transmitancia de la esfera de integración, tomando como

referencia el aire y se realizó la lectura de la transmitancia (Salamanca *et al.*, 2011). La transparencia fue medida a 600 nm (T_{600}) de acuerdo a la $Transparencia = \frac{\log \%T}{b}$ Ecuación 6.

$$Transparencia = \frac{\log \%T}{b} \quad \text{Ecuación 6}$$

Dónde:

T_{600} = transmitancia a una longitud de onda de 600 nm

b = grosor de la película (mm)

Contenido de humedad: El contenido de humedad se realizó de acuerdo al método reportado por (Ramos *et al.*, 2012); brevemente, se recortó la película para obtener un peso de 0.200 g que fue colocada en una capsula de aluminio con tapa y sometida a calentamiento en una estufa Blue M, Electric Company a 103 °C por 24 horas, se registró el peso inicial y final. El cálculo del contenido de humedad se determinó como la fracción del peso inicial y la pérdida de peso durante el secado.

$$\% \text{ Contenido de humedad} = \frac{\text{Peso de la muestra húmeda} - \text{Peso de la muestra seca}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

Grosor de la película: El grosor de la película fue medido con un micrómetro digital Biuged Instruments Mod. BGD962; se realizaron 5 mediciones una al centro y cuatro en la periferia de cada película y se consideró el valor promedio (Kokoszka *et al.*, 2010).

Permeabilidad al vapor de agua: La determinación de la permeabilidad de la película al vapor de agua se realizó de acuerdo con el método reportado por Sánchez *et al.* (2015). Brevemente, 3 g de sílica gel fueron colocados en un pesafiltro de 40 mm x 50 mm sin tapa, la boca del recipiente fue cubierta con la película y se ajustó con una banda elástica. Los recipientes fueron colocados dentro de un desecador que contenía agua destilada para generar una humedad relativa del 100 % a temperatura ambiente. El peso inicial de los

recipientes se registró en los tiempos 1, 2, 4, 8, 16 y 24 horas. La permeabilidad al vapor de agua se calculó utilizando la $PVA = \frac{vtva}{A} * \frac{e}{\Delta P_v}$ Ecuación 8.

$$PVA = \frac{vtva}{A} * \frac{e}{\Delta P_v} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

PVA = permeabilidad al vapor de agua ($g \cdot s^{-1} \cdot m^{-1} \cdot Pa^{-1}$),

$vtva$ = velocidad de transferencia de vapor de agua ($g \cdot s^{-1}$), que se obtiene de la pendiente de la recta al graficar la diferencia del peso final y el peso inicial de las muestras ($W_f - W_0$) en función del tiempo (t)

e = espesor promedio de la película (m)

A = es el área de transferencia de vapor de agua (m^2)

ΔP_v = diferencia de presión de vapor de agua entre la atmósfera de la sílica y la del contenedor (3167 Pa).

Análisis superficial de la película: Para observar la morfología de las películas, se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6010 con filamento de tungsteno, un voltaje de aceleración de 20 kV y al vacío. El montaje de la muestra se realizó en un portamuestras de cobre con cinta electromagnética de carbono y se realizó un recubrimiento de oro.

4.2.5. Evaluación *in vitro* de la película con la incorporación de nanopartículas de ZnO

Para determinar la actividad antimicrobiana de las películas con incorporación de ZnO-F, se realizó el método de difusión con algunas modificaciones de acuerdo con lo reportado por Maizura *et al.* (2007). Para este ensayo se utilizaron películas con incorporación de nanopartículas de ZnO-F, de ZnO-S como control positivo, de ampicilina como testigo y películas del biopolímero como control.

En condiciones de asepsia se cortaron discos de 6 mm de diámetro de las películas antes mencionadas. Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo fresco de *Salmonella* Enteritidis que fue ajustado a una concentración estándar de 0.5 de McFarland en solución salina esterilizada. En la solución ajustada se sumergió un hisopo estéril que fue rotado varias veces y presionado firmemente en las paredes del tubo para remover el exceso de líquido. La inoculación del medio se realizó en placas de agar Mueller Hinton a través de sembrado masivo y se permitió secar de 3 a 5 minutos.

Posteriormente se colocaron cuidadosamente los discos sobre el agar inoculado y se incubó a 37 °C por 16 a 20 horas. Después del periodo de incubación se evaluó la zona o halo de inhibición, en la que se consideró también el área de contacto directo del disco en el agar. La evaluación del efecto antimicrobiano de las películas se realizó a través del cálculo del área de inhibición en donde se consideró el área de contacto de la película, así como el halo de inhibición alrededor del disco (Chen, 1996). La película control fue a base del biopolímero y como película testigo fue el biopolímero con incorporación de nanopartículas de ZnO-S. Para observar mejor dicho efecto se utilizó un estereoscopio marca Leica EZ4-D con cámara acoplada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de nanopartículas de ZnO

5.1.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.

La espectroscopia UV-Vis es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para determinar las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos como el ZnO. En la Figura 3 se presenta el espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de ZnO con morfología tipo flor, en el cual se observa una banda de absorción a 379 nm característico para ZnO con estructura cristalina tipo wurtzita hexagonal. Se ha reportado que el tamaño de partícula influye en la posición de la banda de absorción, y estructuras de ZnO con tamaños micrométricos presentan la banda de absorción a una longitud de onda de 380 nm, una disminución en la longitud de onda puede indicar una reducción en el tamaño del cristalito (Hemalatha *et al.*, 2014). Además, un corrimiento hacia el rojo puede indicar un aumento en el tamaño de la partícula, mayor cristalinidad del material, o bien a un aumento de su actividad fotocatalítica (Chandrappa *et al.*, 2012). El valor de la energía de la banda prohibida para las nanopartículas de ZnO utilizando la relación de Plank fue de 3.26 ± 0.01 eV. El ZnO es conocido como un material semiconductor con un valor de E_g de 3.37 eV que posee una alta eficiencia fotocatalítica; sin embargo, esta propiedad está limitada a la absorción de radiación ultravioleta. El proceso de calcinación en el ZnO en un rango de 400 °C a 800 °C también se puede asociar a la creación de vacancias de oxígeno, las cuales disminuyen el valor del ancho de banda prohibida y propician la absorción de luz visible ($\lambda > 400$ nm), lo que conlleva a una mejor eficiencia fotocatalítica del material (Wang *et al.*, 2012). Morales *et al.* (2007) reportaron un valor para E_g de 3.27 eV para nanoestructuras de ZnO tipo flor obtenidas por el método hidrotérmico y calcinadas a 300 °C, estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo.

Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de ZnO con morfología tipo flor.

5.1.2. Espectroscopia UV-Vis por reflectancia difusa.

El análisis por UV-Vis-RD también brinda información de las propiedades ópticas del ZnO, su ventaja es que no requiere preparación previa del material y se evita la dispersión de la radiación por el disolvente. La teoría que permite el empleo de la reflectancia difusa es la propuesta por Kubelka -Munk que describe el comportamiento de la luz del material a través de la dispersión y absorción de luz del espécimen, lo que está directamente relacionado con el cálculo de la energía de la banda prohibida en semiconductores (Morales *et al.*, 2007).

En la Figura 4 (a) se presenta el espectro de reflectancia difusa para las nanopartículas de ZnO sintetizadas. La muestra presenta un punto de inflexión abrupto alrededor de los 450 nm, el cual ha sido asociado a la transición de los electrones de la banda de valencia a la de conducción. Con la finalidad de determinar el valor más certero de la energía de la banda prohibida se utilizó la función de Kubelka - Munk para convertir los datos de reflectancia difusa. Como resultado de aplicar la función, se obtuvo un valor de la energía de la banda

prohibida (E_g) de 3.18 ± 0.01 eV a partir del gráfico de $(F(R)h\nu)^2$ en función de la energía del fotón ($h\nu$) (Figura 4b). Zak *et al.* (2011), reportaron valores de E_g de 3.31 eV para nanopartículas de 32 nm con estructura de plato hexagonal obtenidas por el método de sol gel y calcinadas a 600°C. Kumar *et al.* (2013) encontraron valores de E_g 3.28 eV y 3.27 eV para nanoestructuras de ZnO tipo escamas, cuando las muestras fueron sometidas a tratamientos térmicos de 500 y 700 °C, respectivamente. Estos autores, señalaron que una disminución en la E_g puede deberse al incremento en el tamaño de partícula debido al tratamiento térmico a mayor temperatura. Se ha reportado que la E_g para ZnO de tamaño másico es de 3.37 y para estructuras tipo flor sin calcinación se han encontrado valores de 3.30 eV, mientras que en pseudo-esferas calcinadas a 1000 °C el valor disminuye hasta 3.24 eV, atribuyen que la variación en los valores de la E_g pueden deberse a la cantidad de vacancias de oxígeno en las partículas de ZnO (Ashar *et al.*, 2016). Li *et al.* (2009) reportaron valores de E_g de 3.23 eV para nanoestructuras tipo flor sintetizadas por el método de precipitación a temperatura ambiente. Por otro lado, Morales *et al.* (2007) reportaron que para estructuras tipo flor calcinadas a 300 °C la energía de la banda prohibida fue de 3.24 eV. Además, estos autores señalan que los valores de la E_g están directamente relacionados con la actividad fotocatalítica del material, y esta actividad puede ser influenciada por la morfología, aumentando mientras más compleja sea la estructura. Wang *et al.* (2012) evaluaron la generación de vacancias de oxígeno en nanopartículas de ZnO generadas por calcinación a tres temperaturas 400 °C, 600 °C y 800 °C, obteniendo valores de E_g menores de 3.2 eV. Señalaron que, el valor de E_g tiene una relación inversamente proporcional con el número de vacancias presentes en el material, esto es, la disminución del valor de E_g se debe a un mayor número de vacancias.

Figura 4. Espectro de UV-Vis por reflectancia difusa (a) y función de Kubelka-Munk para obtener la E_g de las nanopartículas de ZnO (b).

La presencia de las vacancias de oxígeno ha sido relacionada a la actividad antimicrobiana del ZnO, por una mayor generación de especies reactivas de oxígeno. Se ha reportado que un cambio de color en el ZnO de blanco a amarillo (termocromismo) generado por el tratamiento térmico a altas temperaturas (400-800°C) es debido al incremento de las vacancias de oxígeno, las cuales generan un nivel de impureza en la proximidad de la banda de valencia. La existencia de vacancias es considerada un tipo de autodopado, que permite preservar la estructura cristalina intrínseca del ZnO y su presencia supone una mejora en el desempeño fotocatalítico del material a longitudes de onda del visible (Wang *et al.*, 2012).

Por lo anterior, se infiere que la disminución del valor de E_g se ve influenciado por aumento del tamaño de partícula, por la complejidad de la morfología, el mejoramiento de la cristalinidad, el tratamiento térmico superior a 400 °C y la formación de vacancias de oxígeno evidenciado por el termocromismo del material. El valor de E_g (3.18 eV) de las nanopartículas de ZnO sintetizadas en este trabajo se encuentra entre los rangos reportados para el material. Es importante mencionar, que con las temperaturas empleadas para el tratamiento térmico se observó un cambio de color de blanco a amarillo de las nanopartículas de ZnO, lo que sugiere la generación de vacancias de oxígeno en el material, que podría influir en la disminución del valor de la E_g y traducirse en una mejor actividad antimicrobiana y eficiencia fotocatalítica.

5.1.3. Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).

La relación del área superficial con respecto al volumen para las nanopartículas es mayor en comparación con el material en tamaño micrométrico (bulto), por lo que es posible que en la superficie de las partículas a escala nanométrica se adsorban moléculas. Con la finalidad de identificar la presencia o ausencia de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas de ZnO calcinadas a 600 °C durante dos horas, éstas fueron analizadas por espectroscopia FTIR. El espectro de FTIR se obtuvo en un rango de los 400 a los 4000 cm^{-1} . En la Figura 5 se observa que las bandas en el rango de los 1600–3600 cm^{-1} (Noei *et al.*, 2008) que corresponde a la vibración del grupo hidroxilo (O-H) no están presentes, lo que indica que el tratamiento térmico fue eficiente para eliminar las moléculas de agua en el material. En la región de cercano infrarrojo (NIR) del espectro se encuentran los modos vibracionales para el enlace

metal-oxígeno. En el espectro FTIR de las nanopartículas ZnO se observa una banda intensa alrededor de los 365 cm^{-1} , esta banda es característica del modo vibracional por estiramiento para el enlace Zn-O (Hemalatha *et al.*, 2014). La presencia de bandas a los 1433 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} y 880 cm^{-1} están asociadas a la presencia CO_2 (Xiong *et al.*, 2007, Kajbafvala *et al.*, 2009), que en los resultados son despreciables.

