

Actividad biológica de nanopartículas TiO₂ obtenidas por rutas verdes

Biological activity of TiO₂ nanoparticles obtained by green routes

Lessli A. Guerrero-Dimas^{a, *}, Adali O. Castañeda-Facio^a, Aide Saenz-Galindo^a, Abril Fonseca-García^b, Sandra C. Esparza-Gonzalez^a, Maria M. Tellez Rosas^a.

^aUniversidad Autónoma de Coahuila, Ing. J. Cárdenas Valdez S/N, República, 25280 Saltillo, Coahuila, México.

^bCentro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Blvd. Enrique Reyna Hermosillo #140, San José de los Cerritos, C.P.25294, Saltillo, Coahuila, México

Resumen

El TiO₂ se ha estudiado como un material fotocatalítico debido a su buena estabilidad y capacidad para degradar contaminantes orgánicos. Este tipo de material se utiliza en el control de la contaminación ambiental y en recubrimientos antimicrobianos y fotocatalíticos, entre otras aplicaciones. Dada la importancia actual de este material, en el presente trabajo se realizó la síntesis de nanopartículas de TiO₂ (NPsTiO₂) utilizando extracto de *Ricinus communis*. Para la obtención de las NPsTiO₂, el extracto vegetal y TiCl₄ se mezclaron en presencia de hidróxido de amonio NH₄OH y se mantuvieron en agitación constante durante 2 h a 80 °C; posteriormente, las nanopartículas fueron secadas y calcinadas a 500 °C durante 4 h. Las nanopartículas obtenidas se analizaron mediante FT-IR, donde se identificaron bandas asociadas a los grupos presentes en el extracto. El análisis por DRX mostró picos de difracción característicos de la fase anatasa, ubicados a 2θ = 25°, 37°, 48°, 53°, 62°, 68° y 74°. Por DLS, las NPsTiO₂ presentaron dos poblaciones con tamaños de 87 y 317 nm. En cuanto a su actividad biológica, las NPsTiO₂ presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, observándose un incremento de la actividad después de la irradiación con luz UV durante 30 min, mientras que bajo irradiación con luz solar no se observó actividad antimicrobiana. Asimismo, en la evaluación de citotoxicidad sobre células A549, utilizando concentraciones de 100 y 200 ppm, se observó el menor porcentaje de citotoxicidad a 200 ppm con irradiación UV y el mayor porcentaje a 100 ppm sin irradiación. Estos resultados evidencian que las NPsTiO₂ obtenidas mediante una ruta verde presentan actividad antibacteriana y un comportamiento diferencial sobre la viabilidad celular dependiendo de las condiciones de irradiación y concentración.

Palabras Clave:

Nanopartículas, síntesis, extracto, antimicrobiano TiO₂.

Abstract

TiO₂ has been studied as a photocatalytic material due to its good stability and ability to degrade organic pollutants. This material is used in environmental pollution control and in antimicrobial and photocatalytic coatings, among other applications. Given the current importance of this material, the present study focused on the synthesis of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) using *Ricinus communis* extract. To obtain the TiO₂ NPs, the plant extract and TiCl₄ were mixed in the presence of NH₄OH and maintained under constant stirring for 2 h at 80 °C; subsequently, the nanoparticles were dried and calcined at 500 °C for 4 h. The obtained nanoparticles were characterized by FT-IR, where bands associated with functional group bonds were identified. XRD analysis showed diffraction peaks characteristic of the anatase phase, located at 2θ = 25°, 37°, 48°, 53°, 62°, 68°, and 74°. DLS analysis revealed two particle populations with sizes of 87 and 317 nm. Regarding their biological activity, the TiO₂ NPs exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, with an increase in activity observed after irradiation with UV light for 30 min, whereas no antimicrobial activity was observed under sunlight irradiation. Likewise, in the cytotoxicity evaluation using A549 cells at concentrations of 100 and 200 ppm, the lowest percentage of cytotoxicity was observed at 200 ppm with UV irradiation, while the highest percentage was observed at 100 ppm without irradiation. These results demonstrate that TiO₂ NPs obtained through a green synthesis route exhibit antibacterial activity and differential effects on cell viability depending on the irradiation conditions and concentration.

