

## Evaluación de la actividad antimicrobiana del trióxido de molibdeno MoO<sub>3</sub>

### Evaluation of antimicrobial activity of molybdenum trioxide MoO<sub>3</sub>

Julia María Ortiz Reyes, Aidé Sáenz Galindo, Lluvia Itzel López López, Adalí Castañeda Facio

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila

---

#### Resumen

En el presente artículo se reporta el estudio de la actividad antibacteriana de nanopartículas de trióxido de molibdeno (MoO<sub>3</sub>) obtenidas mediante molido en seco (relación sólido-líquido 70-30) a diferentes tiempos (0.5 h, 1:30 h, 4 h y 8 h) con una relación de volumen bolas-polvo de 0.5:10, con tamaños promedio de partículas de 1000 nm, 300 nm, 37 nm y 800 nm respectivamente. Las partículas fueron evaluadas frente a *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, mediante la técnica de halo de inhibición. La nanopartícula que presentó la mayor inhibición frente a *S. aureus*, fue de 8 h con un tamaño de 800 nm seguida de la que se molió durante 4 h obteniendo un tamaño de partícula de 37 nm.

---

#### Abstract

In this article the study of the antimicrobial activity of nanoparticles of molybdenum trioxide MoO<sub>3</sub> obtained by dry milling (solid-liquid ratio 70-30) at different times (0.5 h, 1:30 h, 4 h and 8 h is reported ) with a ratio of ball-powder 0.5 volume: 10 with average particle size of 1000 nm sizes, 300 nm, 37 nm and 800 nm respectively, the particles were tested against *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, by inhibition halo technique, MoO<sub>3</sub> has an antibacterial effect. The nanoparticle that had the highest inhibition against *S. aureus* was 8h with a size of 800 nm followed which was milled for 4 h to obtain a particle size of 37 nm.

---

**Palabras clave:** Actividad antibacteriana, trióxido de molibdeno, nanopartículas.

**Key words:** Antibacterial activity, molybdenum trioxide, nanoparticles.

---

#### Correspondencia:

Aidé Sáenz Galindo  
Departamento de Química Orgánica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Coahuila  
Blvd. V. Carranza esq. José Cárdenas Valdés  
C.P. 25280  
Saltillo, Coahuila., México  
Tel. (844)4169213  
Correo electrónico: aidesaenz@uadec.edu.mx

Fecha de recepción: 16 de diciembre de 2015

Fecha de recepción de modificaciones: 06 de mayo de 2016

Fecha de aceptación: 16 de mayo de 2016

## Introducción

El número de infecciones asociada al cuidado de la salud y sus estrategias de prevención ha aumentado rápidamente en los últimos años debido al gran impacto que tiene sobre el bienestar de la sociedad humana y los problemas asociados a la seguridad ambiental.<sup>1</sup>

Existen bacterias Gram positivas que contiene una capa gruesa (20-50 nm) de peptidoglicano (PG), que está unido a ácidos teicoicos que solamente existe en la pared celular Gram positiva. Por el contrario, las paredes celulares de las bacterias Gram negativas son más complejas, tanto estructural como químicamente. Más específicamente, en las bacterias Gram negativas, la pared celular comprende una capa delgada de PG y contiene una membrana externa, que cubre la membrana de superficie. La membrana externa de las bacterias Gram negativas a menudo confiere resistencia a compuestos hidrófobos incluyendo detergentes y contiene un componente único que son los lipopolisacáridos, que aumentan la carga negativa de las membranas celulares y son necesarias para la integridad estructural y viabilidad de la bacteria.<sup>1</sup>

En general, los agentes utilizados para eliminar tanto las bacterias Gram positivas como negativas pueden clasificarse ya sea como bactericida, que matan bacterias, o bacteriostático, lo que frena el crecimiento bacteriano. Los agentes antibacterianos son de suma importancia para luchar contra las enfermedades infecciosas. Sin embargo, las consecuencias de su amplio uso y abuso, han dado como resultado el crecimiento, transferencia y aparición de