Ashar *et al.* (2016), señalaron que la agudeza de la banda a los 500 cm^{-1} se atribuye al incremento del número de enlaces de Zn-O como resultado a la deficiencia de oxígeno y consecuentemente al mejoramiento de la cristalinidad del material en partículas con morfología esferoidal. Wahab *et al.* (2007) reportaron una banda en 540 cm^{-1} para estructuras tipo flor de ZnO.

Figura 5. Espectro de FTIR de las nanopartículas de ZnO sintetizadas.

En relación a la pérdida de agua debido al tratamiento térmico de las nanopartículas de ZnO, Noei *et al.* (2008) evaluaron la interacción del agua con nanopartículas de ZnO (presencia de grupos O-H) y los cambios que se registraron a una temperatura de $500\text{ }^\circ\text{C}$, los autores observaron que la banda a los 3620 cm^{-1} asignada a grupos O-H de agua unidas al oxígeno

terminal del ZnO en el plano (000 $\bar{1}$), es formada por la disociación y adsorción de agua en sitios con vacancias de oxígeno. Y la disminución en la intensidad de las bandas 3620 cm⁻¹, 3639 cm⁻¹ y 3672 cm⁻¹ asignado a especies aisladas de especies hidróxilo, es un indicativo de la pérdida de H₂O co-adsorbida dentro de la estructura de ZnO por el proceso de calcinación del material.

5.1.4. Difracción de rayos X.

Para determinar el tipo de estructura cristalina, las nanopartículas de ZnO fueron analizadas por difracción de rayos X. En la Figura 6 se presenta el difractograma con los picos de difracción característicos para el ZnO a los valores de 2θ de 31.86°, 34.58°, 36.40°, 47.20°, 56.54°, 62.80°, 66.81° 68.38° y 69.54° que corresponde a los planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112), (200), (201), respectivamente. Los planos cristalinos corresponden a la estructura cristalina hexagonal wurtzita del óxido de zinc de acuerdo a la tarjeta JCPDF No. 36-1451. Se ha reportado que los procesos de calcinación en nanoestructuras tipo flor de ZnO pueden aumentar el grado de cristalinidad del material y mostrar un incremento en el tamaño del cristal, indicado por la forma de pico (agudo) (Chandrappa *et al.*, 2012). Ashar *et al.* (2016) sintetizaron nanopartículas de ZnO tipo flor por el método de precipitación y evaluaron el efecto de la temperatura de calcinado (200 °C a 1000 °C) en la cristalinidad del material y en el tamaño del cristalito, los autores reportaron que al incrementar la temperatura de calcinado, aumenta la cristalinidad y el tamaño del cristalino, además que los picos cortos y anchos son indicativo de partículas pequeñas, mientras que el estrechamiento y agudeza de las reflexiones indican tamaños grandes de cristalitos, y aluden a una mejora la cristalinidad del ZnO a altas temperaturas de calcinación.

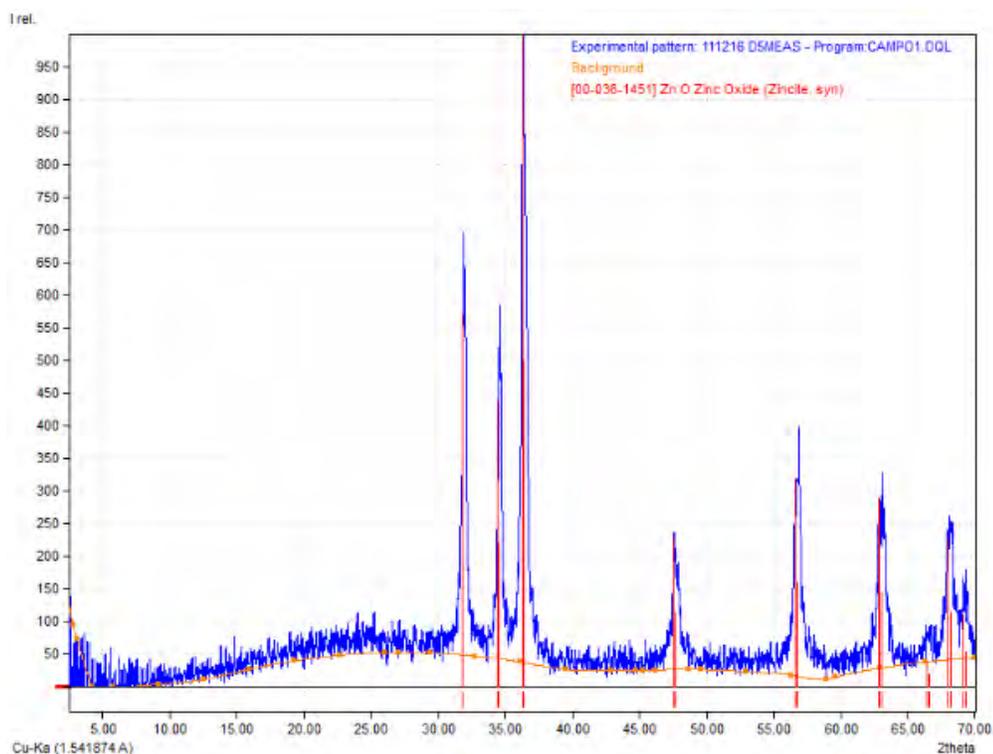


Figura 6. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de ZnO sintetizadas.

5.1.5. Potencial zeta (ζ) y distribución de tamaño de partícula.

Para determinar la carga superficial de las nanopartículas sintetizadas con estructura tipo flor, se realizó el análisis del potencial zeta, en cual se obtuvo un valor de +11.4 mV con un pH de 7.83 ± 0.01 . Degen *et al.* (2000) señalaron que el potencial zeta del ZnO dispersado en agua desionizada, involucra una reacción química entre la superficie del material y la presencia de iones H^+ y OH^- , por lo que la adsorción de las especies resultantes del zinc afectan el signo y la magnitud de la carga de superficie de las partículas de ZnO. En un rango de pH de 7 a 9, se ha reportado que el valor del potencial zeta es positivo, y que las especies iónicas dominantes que se forman $Zn_{(aq)}^{2+}$ y $Zn(OH)_{(aq)}^+$; mientras la disminución del valor de pH 7 a 8 favorece que la especie $Zn_{(aq)}^{2+}$ sea predominante lo que puede disminuir el valor del potencial zeta por la compresión de la doble capa eléctrica porque la carga iónica y su concentración es mayor que en la especie iónica $Zn(OH)_{(aq)}^+$. El valor del potencial zeta está directamente relacionado a la estabilidad de las nanopartículas, el valor obtenido en este trabajo sugiere que las partículas son susceptibles a la aglomeración y subsecuente precipitación en medio acuoso.

En la Figura 7 se muestra la distribución del tamaño de partícula obtenida de las muestras de ZnO calcinadas. En la gráfica se observa que el tamaño promedio es de 2665 ± 403 nm en el 35% de la población, por lo que los valores son mayores a los resultados obtenidos en el microscopio electrónico de barrido y de transmisión probablemente por la aglomeración de las nanopartículas en la dispersión en agua.

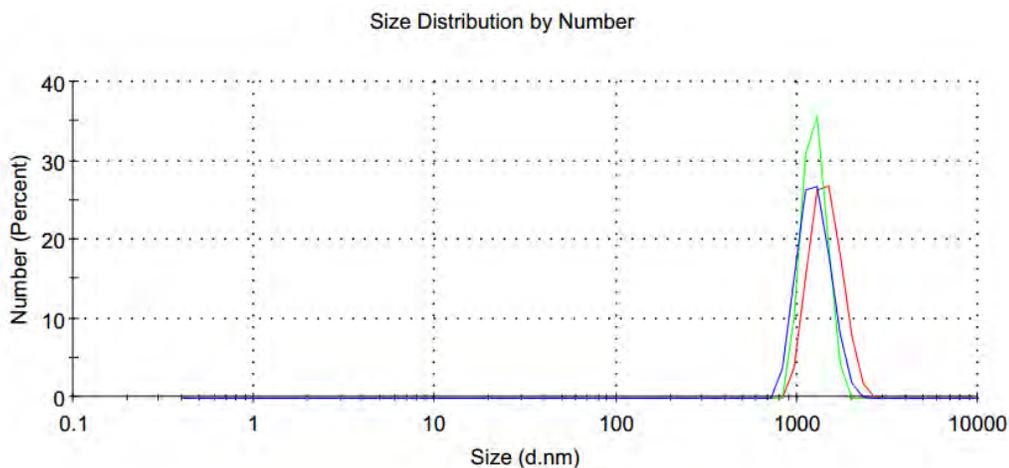


Figura 7. Distribución de tamaño de partícula de nanopartículas de ZnO.

5.1.6. Microscopia electrónica de barrido (MEB).

La morfología de las muestras obtenidas fue analizada por microscopia electrónica de barrido. En la Figura 8 se presentan las micrografías de las nanopartículas de ZnO, se observa que la forma predominante de las partículas es de tipo flor formadas por barras con un centro de crecimiento y el tamaño promedio fue de $1.5 \mu\text{m}$. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por otros autores para la formación de estructura de ZnO en forma de flor (Liu *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2009).

La formación de la morfología tipo flor es un proceso de formación de núcleos y crecimiento de la estructura, se ha reportado que la descomposición del precursor y la base en iones Zn^{2+} y OH^- forman los núcleos de crecimiento (ZnO) cuando hay un grado de saturación que excede el valor crítico. Para el desarrollo de la estructura se requiere la formación de complejos ($\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$) que determina la distribución de los sitios activos en la superficie del núcleo y se

controla a través de la cantidad de OH^- en la solución (valor de pH superior a 11) y el tiempo de agitación. Estos sitios activos estimulan la nucleación en la interface promoviendo el crecimiento de pétalos. El proceso de crecimiento está influenciado por varios mecanismos, siendo la maduración de Ostwald uno de los más importantes (Liu *et al.*, 2006, Ahsanulhaq *et al.*, 2008). Se ha reportado que el valor del pH de la reacción juega un papel dominante en la formación de estructuras complejas del ZnO, en este trabajo, el control de valor de pH de 12 permitió la formación de estructuras tipo flor.

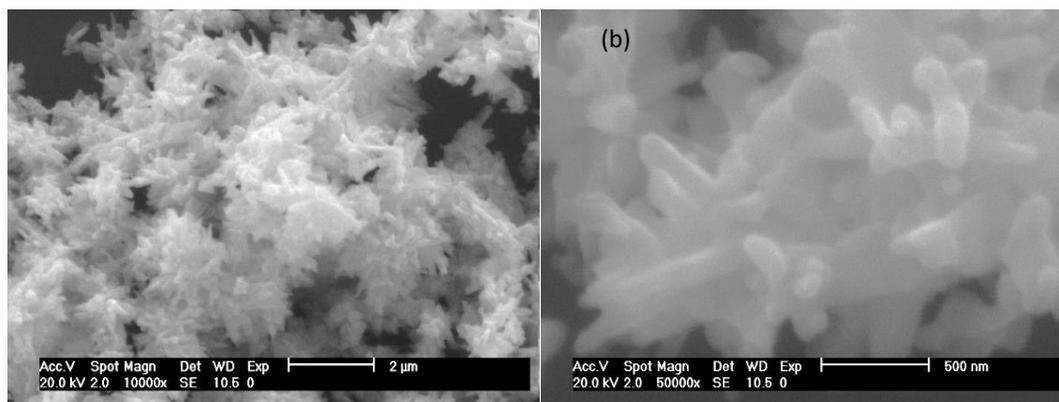


Figura 8. Imagen de microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas de ZnO sintetizadas con morfología tipo flor, (a) se observa uniformidad estructural (1000x) y (b) brazos con puntas romas (5000x).

5.1.7. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (Figura 9) revelan que la morfología tipo flor observada en SEM, está compuesta por pétalos en forma de nanobarras unidas en el centro de la estructura, cuya longitud oscila de los 100 a los 300 nm, y el diámetro de las barras va de 40 a 70 nm. A mayor amplificación se observan partículas esferoidales (10-20 nm) en la superficie de las nanoestructuras, y un crecimiento segmentado de las barras.

Wu *et al.* (2005) obtuvieron nanopartículas en forma de barras a través de un método de síntesis hidrotérmico, en las que señala la existencia de huecos de 5 nm de diámetro en promedio, y que estas microestructuras pueden ser causadas por la agregación orientada de los nanocristales, los cuales se observan como la formación de otras nanopartículas a través

de la maduración de Ostwald, lo que podría explicar la existencia de las partículas esféricas presentes en las nanoestructuras.