Keyword

Nanoparticles, synthesis, extract, antimicrobial, TiO₂

*Autor para la correspondencia: lessli_guerrero@uadec.edu.mx

Correo electrónico: lessli_guerrero@uadec.edu.mx (Lessli Aneth Guerrero Dimas), adali.castaneda@uadec.edu.mx (Adali Oliva Castañeda Facio), aidesaenz@uadec.edu.mx (Aide Saenz Galindo), abril.fonseca@ciqa.edu.mx (Abril Fonseca García), sandraesparzagonzal@uadec.edu.mx (Sandra Cecilia Esparza Gonzalez), mauratellez@uadec.edu.mx (María Maura Tellez Rosas)

1. Introducción

El uso de las nanopartículas ha adquirido una importancia significativa en la investigación química, debido a la amplia variedad de propiedades y aplicaciones potenciales incluyendo las conductivas, optoelectrónicas y antimicrobianas, entre otras, que pueden explotarse en diversos campos (Altammar., 2023).

El desafío actual en la síntesis de nanopartículas (NPs) se centra en el control del tamaño, la forma, la cristalinidad y las propiedades físicas y químicas. Por ello, se han desarrollado diversos métodos para sintetizar y fabricar estos materiales, así como para controlar su tamaño, forma y estructura. Uno de ellos es el método biológico que se ha utilizado para la obtención de nanopartículas y puede realizarse a partir de microorganismos, tejidos vegetales, algas marinas y diversos tipos de extractos de plantas (Mo y col., 2015).

En los últimos años, las nanopartículas de TiO_2 (NPsTiO_2) se han convertido en uno de los nanomateriales más utilizados a nivel comercial debido a sus destacadas propiedades oxidantes, su elevado índice de refracción, bajo costo, notable estabilidad química y vacantes de oxígeno en su red cristalina. Estas características convierten a las NPsTiO_2 en uno de los óxidos metálicos más versátiles y estudiados. Una de las características más importantes de las NPsTiO_2 para su aplicación como semiconductores en dispositivos ópticos e industriales es su amplio ancho de banda, lo que les confiere propiedades eléctricas e iónicas particulares que favorecen su uso en sensores y dispositivos electrónicos (Chandoliya y col., 2024).

Por esta razón, se han estudiado ampliamente, ya que presentan baja toxicidad y se consideran seguras tanto para el medio ambiente como para los seres humanos (Mohammed, 2021). En el presente estudio, se desarrolló un nuevo enfoque para la síntesis de NPsTiO_2 utilizando extracto de *Ricinus communis*.

2. Desarrollo experimental

2.1 Reactivos

El reactivo utilizado para la síntesis de las nanopartículas fue tetracloruro de titanio (TiCl_4) marca Sigma-Aldrich 99.9%, agua bidestilada y extracto de planta *Ricinus communis*.

En el estudio de la viabilidad celular del extracto para el ensayo MTT se emplearon reactivos Rodamina B (BOC Science®, $\geq 98\%$), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich, 98%), dimetilsulfóxido (DMSO, FAGA®LAB), Medio Modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich), solución antimicótica-antibiótica (100x, Corning), suero bovino fetal (FBS, Gibco), L-glutamina (Fischer Science), aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich). La célula utilizada fue A549 (pulmón).

2.2 Caracterización

Las nanopartículas de TiO_2 se analizaron mediante difracción de rayos X en el equipo PANalytical (Lelyweyg), así como mediante espectroscopía infrarroja con un espectrofotómetro Perkin Elmer Nicolet Nexus 47 (Espectrómetro FT-IR Frontier, Accesorio de Muestreo Universal ATR) y mediante dispersión de luz con el equipo Microtrac (NANO-flex 180 DLS Size).

2.3 Obtención del extracto natural

Las hojas frescas de *Ricinus communis* se lavaron y cortaron en trozos pequeños, se secaron en la estufa y se trituraron hasta obtener un polvo fino. Este se colocó en agua

bidestilada en relación 1:8; se agitó y se calentó durante 1 hora a temperatura de ebullición. Finalmente, se filtró para obtener un extracto acuoso transparente con valor de pH 5.

