Universidad Autónoma de Baja California Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



Evaluación de la actividad toxicológica de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas a partir del extracto "*Rubus ulmifolius*"

Tesis para

"Obtener el grado de maestro en ingeniería"

Presenta:

Aleksy Moreno Meza

Directora

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Codirector

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Ensenada, Baja California, México, agosto 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

Evaluación de la actividad toxicológica de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas a partir del extracto "Rubus ulmifolius

TESIS

Que para obtener el grado de maestría en ingenieria presenta:

Aleksy Moreno Meza

Aprobada por:

Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez

Director de tesis

Dr.Priscy A. Luque Morales Codirector de tesis

Rubén C. Villarreal Sánchez Miembro del comité

Ensenada Baja California, México. Agosto, 2022

Resumen de la tesis que presenta Aleksy Moreno Meza como requisito parcial para la obtención del grado de Maestría en Ingeniería en la línea de generación y aplicación del conocimiento de Bioquímica.

Evaluación de la actividad toxicológica de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas a partir del extracto "Rubus ulmifolius"

Resumen aprobado por:

Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez

Dr. Priscy A Luque Morales

Directora

Codirector

En años recientes, la sintesis de nanopartículas por métodos físicos, químicos y biológicos, está desarrollando una contaminación ambiental. El uso de reactivos altamente oxidantes se desecha como productos tóxicos para el medio ambiente. Esto ha llamado la atención dado que, la demanda de nanopartículas cada vez se vuelve mayor por sus amplios campos de aplicación, por lo que las nanopartículas (NP's) de óxido de zinc (ZnO), tienen un interés particular, ya que, su campo de acción es diverso, desde la electrónica, cosméticos, ambientales hasta aplicaciones biomédicas. Por tal motivo, el interés de este proyecto se ha enfocado en la investigación de la actividad toxicológica de las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con Rubus ulmifolius. Por otra parte, en esta investigación se expusieron bacterias, células "sanas" y cancerosas a nanopartículas de óxido de zinc utilizando diferentes porcentajes de extracto Rubus ulmifolius determinando el efecto que ejercen las nanopartículas de óxido de zinc sobre E. coli y células de cerebro de ratón, a través de estudios de actividad antimicrobiana y ensayos de viabilidad celular. El resultado de las pruebas, demostraron que las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con Rubus ulmifolius tienen actividad inhibitoria sobre cepas grampositivas y gramnegativas. En los cultivos celulares se observó, que, a mayor concentración menor viabilidad, destacando un efecto ligeramente mayor en las células de glioma que las de cultivo primario sano.

Palabras clave: Antimicrobiano, Anticancerígeno, E. coli, Rubus ulmifolius, Líneas celulares, Síntesis verde, Nanotecnología, Nanopartículas de óxido de zinc.

Dedicatorias

Este trabajo quiero dedicarlo a mi pareja Lilian B. López Valdez, quien está conmigo desde antes de comenzar este camino y siempre me ha apoyado a seguir adelante, le debo las gracias por su apoyo y comprensión para lograr mis sueños. A mi hija Lia Aleksya Moreno López que está presente y me motiva a no rendirme, siguiendo adelante cada día en contra de las adversidades mostrándome su sonrisa.

También lo dedico a mis padres Gloria A. Meza Valenzuela y José eligió moreno López, quienes me apoyaron incondicionalmente. Por darme los valores y habilidades necesarias para cumplir mis objetivos, y por impulsarme siempre a construir mi propio futuro.

Este trabajo también lo debo dedicar a mis amigos Kevin, Roman, Juan Carlos, Toyes, y Daniela. Por su ayuda, su confianza en mí, su aliento y compañía en los momentos difíciles, su aporte de conocimiento e ideas. Estando conmigo desde el comienzo que yo decidí tomar este camino, y hasta la fecha siguen demostrando su cariño y amistad hacia mi persona, dándome a conocer que puedo contar con ellos en todo momento. Llegando a ser personas muy importantes en mi vida.

Por último, dedico este trabajo y mí mismo. Dándome el reto de superarme cada día más, rompiendo mi zona de confort, para desempeñar un trabajo que no sabía que era capaz de realizar. Mi hambre por el conocimiento y ganas de seguir aprendiendo cosas nuevas. Por los momentos difíciles que deseaba rendirme, pero mi perseverancia y constancia me impulsaban a seguir, no aparando la mirada del propósito y meta que un día decidí alcanzar.

Este proyecto fue mi recordatorio de todo lo que me fue enseñado y lo que aún queda por aprender, sin duda este no es el final, así que también, lo dedico a lo que está por venir en mi formación profesional y personal.

Agradecimientos

A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño de la Universidad Autónoma de Baja California y al programa de posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería, por haberme brindado las instalaciones, recursos y conocimientos necesarios para realizar este proyecto y complementar mi formación académica.

A CONACYT por el apoyo económico para sustentarme y desarrollar el proyecto denominado Evaluación de la actividad toxicológica de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas a partir del extracto "Rubus ulmifolius"

A mi directora y codirector de tesis, la Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez y el Dr. Priscy A. Luque Morales, por guiarme en este proyecto, siendo mentores pacientes y dedicados.

Al comité de tesis conformado por Rubén C. Villarreal Sánchez por contribuir con sus observaciones para ayudarme a realizar un mejor trabajo de investigación.

A mis padres, mi pareja de vida, mi hija y amigos, por los ánimos e impulso que me dieron para seguir adelante y no rendirme en el trayecto, por ser mi apoyo y motivación tanto en el ámbito personal como profesional, ayudándome a ser una mejor persona, un mejor estudiante y un mejor profesionista.

Resumen	II
Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Índice de figuras	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Nanotecnología	1
1.1.2 Nanopartículas de óxido de zinc	2
1.1.3 Método de síntesis	4
1.2 Generalidades de <i>Rubus ulmifolius</i>	8
1.3 Antecedentes	10
1.3.1 Síntesis verde de NP's ZnO	10
1.3.2 Nanopartículas de óxido de zinc aplicadas en biomedicina	11
1.4 Justificación	
1.5 Hipótesis	
1.6 Objetivos	18
1.6.1 Objetivo General	18
1.6.2 Objetivos Específicos	18
2. METODOLOGÍA	20
2.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc	20
2.2 Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc	21
2.3 Susceptibilidad antimicrobiana	21
2.4 Evaluación en cultivos celulares	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Caracterización	26
3.2 Actividad antimicrobiana	33
3.3 Ensayo de viabilidad celular	40
4. CONCLUSIÓNES	46
5. REFERENCIAS	48
6. ANEXOS	58