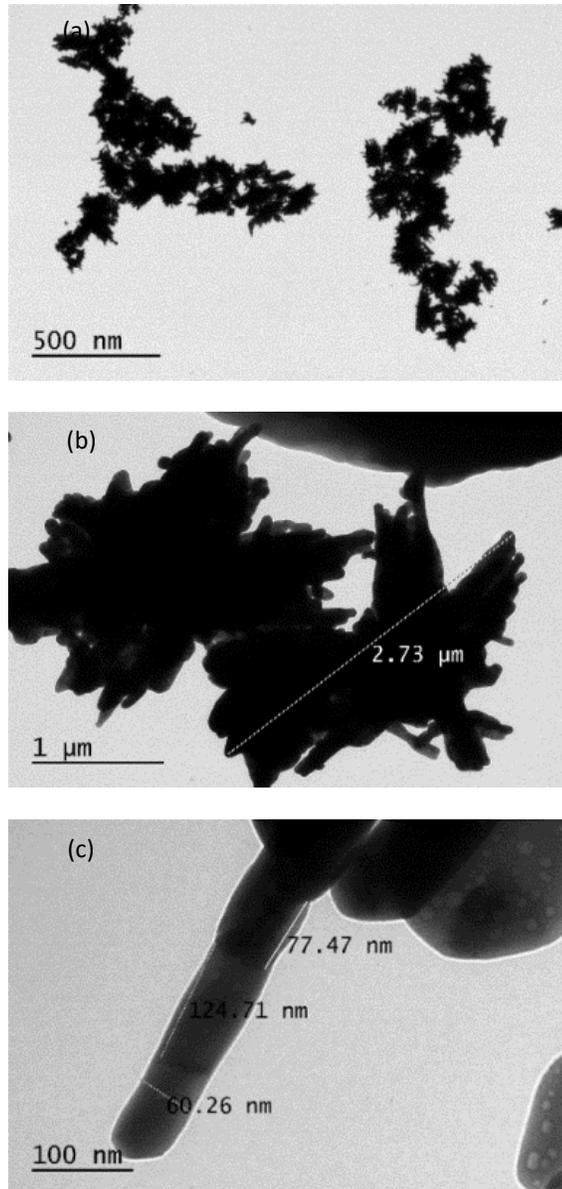


Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de barrido a diferentes magnificaciones (a) 100 x, (b) 1000x y (c) 10000x, de las nanopartículas de ZnO sintetizadas.

5.2. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO

5.2.1. Identificación y caracterización de la cepa.

Posteriormente a la reconstitución de la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, la identificó el género y especie a través de la tinción de Gram, descripción de la colonia así como por medios diferenciales y selectivos. Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 4. En relación a la descripción de la colonia en agar nutritivo se observó, pequeña, color blanco, redondeada, brillante, translúcida y convexa. Al microscopio se observaron formas bacilares con arreglo individual o en pares.

Tabla 4. Resultado de pruebas bioquímicas realizadas a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076.

Medio	Resultado	Medio	Resultado
Tinción de Gram	-	Pico	K
SIM	Movilidad	Fondo	A
	Indol	H ₂ S	+
Medio RM	+	Gas	+
Medio VP	-	Ureasa	-
Medio citrato de Simmons	+	Fermentación de azúcar	Ramnosa
Oxidasa	-	Agar XLD	Colonias negras
Catalasa	+	Agar	Crecimiento
		McConkey	Lactosa

K: reacción alcalina

A: reacción ácida

+: positivo

- : negativo

Por lo que los resultados son concordantes con el género *Salmonella enterica* de acuerdo a lo reportado por Vinayananda *et al.* (2017) y por el certificado ATCC de la cepa.

5.2.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC).

En relación a la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO-F se encontró que la MIC fue de 2400 µg/mL, mientras que para las ZnO-S utilizadas como control positivo fue de 1600 µg/mL.

Tayel *et al.* (2011) reportaron que la MIC para nanopartículas de ZnO con tamaños de 50 nm y 5 µm adquiridas en Sigma-Aldrich, contra *Salmonella* Enteritidis fue de 1600 µg/mL y 4,396 µg/mL, respectivamente. El grupo de investigación señaló que las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas y el efecto antibacterial es más fuerte en ZnO a escala nanométrica, debido a una mayor área superficial en comparación al material a escala micrométrica.

Una de las hipótesis que se plantean acerca de una menor sensibilidad al ZnO por las bacterias Gram negativas en comparación a las Gram positivas, es quizá por la presencia de compuestos de la membrana como los factores asociados a la patogenicidad que incluyen los lipopolisacáridos (que consisten en lípidos A, polisacáridos y antígeno O), porinas y fragmentos de peptidoglicanos; y que probablemente debido a la estructura de la pared celular se podría evitar la internación e interacción con los componentes internos de las bacterias (Tayel *et al.*, 2011).

En las investigaciones de Xie *et al.* (2011) evaluaron el efecto antibacteriano de las nanopartículas de ZnO (30 nm) y su efecto en los cambios en la morfología celular, el daño en membrana y los cambios en la expresión génica ante el estrés oxidativo, utilizando tres agentes patógenos Gram negativos, resaltando sus resultados en tres cepas de *Campylobacter jejuni* y como control positivo *Salmonella* Enteritidis y *E. coli* O157:H7. La MIC obtenida para las cepas de *C. jejuni* osciló de 25 µg/mL a 50 µg/mL, mientras que para *Salmonella* Enteritidis señalaron que se requirió una concentración hasta 100 veces mayor para disminuir la viabilidad celular de 1 a 2 logaritmos con una exposición de hasta 8 horas

obteniendo la inhibición a 400 µg/mL, lo que demostró una mayor sensibilidad de *C. jejuni* al ZnO y que entre los daños que mostró este microorganismo fueron los cambios morfológicos (de vibrio a cocoide), así como en la transcripción en genes asociados al estrés oxidativo (codificación a catalasa y alquil hidroperóxido reductasa) lo que genera la inviabilidad del microorganismo, sin embargo, para *E. coli* sólo se observó daño en la membrana, sin señalar más observaciones para *Salmonella* Enteritidis. Los resultados obtenidos de esta investigación se encuentran muy por debajo de lo obtenido con el control positivo y con las nanopartículas tipo flor, uno de los factores que influye de manera importante en este tipo de ensayo es la concentración celular, en el caso del artículo la concentración fue de 1×10^4 UFC, mientras que la concentración utilizada en este trabajo fue de 1×10^5 , por lo que para inhibir una mayor cantidad de microorganismos se requiere mayor concentración de nanopartículas; asimismo otro factor que influye de manera importante es el tamaño de partícula, que al disminuir su tamaño su efecto antimicrobiano es mayormente marcado, en comparación a la dimensión que presentan las nanopartículas con morfología tipo flor (1.5 µm) que son empleadas en este trabajo.

El grupo de Raghupathi *et al.* (2011) realizaron la síntesis de nanopartículas de ZnO por dos métodos distintos cuya variación radica en los agentes precursores y las bases en diferente proporción, obteniendo 7 diferentes tamaños en un rango de 12 nm a 303 nm. Para comprobar la actividad antimicrobiana asociada al tamaño de partícula se utilizaron 12 diferentes cepas bacterianas Gram positivas y Gram Negativas; entre ellas *Salmonella* Typhimurium. En general, con nanopartículas de ZnO de un tamaño de 12 nm obtuvieron que la concentración mínima inhibitoria para la mayoría de las cepas fue en un rango de 325 µg/mL y 569 µg/mL, observando que a una concentración de 407 µg/mL había una inhibición del crecimiento bacteriano del 95%. Mientras que para *Salmonella* Typhimurium en un rango de concentración 407 µg/ml y 814 µg/mL solo se presentó una inhibición del 50%. Señalaron que el efecto antimicrobiano se debe al tamaño de partícula presentando mejor actividad al reducir su escala y por el aumento de la solubilidad del compuesto liberando iones Zn^{2+} .

Talebian *et al.* (2013) evaluaron la actividad antimicrobiana de tres diferentes morfologías de nanopartículas de ZnO (tipo barra, esférica y estrella), el estudio se realizó en medio de caldo

nutritivo complementado con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas de ZnO contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con una exposición a luz UV durante 20, 40, 60 y 80 minutos y en condiciones de oscuridad. Como resultados mostraron que el efecto antimicrobiano es mejor después de 20 minutos de exposición a luz UV, que la morfología tipo estrella tiene una mayor eficacia de 10 veces mayor en *E. coli* y 1.5 veces mayor en *S. aureus* en comparación a la morfología tipo barra, observaron una drástica disminución en la viabilidad de células en muestras en condiciones de luz mientras que, en condiciones de oscuridad hubo una disminución de casi tres unidades logarítmicas, conservando la eficiencia de inhibición la morfología tipo flor sobre el tipo barra. Señalaron que el efecto antimicrobiano en la morfología tipo flor pudo deberse a que esta estructura presentó un menor tamaño de cristalito, su mayor área de superficie y un valor menor del ancho de banda prohibida (3.27 eV) comparado con las otras morfologías; otro efecto que contribuye a estos resultados es la presencia de defectos de superficie dadas por las vacancias de oxígeno en la estructura y la consecuente formación de un mayor número de radicales hidroxilo que podrían provocar daños en la membrana. Señalaron que la diferencia de viabilidad en las cepas bacterianas (Gram positivo y Gram negativo) se vio afectada no solo debido al grosor de la pared celular sino también la morfología y la resistencia que tiene la membrana a las especies reactivas de oxígeno producida por la fotocatalisis de la superficie.

Se ha reportado que la actividad antibacteriana de las nanopartículas depende de diversos factores como la morfología y el tamaño, el área de superficie, la concentración y la generación de vacancias de oxígeno del ZnO por recocido. En relación a la morfología y tamaño se ha reportado que la morfología tipo barra y alambre penetran (internación) más fácilmente debido a su gran área de superficie que las tipo esféricas, aunque las de morfología tipo estrella no pudiese tener ese efecto poseen una alta actividad antimicrobiana. Una gran área de superficie, una alta concentración y un menor tamaño de partícula mejoran de manera significativa la actividad antimicrobiana, porque hay una mayor disolución del ZnO liberando Zn^{2+} , así como la generación de H_2O_2 (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

En relación a la manipulación de las vacancias de oxígeno en el ZnO se puede llevar a cabo por el dopado de otro elemento durante la síntesis de las nanopartículas, o bien por

tratamientos de recocido del material (Vijayaraghavan *et al.*, 2017). Para la generación de especies reactivas de oxígeno el oxígeno disuelto en agua reacciona con los electrones huecos, por lo que la presencia de vacancias de oxígeno permite la captura de electrones, evitando la recombinación con los huecos de electrones por lo que aumenta la producción de radicales OH.

Con base a la información citada, la MIC de las nanopartículas de ZnO de Sigma (<50 nm) concuerda con los resultados obtenidos por Tayel *et al.* (2011), mientras que las nanopartículas de ZnO-F contra *Salmonella* Enteritidis el valor de la concentración fue menor (2400 µg/mL) en comparación a lo reportado para ZnO de tamaño de 5 µm, por lo que se puede asociar que al reducir el tamaño de partícula el efecto de la actividad antimicrobiana mejora como lo señalan Zhang *et al.* (2008) y Padmavathy *et al.* (2016).

Por lo anterior, inferimos que los resultados de la MIC con respecto a las nanopartículas de ZnO con morfología tipo flor (2400 µg) se debe a varios factores, como es el de la concentración pues se ha señalado que al aumentar la concentración del material aumenta su efecto antimicrobiano; la disolución del ZnO en iones Zn²⁺ que está influenciado también por el tamaño de partícula, siendo mayor en partículas más pequeñas lo que se infiere que esta disolución se lleva en menor grado por el tamaño de la estructura; la generación de especies reactivas de oxígeno en condiciones de oscuridad la cual podría verse mejorada por la posible existencia de vacancias de oxígeno en el ZnO aunque la respuesta en luz podría ser mejor. Todos estos factores permiten observar que las nanopartículas de ZnO-F ejerce un efecto antimicrobiano contra *Salmonella* Enteritidis.

5.2.3. Ensayo de difusión en disco de las nanopartículas de ZnO.

En el ensayo de difusión en disco se evaluaron comprimidos de 500 mg nanopartículas de ZnO-F y ZnO-S (control positivo), los resultados de los ensayos se presentan en la *Tabla 5*. Halo de inhibición del ensayo de difusión de disco de nanopartículas de ZnO *Tabla 5*, como control negativo se utilizó papel Whatman y como testigo ampicilina trihidratada. Particularmente en los comprimidos de ZnO-F y ZnO-S presentan un halo de inhibición aparente.