2.4 Síntesis de NPsTiO_2

Se colocaron 120 ml del extracto, se añadieron 6 mL de TiCl_4 y 12 mL de NH_4OH , manteniéndolo en agitación constante durante 2 h a una temperatura de 80 °C. Posteriormente, se realizaron lavados por centrifugación a 5000 rpm, realizando 3 lavados con etanol, luego se secó a 90 °C durante 24 h y finalmente se calcinó a 500 °C durante 4 horas.

2.5 Prueba antibacteriana

El ensayo se realizó con la bacteria *Staphylococcus aureus*. Para el control, se inoculó la bacteria extendiéndola uniformemente con un hisopo esterilizado. Posteriormente, en los demás experimentos, se colocó 1 ml de la solución de NPsTiO_2 hasta su secado. Se realizaron tres pruebas: la primera irradiando con luz ultravioleta durante 30 minutos, la segunda exponiéndola a la luz solar durante 30 minutos y la última sin colocar ninguna fuente de luz. Transcurrido este tiempo, se sembró la bacteria y se incubó a 37 °C durante 24 h.

2.6 Prueba citotóxica

La prueba se realizó con células A549, correspondientes a cáncer de pulmón, que se sembraron en una microplaca de 96 pocillos, añadiendo 200 μL . Una vez realizada la prueba, se incubó durante 24 a 48 horas a 37 °C con 5 % de CO_2 . Tras el tiempo de incubación y el crecimiento celular, se realizó el ensayo con NPsTiO_2 a las concentraciones de 100 ppm y 200 ppm, sin irradiar con luz UV, durante 20 minutos. Se incubó durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se incubaron 100 μL de MTT durante 4 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se añadieron 100 μL de DMSO para su lectura en un espectrofotómetro.

3. Resultados y discusiones

3.1 Síntesis de nanopartículas

Las NPsTiO_2 se obtuvieron utilizando el extracto natural de *Ricinus communis* como agente reductor. Se empleó espectroscopía infrarroja para la identificación de los grupos funcionales presentes en las moléculas del extracto de *Ricinus communis*. La Figura 1 muestra los espectros del extracto y de las NPsTiO_2 . En el caso del espectro del extracto, se observan señales en la región de 3440-3000 cm^{-1} correspondientes al enlace -OH. La banda presente a 1690 cm^{-1} se puede atribuir a las vibraciones del enlace C=O de los grupos funcionales presentes en los compuestos orgánicos del extracto, al igual que las bandas presentes de 1400 a 1100 cm^{-1} corresponden a la presencia de enlaces -C-O-C-, -C-O y C=C. Después de la síntesis y calcinación de las NPsTiO_2 , las bandas características del extracto disminuyen considerablemente, observándose principalmente una banda amplia entre 3500 y 3250 cm^{-1} , atribuible al estiramiento del grupo O-H, asociada a moléculas de agua adsorbidas en la superficie de las nanopartículas. (Venkatappa y col., 2023).

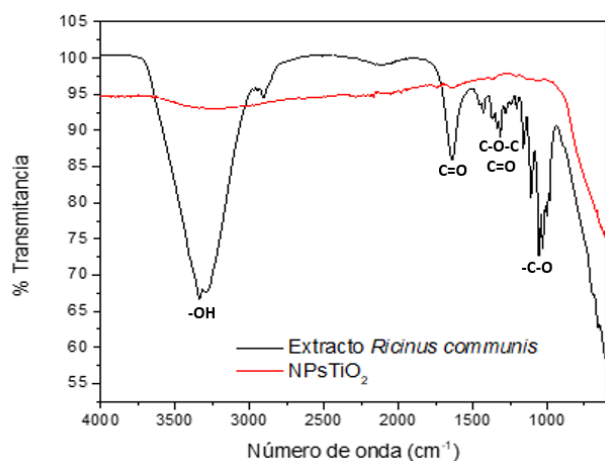


Figura 1: Espectro infrarrojo del extracto y las NPs obtenidas.