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de cristalinidad de nanopartículas de óxido de zinc a) sal de roca B) zinc blenda y C) hexagonal wurtzita [16]
Figura 2. Modelo de estructura hexagonal wurtzita del ZnO. Se muestra la coordinación tetraédrica del Zn-O. Los átomos de O se muestran como esferas blancas más grandes mientras los de Zn son esferas marrones más pequeñas [17].
Figura 3. Métodos de síntesis de nanopartículas [22]
Figura 4. Características de <i>Rubus ulmifolius</i> [43]9
Figura 5. Ejemplo del mecanismo de síntesis de nanopartículas de óxido de zinc por síntesis verde [47]
Figura 6. Descripción gráfica de la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc utilizando <i>Rubus ulmifolius.</i> 21
Figura 7. Descripción gráfica de las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas. 23
Figura 8. Descripción gráfica de las pruebas de viabilidad celular
Figura 9. Espectro FTIR de NP's ZnO Sintetizadas con Rubus ulmifolius27
Figura 10. Espectros FTIR de NP's de ZnO extraídos de cebolla, repollo, zanahoria y tomate mediante métodos de síntesis verde [81]
Figura 11. Espectro UV-VIS de NP's ZnO Sintetizadas con Rubus ulmifolius 29
Figura 12. Espectro de absorción UV-VIS de las nanopartículas de ZnO [82] 30
Figura 13. Espectro de absorción UV-VIS de las nanopartículas de ZnO al 0.1% de extracto
Figura 14. Espectro de absorción UV-VIS de las nanopartículas de ZnO al 0.1% de extracto
Figura 15 . Espectro de absorción UV-VIS de las nanopartículas de ZnO al 0.1% de extracto
Figure 40. Heles de inhibitión en E seli el heles de inhibitión con diómetre de

Figura 16. Halos de inhibición en *E. coli*. a) halos de inhibición con diámetro de 19.5mm en NP's ZnO a 1%, diámetro de 16mm con muestra de NP's ZnO a 0.5 %. b) halos de inhibición en No.20 con diámetro de 15mm a una concentración de

1mg/mL, con muestra de NP's ZnO a 2%. c) halo de inhibición de 19mm de diámetro a concentración de 100ug/mL con muestra de NP's de ZnO a 0.25% inhibición. . 34

Figura 18. Cultivo de *E. coli* con muestra de nanopartículas de óxido de zinc a distintas concentraciones expuesta a lampara de luz ultravioleta que no mata E. coli.

Figura 20. Exposición de *E. coli* a nanopartículas de óxido de zinc con extracto de mandarina a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc...... 37

Figura 24. Tratamiento de células con varias concentraciones (10,20,30 mg/ml) NP's ZnO durante uno y siete días (A, B) [89]......43

 Figura 29. Células muertas como control positivo en ensayo MTT expuestas a 50ul de Dimetilsulfóxido (DMSO)......66

Figura 30. Células vivas como control negativo en ensayo MTT. 66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de nanopartículas de óxido de zinc [19]. 4
Tabla 2. Actividad anticancerígena de nanopartículas de óxido de zinc [80] 16
Tabla 3. Halos de inhibición expuestas a nanopartículas de óxido de zinc utilizandoextracto de Anoectochilus elatu [84]
Tabla 4. Actividad antimicrobiana de diferentes cepas de NP's SQ-ZnO y SV- ZnO [85]
Tabla 5. Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc usando extractos de plantas[59][59]
Tabla 6. Síntesis verde de nanopartículas metálicas de varios extractos de plantas[101].65

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanotecnología

La nanotecnología se encuentra desde la antigüedad, alrededor del siglo IV d.C., la civilización de los romanos utilizó nanopartículas con elementos de oro y plata para fabricar una copa de licurgo, la cual tenía dos colores distintos al reflejo de la luz [1].

Hace 4500 años los humanos explotaban el uso de nano fibras de amianto para reforzar las mezclas con cerámica. Los antiguos egipcios estaban habituados al uso de nanopartículas de PbS implementadas en una fórmula para tinción de cabello, alrededor de hace unos 4000 años [2].

En 1857, Faraday informó sobre la síntesis de oro coloidal (y otros metales como Cu, Zn, Fe y Sn) y su interacción con la luz [3].

En 1925, Richard Zsigmondy galardonado con el premio nobel de química. Hizo mención del término nanómetro para caracterizar el tamaño de las partículas y fue el primero en realizar una medición del tamaño de partículas de unos coloides de oro usando un microscopio [4].

En diciembre de 1959, el concepto de nanotecnología fue mostrado por el premio nobel de física Richard P. Feynman en su famosa conferencia "Hay mucho espacio en el fondo" [5].

En 1974, Norio Taniguchi (profesor de la Universidad de Ciencias de Tokio) inventó el término "nanotecnología" para describir una precisión extra alta y dimensiones ultrafinas. Introdujo el 'enfoque de arriba hacia abajo' al predecir mejoras y miniaturización en circuitos integrados, dispositivos optoelectrónicos, dispositivos mecánicos y dispositivos de memoria de computadora. Aproximadamente diez años después, K Eric Drexler introdujo el enfoque de abajo hacia arriba [6].

En el campo de las NP's magnéticas, Blakemore publicó un trabajo pionero notable en 1975, donde se encontró magnetita precipitada bioquímicamente (Fe_3O_4) en los tejidos de varios organismos, incluidas bacterias, algas, insectos, pájaros, y mamíferos [7].

El fundamento de la nanotecnología son las nanopartículas. Las nanopartículas poseen un tamaño alrededor de 1 a 100 nanómetros y están conformadas por carbono, metal, óxidos metálicos o materia orgánica. Las nanopartículas presentan unas propiedades físicas, químicas y biológicas únicas a su nano escala, comparadas con sus partículas a escalas normales. Se le atribuye que poseen una superficie relativamente mayor respecto al volumen, a una mayor reactividad o estabilidad en un proceso químico, a una mayor resistencia mecánica, etc. [8].

1.1.2 Nanopartículas de óxido de zinc

El zinc es un mineral esencial en el cuerpo humano, presente en cerebro, músculos, huesos. Ya que aporta enzimas para síntesis de proteínas, y ácidos nucleicos. El zinc no es toxico en condiciones fisiológicas sim embargo, la toxicidad se deriva de los iones de Zn^{2+} [9]. El zinc es un elemento importante en los seres humanos, donde varias enzimas como la anhidrasa carbónica, la carboxipeptidasa y el alcohol deshidrogenasa son inactivas en el sistema humano en ausencia de zinc. Nuestro cuerpo posee unos 2-3 g de zinc y tiene una necesidad diaria de unos 10-15 mg. El organismo lo absorbe fácilmente a partir de nanopartículas de óxido de zinc debido a su menor tamaño de partícula [10].

El zinc elemental aporta el correcto funcionamiento de macromoléculas, y coenzimas, se involucra en la estructura dedos de zinc (zinc finger en inglés) proporciona un andamiaje único que permite a las proteínas interactuar con el ADN u otras proteínas [11].

Las nanopartículas de óxido de zinc, se aplicaron por primera vez en la industria del caucho, mejorando el rendimiento del polímero en la dureza e intensidad, utilizándose en productos de cuidado personal como cosméticos y protectores solares [12].