Tabla 5. Halo de inhibición del ensayo de difusión de disco de nanopartículas de ZnO

Disco	Halo de inhibición (mm)
Control	0 a
ZnO-F	11.1±0.1 b
ZnO-S	13.5±0.5 c
Ampicilina trihidratada	18.0±1 d

Valor promedio ± error estándar

Medias con letra diferentes son estadísticamente diferentes (Fisher P<0.05)

Las investigaciones realizadas por Xu *et al.* (2013) evaluaron la actividad antimicrobiana del ZnO en condiciones de oscuridad usando muestras de diferentes morfologías y tamaños, estas fueron tipo espinas (50 μm), nanopartículas hexagonal (60 nm) y hexagonal micrométrico (aprox. 1 μm), las muestras fueron calcinadas a 600 °C por 3 horas bajo distintos ambientes y posteriormente detectaron la existencia de vacancias de oxígeno, también evaluaron el efecto biocida contra *Escherichia coli* a través de la generación de especies reactivas de oxígeno con respecto a las vacancias de oxígeno. Para ello realizaron comprimidos de 100 mg de las muestras de ZnO con un diámetro de 10 mm y realizaron el ensayo de difusión de disco; en los resultados señalan que los tres tipos de morfologías presentan halo de inhibición que permitió observar el efecto biocida contra *E. coli*, mostrando un diámetro de inhibición para la morfología tipo espina de 12.31 mm, hexagonal nanométrico de 11.91 mm y hexagonal micrométrico 11.48 mm, y que el efecto antimicrobiano las partículas de ZnO con morfología hexagonal nanométrico presentó mayor actividad antimicrobiana que el tamaño micrométrico, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura, sin embargo, el ZnO tipo espina muestra un área mayor en comparación a las otras muestras. Señalaron que la generación de OH está relacionado principalmente con la radiación de luz, en relación con la liberación de iones Zn^{2+} resaltaron que la muestra que tuvo mayor liberación de iones fue la de escala nanométrica, aunque la cantidad detectada no fue la suficiente para inducir el efecto antimicrobiano. Por lo que se asoció principalmente a la generación de H_2O_2 en la actividad antimicrobiana del ZnO en suspensión acuosa en la

oscuridad, siendo este efecto más pronunciado en el ZnO tipo espina, seguido hexagonal nanométrico y finalmente el micrométrico.

En el trabajo de Tayel *et al.* (2011) utilizaron ZnO en escala micrométrica (5 μm) y nanopartículas de ZnO (≤ 50 nm) de Sigma Aldrich y prepararon una dispersión con una concentración de 1 M para cada muestra, a través del ensayo de difusión de disco se evaluó cualitativamente la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis entre otras cepas. El ensayo de difusión que consistió en colocar un disco de papel Whatman No.1 con un diámetro de 6 mm y la adición de 10 μl de cada dispersión de las muestras de ZnO. Los resultados obtenidos señalan que las cepas Gram positivas son más sensibles a este compuesto que las cepas Gram negativas. Específicamente, los resultados obtenidos para *Salmonella* Enteritidis, se encontró que el halo de inhibición fue de 11 mm de diámetro para el ZnO en escala micrométrica y de 22 mm para las nanopartículas de ZnO; puntualizaron que la cantidad para obtener el halo de inhibición fue menor que la requerida para la MIC para todas las cepa y resaltaron que no hay una correlación lineal entre los resultados de los ensayos. Atribuyen el efecto antimicrobiano a la generación de H_2O_2 , asumiendo que al disminuir el tamaño de partícula hay una mayor generación de peróxido, asimismo, el otro mecanismo involucrado es la liberación de iones Zn^{2+} debido a la inestabilidad del ZnO en la solución por lo que se produce H_2O_2 y un aumento en la concentración de iones Zn^{2+} debido a la descomposición del ZnO. Mencionan que la experimentación se realizó en condiciones de oscuridad para evitar la liberación de especies reactivas de oxígeno a partir de las nanopartículas de ZnO y detectar los mecanismos adicionales involucrados en la actividad antimicrobiana. Es importante señalar que la experimentación microbiológica de este trabajo se realizó en condiciones de oscuridad.

En relación a la concentración de nanopartículas de ZnO para realizar los comprimidos, la cantidad empleada excedió por mucho a lo reportado en otros trabajos, aunque el halo de inhibición de ZnO-F coincidió con los diámetros obtenidos; en ensayos previos se utilizaron las mismas concentraciones de ZnO-F y ZnO-S señaladas en la literatura sin obtener resultados similares. Los halos de inhibición obtenidos en este trabajo podría ser un indicativo de la insolubilidad del ZnO y su limitada difusión, y de acuerdo a lo reportado, se infiere que el

efecto del halo de inhibición está en función de la concentración del ZnO, la generación de H₂O₂ y la consecuente disolución del compuesto liberando Zn²⁺.

De acuerdo a lo anterior, la interpretación del ensayo de susceptibilidad a antimicrobianos de acuerdo con los criterios del CLSI (2012b) que permiten evaluar la respuesta *in vitro* de un microorganismo ante un agente antimicrobiano como: no susceptible, resistente, intermedio y susceptible, permiten obtener la concentración adecuada de un antibiótico para un tratamiento médico. En este sentido, las nanopartículas de ZnO-F se proponen como un antimicrobiano y su aplicación en el área de alimentos y no al área médica. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos y basados en dichos criterios, la respuesta de *Salmonella* Enteritidis a las nanopartículas de ZnO con morfología tipo flor se interpreta como intermedio, la cual señala que la tasa de respuesta al antimicrobiano puede ser más baja que en aislamientos susceptibles, lo que implica una eficacia en zonas donde este se encuentra una mayor concentración del antimicrobiano o cuando la dosis es más alta de lo normal, además de presentar una zona de amortiguamiento que evita la discrepancia en la interpretación cuando el margen de respuesta de toxicidad es estrecho.

5.3. Caracterización de la película

5.3.1. Propiedades físicas

Color: se ha reportado que el color de la película y su apariencia en el alimento es un parámetro importante que influencia la aceptación del consumidor, por lo que la adición de compuestos activos en la solución formadora de película puede cambiar el color de la película (Espitia *et al.*, 2013a).

Las propiedades de color en las películas evaluadas se presentan en la Tabla 6, la incorporación de nanopartículas afectó las propiedades de color de la película con respecto al control. El valor de ΔE aumentó significativamente de 1.21 ± 0.13 a 4.15 ± 0.17 después de la adición de las nanopartículas de ZnO, que representa una diferencia de valor del 29.15%.

Tabla 6. Valores obtenidos de color, transparencia y transmitancia de las películas evaluadas.

Película	ΔE	Croma	Angulo Hue	Transparencia (%)	Transmitancia (%) a 600 nm
Control	1.21±0.04 a	4.64±0.03 a	80.23±0.24 a	24.68±0.38 a	90.75±0.32 a
ZnO-F	4.15±0.05 b	7.83±0.05 b	71.98±0.92 b	7.87±0.19 b	9.07±0.48 b

Valor promedio \pm error estándar

Medias con letra en la columna, son estadísticamente diferentes (Tukey $P < 0.05$)

Nafchi *et al.* (2012) elaboraron películas de almidón de sagú con adición de nanopartículas de ZnO en concentraciones al 1%, 2%, 3% y 5% p/p, en relación al color señalaron que, al aumentar el porcentaje de nanopartículas disminuyó el ángulo Hue y aumento el valor del Croma.

De los resultados obtenidos por Kanmani *et al.* (2014), que señalaron aumentos significativos del valor de ΔE al adicionar las nanopartículas de ZnO en los polímeros empleados (agar, carragenina y carboximetil celulosa), aumentando este valor al 50.94% en películas de agar. Por lo que los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado.

Transparencia. Los resultados de transparencia se muestran en la Tabla 6, los resultados muestran que las películas control presentan una mayor transparencia con respecto a aquellas con la adición de nanopartículas de ZnO, ambas presentan diferencias estadísticamente significativas.

Kanmani *et al.* (2014) midieron la transparencia de películas de varios polímeros como agar, carragenina y carboximetilcelulosa a partir de los valores de porcentaje de transmitancia por espectroscopía de UV-Vis, como resultados obtuvieron altos valores de transparencia en las películas de los biopolímeros, pero disminuye significativamente con la presencia de nanopartículas de ZnO, señalando que las películas tienen una fuerte capacidad de bloqueo de luz UV sin comprometer la transparencia. Los resultados que presentaron Akbariazam *et al.* (2016) empleando polisacáridos aislados de soya en diferentes concentraciones de

nanopartículas de ZnO (1, 2, 4% peso/peso y 0% como control), reportaron una disminución en la transmisión de luz UV cuanto mayor es el contenido de ZnO, obteniendo un 3.4% de transmisión a una concentración de 4% de nanopartículas, señalando la obtención de picos de absorción a 375 nm en los nanocompuestos de la película que atribuyeron a un incremento del ancho de banda prohibida por el efecto del confinamiento cuántico. Es importante señalar que los valores de transparencia en los trabajos anteriormente citados, son los valores de transmitancia, sin embargo, con los datos de transparencia obtenidos en este trabajo se relacionó con el grosor de la película y establecer una diferencia puntual entre transparencia y transmitancia, por lo que transparencia de las películas fue influenciado tanto por el contenido de nanopartículas de ZnO así como por el aumento en el grosor de las películas, por lo que los resultados obtenidos son congruentes con lo reportado.

Es importante señalar que el espectro de transmitancia de las películas en un rango de 270 nm a 400 nm (Figura 10), las películas control presentan un alto porcentaje de transmisión, mientras que la adición de ZnO disminuyó hasta casi 0% y que dicha absorción de luz UV fue hasta los 430 nm. Los resultados obtenidos por Yu *et al.* (2009) en películas de almidón de chícharo con nanopartículas de ZnO y carboximetil celulosa a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 3, 4 y 5% peso/peso), obtuvieron una disminución en la transmisión al aumentar la concentración de nanopartículas de ZnO a comparación de la película control que presento una mayor transmisión de luz UV en un rango de 200 nm a 400 nm, señalando que puede deberse al efecto cuántico de las nanopartículas, concluyendo que las películas pueden proteger contra luz UV. Nafchi *et al.* (2012) señala que las matrices de biopolímeros con la incorporación de nanopartículas de ZnO pueden ser utilizados como películas de protección y aislantes de calor, que potencialmente pueden ser utilizadas en la industria del embalaje.

Figura 10. Espectro de transmitancia de las películas control y con incorporación de nanopartículas de ZnO

Contenido de humedad: El porcentaje del contenido de humedad en las películas evaluadas se presenta en la Tabla 7 los valores muestran una mayor pérdida de humedad en la película control con respecto con la incorporación de nanopartículas.

Nafchi *et al.* (2012) elaboraron películas con almidón de sagú con incorporación de nanopartículas de ZnO en una concentración de 1, 2 3, 4 y 5% peso/peso. El contenido de humedad en películas de almidón de sagú fue del 13%, mientras que las películas con la adición de nanopartículas de ZnO fueron de 11% independientemente de la concentración de ZnO. Mencionan que la incorporación de ZnO en la matriz del almidón disminuye significativamente la solubilidad de los compuestos, atribuido a las interacciones en la estructura de la película por el aumento del enlace de hidrógeno con el ZnO y los componentes de la matriz.

El empleo de dos diferentes tratamientos para promover la gelatinización del almidón que consisten en la aplicación de una presión hidrostática elevada y la segunda es la realización

de un tratamiento térmico, para poder elaborar películas a partir de trigo y de tapioca, fue un trabajo realizado por el equipo de Kim *et al.* (2018); en relación a los resultados del tratamiento térmico el contenido de humedad de la película de almidón de trigo fue 12.03%, mientras que para el de tapioca fue de 12.14%, mientras que el tratamiento con presión hidrostática elevada fue de 15.76% y 13.40% respectivamente. Señalaron que las películas preparadas por la elevación de la presión no requieren calentamiento lo que provoca una menor pérdida de agua durante la preparación de la película, en comparación con el tratamiento térmico; causando diferencias en sus propiedades físicas, de barrera, morfológica y térmicas.

De los resultados obtenidos en esta investigación, la película control se encuentra en los valores reportados para almidón, considerando que el contenido de humedad en el almidón varía dependiendo de su origen. Mientras que la disminución de los valores en la película con incorporación de nanopartículas de ZnO puede deberse a la interacción de los compuestos de la película con el ZnO y su naturaleza hidrofóbica lo que pudo provocar una disminución en el contenido de humedad.

Grosor: Los resultados obtenidos de la medición del grosor de la película con incorporación de nanopartículas se presentan en la Tabla 7, se puede observar un aumento significativo de la película con la incorporación del ZnO que corresponde a un 42.35% con respecto al control.

Kanmani *et al.* (2014) elaboraron películas a partir de tres diferentes biopolímeros (agar, carragenina y carboximetil celulosa), el procedimiento realizado consistió primero en la síntesis de las nanopartículas de ZnO y posteriormente la adición del biopolímero en la solución de reacción. Aunque los autores no señalan la concentración de ZnO en la película, observaron el aumento del grosor en películas debido a la presencia de las nanopartículas de ZnO de diferentes polímeros con respecto al control, el grosor de las películas de agar, carragenina y carboximetil celulosa fue de 0.0367 mm, 0.0367 mm y 0.045 mm, respectivamente; el porcentaje por el aumento del grosor en películas con ZnO fue de 54.5%, 81.7% y 59.0%, respectivamente.