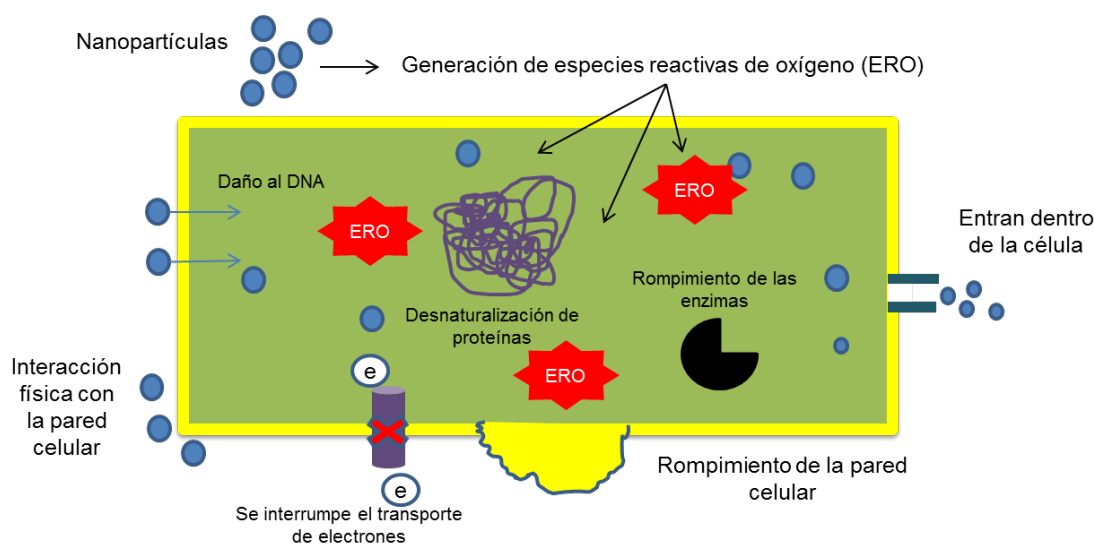
resistencia bacteriana asociado a los fármacos antibacterianos que se ha convertido en un fenómeno común y es un problema importante. La resistencia se basa más a menudo en los procesos evolutivos de las bacterias que por ejemplo tienen lugar en la terapia con antibióticos, y conduce a la resistencia hereditaria.<sup>1</sup>

Por lo que se han desarrollado nuevos materiales capaces de dar una solución a esta problemática por lo que recientes estudios sugieren que las nanopartículas presentan excelentes propiedades antimicrobianas.<sup>2</sup>

Los mecanismos exactos de toxicidad de las nanopartículas (NP) contra diversas bacterias no se entienden completamente. Las NP son capaces de adherirse a la membrana de las bacterias por la interacción electrostática y romperlas. La nanotoxicidad se desencadena generalmente por la inducción del estrés oxidante debido a la formación de radicales libres conocidas como ROS (reactive oxygen species) inmediatamente después de administrar las NP (Figura 1).

Existen diferentes tipos de nanopartículas, en especial las metálicas tales como plata (Ag)<sup>3</sup> y oro (Au)<sup>4</sup>, o bien las que se presentan en forma de óxidos como: óxido de plata (Ag<sub>2</sub>O)<sup>5</sup>, dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>),<sup>6</sup> óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>),<sup>7</sup> óxido de cobre (CuO),<sup>2</sup> óxido de cinc (ZnO),<sup>8</sup> óxido de calcio (CaO),<sup>9</sup> las cuales presentan actividades antimicrobianas.<sup>10</sup>

La sensibilidad de las bacterias no sólo está relacionada con la estructura de la pared celular, en bacterias Gram positivas y Gram negativas existen varios factores adicionales que pueden



**Figura 1. Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas (NP) contra las bacterias. Las NP pueden producir radicales libres, lo que resulta en la inducción del estrés oxidante.**

influir en la susceptibilidad o tolerancia de las mismas a las NP. Entre estos factores se encuentran la tasa de crecimiento de las bacterias, la formación del biofilm.<sup>1</sup> Además de las características muy particulares de cada NP, como tamaño y forma además de condiciones ambientales como pH del medio, temperatura, concentración de las bacterias; de tal manera que se han probado las NP de CuO, NiO, ZnO, y Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, contra las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y se ha demostrado que las NP de CuO tienen la toxicidad más elevada, seguido de ZnO (a excepción de *S. aureus*), NiO y Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.<sup>1</sup>