El óxido de zinc es un material inorgánico que rara vez se encuentra en la naturaleza [13], [14]. Corresponde a una longitud de onda de excitación máxima de 380 nm similar al TiO_2 [15].

El ZnO puede presentar tres estructuras cristalinas: Wurtzita, blenda de zinc y sal de roca (Figura 1). En condiciones ambientales, la fase termodinámicamente estable es la estructura Wurtzita, en la que cada átomo de zinc está coordinado tetraédricamente con cuatro átomos de oxígeno. En cada una de las formas, el ZnO es un material semiconductor con una brecha de banda ancha directa de 3,3 eV [16].

La estructura de ZnO wurtzita tiene una celda unitaria hexagonal con dos parámetros de red, a y c, y pertenece al grupo espacial de C46V o P63mc. La estructura está compuesta por dos subredes hexagonales cerradas (hcp) inter penetradas, en las que cada una está formada por un tipo de átomo (Zn u O) desplazado entre sí a lo largo del triple eje c. Puede explicarse esquemáticamente como un número de planos alternos apilados capa a capa a lo largo de la dirección del eje c y compuestos por Zn^{2+} y O^{2-} de coordinación tetraédrica (Figura 2). La coordinación tetraédrica del ZnO da lugar a la estructura no centro simétrica. En el ZnO hexagonal de wurtzita, cada anión está rodeado de cuatro cationes en las esquinas del tetraedro, lo que muestra la coordinación tetraédrica y, por tanto, exhibe el enlace covalente.



Figura 1. Tipos de cristalinidad de nanopartículas de óxido de zinc a) sal de roca B) zinc blenda y C) hexagonal wurtzita [16].



Figura 2. Modelo de estructura hexagonal wurtzita del ZnO. Se muestra la coordinación tetraédrica del Zn-O. Los átomos de O se muestran como esferas blancas más grandes mientras los de Zn son esferas marrones más pequeñas [17].

ZnS tiene un tipo de estructura único en comparación con otras moléculas, que tienen diferentes tipos de estructuras únicas. ZnS puede tener una estructura de blenda de zinc que es una "red de tipo diamante" y, a una temperatura diferente, ZnS puede convertirse en el tipo de estructura de wurtzita que tiene una simetría de tipo hexagonal. En cuanto a la estructura, la estructura zinc blenda es más favorecida termodinámicamente, sin embargo, debido a la construcción lenta de las estructuras de wurtzita, se pueden encontrar ambas formas de ZnS. El término blenda de zinc tiene su origen en compuestos como el ZnS, que puede estar en fase cúbica o hexagonal [17].

La fase B4 se transforma en una estructura cúbica de NaCl (fase B1). Un estudio teórico reciente predijo además la transformación de la fase B1 a la fase B2 (CsCl cúbico) bajo una presión de 256 GPa [18].

Las aplicaciones del óxido de zinc abarcan: nano generadores, sensores de gas, biosensores [14]. Biocompatible, propiedades dependientes de la estructura, transporte eléctrico y termino (Tabla 1) [19].

Categoria	Aplicaciones	
	Jabón	
formocoutions	Ungüento	
laimaceuticas	Incrustaciones dentales	
	Polvos alimenticios	
	Polvos	
Comptione: productos do pobello y piel	Cremas	
Cosmeticos: productos de cabello y piel	Lociones de protección solar que bloquean la radiación ultravioleta	
	Ungüentos para quemaduras	
	Adhesivos quirúrgicos/industriales	
Dispositivos medicos	Masillas	
	Selladores	

Tahla 1	Anlicaciones	de nano	nartículas	de óxido	de zinc l	[10]
	. Aplication co		particulas			LISI.

La nanotecnología tiene una posición dominante en la transformación de la agricultura y la producción de alimentos. La nanotecnología tiene un gran potencial para modificar las prácticas agrícolas convencionales. La mayoría de los agroquímicos aplicados a los cultivos se pierden y no llegan al sitio de destino debido a varios factores que incluyen la lixiviación, la deriva, la hidrólisis, la fotólisis y la degradación microbiana [20].

1.1.3 Método de síntesis

Existen distintos métodos para la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc, los cuales se dividen en dos principales clases: Métodos *hacia abajo* y *hacia arriba* (Figura 3) [21].



Figura 3. Métodos de síntesis de nanopartículas [22].

El método hacia abajo consta de síntesis por métodos físicos.

1. Síntesis física:

Es un proceso ascendente para sintetizar materiales nanoestructurales, que sigue dos pasos, el primer paso es evaporar el material y el segundo paso es la condensación rápida controlada para obtener el tamaño de las partículas. La síntesis física se divide en método de molienda de bolas de alta energía; la deposición de vapores sólidos, físicos y químicos; y la ablación por láser [23].

Método de molienda de bolas de alta energía:

El polvo de ZnO se muele en atmósfera ambiente utilizando bolas de acero endurecidas en celdas de acero durante 2-50 horas en diferentes rangos de tiempo. La molienda mecánica se lleva a cabo en un molino horizontal oscilante a 25Hz. El

polvo de ZnO y las bolas de acero, es de 1:15 en porcentaje de peso. Sin añadir agente de molienda, el material se molió directamente [24]

Ablación láser:

Para la ablación láser, se disuelve dodecil sulfato de sodio en agua doblemente destilada, mientras se irradia el zinc metálico con láser Nd:YAG a una frecuencia de 10 Hz [25].

2. El método hacia arriba consiste en los métodos químicos

La síntesis química es un método que requiere unas o varias reacciones químicas, donde los materiales iniciales / reactivos se convierten en el producto final. La síntesis química se divide en dos fases: fase liquida y fase gaseosa. Dentro de la fase gaseosa se subdivide en pirolisis y condensación de gas. Mientras la fase liquida se subdivide en métodos de precipitación/ coprecipitación, coloidal, sol gel, micro emulsión, hidrotérmico y solvotermal [26].

Método sol-gel:

El método sol-gel es un proceso químico húmedo en el que se desarrolla una suspensión coloidal (sol) y se gelifica el sol en fase líquida constante (gel) para formar una red tridimensional. El compuesto de zinc se disuelve en agua bidestilada y se calienta a 50°C, con agitación constante, se añade lentamente alcohol absoluto, y además, se añade H_2O_2 gota a gota bajo agitador magnético hasta obtener una solución clara. La solución se incuba durante 24 horas y se seca a 80°C para obtener nanopartículas de óxido de zinc blancas. Para eliminar los subproductos, se lava varias veces con agua bidestilada y se seca a 80°C en un horno de aire caliente. Durante el proceso de secado se produce la completa conversión del óxido de zinc.