Por otro lado, en la Figura 2 se muestra el difractograma de las NPs TiO₂, que presenta los picos de difracción característicos ubicados en $2\theta = 25^\circ, 37^\circ, 48^\circ, 53^\circ, 62^\circ, 68^\circ$ y 74° , indexados como (101); (004); (200); (105); (204); (116); (220) respectivamente, lo que confirma la presencia de la fase anatasa de las NPs TiO₂ con estructura tetragonal centrada en el cuerpo característico de la fase anatasa, referenciado en la carta patrón PDF 21-1272 (Anatasa). Estos resultados también fueron presentados por Ajel et al, en 2021, donde se realizó la síntesis de NPs TiO₂ a partir del extracto de *Ricinus communis*, utilizando tetraisopropóxido de titanio como sal precursora, reportando los mismos picos de difracción y obteniendo fase anatasa (Ajel et al., 2021).

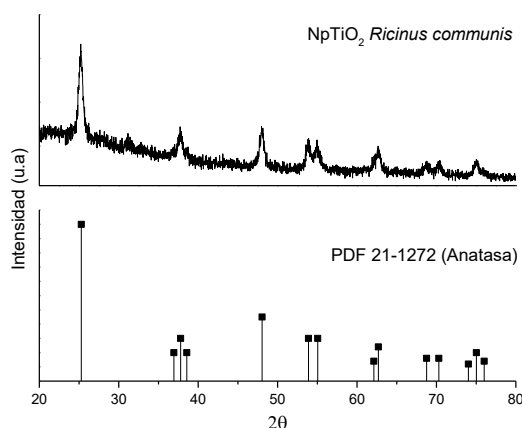


Figura 2: Difractograma de las NPs TiO₂

El tamaño promedio del cristalito se determinó mediante la ecuación de Scherrer a partir de la anchura del pico de difracción más intenso correspondiente al plano cristalino (101) de la fase anatasa en $2\theta = 25.22^\circ$ y con un valor del ancho a la mitad de la altura de 0.6370° , resultando en un tamaño de cristalito de 12.78 nm.

En la Figura 3 se observa la curva de distribución de tamaño de las NPs TiO₂, que presentaron un comportamiento bimodal con dos poblaciones de tamaño hidrodinámico en 87 nm y 317 nm. Este comportamiento bimodal también fue observado por Ansari et al. en 2022, cuando sintetizaron NPs TiO₂ a partir del extracto de *Acorus calamus*, donde obtuvieron tamaños de 38 y 59 nm, lo que indica la formación de aglomeraciones en el solvente (Ansari et al., 2022), mencionando que es un comportamiento característico en la síntesis verde de óxidos metálicos y pone de

manifiesto la tendencia de las nanopartículas a formar aglomerados en suspensión acuosa.

Donde la formación de estas poblaciones se atribuye a que su tamaño nanométrico y su alta energía libre superficial, las partículas experimentan un proceso de agregación espontánea impulsado por fuerzas atractivas de Van Der Waals (Altammar., 2023). Al igual que durante el tratamiento térmico de calcinación, sucede la descomposición térmica de la materia orgánica que actuaba como agente de recubrimiento y estabilizador estérico, promoviendo el contacto interpartícula y una sinterización parcial entre cristalitos (Ajel y col., 2021).

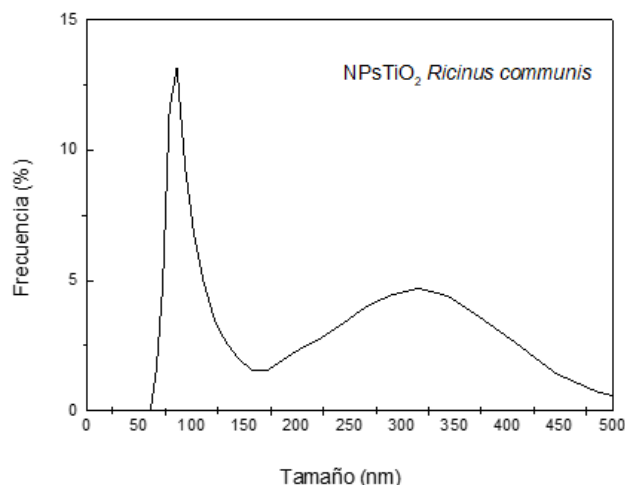


Figura 3: Distribución de tamaño de las NPs TiO₂

Es por ello que al redispersar el material en agua, los grupos hidroxilo (-OH) de la superficie interaccionan mediante puentes de hidrógeno con el solvente y con partículas adyacentes (Venkatappa y col., 2023). En consecuencia, la primera población corresponde a nanopartículas primarias o pequeños agregados monodispersos, mientras que la segunda población representa aglomerados secundarios de mayor complejidad estructural suspendidos en el medio