Por lo que recientemente el trióxido de molibdeno (MoO<sub>3</sub>) ha cobrado especial interés por presentar excelente actividad antimicrobiana,<sup>11</sup> además de que el molibdeno y la mayoría de los compuestos de molibdeno muestran una baja citotoxicidad y exhiben una alta biocompatibilidad en general para el organismo humano, los animales y las plantas. De hecho, MoO<sub>3</sub> puede ser utilizado como una fuente de molibdeno para los sistemas biológicos y es un cofactor esencial para varias enzimas tales como la xantina oxidasa, sulfito oxidasa, aldehído oxidasa, piranopterin y nitrogenasas.<sup>12</sup>

Krishnamoorthy y col.<sup>11</sup> en 2013 encontraron una buena actividad antibacteriana de las NP de MoO<sub>3</sub> contra diferentes bacterias Gram negativas como la *E. coli* y *Salmonella typhimurium* y bacterias Gram positivas como *B. subtilis* y *Enterococcus faecalis*, así mismo encontraron que el mecanismo de toxicidad se debió a la penetración de la pared celular, también se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de MoO<sub>3</sub> utilizando el método de microdilución. Los valores de CMI de las NP de MoO<sub>3</sub> contra estas bacterias son bajos en el orden de 8 µg/mL en comparación con 64 µg/mL de CMI de kanamicina (antibiótico estándar), lo que sugiere MoO<sub>3</sub> que puede ser utilizado eficazmente como un agente antibacteriano.<sup>11</sup>

En cuanto a los métodos de síntesis de NP, estos pueden ser las aproximaciones «de arriba hacia abajo» y las «de abajo hacia arriba». La primera consiste en la división de sólidos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados.<sup>13</sup>

### Molienda mecánica

La molienda es un método primario para reducir el tamaño de partículas grandes y de partículas aglomeradas a partículas de tamaño milimétrico y nanométrico. Existen muchos equipos para llevar a cabo las moliendas, pero uno de los más utilizados e importantes es el molino de bolas, considerado

como uno de los más efectivos en la reducción de tamaño de partícula de polvos. El proceso de molienda puede llevarse en seco o en húmedo, dependiendo del fin a seguir. Para una mayor efectividad en la molienda y reducir la formación de agregados de los polvos, se utilizan surfactantes como los alcoholes. Los líquidos utilizados durante la molienda también ayudan a dispersar los aglomerados.<sup>13</sup>

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana del trióxido de molibdeno (MoO<sub>3</sub>) obtenido mediante reducción por molienda de este tipo de NP frente a organismos patógenos por medio de la técnica de halo de inhibición basada en el método de Kirby-Bauer. De esta manera realizar un estudio de alto valor agregado en cuanto a las posibles aplicaciones como agente antibacteriano.

## Materiales y métodos

### Mecanosíntesis de las partículas de MoO<sub>3</sub>

Los polvos de MoO<sub>3</sub> se molieron en seco (relación sólido-líquido 70-30) a diferentes tiempos (0.5 h, 1:30 h, 4 h y 8 h) con una relación de volumen bolas-polvo de 0.5:10. Se utilizó un molino Fritsch, pulverisette 6 con un deware y bolas de aproximadamente 2 cm de diámetro de ágata. Para moler los polvos se utilizó una mezcla de agua-ácido oleico (10% de ácido oleico con respecto al agua). Se pesaron 5 g de MoO<sub>3</sub> y se agregó 1.5 mL de la mezcla de agua ácido oleico, la muestra se molió a una velocidad de 110 rpm a los 4 tiempos antes mencionados. Después de la molienda, se recuperaron los polvos y se conservaron en viales de vidrio.

### Tamaño promedio de partícula mediante dispersión de luz dinámica

Se midió el tamaño de partícula mediante la técnica de tamaño promedio por dispersión de luz dinámica utilizando un equipo Zetaziser Nano S Malvern Instruments.

### Preparación de las muestras de trióxido de Molibdeno (MoO<sub>3</sub>)

Se obtuvieron pastillas de 7 mm de diámetro de 8.5 mg de MoO<sub>3</sub>.

### Evaluación de actividad antibacteriana

Se probó el MoO<sub>3</sub> frente a las bacterias Gram negativas y Gram positivas *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 1070), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6438), las cepas se mantuvieron en medio líquido a temperatura de refrigeración de 4°C.