Método de micro emulsión:

La micro emulsión es una solución líquida termodinámicamente estable y ópticamente isotrópica, que es la mezcla de agua, aceite y anfibillo. En esta técnica, la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc se realiza mediante el sistema de micro emulsión inversa. Las sustancias utilizadas son el Dioctil sulfosuccinato de sodio, el glicerol y el N-heptano como tensioactivos, fase polar y fase no polar respectivamente. Se prepara la formulación de dos micro emulsiones con diferentes proporciones de tensioactivos. Se disuelve el Dioctil sulfosuccinato de sodio en n-heptano a temperatura ambiente con agitación constante para obtener la micro emulsión. Después de la disolución, la solución debe separarse en dos partes, solución A y solución B. El compuesto de zinc se disuelve en la mitad de glicerol y se añade lentamente a la solución A mediante agitación constante. Del mismo modo, para la solución B se añade NaOH disuelto en glicerol, las dos soluciones anteriores se agitan continuamente a temperatura ambiente hasta obtener una solución transparente [27].

Método hidrotérmico:

Es un método de preparación de monocristales que se basa en la solubilidad de los minerales con alta presión en agua caliente [28], [29].

Método solvotérmico:

Es el proceso en el que se añade el disolvente manteniendo una presión y temperatura de moderada a alta, donde se facilita la interacción de los precursores para la síntesis [30].

Método de pirólisis:

El pirólisis es un método en el que la solución precursora se atomiza, se evapora y luego se descompone en películas y partículas. El compuesto de zinc se disuelve en agua destilada para preparar una solución precursora. Bajo la presión del aire, la solución se nebuliza y la descomposición de las gotas tiene lugar en el reactor a una temperatura de 1200°C. Con ello, se obtienen nanopartículas que se recogen en un precipitador en frío y se secan a 100°C en un horno [29], [31].

Método de condensación de gases

Para este método el compuesto de zinc se coloca en una cámara de vacío, calentándose mediante corriente inducida, manteniendo la presión de vacío y la temperatura de vaporización, donde el compuesto se funde y se vaporiza en gas. En la cámara de vacío, el vapor del material choca con el gas inerte fluyendo hacia la superficie del colector de baja temperatura y se forman las nanopartículas. Dado que el nitrógeno líquido fluye continuamente dentro de la cámara de vacío a través del colector, la temperatura de la superficie del colector aumenta, manteniendo las condiciones ideales en la cámara de vacío. Las partículas metálicas a nano escala se nuclean y crecen. Mediante la vaporización y la condensación, las nanopartículas se recogen en la superficie del colector [32].

3. Síntesis biológica.

Este método se refiere a la biorremediación, en la que la degradación y la metabolización de las sustancias químicas se realizan mediante procesos biológicos y se restablece la calidad del medio ambiente. La síntesis biológica se divide en dos tipos: mediada por plantas y mediada por microbios.

Método por plantas

En este método, las nanopartículas se sintetizan utilizando plantas o partes de plantas para la bio reducción de iones metálicos a la forma elemental [33].

Bacterias. Las bacterias que se pueden utilizar en la síntesis verde de nanomateriales pertenecen a un gran grupo de organismos unicelulares con paredes celulares, pero carecen de orgánulos y de un núcleo organizado. Aunque algunas cepas de bacterias pueden ser muy peligrosas, muchas cepas ocurren

naturalmente en el cuerpo y representan poco o ningún daño para alguien que trabaja con ellas. Además, muchas de estas cepas, como *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Bacillus subtilis*, son muy fáciles de cultivar y su código genético se puede alterar fácilmente. Debido a estas características, la síntesis de nanopartículas en bacterias es un proceso factible [34], [35].

Hongos. Las nanopartículas mono dispersas con morfologías complejas pueden desarrollarse de forma muy eficiente por la vía biosintética a partir de metales y óxidos metálicos mediada por hongos. Son agentes biológicos eficaces en la producción de nanopartículas metálicas, ya que en ellos se encuentra una gran variedad de enzimas intracelulares y, como resultado, en contraste con las bacterias, los hongos pueden sintetizar mayores cantidades de nanopartículas. En la superficie de las células de los hongos hay una serie de proteínas, enzimas y componentes reductores superficies celulares de los hongos, lo que les da una gran ventaja sobre otros organismos. Se cree que la reducción enzimática por la enzima reductasa dentro de la célula fúngica o en la pared celular es el mecanismo probable para la síntesis de nanopartículas [36], [37].

Plantas. Las partes de las plantas, como las hojas, los tallos, las raíces, los frutos y las semillas, se han utilizado para la síntesis del NP's ZnO debido a los exclusivos productos fitoquímicos que producen. Se tarda muy poco tiempo, no implica el uso de equipos y precursores costosos y proporciona un producto muy puro y enriquecido sin impureza. Las plantas son la fuente más preferida de síntesis de NP's porque permiten la producción a gran escala y la producción de NP's estables, de forma y tamaño variados. La biorreducción implica la reducción de los metales y de los óxidos de metales a NP's de valor cero con la ayuda de fitoquímicos como los polisacáridos, los compuestos polifenólicos, las vitaminas, los aminoácidos, los alcaloides y los terpenoides segregados por la planta [38].

1.2 Generalidades de Rubus ulmifolius

Rubus ulmifolius schott (Roseaceae) es un arbusto perenne conocido comúnmente como mora silvestre o mora de hoja de olmo que está ampliamente distribuido en Asia, norte de África y Europa, predominantemente en la Península Ibérica, tanto en suelos silvestres como cultivados [39].

La época de floración se produce entre mayo y junio, seguida de la maduración y desarrollo del fruto, que se caracteriza por ser un conjunto de varias drupeolas carnosas, que durante la maduración cambian su color de verde a negro. Es un arbusto de 1-6 m, caducifolio, espinoso, con tallos arqueados e intrincados. Turiones o tallos jóvenes de color violeta oscuro, angulosos, con aguijones. Hojas alternas, compuestas, divididas en 3 o 5 foliolos ovados u obovados, irregularmente dentados o aserrados, y ápices más o menos estrechos y alargados, con haz lampiño, a veces algo peloso, y con frecuencia moteado de rojo; envés tomentoso-blanquecino con

pelos estrellados. Flores vistosas, solitarias o en cimas racemiformes. Cáliz con 5 sépalos blanco-tomentosos. Corola con 5 pétalos 9-14 x 7-12 mm, ovados, color más o menos rosado, a veces blancos. Fruto en poli drupa, formado por muchas drupas pequeñas, arracimadas y soldadas entre sí, de color rojo que se oscurece al madurar. Su morfología es variable, por lo que se han descrito numerosas micro especies difíciles de identificar. Dicha variabilidad es debida a las condiciones ambientales y a su capacidad de generar híbridos poco estables [40], [41].

Es una especie medicinal utilizada como astringente, antiséptica y vulneraria para tratar diarreas, hemorroides, inflamaciones bucales y de garganta, fortalecer encías y tratar afecciones cutáneas, principalmente. Muy extendido es su empleo como hipotensor, aunque también se emplea para otros usos [42].