Li *et al.* (2010) formaron películas de policloruro de vinilo (PVC por sus siglas en inglés) con dos diferentes volúmenes (1.5 mL y 3.0 mL) de una dispersión de nanopartículas de ZnO a una concentración de 5 g/L, obteniendo dos concentraciones diferentes por área de película (93.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 187.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Con relación al grosor obtuvieron un aumento de 0.050 y 0.53 mm respectivamente en películas por la adición del ZnO con respecto a la película control (0.048 mm), habiendo un aumento gradual cuanto mayor es la concentración del óxido metálico.

Un factor que influye en el grosor de la película es el volumen empleado para su formación en placa, por ello el grosor de película evaluada difiere con los grosores reportados, aunque en relación al aumento del grosor por la adición del ZnO coincide con los resultados de la literatura citada.

Permeabilidad al vapor de agua: La permeabilidad al vapor de agua (PVA) en las películas es un parámetro importante que influye en la vida de anaquel de los alimentos, ya que la pérdida de humedad afecta la calidad del producto (Li *et al.*, 2010). Una característica de las películas de polisacáridos, particularmente de almidón se caracterizan por tener una baja permeabilidad al oxígeno, lo que implica la disminución de intercambio gaseoso, sin embargo, son biopolímeros higroscópicos que constituyen una pobre barrera de al vapor de agua (Chiumarelli *et al.*, 2012). En la Tabla 7 se muestran los valores de la permeabilidad al vapor de agua de las películas evaluadas, los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre el control y aquellas con la adición del 5% de nanopartículas de ZnO, siendo mayor el valor de este último.

Tabla 7. Grosor, contenido de humedad y permeabilidad al vapor del agua (PVA) en películas de almidón control y con incorporación de nanopartículas.

Película	Grosor (mm)	Contenido de humedad (%)	PVA
			($g \cdot s^{-1} \cdot m^{-1} \cdot Pa^{-1}$)
Control	0.076 ± 0.001 a	11.86 ± 0.71 a	1.86 x 10 ⁻⁵ a
ZnO-F	0.122 ± 0.001 b	7.4031 ± 0.52 b	3.07 x 10 ⁻⁵ b

Valor promedio ± error estándar

Medias con letra en la columna, son estadísticamente diferentes (Tukey P<0.05)

En la investigación de Ma *et al.* (2009), elaboraron películas de almidón de chícharo con nanopartículas de ZnO a diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 3 y 4 % peso/peso con respecto al almidón). Como resultados obtuvieron valores menores con respecto al control en la permeabilidad al vapor de agua a una mayor adición de ZnO, lo que atribuyeron a la gran resistencia al agua de este compuesto, probablemente por la introducción de una vía tortuosa para el paso de moléculas de vapor de agua y oxígeno a través de la película. Yu *et al.* (2009), obtuvieron resultados similares en películas de almidón de chícharo con nanopartículas de ZnO estabilizadas con carboximetilcelulosa de sodio, señalando que la disminución en películas con ZnO se debe al paso limitado de moléculas de agua a través de los nanocompuestos.

Li *et al.* (2010) señalaron en sus resultados una disminución en el valor de la permeabilidad al vapor de agua en películas de PVC (policloruro de vinilo) con la incorporación de nanopartículas de ZnO con respecto al control, dato que está relacionado con el aumento del grosor por la adición del óxido metálico, señalaron que probablemente este valor disminuyó porque las nanopartículas recubren una cara de la película lo que evita que la humedad pase a través de ella.

Es importante señalar que los valores que los autores anteriores obtuvieron fueron con exponencial de $\times 10^{-10}$, por lo que los valores obtenidos en este trabajo son mayores a lo reportado. La variación de los resultados obtenidos, podría explicarse por el aumento en el grosor debido a la incorporación de nanopartículas, el aumento en el contenido del plastificante con respecto a la película control, y por el gradiente de humedad relativa.

En relación al grosor, en estructuras poliméricas ideales la permeabilidad al gas y al vapor son independientes del grosor, sin embargo, hay evidencia de que al aumentar el grosor también aumenta la resistencia a la transferencia de masa a través de esta, por lo tanto se reduce la resistencia al paso del vapor de agua (Bertuzzi *et al.*, 2007).

El glicerol permite la flexibilización y cambios estructurales de la red polimérica, además de ser un compuesto higroscópico, el aumento en la concentración en la película incrementa la

sorción de agua y su movilidad en la estructura, como resultado aumenta el valor de PVA (Bertuzzi *et al.*, 2007).

El aumento del valor de la PVA puede también deberse al incremento del gradiente de humedad relativa, que puede ser explicado por el efecto plastificante del agua y la fuerza motriz de la transferencia de masa; pues a mayor humedad relativa hay una mayor transferencia de masa mientras que a menor humedad relativa la transferencia al vapor de agua disminuye gradualmente (Kokoszka *et al.*, 2010). Esto es porque los materiales hidrocoloides como polisacáridos y proteínas dependen de su contenido de humedad así como de la humedad circundante (Bertuzzi *et al.*, 2007).

En este sentido permeabilidad al vapor de agua por parte de la película con incorporación de nanopartículas de ZnO, permite que el paso del agua active las características antimicrobianas del ZnO, que para ejercer esta acción requiere agua para la generación de especie reactivas de oxígeno.

La película a base de almidón y con incorporación de nanopartículas presenta buenas características funcionales para su aplicación no sólo en el campo de alimentos, sino incluso en el campo de la medicina. La película presenta las ventajas de ser un polímero de origen natural, renovable y biodegradable.

Análisis superficial de la película. Al análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido de la película de almidón (control) y la película de almidón con la incorporación de nanopartículas de ZnO (ZnO-F) puede observarse en la Figura 11. Como resultados se obtuvo que, la película control (Figura 11-a) muestra una superficie uniforme sin presencia de gránulos sin disolver. La película con incorporación de nanopartículas de ZnO (Figura 11-c), se observa una distribución homogénea de las partículas y la presencia de partículas individuales en el biopolímero, sin una aglomeración aparente y una concentración importante en la película. En relación con el grosor la película control presentó un grosor de 0.0855 mm y la película con incorporación de nanopartículas de ZnO fue de 0.0905 mm (Figura 11- b y d respectivamente) la diferencia con respecto a la medición física podría deberse a la inclinación del corte lo que probablemente dio la variabilidad de la medición.

Espitia *et al.* (2013a), elaboraron películas con metil celulosa y la incorporación de nanopartículas de ZnO en diferente proporción (desde 5% a 20% peso/peso de ZnO) y de pediocina (desde 15% al 50% peso/peso). En las películas evaluadas (20% peso/peso de ZnO y 50% peso/peso de pediocina), observaron una morfología homogénea en la película control, mientras que las películas de pediocina mostraron la presencia escasa de resina sin disolver y la formación de numerosos poros en forma de cráter, y aluden que podría haber una débil interacción de la matriz polimérica. En la película con incorporación de la bacteriocina y las nanopartículas de ZnO, se observó una buena intercalación del ZnO en la matriz polimérica, sin embargo, señalan que la formación de los poros por la pediocina atrapan las nanopartículas y esto podría provocar la mejora de la resistencia mecánica de las películas de nanocompuestos. Espinoza *et al.* (2011) señalo que la formación de los poros en la matriz polimérica es debido probablemente a la reducida transferencia de masa relacionado con el solvente, ocasionando una disminución en la velocidad de secado de la película.

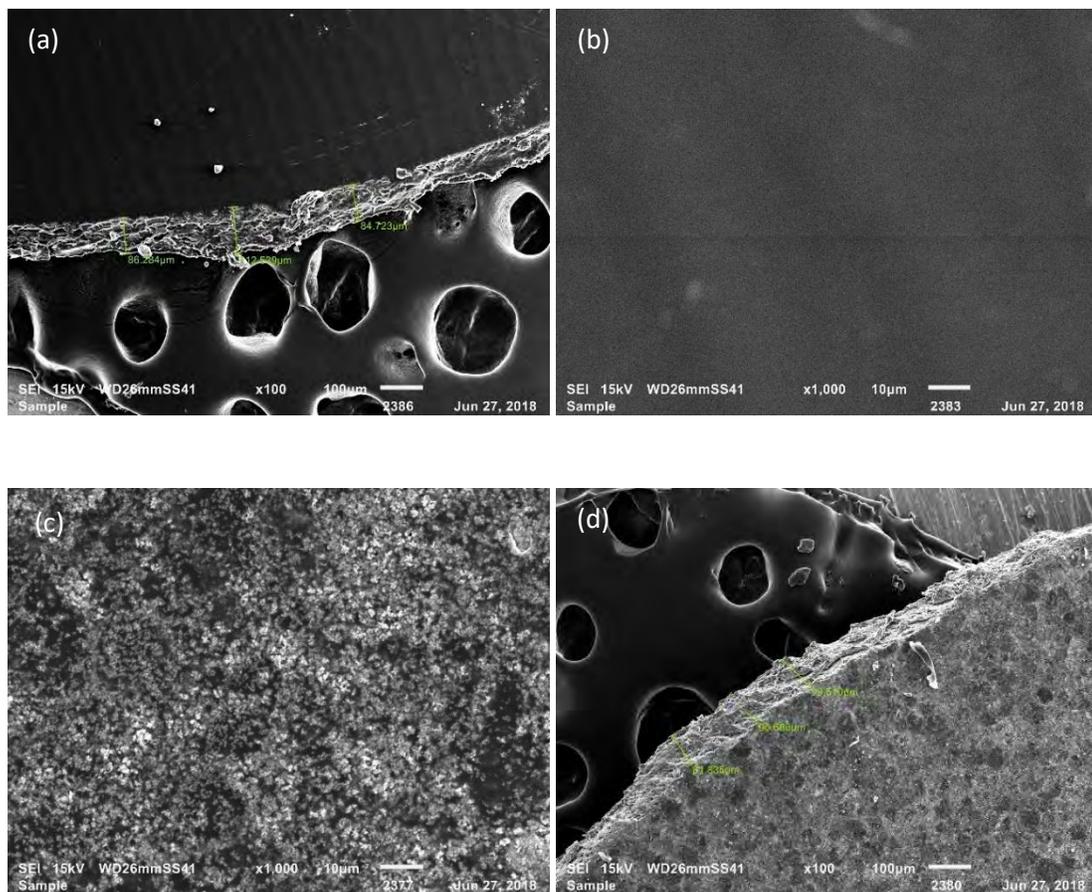


Figura 11. Imagen del microscopio electrónico de barrido de la película de almidón (a) y medición del grosor (b), película con incorporación de nanopartículas ZnO (ZnO-F) (c) y grosor (d).

Las películas que desarrollaron Yu *et al.* (2009) a partir de almidón de chícharo con nanopartículas de ZnO estabilizadas con carboximetilcelulosa (CMC), en diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5% peso basado a partir del almidón), en su análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido, no mostraron la presencia de zonas granulares de almidón por lo que se observó una superficie continua en la película control, esto debido a que la alta temperatura (90°C) a que fue sometida la solución de agua y glicerol permitió el rompimiento de los gránulos de almidón por la ruptura de los enlaces de hidrógeno intra e intermolecularmente del almidón con el plastificante. En el caso de la película con incorporación con nanopartículas de ZnO, se observaron uniformemente distribuidas con la presencia de algunas nanoestructuras aglomeradas, con un recubrimiento uniforme del

material por polímero, a lo que atribuyen una fuerte interacción entre las nanopartículas de ZnO-CMC y el almidón por su estructura de polisacárido similar.

Las películas con incorporación de nanopartículas de ZnO-F, aparentemente no presentaron la formación de poros, y las nanopartículas de ZnO se observan distribuidas uniformemente tanto en la superficie como a lo ancho del perfil del corte de la película, lo que permitiría su funcionalidad activa del material con el compuesto antimicrobiano. Es importante mencionar, que durante el análisis de microscopia la película control la muestra era afectada por el láser del microscopio a mayores aumentos, mientras que la película con nanopartículas permitió su observación a mayores aumentos sin afectar la muestra, lo que nos permite confirmar que con base a lo encontrado en el análisis de UV-Vis que la película permite aislamiento térmico sin afectación del polímero, esta fusión de materiales confiere una mejora de protección y cambia las propiedades fisicoquímicas de la película del biopolímero haciéndola idónea como recubrimiento.

5.4. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de las películas incorporadas con nanopartículas de ZnO.

5.4.1. Ensayo de difusión en disco.

En la Tabla 8 se presentan los resultados del ensayo de difusión en disco para las nanopartículas de ZnO sintetizadas en forma de flor (ZnO-F), las nanopartículas de ZnO utilizadas como control positivo (ZnO-S), película sin la incorporación de ZnO (control negativo) y ampicilina como testigo. Se puede observar que los tratamientos presentan una diferencia estadísticamente significativa en relación al área de inhibición. La película utilizada como control positivo presentó un halo de inhibición mayor a las de las películas incorporadas con las nanopartículas en forma de flor, lo que puede indicar que el tamaño de la estructura influye directamente en el grado de difusión que se tienen en el medio de cultivo. Asimismo, hubo un efecto de inhibición positivo en el área de contacto de ambas películas en el agar. La película testigo permitió comprobar la difusión de elementos solubles en el agar a través del biopolímero. Es importante resaltar que la película de almidón (control negativo) no presentó

un efecto antimicrobiano, observando crecimiento de colonias por encima y debajo de la película.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de películas incorporadas con nanopartículas de ZnO contra *Salmonella* Enteritidis.