Se empleó el método de difusión por disco por halo de inhibición, basado en el método de Kirby-Bauer.<sup>14</sup>

### Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se sembraron las bacterias en caldo Müller-Hinton Difco® preparado según especificaciones del proveedor y se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 Lbs de presión durante 15 min. Se dejaron incubadas por un tiempo de 24 h a 37°C. Posteriormente se realizó el conteo leyendo en un espectrofotómetro a una absorbencia de 625 nm, ajustando la concentración utilizando como referencia el estándar de 0.5 Mcfarland hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

El ensayo de actividad antibacteriana se empleó el agar Müller-Hinton marca Difco®, preparado según especificaciones del proveedor y esterilizado en autoclave a 121°C y 15 Lbs de presión durante 15 min. Se vaciaron 20 mL del agar en cajas Petri estériles. Se dejó solidificar y se inocularon por el método de estría, tres cajas por bacteria mediante un hisopo estéril cubriendo toda la superficie de la caja. Posteriormente, con ayuda de una pinza se colocaron los discos de  $\text{MoO}_3$  con los diferentes tratamientos mostrados en la tabla 1. Se taparon las cajas y se incubaron por 24 h a 37 °C. Terminado el tiempo se midió el halo de inhibición alrededor de la pastilla. Los experimentos se realizaron por triplicado.

**Tabla 1. Tratamientos y bacterias utilizadas en la actividad antimicrobiana del  $\text{MoO}_3$ .**

<i>S. choleraesuis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
Blanco	Blanco	Blanco
30 min	30 min	10 min
1:30 h	1:30 h	1:30 h
4 h	4 h	4 h
8 h	8 h	8 h

## Resultados y discusión

### Molienda del $\text{MoO}_3$

En la Tabla 2, se muestran los resultados del tamaño de partícula en función del tiempo de molienda del  $\text{MoO}_3$ , donde se observa que a mayor tiempo de molienda se disminuye el tamaño de partícula. Sin embargo a 8 h se presenta un aumento del tamaño, esto probablemente debido a la aglomeración de las partículas.

### Evaluación de actividad antibacteriana

Se realizaron pruebas bacteriológicas *in vitro* con partículas de  $\text{MoO}_3$  sometidas a molienda para las bacterias Gram negativa *E. coli* y *S. choleraesuis* y Gram positiva *S. aureus* posteriormente después de 24 h, se midió el halo que se formó alrededor de la pastilla.

**Tabla 2. Resultados de tamaño de partícula en función del tiempo de molienda del  $\text{MoO}_3$ .**

Tiempo	Tamaño de partícula nm
30 min	1000
1:30 h	300
4 h	37
8 h	800

En la Tabla 3, se presentan las mediciones en mm del  $\text{MoO}_3$  sin tratamiento de molienda, se puede observar que existe un mayor efecto antibacteriano en la bacteria *S. aureus*, ya que presenta un halo de 5 mm mientras que en la bacteria *E. coli* fue de 4 mm y con la bacteria *S. choleraesuis* fue de solo 3 mm. En estudios relacionados donde Solmaz y col. en 2014 investigaron las actividades antibacterianas de las NP de CuO contra dos bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) y dos bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa* y *E. coli*), las nanopartículas CuO demostraron efectos inhibitorios contra ambos grupos de las bacterias mencionadas. Los autores concluyeron que la actividad bactericida de estas NP dependía de su tamaño, la estabilidad y la concentración. Los autores señalaron que las NP metálicas restringen el crecimiento bacteriano a través de los poros nanométricos que pasan a través de las membranas celulares de la mayoría de las bacterias.<sup>10</sup>

**Tabla 3. Resultados de las pruebas de actividad antibacteriana de las partículas de  $\text{MoO}_3$  sin tratamiento de molienda.**

Tratamiento	<i>S. choleraesuis</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
$\text{MoO}_3$	3	4	5

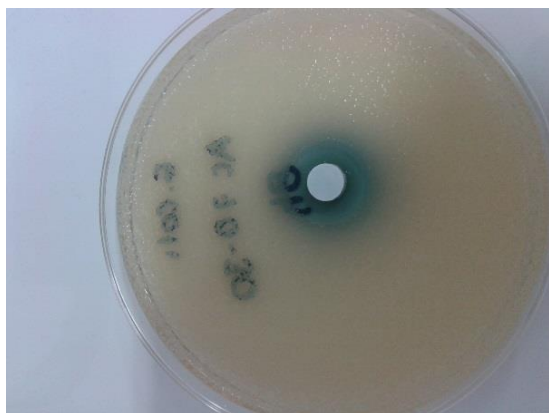
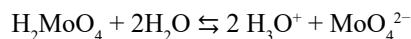
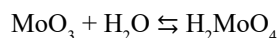
En la Tabla 4, se presentan los resultados de las pruebas de actividad antibacteriana del  $\text{MoO}_3$ , sometidos a diferentes tiempos de molienda. En ella se puede ver que a mayor tiempo existe un mayor efecto inhibitorio este efecto se observa más marcado en la bacteria *S. aureus*, con 6.5 mm de halo de inhibición a 8 h de molienda, en comparación del  $\text{MoO}_3$