Los frutos de zarzamora (*Rubus sp.*) han sido recolectados y consumidos durante mucho tiempo, no solo por su agradable aroma y sabor, sino también por su alto valor nutricional y propiedades bioactivas asociadas con la amplia variedad de fitoquímicos (vitaminas, minerales, polifenoles, etc.) que poseen. Por lo tanto, entre otros beneficios para la salud, se ha informado que las moras tienen actividades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antidiabéticas, antidiarreicas y antivirales (Figura 4) [43].



Figura 4. Características de Rubus ulmifolius [43].

1.3 Antecedentes

1.3.1 Síntesis verde de NP's ZnO

En la década de los 2000's, Anastas y Warner publicaron en su libro química verde, los 12 principios de la química verde. La síntesis verde utiliza hojas, tallos, extractos, o frutas de una planta, bacterias, hongos algas y productos orgánicos para la síntesis de nanopartículas. No se agrega ningún agente estabilizador por separado. En el caso de la planta, los metabolitos actúan como agente reductor y estabilizador [44].

En el método biológico, los extractos de plantas se utilizan para la síntesis controlada y precisa de varias nanopartículas metálicas. La alta superficie y una gran fricción de átomos superficiales son responsables del comportamiento atómico de las nanopartículas. La síntesis verde, requiere más tiempo que la síntesis por métodos convencionales, sin embargo, no contribuye a la utilización de productos químicos tóxicos para el medio ambiente [45].

Los estudios recientes muestran una efectividad de la síntesis verde para la producción de nanopartículas de metal y óxidos metálicos, solamente en ambientes de laboratorio, no ha alcanzado una mayor escala. Se conoce que las plantas contienen altas concentraciones de compuestos activos como metilxantinas, ácidos fenólicos, flavonoides y saponinas, compuestos conocidos como antioxidantes. La ruta del mecanismo de complejación del metal requiere un tratamiento térmico para obtener las nanopartículas (Figura 5) [46].



Figura 5. Ejemplo del mecanismo de síntesis de nanopartículas de óxido de zinc por síntesis verde [47].

Las plantas tienen biomoléculas (como carbohidratos, proteínas y coenzimas, etc.) con un potencial para reducir la sal metálica en nanopartículas. Las nanopartículas metálicas de oro y plata se investigaron por primera vez en la síntesis asistida por extractos de plantas [incluyendo *aloe vera* (*Aloe barbadensis Miller*), *Avena (Avena sativa), alfalfa (Medicago sativa), Tulsi (Osimum sanctum), Limón (Citrus limon*

), Neem (Azadirachta indica), Cilantro (Coriandrum sativum), Mostaza (Brassica juncea) y hierba de limón (Cymbopogon flexuosus)] se han utilizado para sintetizar nanopartículas de plata y nanopartículas de oro [35].

Con la aplicación de la síntesis verde, se puede obtener una forma esférica y un tamaño alrededor de 100 a 150 nm, sintetizando óxidos metallicos, incluyendo al óxido de titanio (TiO^2).

Los siguientes estudios reportan la síntesis verde de nanopartículas de óxidos metálicos utilizando extractos.

- 1. Cascara de Annona squiamosa [48].
- 2. Fibra de Cocos nucifera [49].
- 3. Extracto de hojas de Nyctanthes arbor-tristis [50].
- 4. Guayaba psidium [51].
- 5. Eclipta prostrata [52].
- 6. Catharanthus roseus [53].

Para las NP's de ZnO. Algunos autores reportan nanopartículas de óxido de zinc con una forma esféricas, realizando una síntesis verde utilizando los extractos: Latex de *Calotropis procera* [54], *Alore vera* [55], *Kengi* [56], *Sedum alfredii* [57].

Phokha et al. 2008 [58]. Reporta la utilización de la síntesis verde para nanopartículas de óxido de indio biogénicas (In_2O_3) con un tamaño entre 5-50 nm con extracto de hoja de Aloe vera (*Aloe barbadensis*).

En la síntesis biológica, las frutas, hojas y extractos de plantas, son las más utilizadas y reportadas para sintetizar nanopartículas de óxidos metálicos (Ver tabla en anexos).

1.3.2 Nanopartículas de óxido de zinc aplicadas en biomedicina

Actividad antimicrobiana

Las nanopartículas de óxido de zinc exhiben una impresionante actividad antibacteriana, en una amplia variedad de bacterias, ya sean, gram positivas o gram negativas. Las NP's ZnO presentan viarios mecanismos bactericidas, desencadenados al vincularse con la superficie bacteriana y el núcleo bacteriano. El mecanismo se determina en función del pH, temperatura, el área superficial de las NP's ZnO, la concentración y la interacción del sustrato en la superficie del compuesto [59].

Los mecanismos propuestos son:

(i) La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [60].

- (ii) La pérdida de integridad celular tras el contacto entre las NP de ZnO y la pared celular [61].
- (iii) La liberación de iones Zn^{+2} [62].
- (iv) La internalización de NP de ZnO [63].

Abebe et al. 2020 [64] reporta que la actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxidos metálicos, dependiente de varios parámetros, como el tamaño de partícula, el área superficial, la cristalinidad, el agente protector/estabilizador, la morfología, la concentración/dosis, el pH de la solución y la naturaleza de los microorganismos. Cuanto más pequeñas sean las nanopartículas (NP's) mas fácilmente penetran a través de los poros nanométricos de las bacterias [65]. El tamaño nanométrico de NP's ZnO, interactúa con la superficie bacteriana y/o núcleo bacteriano, ingresando al interior de la célula, y posteriormente, desencadena mecanismos bactericidas. Las interacciones de los nanomateriales con las bacterias en su mayoría son toxicas, aprovechándose para aplicaciones antimicrobianas en la industria alimentaria [66].

Raghupathi et al. 2011[67] menciona el aumento de la actividad antibacteriana de las NP de ZnO consecuente, de la producción de ROS por parte de las NP's después de la exposición a la luz ultravioleta. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que se pueden crear ROS incluso sin exposición a la luz.

Hirota et al. 2010 [68] desarrollaron cerámica de ZnO con actividad antibacteriana sostenible. Los análisis de resonancia de espín de electrones y fotoluminiscencia química mostraron que la actividad antibacteriana de ZnO podría atribuirse a la producción de anión superóxido en la superficie de ZnO, incluso en condiciones de oscuridad. La pared celular bacteriana tiene cargas negativas, como radicales hidroxilo y superóxidos, por lo que no pueden penetrar la membrana, pero el contacto directo puede causar daños. Por lo tanto, estas especies solo se pueden encontrar fuera de la bacteria. Por el contrario, el peróxido de hidrógeno puede atravesar la pared celular y puede internalizarse en la célula bacteriana, lo que desencadena la muerte celular.

D'Água et al 2018 [69] demostraron que las bacterias más sensibles al peróxido de hidrógeno también lo eran a las NP de ZnO. Se obtuvieron resultados similares con bacterias menos sensibles. De esta forma, los autores sugirieron que el peróxido de hidrógeno podría ser el mecanismo responsable de la actividad antibacteriana de las NP de ZnO.