Película	Área de inhibición mm ²	Efecto inhibitorio
Control	0 a	-
ZnO-F	49.34 ± 1.46 b	+
ZnO-S	77.76 ± 2.11 c	+
Ampicilina trihidratada*	553.48 ± 6.64 d	+

(+) efecto inhibitorio (-) sin efecto inhibitorio

Valor promedio ± error estándar

Medias con letra en la columna, son estadísticamente diferentes (Tukey P<0.05)

En la Figura 12 se presentan las imágenes de los ensayos de difusión en disco de la película control (a) y de la película con antibiótico (testigo) (b); para el caso de la película control no se observó un halo de inhibición y el crecimiento de la cepa en la placa de agar fue homogéneo, a mayor cercanía de la película se puede observar la continuidad del desarrollo del microorganismo e incluso el crecimiento de colonias en la superficie de la película (Figura 13 a y b), por lo que los componentes de la película no contribuyen a la inhibición de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis.

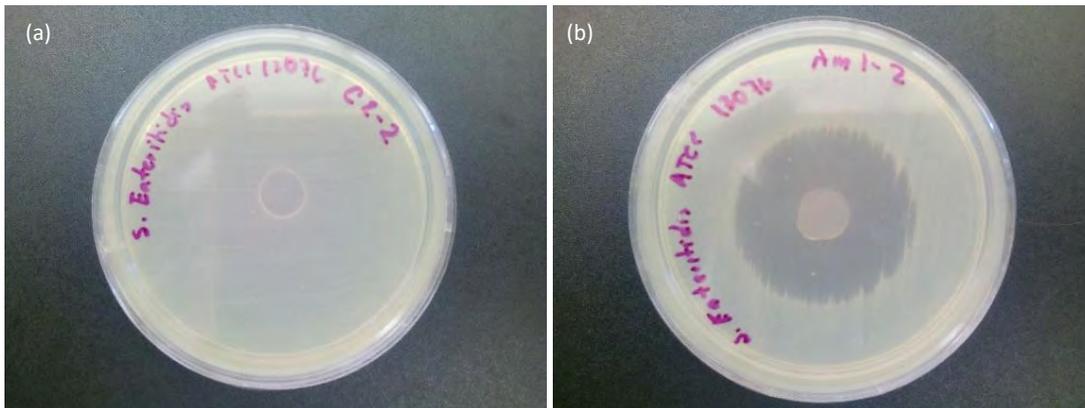


Figura 12. Ensayo de difusión de disco de la película de almidón control (a) y con la incorporación de ampicilina en la que se observa un halo de inhibición (b).

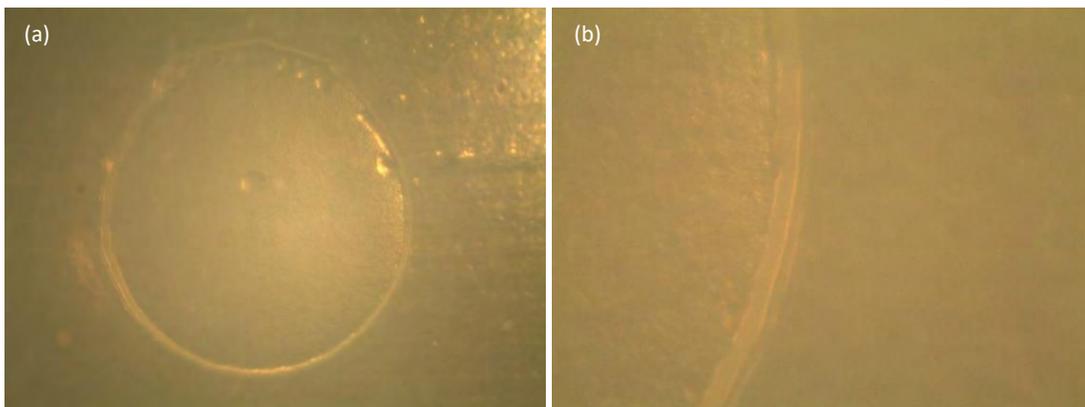


Figura 13. Acercamiento del disco de la película control (aumento (a) 7x y (b) 15x), se observa un crecimiento uniforme de *Salmonella* Enteritidis en la placa de agar y sobre la película control sin distinción de colonias individuales.

La película con el antibiótico que presentó un halo de inhibición de $553.48 \pm 6.64 \text{ mm}^2$, en la magnificación se observó nulo crecimiento del microorganismo dentro en esta área (Figura 14 a y b). Lo anterior podría ser indicativo de que la película permite la libre difusión de componentes solubles en agua y que los agentes de la película no interfieren con el efecto antimicrobiano del antibiótico, lo que permite extrapolar que los elementos solubles del ZnO como los iones Zn^{2+} pueden difundir libremente en la película del biopolímero.

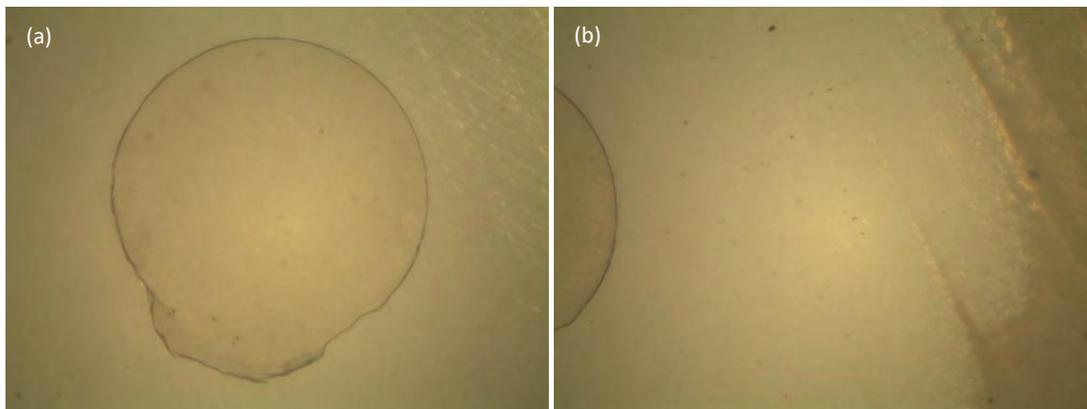


Figura 14. Inhibición de crecimiento de colonias de *Salmonella* Enteritidis en la película con incorporación de antibiótico, aumento (a) y (b) 5.8x.

En la Figura 15 se presentan la imagen del ensayo de difusión en disco de la película con incorporación de nanopartículas ZnO-F, a diferencia de las placas anteriores el sembrado no tuvo un crecimiento homogéneo y continuo de la cepa, y no presentó un halo de inhibición aparente y definido lo que demuestra una menor insolubilidad del ZnO-F en agua por lo que se restringe la difusión de las nanopartículas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** b), sin embargo, a una mayor magnificación del disco se aprecia un gradiente irregular de inhibición mostrando colonias más pequeñas en la proximidad de la película así como colonias más grandes conforme aumenta la distancia, así mismo se observó la formación de un delgado halo de inhibición de crecimiento (0.742 ± 0.49 mm) en la cercanía de la película (Figura 16 a y b).



Figura 15. El ensayo de difusión de disco de las películas de almidón con incorporación de nanopartículas, la magnificación permite observar el

crecimiento irregular de las colonias de *Salmonella* Enteritidis alrededor de la película con ZnO-F (aumento 6.9x).

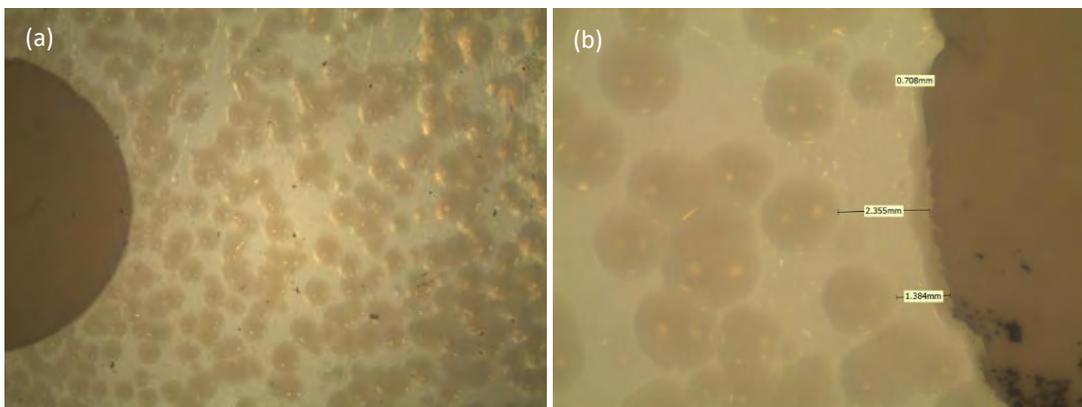


Figura 16. Gradiente de inhibición de crecimiento de colonias de *Salmonella* Enteritidis la película con ZnO-F (a) (aumento 5.8x), halo de inhibición en la periferia del disco (b) (aumento 9.7x).

La película de control positivo (ZnO-S) presentó un halo de inhibición (77.76 ± 2.11 mm) con un gradiente de inhibición como puede observarse en la Figura 17 (a), de esta forma las colonias cercanas a la película son más pequeñas y aumenta su tamaño al ser más distantes del disco (Figura 17 (b)). Es importante resaltar que el área de contacto de ambas películas tuvo un efecto inhibitorio positivo y no presentaron crecimiento del microorganismo.

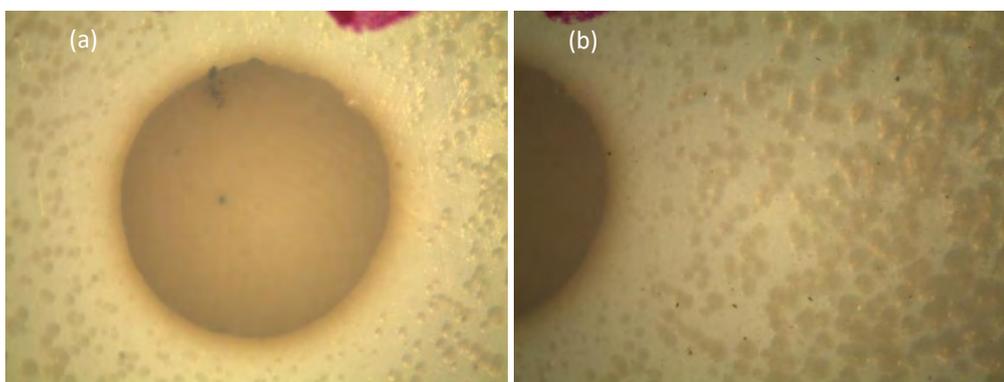


Figura 17. Halo de inhibición de la película de control positivo (ZnO-S), (a) (aumento 6.9x), gradiente de inhibición en la cepa (b) (aumento 5.8x).

Akbar *et al.* (2014) elaboraron películas con alginato de sodio y con la incorporación de ZnO a diferentes concentraciones (1, 2, 3 y 4 mg/mL) y con una morfología esférica y un tamaño de 50 nm, las cuales fueron desafiadas contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*, para evaluar visualmente los daños utilizaron microscopia electrónica de transmisión. De los resultados obtenidos, señalan que al incrementar la concentración existe una mayor actividad contra los microorganismos, determinando que la concentración óptima de ZnO en la película fue de 3 mg/mL. La interacción de la superficie celular con las nanopartículas de ZnO y su efecto en la morfología evaluado por microscopia evidenció daño y ruptura de la pared celular, y se observó la presencia de nanopartículas de ZnO alrededor de los microorganismos. Señalaron que el efecto antimicrobiano podría darse por efecto de la generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de humedad, afectando la integridad de la pared celular causando daño al contenido como lípidos o proteínas, resaltaron que con base a lo observado en las micrografías las nanopartículas no cruzan la membrana celular, y que el ZnO es más activo en bacterias Gram positivas que en el grupo de las Gram negativas.