**Tabla 4. Resultados de las pruebas de actividad antibacteriana del  $\text{MoO}_3$ , sometidas a diferentes tiempos de molienda.**

Tratamiento	<i>S. choleraesuis</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
30 min	3.33	5	6
1;30 min	4.5	5	5
4h	4.5	5	6
8h	4.5	5	6.5

sin tratamiento. Por lo que se concuerda con otros estudios similares en donde se observa que el tamaño de partícula influye directamente en la actividad antimicrobiana de las NP.

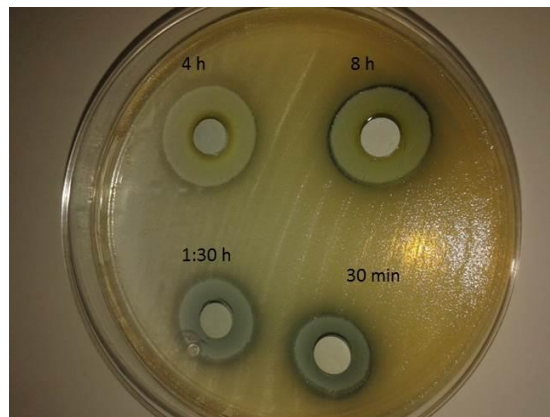
En la Figura 2, se observa que se forma un halo de 5 mm alrededor de la pastilla de  $\text{MoO}_3$ , lo que indica que existe una inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli*. Zollfrank y col.<sup>15</sup> en 2012, presentan un nuevo concepto de materiales para prevenir de forma permanente el crecimiento de agentes infecciosos (bacterias) en varias superficies de materiales (por ejemplo, polímeros, metales) con tubos de poliuretano rellenos con NP de  $\text{MoO}_3$  los cuales mostraron que las superficies de materiales estaban prácticamente libres de microorganismos seis horas después de la contaminación con agentes infecciosos que causan enfermedades graves tales como *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El principio antibacteriano de los óxidos de metales de transición como el  $\text{MoO}_3$  puede estar relacionada con una reacción superficial ácida (liberación de iones hidronio) de acuerdo con las siguientes reacciones<sup>14</sup>



**Figura 2. Fotografía del efecto antibacteriano *in vitro* de la partícula de  $\text{MoO}_3$  en la bacteria *E. coli*.**

En la Figura 3, se observa un claro efecto del tiempo de molido ya que a las 8 h se incrementa el halo en todas las pruebas; Maleki y col.<sup>10</sup> en 2014 exponen en su trabajo que el tipo de los materiales utilizados para la preparación de las nanopartículas así como el tamaño de partícula eran dos parámetros importantes que afectaron la eficacia antimicrobiana resultante. Las NP generalmente tienen propiedades diferentes en comparación con el mismo material que está a mayores tamaños de partículas, debido al hecho de que la relación superficie/volumen de las NP

aumenta considerablemente con la disminución en el tamaño de partícula. Además, las características morfológicas y fisicoquímicas de los metales a un tamaño manométrico han demostrado ejercer un efecto sobre su actividad antimicrobiana. Se sabe que las NP más pequeñas tienen el efecto bactericida más fuerte. La carga positiva de la superficie de las NP metálicas facilita su unión a la superficie de las bacterias que están cargadas negativamente, dando como resultado una mejora del efecto bactericida.<sup>10</sup>



**Figura 3. Fotografía del efecto antibacteriano del  $\text{MoO}_3$ , sometido a diferentes tiempos de molienda con la bacteria *E. coli*.**

## Conclusión

Para el presente bioensayo se concluye que, las NPs de  $\text{MoO}_3$  presentan un efecto antibacteriano sobre la bacteria Gram positivas como Gram negativas, ya que hubo un efecto antibacteriano contra *S. aureus*, *E. coli* y *S. choleraesuis*, presentándose un efecto ligeramente mayor contra la *S. aureus*, además se observa por los resultados que si existe un efecto del tiempo al que fue sometido el  $\text{MoO}_3$  al tratamiento de molienda ya que a mayor tiempo existe un mayor efecto antibacteriano de las partículas, ya que se incrementa el diámetro del halo alrededor de las pastillas de  $\text{MoO}_3$ . Este efecto puede ser por la generación de especies reactivas de oxígeno que rompe la pared celular, la generación de especies ácidas cuando están en contacto con agua y depende del tamaño, características estructurales y naturaleza química de la NP.