Kadiyala et al. 2018 [70] estudiaron recientemente el mecanismo antibacteriano de las NP de ZnO frente a *S. aureus* resistente a la meticilina. Contrariamente a los estudios que demuestran que la actividad antimicrobiana depende de los iones ROS o Zn, en este estudio, la toxicidad de ROS no fue el principal mediador de la actividad antibacteriana. Los parámetros más relevantes para explicar la actividad

de las NP de ZnO fueron los mecanismos que involucran la pirimidina, el metabolismo de los azúcares y la biosíntesis de aminoácidos.

Pasquet et al. 2015 [71], proponen otro mecanismo que puede matar bacterias, esto es por la liberación de iones Zn^{2+} . Cuando las NP de ZnO están en solución, la disolución parcial da como resultado la liberación de iones Zn^{2+} . que tienen actividad antimicrobiana. Por lo tanto, la disolución de las NP de ZnO contribuye a su actividad antimicrobiana al disminuir el metabolismo de los aminoácidos y perturbar el sistema enzimático. En condiciones ácidas, las NP de ZnO se disuelven y producen iones Zn^{2+} en base en la disolución.

Cho et al. 2011 [72]. Realizaron estudios en ratas y demostraron que las NP's de ZnO permanecen intactas a pH neutro o biológico. Sin embargo, se disuelven rápidamente en condiciones ácidas (pH 4,5), por ejemplo, en los lisosomas de un microorganismo, provocando la muerte debido a que se unen a las biomoléculas dentro de la célula bacteriana e inhiben su crecimiento.

Actividad anticancerígena

Las NP's de óxido de zinc están mostrando una aplicación y eficacia prometedoras en la terapia del cáncer debido a su naturaleza altamente selectiva hacia las células cancerosas.

Reporta Zhou et al. 2006 [73], reportaron alta biocompatibilidad. Su forma más voluminosa es reconocida como segura por la (GRAS) por la FDA. Esto se atribute a que el zinc es un cofactor importante en varios mecanismos celulares y juega un papel importan en el mantenimiento de la homeostasis celular, por lo tanto, El ZnO muestra biocompatibilidad. Además, el ZnO administrado puede biodegradarse fácilmente o puede participar en el ciclo nutricional activo del cuerpo.

Hanley et al. 2008 [74]. Menciona la selectividad de parte de las nanopartículas de ZnO por su naturaleza inherente de mostrar citotoxicidad selectiva contra células cancerosas en condiciones *in vitro* en comparación con otras nanopartículas. Pueden modificarse aún más en la superficie para mostrar una mayor citotoxicidad selectiva.

La síntesis verde tiene un papel importante en las nanopartículas de óxido de zinc Vasile et al. 2015 [75], comenta que es relativamente fácil, con una amplia variedad de métodos. Debido a estos diferentes métodos de síntesis, su tamaño y distribución de tamaño pueden controlarse fácilmente. Ha demostrado que el tamaño de las nanopartículas es directamente proporcional a la toxicidad que muestran: Además, la manipulación del tamaño es importante para producir un mayor efecto, para aumentar la concentración intra tumoral de nanopartículas [76]. Mientras que el ZnO extracelular muestra biocompatibilidad, los niveles elevados de ZnO intracelular administrado muestran una mayor citotoxicidad a través del deseguilibrio de la actividad proteica mediada por zinc y el estrés oxidativo. Las nanopartículas de ZnO tienen la capacidad única de inducir estrés oxidativo en las células cancerosas, que se ha descubierto que es uno de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas de ZnO hacia las células cancerosas. Esta propiedad se debe a la naturaleza semiconductora del ZnO. ZnO induce la generación de ROS, lo que conduce al estrés oxidativo y, finalmente, a la muerte celular cuando se excede la capacidad antioxidante de la célula.

La solubilidad de las NP de ZnO es el factor fundamental que provoca la citotoxicidad in vitro. El estudio de A rama narsimha et al. 2018 [77]. menciona que el Zn^{2+} a baja concentración es fundamental para mantener los procesos celulares y el metabolismo; sin embargo, Zn^{2+} en una alta concentración puede causar toxicidad. Los NP de ZnO pueden inducir la muerte celular a través de la apoptosis a través de la vía mitocondrial intrínseca. Se ha demostrado que el tratamiento con NP de ZnO in vitro reduce el potencial de la membrana mitocondrial y, por el contrario, aumenta la relación Bax/Bcl2. Además, se demostró que la liberación excesiva de Zn^{2+} es secuestrada por la mitocondria. La presencia de cationes ayuda

a regular la síntesis de ATP y la producción de ROS en la mitocondria. Por el contrario, la entrada rápida de Zn^{2+} da como resultado una disminución rápida del potencial de membrana mitocondrial que posteriormente activa la apoptosis dependiente de caspasa y la liberación de LDH.

Vodyanoy et al. 2016 [78]. Compara el Zn y el Cu concluyendo que: "las nanopartículas de zinc examinadas en su trabajo mostraron ser letales para las células cancerosas en concentraciones de unos pocos órdenes de magnitud más pequeñas que las encontradas en la literatura, mientras que las células no cancerosas no se vieron afectadas".

Los tratamientos actuales basados en agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales bioactivos, etc., no suelen producir una respuesta completa contra el cáncer. Además, Los tratamientos terapéuticos no distinguen entre las células cancerosas y las normales, lo que provoca toxicidad sistemática y efectos adversos como la supresión de la función de la medula ósea, neurotoxicidad y cardiomiopatía [79].

Singh et al. 2020 [80]. Realiza una búsqueda de agentes quimioterapéuticos alternos con un alto grado de selectividad hacia las células cancerosas. En la tabla 2 se discute sobre la actividad anticancerígena de las nanopartículas de óxido de zinc contra varios tipos de cáncer.

No.	Morfología	Linea celular	Observaciones	Año de publicación	Referencia
1	10 nm	Carcinoma cervical humano (HeLa)	Zno Mostro una reducción en la viabilidad celular de 5-50%	2016	[73]
2	10-20nm	MSC , Beas 28, HeLa, KLN 205	El dopaje de Fe en las ZnONPs disminuye la liberación de iones Zn2+ y muestra menos toxicidad en las células cancerosas en comparación con las ZnONPs puras. Sin embargo, las ZnONPs dopadas con Fe mostraron una mayor citotoxicidad en las células cancerosas en comparación con las células normales. Las NPs de ZnO dopadas con Fe al 2% mostraron una importante actividad antitumoral en un modelo animal preclínico singénico tras su administración peritumoral.	2017	[74]
3	30 nm	HeLa	Las ZnONPs recubiertas de quitosano muestran una mayor citotoxicidad en las células HeLa tratadas dentro del rango de concentración de 0,1-75 µg/ml durante 24 h en comparación con las ZnONPs no recubiertas	2018	[75]

Tabla 2. Actividad anticancerígena de nanopartículas de óxido de zinc [80].