Nafchi *et al.* (2012), emplearon nanopartículas de ZnO (con un diámetro de 40 nm a 100 nm y una longitud de 200 nm a 700 nm) a concentraciones de 1%, 2%, 3% y 5% p/p que fueron incorporadas a películas de almidón de sagú, el ensayo microbiológico fue realizado con *Staphylococcus aureus*. Los autores señalaron que a mayor porcentaje de incorporación de material nanoparticulado (5%) en la película incrementa significativamente la zona de inhibición (cercana a 80 mm²). Por lo que consideran que la película puede ser considerada activa contra microorganismos y que los posibles mecanismos de acción pueden ser la interacción física o química de las nanopartículas con las bacterias, la generación de especies reactivas o bien la generación de iones Zn²⁺.

En este sentido, Pasquet *et al.* (2014), evaluaron la contribución de iones Zn²⁺ liberados por la disolución de las nanopartículas de ZnO en la actividad antimicrobiana, considerando las condiciones del medio y las características fisicoquímicas del material, el análisis se lleva a cabo con cinco cepas de acuerdo a las pruebas de eficacia de conservadores "Challenge Test" para productos farmacéuticos y cosméticos. Para los ensayos utilizaron tres tamaños de

nanopartículas y una fuente de iones que en este caso fue gluconato de zinc. Como resultados mostraron que, en los discos de difusión obtuvieron zonas de inhibición alrededor de los discos, resaltan que las nanopartículas no pudieron difundir fuera de los discos de celulosa y que el efecto antimicrobiano puede deberse por la difusión de especies solubles en el agar como Zn^{2+} en el agar donde *Staphylococcus aureus* y *E. coli* resultaron ser más sensibles con un halo evidente, mientras que *Pseudomonas auroginosa* sólo se apreció un halo de color verde pálido poco perceptible, obteniendo resultados similares con el gluconato de zinc. Adicionalmente señalan la dependencia de la concentración con las zonas de inhibición, las cuales fueron mayores al aumentar la dosis del material. El proceso de dilución del ZnO es dependiente del tipo de diluyente (agua o medio Mueller Hinton), del tiempo, la concentración y el tamaño de las nanopartículas ZnO. La disolución y concentración de iones en medio Mueller Hinton es fuertemente dependiente de la concentración de ZnO que aumenta de dos a tres órdenes de magnitud en comparación al agua, y este proceso de disolución o “equilibrio de la concentración” es un proceso muy lento que persiste después de 24 horas. Por el contrario la concentración de iones de la disolución de ZnO en agua no incremento con respecto al tiempo; debido a que la disolución está asociada fuertemente al pH, en una dispersión en agua de ZnO el valor de pH es de 6.9 a 7, mientras que en caldo M.H es a pH es de 8, siendo las especies predominante solubles el Zn^{2+} y $ZnOH^+$. Puntualizan que la disolución de iones también es un fenómeno que es dependiente del tamaño y la forma de la partícula así como de la formación de aglomerados, siendo más rápida la disolución parcial en partículas más pequeñas y con formas esféricas que en tipo barra y cuando el tamaño del agregado disminuye.

Vijayaraghavan *et al.* (2017), señalaron que el corto tiempo de vida y la poca difusión de las especies reactivas de oxígeno, sugiere que las nanopartículas deben estar en la proximidad del microorganismo para generar estrés oxidativo para un mejor resultado en la actividad antibacteriana.

Por lo anteriormente señalado, en muchas investigaciones se han manejado microorganismos modelos para ensayos de actividad antimicrobiana que generalmente son *S. aureus* y *E. coli* los cuales resultan ser más sensibles a bajas concentraciones del ZnO en comparación del

genero *Salmonella* siendo este un microorganismo más resistente y que requiere mayor concentración de acuerdo a lo reportado por Raghupathi *et al.* (2011), Tayel *et al.* (2011) y Xie *et al.* (2011), por lo que los resultados en el ensayo de difusión en disco dependen de la sensibilidad del organismo, además de las características de las nanopartículas como el tamaño, la morfología, la concentración y el biopolímero de la película. Además, se ha reportado que los posibles mecanismos antimicrobianos involucrados en el ensayo de difusión puede ser la generación de especies reactivas de oxígeno así como también la liberación de iones ZnO^{2+} , siendo este último el que presentó mayor actividad debido a la solubilidad que presenta el ZnO en el agar Mueller Hinton, mientras que en agua la solubilidad del material es pobre y restringe la difusión. Por lo que el crecimiento irregular de las colonias en la caja de Petri con la película con nanopartículas de ZnO puede ser por la movilidad y la mayor difusión de los iones, que podría compararse con la limitada difusión que tiene el antibiótico que, aunque es soluble, el tamaño y peso molecular que es por mucho mayor al catión, y que fuera del halo de difusión de la ampicilina se observa un crecimiento homogéneo de las colonias. La literatura también señala que a menor tamaño de partícula la disolución y liberación de cationes Zn^{2+} es mayor y que la estabilidad de ese procesos se lleva aún después de 24 horas, sin embargo, podríamos decir que la generación de cationes en partículas más grandes podría ser gradual, habiendo mayor cantidad disponible, lo que nos lleva a suponer una mayor estabilidad y durabilidad del efecto antimicrobiano por la compleja morfología tipo flor.

6. CONCLUSIONES

La metodología establecida para la síntesis de nanopartículas de ZnO permitió la obtención de nanoestructuras en forma de flor con tamaños promedio de 1.5 μm , con propiedades ópticas que señalan una eficiencia fotocatalítica, promovida por el tipo de morfología así como por la probable generación de vacancias de oxígeno en el material lo que provoca una disminución en el ancho de banda prohibida y que podría contribuir a un mejor efecto antimicrobiano.

La película con incorporación de nanopartículas presentó mayor grosor, menor transparencia provocada por la adición del material y presenta propiedades de protección a la radiación UV-Vis, un menor contenido de humedad y permite una baja permeabilidad al vapor de agua. Morfológicamente la película tiene buena distribución del material en el biopolímero.

En los ensayos *in vitro* las nanopartículas de ZnO presentan un efecto antimicrobiano contra *Salmonella* Enteritidis, la concentración mínima inhibitoria fue de 2400 $\mu\text{g/mL}$, el ensayo de difusión de disco del comprimido presentó un halo de inhibición 11.1 mm, cuyo criterio de interpretación de respuesta es intermedio.

La película con incorporación de nanopartículas presenta una difusión moderada en medio sólido lo que se refleja en una mínima inhibición de crecimiento bacteriano; sin embargo, el contacto directo con la película sí mostró una inhibición de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis, por lo cual se le puede considerar una película activa.

7. PERSPECTIVAS

Por las características que presentan las nanopartículas sintetizadas y particularmente por sus propiedades antimicrobianas y su incorporación en las películas desarrolladas, sería interesante investigar el efecto en otros microorganismos Gram positivos, Gram negativos, hongos filamentosos y levaduriformes contaminantes de alimentos y evaluar su sensibilidad a las nanopartículas de ZnO. También se podría evaluar el efecto antimicrobiano y su aplicación en alimentos como en huevo y carne de ave. Así mismo, se podría realizar los estudios necesarios para desarrollar un parche tópico contra infecciones cutáneas para ser utilizadas en el área médica veterinaria.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acuff, G. (2005). Chemical decontamination strategies for meat. Improving the safety of fresh meat. Elsevier: 350-363.

Ahsanulhaq, Q., Kim, S., Kim, J. Hahn, Y. (2008). Structural properties and growth mechanism of flower-like ZnO structures obtained by simple solution method. Materials Research Bulletin **43**(12): 3483-3489.

Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. LWT-Food Science and Technology **43**(6): 837-842.

Akbar, A. Anal, A. K. (2014). Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat. Food control **38**: 88-95.

Akbariazam, M., Ahmadi, M., Javadian, N. Nafchi, A. M. (2016). Fabrication and characterization of soluble soybean polysaccharide and nanorod-rich ZnO bionanocomposite. International Journal of Biological Macromolecules **89**: 369-375.

Al-Naamani, L., Dobretsov, S. Dutta, J. (2016). Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. Innovative Food Science & Emerging Technologies **38**: 231-237.

Amadi, A., Dickson, A. Maate, G. (1993). Remediation of oil polluted soils: 1. Effect of organic and inorganic nutrient supplements on the performance of maize (*Zea mays* L). Water, Air, and Soil Pollution **66**(1-2): 59-76.

An, Q., Xin, Y., Huo, K., Cai, X. Chu, P. K. (2009). Corrosion behavior of ZnO nanosheets on brass substrate in NaCl solutions. Materials Chemistry and Physics **115**(1): 439-443.

Anastas, P. Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. Chemical Society Reviews **39**(1): 301-312.

Ashar, A., Iqbal, M., Bhatti, I. A., Ahmad, M. Z., Qureshi, K., Nisar, J. Bukhari, I. H. (2016). Synthesis, characterization and photocatalytic activity of ZnO flower and pseudo-sphere: Nonylphenol ethoxylate degradation under UV and solar irradiation. Journal of Alloys and Compounds **678**: 126-136.

ATCC (2015). ATCC Bacterial Culture Guide tips and techniques for culturing bacteria and bacteriophages. Vancouver, American Type Culture Collection.

Bajpai, S., Chand, N. Chaurasia, V. (2010). Investigation of water vapor permeability and antimicrobial property of zinc oxide nanoparticles-loaded chitosan-based edible film. *Journal of Applied Polymer Science* **115**(2): 674-683.

Benavente, D., Cañaveras, J. C., Martínez-Martínez, J., Cervera, M. C. M., García, M. Á. R. Ordóñez, S. (2012). Identificación de minerales mediante difracción de rayos X utilizando bases de datos online de libre acceso. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra* **20**(3): 280.

Bertuzzi, M., Vidaurre, E. C., Armada, M. Gottifredi, J. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of food engineering* **80**(3): 972-978.

Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K. McHugh, T. H. (2008). Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science* **73**(8): R107-R116.

Brooks, G. C., Karen; Butel, Janet; Morse, Stephen; Mietzner, Timothy (2013). *Microbiología Médica*. México, Mc Graw Hill.

Cagri, A., Ustunol, Z. Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection* **67**(4): 833-848.

Cao, W., Zhu, Z. W., Shi, Z. X., Wang, C. Y. Li, B. M. (2009). Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* Enteritidis and its contaminated shell eggs. *International Journal of Food Microbiology* **130**(2): 88-93.

Clark, J., Macquarrie, D., Gronnow, M. Budarin, V. (2012). *Green chemistry principles. Process Intensification for Green Chemistry: Engineering Solutions for Sustainable Chemical Processing*: 33-58.

CLSI (2012a). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards (M07-A9)*. USA, Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2012b). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standards-Eleven Edition (M02-A11)*. USA, Clinical Laboratory Standards Intitute.

CLSI (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement. M100-S25*. USA, Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cox, N., Berrang, M. Cason, J. (2000). *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs--a review. *Poultry Science* **79**(11): 1571-1574.

Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M. Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry—Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology* **24**(1): 30-46.

Chandrappa, K. G. Venkatesha, T. V. (2012). Electrochemical synthesis and photocatalytic property of zinc oxide nanoparticles. *Nano-Micro Letters* **4**(1): 14-24.

Chellaram, C., Murugaboopathi, G., John, A., Sivakumar, R., Ganesan, S., Krithika, S. Priya, G. (2014). Significance of nanotechnology in food industry. *APCBEE Procedia* **8**: 109-113.

Chen, M.-C. Y., Gene Horng-Chin Chiang, Been-Huang (1996). Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation* **20**(5): 379-390.

Chen, Z., Deutsch, T. G., Dinh, H. N., Domen, K., Emery, K., Forman, A. J., Gaillard, N., Garland, R., Heske, C. Jaramillo, T. F. (2013). *UV-vis Spectroscopy. Photoelectrochemical Water Splitting*, Springer: 49-62.

Chin, J. (2001). El control de las enfermedades transmisibles, Pan American Health Org.

Chiumarelli, M. Hubinger, M. D. (2012). Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch—Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids* **28**(1): 59-67.

Degen, A. Kosec, M. (2000). Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. *Journal of the European Ceramic Society* **20**(6): 667-673.

DGE. (2018) Boletín epidemiológico. Dirección General de Epidemiología.No. 43, Vol. 35, Semana 43.<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/409903/sem43.pdf>

Díaz, V., J, Gutiérrez, C., Von Plessing, C. García, A. (2011). Metal nanostructures as antibacterial agents. *Science and technology against microbial pathogens: Research, Development and Evaluation*. Badajoz: Formatex: 210-218.

Dominguez, C., Gomez, I. Zumalacarregui, J. (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology* **72**(1-2): 165-168.

Espinoza, H., Norma, Pedroza-Islas, R., San Martín-Martinez, E., Cruz-Orea, A. Tomás, S. A. (2011). Thermal, mechanical and microstructures properties of cellulose derivatives films: a comparative study. *Food Biophysics* **6**(1): 106-114.

Espitia, P. J. P., Soares, N. d. F. F., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Cruz, R. S. Medeiros, E. A. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food and Bioprocess Technology* **5**(5): 1447-1464.