3.2 Pruebas antimicrobianas

En cuanto a la actividad antibacteriana de las NPs TiO₂ contra *Staphylococcus aureus*, se puede observar en la Figura 4 que las NPs TiO₂ irradiado con luz solar (Fig. 4c.) muestran nula actividad antimicrobiana, mientras que las NPs TiO₂ (Fig. 4b.) y el NPs TiO₂ irradiados con luz UV (Fig. 4d.) aumentan su actividad antimicrobiana. Senarathna et al. en 2017 indicaron que la ventaja del TiO₂ como desinfectante se debe a su actividad fotocatalítica en presencia de radiación UV, al exponerse a un rango de luz UV ($\lambda < 400$ nm) promueve la generación de reacciones redox que producen especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y el oxígeno singlete (O_2). Estos radicales libres contribuyen a la actividad biocida al destruir los compuestos orgánicos celulares (Senarathna et al., 2017).

Debido a que el tamaño nanométrico de las NPs TiO₂ también puede influir en su actividad antimicrobiana debido a la elevada relación superficie/volumen ya que su morfología y fase cristalina pueden modificar la actividad antimicrobiana de las NPs TiO₂, observándose en diversos estudios una tendencia hacia una mayor actividad con tamaños de partícula menores (Serov et al., 2024). Por lo que el incremento de la actividad antimicrobiana observado después de la irradiación UV durante 30 min es consistente con el carácter fotocatalítico del TiO₂, ya que la radiación UV puede favorecer la generación de especies reactivas de oxígeno responsables de procesos oxidativos sobre las células bacterianas

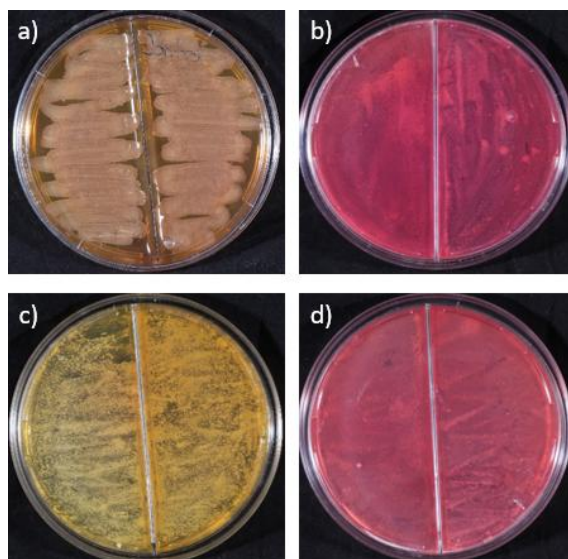


Figura 4: Actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* a) Control, b) NpTiO₂, c) NpTiO₂ con luz solar, d) NpTiO₂ con UV

3.3 Pruebas citotóxicas

La Figura 5 muestra los resultados de citotoxicidad de la línea celular A549 con concentraciones de nanopartículas de 100 y 200 ppm, irradiadas con luz UV durante 20 minutos y sin irradiación. Los resultados mostraron que la respuesta celular varió en función de la concentración de nanopartículas y de las condiciones de irradiación (Figura 5). Se observó el menor porcentaje de citotoxicidad en las células tratadas con 200 ppm de NPsTiO₂ e irradiadas con luz UV, mientras que el mayor porcentaje de citotoxicidad se presentó en las células expuestas a 100 ppm sin irradiación. Este comportamiento indica que la respuesta celular no presentó una relación directamente proporcional con la concentración de NPsTiO₂ bajo las condiciones evaluadas.