4	1-4 nm	HFF-2, KB44,	Los puntos cuánticos de ZnO muestran un efecto citotóxico con valores IC50 (ug/ml) de 105, 30, 41, 40 y 35 para las células de fibroblastos, KB44, MCF7, HT29 y HeLa tras 48 h de tratamiento.	2018	[76]
5	20-50 nm	MCF7, HT-29, HeLa, SiHa	Las ZnONP sintetizadas en verde con extracto acuoso de Gracilaria edulis muestran un efecto citotóxico en las células SiHa de forma dependiente de la dosis con un valor IC50 de 35 µg/mL cuando se tratan durante 24 horas a través de la muerte celular apoptótica y necrótica dependiente de la mitocondria.	2019	[77]
6	20 - 50 nm	HeLa	Las ZnONP sintetizadas en verde utilizando extracto de hoja de Annona squamosa (AS) imparten citotoxicidad dentro del rango de concentración de 6,25-200 µg/mL en células HeLa cuando se tratan durante 24 h mediante la producción de ROS.	2019	[78]
7	68.2 nm	HeLa	Los nanocompuestos de WO3/ZnO muestran una mayor citotoxicidad dependiente de la dosis (0,002- 200 µg/mL) y del tiempo (5-60 min) en las células HeLa en comparación con el WO3 y las ZnONP bajo la exposición a la luz visible a través de la producción de ROS.	2020	[79]
8	28 -63 nm	MCF-7	Las ZnONP conjugadas con L- asparaginasa fúngica muestran una citotoxicidad dependiente de la dosis en las células MCF- 7 cuando se tratan durante 24 h.	2015	[80]

9	18.67 ± 2.2 nm	MDA-MB- 231	Las ZnONP muestran un efecto citotóxico dependiente de la dosis dentro del rango de concentración de 12,5-200 µg/mL durante 24 h	2016	[81]
10	250 - 500 nm	PC-3, MDA- MB- 231	El ZnO presenta un efecto citotóxico dependiente de la dosis dentro del rango de concentración de 2,4-300 µg/mL cuando se trata durante 24 h.	2016	[82]

1.4 Justificación

Las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas por síntesis verde tienen gran potencial para aplicaciones biomédicas, por ello, se plantea el objetivo de evaluar la susceptibilidad antimicrobiana y viabilidad celular para observar, si, el porcentaje de extracto y la concentración de nanopartículas de óxido de zinc tienen un efecto significativo. Por lo que, se busca determinar si las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con el extracto *Rubus ulmifolius*, tienen aplicabilidad para su uso alternativo a las terapias actuales y estimar las dosis para su uso como antimicrobiano y anticancerígeno.

1.5 Hipótesis

Las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con síntesis verde utilizando *Rubus ulmifolius* tendrán toxicidad sobre las células bacterianas y células cancerígenas.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Sintetizar, caracterizar y evaluar la toxicidad de nanopartículas de óxido de zinc en cepa de *Escherichia coli* y células de cerebro, sintetizadas mediante síntesis verde utilizando *"Rubus Ulmifolius"*

1.6.2 Objetivos Específicos

1) Preparar extracto de *Rubus ulmifolius* como estabilizante en la síntesis verde.

2) Sintetizar nanopartículas de óxido de zinc.

3) Caracterizar nanopartículas de óxido de zinc mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

4) Caracterizar nanopartículas de óxido de zinc mediante Espectroscopía de Ultra Violeta Visible

5) Evaluar actividad de nanopartículas de óxido de zinc en ensayos de susceptibilidad antimicrobiana

6) Evaluar citotoxicidad de nanopartículas de óxido de zinc en cultivo primario sano y línea celular de cáncer de cerebro C-6.

2. METODOLOGÍA

2.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc

La preparación del extracto consiste en la compra de una caja de 250g de zarzamora, seleccionando la fruta más sana y de mejor parecer. La fruta se colocó en un deshidratador durante 14 horas (más tiempo si es necesario), hasta que la fruta tome una textura lo más seca posible. Una vez teniendo la fruta deshidratada se licuo el extracto deshidratado, hasta obtener un polvo fino. Se peso 0.05g, 0.125g, 0.5g para preparación de 0.1%, 0.25%, 0.5% de extracto en nanopartículas de óxido de zinc, se pasó el polvo a un vaso de precipitado y se adicionó 50 mL de H₂O destilada. Continuando, se colocó los vasos en agitación durante 2 horas. Una vez trascurrido el tiempo, se situó en baño maría 1 hora a 60°C. Después, el contenido se filtró con una bomba de vacío y pasó a tubos falcón de 50 mL almacenándose hasta su posterior uso. Una vez teniendo la muestra lista para la síntesis, se pasó a colocar en vasos de precipitado de 100mL. Se pesó 2g de nitrato de zinc $[Zn(NO_3)_2]$ y se adicionó a las muestras, colocándose en agitación una hora en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se colocó dentro del baño maría durante 14 horas a 60°C (en algunos casos puede variar el tiempo de espera hasta 16 horas, eso se toma bajo consideración propia, ya que, la muestra debe tomar una consistencia similar al caramelo). Se retiró las muestras del baño maría y colocó en porcelana. Se paso al honor para calcinar a 400°C por 1 hora. (la temperatura fue ascendiendo gradualmente 50-50). Al finalizar el tiempo, Se apago el honor y se dejó descender la temperatura de forma ambiental, hasta que llegó a 25°C. Se tomó el polvo y se molió para colocarlo en un tubo falcón y añadirle nitrógeno (como condición inerte) para almacenarlo en oscuridad hasta su uso. [Ver anexos mecanismo de reacción de síntesis].



Figura 6. Descripción gráfica de la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc utilizando *Rubus ulmifolius.*

2.2 Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc

Las nanopartículas de óxido de zinc se caracterizaron mediante Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para identificar los grupos funcionales característicos de las nanopartículas de óxido de zinc.

En la espectroscopía de ultravioleta visible (UV-Vis) se determinó la banda característica de absorción del oxido de zinc y la banda energética prohibida.