## Agradecimientos

Se agradece al CONACYT por la beca no. 280916/241448 otorgada a la MC. Julia María Ortiz Reyes para la realización de este proyecto, así como al Posgrado en Ciencia y Tecnología de Materiales y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

## Bibliografía

- Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar A, Jimenez D, Ruiz I, Rojo T, *et al.* Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012; 30(10): 499-511.
- Katwal R, Kaur H, Sharma G, Naushad M, Pathania D. Electrochemical synthesized copper oxide nanoparticles for enhanced photocatalytic and antimicrobial activity. *Ind Eng Chem.* 2015; 31: 173-184.
- Cheng H, Xiong W, Fang Z, Guan H, Wu W, Li Y, *et al.* Strontium (Sr) and Silver (Ag) loaded nanotubular structures with combined osteoinductive and antimicrobial activities. *Acta Biomaterialia.* 2016; 31: 388-400.
- Balakumaran MD, Ramachandran R, Balashanmugam P, Mukeshkumar DJ, Kalaichelvan PT. Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiol Res.* 2016; 182: 8-20.
- Wenning S, Lajun F, Hui F, Ali L. Divalent silver oxide-diatomite hybrids: synthesis, characterization and antibacterial activity. *Ceram Int.* 2013; 39(5): 5013-5024.
- Zielińska-Jurek A, Wei Z, Wysocka I, Szweda P, Kowalska E. The effect of nanoparticles size on photocatalytic and antimicrobial properties of Ag-Pt/TiO<sub>2</sub> photocatalysts. *Appl Surf Sci.* 2015; 353: 317-325.
- Murthy-Akondi A, Lakshmi-Kantam M, Trivedi R, Bharatam J, Babu-Vemulapalli SP, Bhargava SK, *et al.* Ce/SiO<sub>2</sub> composite as an efficient catalyst for the multicomponent one-pot synthesis of substituted pyrazolones in aqueous media and their antimicrobial activities. *J Mol Catal A Chem.* 2016; 411: 325-336.
- Alvarado R, Solera F, Baudrit J. Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de cinc y de plata estabilizadas con quitosano evaluación de su actividad antimicrobiana. *Rev Iber Polimeros.* 2014; 15(2): 134-148.
- Atkinson I, Anghel EM, Predoana L, Mocioiu OC, Jecu L, Raut I, Munteanu C, Culita D, Zaharescu M. Influence of ZnO addition on the structural, *in vitro* behavior and antimicrobial activity of sol-gel derived CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> bioactive glasses. *Ceram Int.* 2016; 42: 3033-3045.
- Maleki S, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Hossein M, Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C.* 2014; 44: 278-284.
- Krishnamoorthy K, Veerapandianb M, Yunb K, Kim S. New function of molybdenum trioxide nanoplates: Toxicity towards pathogenic bacteria through membrane stress. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 112: 521-524.
- Shafaei Sh, Van D, Fey T, Koch M, Kraus T, Guggenbichler JP, *et al.* Enhancement of the antimicrobial properties of orthorhombic molybdenum trioxide by thermal induced fracturing of the hydrates. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 58: 1064-1070.
- Guerrero MI. Obtención de nanopartículas de MoO<sub>3</sub> por reducción de tamaño mediante molienda mecánica. [Tesis de Licenciatura]. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad autónoma de Coahuila; 2015.
- Andrade M. Estudio de las reacciones de sustitución empleando NTCPM modificados superficialmente con ácidos carboxílicos y sistemas aromáticos del tipo naftoquinona, mediante metodologías verdes. Con posibles aplicaciones biológicas. [Tesis de Maestría]. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila; 2013.
- Zollfrank C, Gutbrod K, Wechsler P, Guggenbichler J.P. Antimicrobial activity of transition metal acid MoO<sub>3</sub> prevents microbial growth on material surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2012; 32: 47-54.