Donde la respuesta de las células A549 frente a NPsTiO₂ puede variar considerablemente dependiendo de las características del material. Un ejemplo de ello es el trabajo de Saravanakumar y col en el 2023 sobre NPsTiO₂ sintetizadas mediante extracto vegetal reportó un efecto citotóxico sobre células A549 asociado con mecanismos relacionados con ROS, daño nuclear y alteraciones mitocondriales. (Saravanakumar et al., 2023)

Por otra parte, Evans y col en el 2022 encontraron que diferentes materiales basados en TiO₂ no necesariamente inducen citotoxicidad en células A549 dentro de determinados intervalos de concentración y tiempo, aun cuando las partículas interactúan e incluso son internalizadas por las células (Evans et al., 2022)

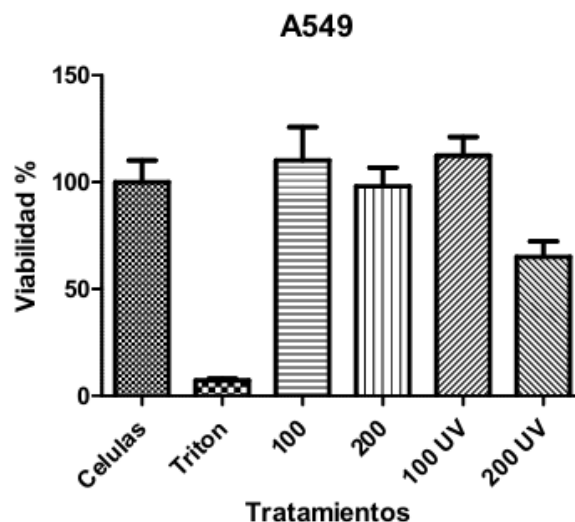


Figura 5: Viabilidad celular de las NPsTiO₂

Es por ello que bajo algunas condiciones experimentales se presentaron valores de viabilidad celular superiores al 100 %. Sin embargo, esto no debe interpretarse como una viabilidad absoluta superior al 100 %, sino como una respuesta relativa respecto al control, al cual se asignó un valor de 100 %. Debido a que el ensayo MTT se basa en la actividad metabólica celular y en la reducción del reactivo para producir formazán, un incremento de la señal metabólica respecto al control puede generar valores relativos superiores al 100 %. Además, en estudios de nanotoxicología se ha señalado que las nanopartículas pueden interferir con ensayos colorimétricos debido a sus propiedades ópticas, su capacidad de adsorción o su interacción con los componentes del ensayo; por ello, los valores obtenidos mediante MTT deben interpretarse considerando posibles interferencias asociadas al nanomaterial (Qiu et al., 2017).

4. Conclusiones

En el presente trabajo se sintetizaron con éxito NPsTiO₂ empleando un método de síntesis verde, sostenible y de bajo costo a partir del extracto acuoso de *Ricinus communis*.

Los análisis de FT-IR confirmaron el papel de los compuestos orgánicos del extracto vegetal como agentes reductores y estabilizadores en el proceso. Mediante DRX se verificó la obtención de la fase cristalina anatasa pura. Por su parte, en el DLS se evidenció un comportamiento bimodal con poblaciones hidrodinámicas de 87 y 317 nm, atribuidas a fenómenos de aglomeración en solución.

Las NPsTiO₂ mostraron una marcada actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus*, la cual se potenció significativamente tras 30 minutos de fotoactivación con luz UV debido a la generación fotocatalítica de especies reactivas de oxígeno. En contraste, bajo irradiación solar no se observó respuesta antimicrobiana significativa.

Los ensayos en células A549 (cáncer de pulmón) revelaron una respuesta celular dependiente de la concentración y de las condiciones de luz. El menor porcentaje de citotoxicidad se obtuvo a 200 ppm con irradiación UV, mientras que el mayor efecto citotóxico se registró a 100 ppm sin irradiación. Asimismo, las variaciones en la viabilidad celular sugieren posibles interferencias ópticas o metabólicas inherentes a las nanopartículas en el ensayo de MTT.