Espitia, P. J. P., Soares, N. d. F. F., Teófilo, R. F., dos Reis Coimbra, J. S., Vitor, D. M., Batista, R. A., Ferreira, S. O., de Andrade, N. J. Medeiros, E. A. A. (2013a). Physical–mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **94**(1): 199-208.

Espitia, P. J. P., Soares, N. d. F. F., Teófilo, R. F., Vitor, D. M., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., de Sousa, F. B., Sinisterra, R. D. Medeiros, E. A. A. (2013b). Optimized dispersion of ZnO nanoparticles and antimicrobial activity against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *Journal of Nanoparticle Research* **15**(1): 1-16.

Fang, Y., Tung, M., Britt, I., Yada, S. Dalglish, D. (2002). Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. *Journal of Food Science* **67**(1): 188-193.

Flores, T. G. Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México* **47**(5): 388-390.

Gennadios, A., Hanna, M. A. Kurth, L. B. (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT-Food Science and Technology* **30**(4): 337-350.

Gunalan, S., Sivaraj, R. Rajendran, V. (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science: Materials International* **22**(6): 693-700.

Hashimoto, S. Yamaguchi, A. (1996). Growth morphology and mechanism of a hollow ZnO polycrystal. *Journal of the American Ceramic Society* **79**(4): 1121-1123.

He, L., Liu, Y., Mustapha, A. Lin, M. (2011). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research* **166**(3): 207-215.

Hemalatha, K., Rukmani, K., Suriyamurthy, N. Nagabhushana, B. (2014). Synthesis, characterization and optical properties of hybrid PVA–ZnO nanocomposite: A composition dependent study. *Materials Research Bulletin* **51**: 438-446.

Heymann, D. L. (2005). El control de las enfermedades transmisibles, Pan American Health Org.

Honikel, K.-O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat science* **78**(1): 68-76.

- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry* **13**(10): 2638-2650.
- Jin, T. Gurtler, J. (2011). Inactivation of *Salmonella* in liquid egg albumen by antimicrobial bottle coatings infused with allyl isothiocyanate, nisin and zinc oxide nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology* **110**(3): 704-712.
- Joe, A., Park, S.-H., Shim, K.-D., Kim, D.-J., Jhee, K.-H., Lee, H.-W., Heo, C.-H., Kim, H.-M. Jang, E.-S. (2017). Antibacterial mechanism of ZnO nanoparticles under dark conditions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **45**: 430-439.
- Johar, M. A., Afzal, R. A., Alazba, A. A. Manzoor, U. (2015). Photocatalysis and bandgap engineering using ZnO nanocomposites. *Advances in Materials Science and Engineering* **2015**.
- Kajbafvala, A., Shayegh, M. R., Mazloumi, M., Zanganeh, S., Lak, A., Mohajerani, M. S. Sadrnezhaad, S. (2009). Nanostructure sword-like ZnO wires: rapid synthesis and characterization through a microwave-assisted route. *Journal of Alloys and Compounds* **469**(1-2): 293-297.
- Kanmani, P. Rhim, J.-W. (2014). Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **106**: 190-199.
- Kim, S., Yang, S.-Y., Chun, H. H. Song, K. B. (2018). High hydrostatic pressure processing for the preparation of buckwheat and tapioca starch films. *Food Hydrocolloids* **81**: 71-76.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A. Voilley, A. (2010). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal* **20**(1): 53-60.
- Kong, X. Y., Ding, Y., Yang, R. Wang, Z. L. (2004). Single-crystal nanorings formed by epitaxial self-coiling of polar nanobelts. *Science* **303**(5662): 1348-1351.
- Kraśniewska, K. Gniewosz, M. (2012). Substances with antibacterial activity in edible films—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **62**(4): 199-206.
- Kumar, S. S., Venkateswarlu, P., Rao, V. R. Rao, G. N. (2013). Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. *International Nano Letters* **3**(1): 30.
- Li, B. Wang, Y. (2009). Facile synthesis and enhanced photocatalytic performance of flower-like ZnO hierarchical microstructures. *The Journal of Physical Chemistry C* **114**(2): 890-896.

- Li, X., Xing, Y., Li, W., Jiang, Y. Ding, Y. (2010). Antibacterial and physical properties of poly (vinyl chloride)-based film coated with ZnO nanoparticles. *Food Science and Technology International* **16**(3): 225-232.
- Liu, J., Huang, X., Li, Y., Duan, J. Ai, H. (2006). Large-scale synthesis of flower-like ZnO structures by a surfactant-free and low-temperature process. *Materials Chemistry and Physics* **98**(2): 523-527.
- Lu, C.-H. Yeh, C.-H. (2000). Influence of hydrothermal conditions on the morphology and particle size of zinc oxide powder. *Ceramics International* **26**(4): 351-357.
- Ma, X., Chang, P. R., Yang, J. Yu, J. (2009). Preparation and properties of glycerol plasticized-pea starch/zinc oxide-starch bionanocomposites. *Carbohydrate polymers* **75**(3): 472-478.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. México, Editorial Médica Panamericana.
- Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M. Karim, A. (2007). Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch–alginate edible film containing lemongrass oil. *Journal of Food Science* **72**(6).
- Mirhosseini, M. Firouzabadi, F. B. (2013). Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. *International Journal of Dairy Technology* **66**(2): 291-295.
- Morales, A. E., Mora, E. S. Pal, U. (2007). Use of diffuse reflectance spectroscopy for optical characterization of un-supported nanostructures. *Revista Mexicana de Física S* **53**(5): 18.
- Nafchi, A. M., Alias, A. K., Mahmud, S. Robal, M. (2012). Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Journal of Food Engineering* **113**(4): 511-519.
- NCBI (2005) Information., N. C. f. B. Zinc Oxide. PubChem Compound Database; CID=14806. Rockville Pike, USA. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14806> May 3, 2017
- Noei, H., Qiu, H., Wang, Y., Löffler, E., Wöll, C. Muhler, M. (2008). The identification of hydroxyl groups on ZnO nanoparticles by infrared spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **10**(47): 7092-7097.
- Padmavathy, N. Vijayaraghavan, R. (2016). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*.

- Pan, Z. W., Dai, Z. R. Wang, Z. L. (2001). Nanobelts of semiconducting oxides. *Science* **291**(5510): 1947-1949.
- Parida, K., Dash, S. Das, D. (2006). Physico-chemical characterization and photocatalytic activity of zinc oxide prepared by various methods. *Journal of Colloid and Interface Science* **298**(2): 787-793.
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D. Bolzinger, M.-A. (2014). The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **457**: 263-274.
- Patil, M. P., Palma, J., Simeon, N. C., Jin, X., Liu, X., Ngabire, D., Kim, N.-H., Tarte, N. H. Kim, G.-D. (2017). Sasa borealis leaf extract-mediated green synthesis of silver–silver chloride nanoparticles and their antibacterial and anticancer activities. *New Journal of Chemistry* **41**(3): 1363-1371.
- Polarz, S., Roy, A., Merz, M., Halm, S., Schröder, D., Schneider, L., Bacher, G., Kruis, F. E. Driess, M. (2005). Chemical Vapor Synthesis of Size-Selected Zinc Oxide Nanoparticles. *Small* **1**(5): 540-552.
- Quintavalla, S. Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* **62**(3): 373-380.
- Raghupathi, K. R., Koodali, R. T. Manna, A. C. (2011). Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* **27**(7): 4020-4028.
- Ramos-García, M. d. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I. Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* **28**(1): 44-57.
- Ramos, Ó. L., Silva, S. I., Soares, J. C., Fernandes, J. C., Poças, M. F., Pintado, M. E. Malcata, F. X. (2012). Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International* **45**(1): 351-361.
- Raoufi, D. (2013). Synthesis and microstructural properties of ZnO nanoparticles prepared by precipitation method. *Renewable Energy* **50**: 932-937.

- Rincón Acero, D. P., Ramírez Rueda, R. Y. Vargas Medina, J. C. (2011). Transmisión de *Salmonella enterica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud **43**(2).
- Salamanca, L., Cabreta, L., Narveaz, G. de Alba, L. (2011). Linseed mucilage and chitosan composite films: Preparation, physical, mechanical, and microstructure properties. Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food.
- Sánchez, A., D, Contreras-Esquivel, J., Nevárez-Moorillón, G. Aguilar, C. (2015). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano. CyTA-Journal of Food **13**(1): 17-25.
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H. Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. Nano-Micro Letters **7**(3): 219-242.
- Smoot, L. M., Pierson, M.D. (1997). Indicator microorganisms and microbiological criteria. En: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (Eds) Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, D.C.
- Talebian, N., Amininezhad, S. M. Doudi, M. (2013). Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **120**: 66-73.
- Tauxe, R. V. (2002). Emerging foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology **78**(1-2): 31-41.
- Tayel, A. A., El-Tras, W. F., Moussa, S., El-Baz, A. F., Mahrous, H., Salem, M. F. Brimer, L. (2011). Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. Journal of Food Safety **31**(2): 211-218.
- Vera, C. Aragón, R. (2005). Evidencia óptica de semiconducción directa en γ -Bi₂MOO₆. Asociación Física de Argentina.
- Vijayalakshmi, K. Sivaraj, D. (2015). Enhanced antibacterial activity of Cr doped ZnO nanorods synthesized using microwave processing. RSC Advances **5**(84): 68461-68469.
- Vijayaraghavan, R. Lakshmi, P. (2017). Chemical manipulation of oxygen vacancy and antibacterial activity in ZnO. Materials Science and Engineering: C **77**: 1027-1034.

Vinayananda, C., Fairoze, M. N., Madhavaprasad, C., Gowda, S. B., Nagaraj, C. Karabasanavar, N. (2017). Studies on Occurrence, Antibioqram and Decontamination of *Salmonella enterica* in Table Eggs. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **6**(3): 2163-2175.

Wahab, R., Ansari, S., Kim, Y., Seo, H., Kim, G., Khang, G. Shin, H.-S. (2007). Low temperature solution synthesis and characterization of ZnO nano-flowers. *Materials Research Bulletin* **42**(9): 1640-1648.

Wang, J., Wang, Z., Huang, B., Ma, Y., Liu, Y., Qin, X., Zhang, X. Dai, Y. (2012). Oxygen vacancy induced band-gap narrowing and enhanced visible light photocatalytic activity of ZnO. *ACS Applied Materials & Interfaces* **4**(8): 4024-4030.

Wara-aswapati, N., Krongnawakul, D., Jiraviboon, D., Adulyanon, S., Karimbux, N. Pitiphat, W. (2005). The effect of a new toothpaste containing potassium nitrate and triclosan on gingival health, plaque formation and dentine hypersensitivity. *Journal of Clinical Periodontology* **32**(1): 53-58.

Whiley, H. Ross, K. (2015). Salmonella and eggs: from production to plate. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**(3): 2543-2556.

Wu, L., Wu, Y. Wei, L. (2005). Preparation of ZnO Nanorods and optical characterizations. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **28**(1): 76-82.

Xie, J., Li, P., Wang, Y. Wei, Y. (2009). Synthesis of needle-and flower-like ZnO microstructures by a simple aqueous solution route. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **70**(1): 112-116.

Xie, J. L., Yanting; Zhao, Wei; Bian, Li; Wei, Yu (2011). Simple fabrication and photocatalytic activity of ZnO particles with different morphologies. *Powder Technology* **207**(1): 140-144.

Xie, L., Hettiarachchy, N., Ju, Z., Meullenet, J., Wang, H., Slavik, M. Janes, M. (2002). Edible film coating to minimize eggshell breakage and reduce post-wash bacterial contamination measured by dye penetration in eggs. *Journal of Food Science* **67**(1): 280-284.

Xie, Y., He, Y., Irwin, P. L., Jin, T. Shi, X. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(7): 2325-2331.

Xiong, G., Pal, U. Serrano, J. G. (2007). Correlations among size, defects, and photoluminescence in ZnO nanoparticles. *Journal of Applied Physics* **101**(2): 024317.

- Xu, X., Chen, D., Yi, Z., Jiang, M., Wang, L., Zhou, Z., Fan, X., Wang, Y. Hui, D. (2013). Antimicrobial mechanism based on H₂O₂ generation at oxygen vacancies in ZnO crystals. *Langmuir* **29**(18): 5573-5580.
- Yu, J., Yang, J., Liu, B. Ma, X. (2009). Preparation and characterization of glycerol plasticized-pea starch/ZnO–carboxymethylcellulose sodium nanocomposites. *Bioresource Technology* **100**(11): 2832-2841.
- Zaidi, M. B., López, C. Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana Microbiológica* **48**(2): 121-125.
- Zak, A. K., Abrishami, M. E., Majid, W. A., Yousefi, R. Hosseini, S. (2011). Effects of annealing temperature on some structural and optical properties of ZnO nanoparticles prepared by a modified sol–gel combustion method. *Ceramics International* **37**(1): 393-398.
- Zhang, L., Ding, Y., Povey, M. York, D. (2008). ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science* **18**(8): 939-944.