Por lo que, en conjunto, estos resultados demuestran que la ruta biológica propuesta es eficiente para la obtención de NPsTiO₂ fotoactivables con potencial en aplicaciones antibacterianas y biomédicas.

Agradecimientos

Este proyecto se lleva a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas y cuenta con el apoyo de la SECIHTY.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Referencias

- Ajel, M. M., & Al-Shamkhawy, S. A. A. (2021). Comparison characterization of synthesis of TiO₂ nanoparticles using Citrullus colocynthis and Ricinus communis leaf extracts. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25, 11832–11841.
- Altammar, K. A. (2023). A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology* 14, 1155622. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1155622.
- Ansari, A., Siddiqui, V. U., Rehman, W. U., Akram, M. K., Siddiqi, W. A., Alosaimi, A. M., Hussein, M. A., & Rafatullah, M. (2022). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using Acorus calamus leaf extract and evaluating its photocatalytic and in vitro antimicrobial activity. *Catalysts* 12(2), 181. DOI: 10.3390/catal12020181.
- Chandoliya, R., Sharma, S., Sharma, V., Joshi, R., & Sivanesan, I. (2024). Titanium dioxide nanoparticle: A comprehensive review on synthesis, applications and toxicity. *Plants* 13(21), 2964. DOI: 10.3390/plants13212964.
- Evans, S., Lawrence, R., Ilett, M., Burgum, MJ, Meldrum, K., Hondow, N., ... & Clift, M. (2022). Los tipos de TiO₂ relevantes para la industria no promueven la citotoxicidad en las líneas celulares A549 o TK6, independientemente de la interacción celular específica. *Toxicology in Vitro*, 83, 105415.
- Qiu, T. A., Nguyen, T. H., Hudson-Smith, N. V., Clement, P. L., Forester, D. C., Frew, H., ... & Haynes, C. L. (2017). Growth-based bacterial viability assay for interference-free and high-throughput toxicity screening of nanomaterials. *Analytical chemistry*, 89(3).
- Saravanakumar, K., Shin, S., Sathiyaseelan, A., & Wang, M. H. (2023). Cytotoxicity of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed sprout extract mediated titanium oxide (TiO₂) nanoparticles in human lung cancer cells. *Materials Letters*, 338, 134000.
- Senarathna, U. L. N. H., Fernando, S. S. N., Gunasekara, T. D. C. P., Weerasekera, M. M., He-wageegana, H. G. S. P., Arachchi, N. D. H., Maduranga, K., & Jayaweera, P. M. (2017). Enhanced antibacterial activity of surface modified TiO₂ nanoparticles with *Garcinia zeylanica* extract. *Chemistry Central Journal* 11, 1–8. DOI: 10.1186/s13065-017-0236-x.
- Serov, DA, Gritsaeva, AV, Yanbaev, FM, Simakin, AV y Gudkov, SV (2024). Revisión de las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de dióxido de titanio. *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (19), 10519. DOI: 10.3390/ijms251910519.
- Mo, Y., Tang, Y., Wang, S., Lin, J., Zhang, H., & Luo, D. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using eucalyptus leaf extract. *Materials Letters* 144, 165–167. DOI: 10.1016/j.matlet.2015.01.004.
- Mohamady Hussein, M. A., Ulag, S., Abo Dena, A. S., Sahin, A., Grinholc, M., Gunduz, O., El-Sherbiny, I., & Megahed, M. (2021). Chitosan/gold hybrid nanoparticles enriched electrospun PVA nanofibrous mats for the topical delivery of *Punica granatum* L. extract: Synthesis, characterization, biocompatibility and antibacterial properties. *International Journal of Nanomedicine* 16, 5133–5151. DOI: 10.2147/IJN.S306526.
- Venkatappa, M. M., Udagani, C., Hanume Gowda, S. M., Venkataramaiah, S., Casini, R., Moussa, I. M., Achur, R., Sannanigaiah, D., & Elansary, H. O. (2023). Green synthesised TiO₂ nanoparticles-mediated *Terenna asiatica*: Evaluation of their role in reducing oxidative stress, inflammation and human breast cancer proliferation. *Molecules* 28(13), 5126. DOI: 10.3390/molecules28135126.