2.3 Susceptibilidad antimicrobiana

Para la preparación del medio de cultivo Luria-Bertani (LB)-Agar, se pesó extracto de levadura (5g/L), triptona (10g/L), cloruro de sodio (10g/L), agar (15g/L). Se mezclan los reactivos en un vaso de precipitado de 250 mL. Inmediatamente, se mezclaron hasta estar completamente homogéneo, una vez mesclado, se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121°C. se esperó a que llegara a 50°C. Se tomó el medio con cuidado (debido a que se encuentra caliente), y se vacío 30 mL de medio LB-Agar, todo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Continuando, se esperó 15-30 minutos hasta que el agar solidifique, después, se pasó a almacenar a 4°C. Para la inoculación de las cajas Petri, se tomó las cajas previamente preparadas. Con una pipeta automática se tomó 200 μ L de *E. coli* y se colocó sobre el agar, inmediatamente, se tomó un asa bacteriología y se pasó por el mechero 30 segundos, luego se dejó enfriar 30 segundos para comenzar a esparcir de forma horizontal, una vez, terminado, la caja se rota 90° y de la misma forma, se estrío de

forma horizontal, se realizó 3 veces para que la caja quede bien estriada sin que haya lugares donde no creciera *E. coli.* Se finalizo el estriado hasta que el asa dejo de deslizarse con facilidad sobre el agar. Para la evaluación de la actividad de las nanopartículas, se realizó una prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Justo después de tener todo previamente inoculado, la caja Petri se dividió en 5 secciones y se marcó de forma clara y ordenada, para identificar las secciones donde se colocaron las NP's. Se tomó una puntilla de 10 μ L, y se realizó unos posos dentro del agar, (el exceso de agar se retiró con unas pinzas estériles). Continuando, con una pipeta automática, se comenzó a colocar las soluciones preparadas de nanopartículas a utilizar. Dentro de cada pozo se añadió 50 μ L de antibiótico (control negativo), se dejó un pozo sin inocula (control positivo), 50 μ L de nanopartículas al 0.1% (0.1mg/mL,0.5mg/mL,1mg/mL), así sucesivamente. Después de 18 horas, se sacaron las cajas Petri de la incubadora y se midieron los halos de inhibición identificados en cada sección de la caja Petri.

Método de dilución en caldo.

Para el método de dilución en caldo se utilizó la cepa de *E.coli*. Primeramente, se preparó 500 ml del medio Luria-Bertani (LB) (Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, Cloruro de sodio 10 g/L). Se prepararon los tubos de ensayo y se inocularon de la siguiente forma:

B=bacterias; NP's 1%

Tubo 1A,2A,3A= 10mL medio+1ml B+ 25 μ L NP's Tubo 1B,2B,3B= 10mL medio+1ml B+ 50 μ L NP's TUBO 1C,2C,3C = 10mL medio+1ml B+ 100 μ L NP's TUBO 1D,2D,3D = 10mL medio+1ml B+ 200 μ L NP's TUBO 1E,2E,3E = 10mL medio+1ml B+ 400 μ L NP's

B=bacterias; NP's 0.5%

Tubo 1F,2F,3F= 10mL medio+1ml B+ 25 μ L NP's Tubo 1G,2G,3G= 10mL medio+1ml B+ 50 μ L NP's TUBO 1H,2H,3H = 10mL medio+1ml B+ 100 μ L NP's TUBO 1i,2i,3i = 10mL medio+1ml B+ 200 μ L NP's TUBO 1J,2J,3J = 10mL medio+1ml B+ 400 μ L NP's

B=bacterias; NP's 0.1%

Tubo 1K,2K,3K= 10mL medio+1ml B+ 25 μ L NP's Tubo 1L,2L,3L= 10mL medio+1ml B+ 50 μ L NP's TUBO 1M,2M,3M = 10mL medio+1ml B+ 100 μ L NP's TUBO 1N,2N,3N = 10mL medio+1ml B+ 200 μ L NP's TUBO 1O,2O,3O = 10mL medio+1ml B+ 400 μ L NP's

Después de preparar todos los tubos de ensayo con su respectiva dilución se pasaron a incubar durante 24h en una incubadora con agitación a 37°C a 125rpm.

Transcurrido el tiempo, se midió absorbancia en un espectrofotómetro de ultra violeta-visible (UV-VIS) a 600nm.



Figura 7. Descripción gráfica de las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas.

2.4 Evaluación en cultivos celulares

Cultivos primarios.

Para los cultivos celulares, se adquirió un ratón bebe y pequeño (sexo indistinto) de una tienda de mascotas, y posteriormente se realizó la disección. Se realizó un corte plano-sagital sobre el tronco del ratón para dejar al descubierto los órganos del animal. Continuando, se prepararon tubos falcón con 3 ml de TRIPSINA-EDTA donde se colocaron los órganos de cerebro, hígado y corazón. Esto, se colocó en una incubadora con agitación a 37°C a 200rpm durante 30-60 minutos, permitiendo que la tripsina se active. Terminando el tiempo, se adiciono medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino y con un antimicótico y antibiótico al 1%, agitando durante 2 minutos en vortex. Se filtro por medio de una gasa a un tubo nuevo y estéril para centrifugar a 1000rpm durante 10 minutos. Se retiro el sobrenadante, tomó el pellet y re suspendió en 5ml de medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino y con un antimicótico y antibiótico al 1%. Al finalizar, se colocó el medio con células en una caja Petri para cultivo celulares, para almacenarse dentro de una incubadora en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 80% de humedad para su posterior uso.

Línea celular glioma C-6

La línea celular de glioma C-6 se descongelo y se mantuvo en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino y con un antimicótico-antibiótico al 1%.

Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Para determinar el efecto de las nanopartículas de óxido de zinc en la viabilidad celular, se realizó un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2,5difeniltetrazol), esto es que el reactivo MTT es reducido por la actividad metabólica de las células a formazan, un compuesto insoluble que forma cristales.

Para la preparación del ensayo MTT. Primero se realiza un sembrado en una placa de 96 pozos, colocando $\frac{1x10^6 celulas}{mL}$ en cada pozo por triplicado. Después se realizó la adición de las nanopartículas, para esto, se prepararon 3 stocks que contenía 5mg de nanopartículas de óxido de zinc al 0.1%,0.25%, 0.5% de extracto, diluidos en 1 ml de medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiotico-antimicotico al 1%. A Partir del stock se comenzó la adición de NP's de ZnO por diluciones seriadas 2:1. Al finalizar se incubaron durante 48 horas en 37°C, 5% *CO*₂ y 80% de humedad.

Después de 48 horas, se realizó el ensayo MTT. Añadiendo 20ul de MTT $(5\frac{mg}{mL\ PBS})$ en cada pozo (Para la adición de MTT fue necesario utilizar la campana de flujo laminar sin luz ya que el MTT es sensible a la luz y la menor exposición posible), Se envolvió la caja Petri con aluminio e incubo por 4 horas. Una vez terminado el tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadió 150ul de dimetilsulfóxido (DMSO) en cada pozo. Para finalizar, se situaron en agitación durante 15 min, posteriormente se leyó absorbancia a 590nm.

Cada ensayo se realizó por triplicado por tres experimentos independientes.



Figura 8. Descripción gráfica de las pruebas de viabilidad celular.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de este trabajo se sintetizaron nanopartículas de óxido de zinc en base a un extracto natural, con el propósito de observar, si por medio de la síntesis verde, el extracto favorece la actividad de las nanopartículas como un inhibidor antibacteriano, y funciona como agente anticancerígeno.

Han reportado el uso de este método de síntesis verde como un método amistoso con el medio ambiente, por el uso de extractos naturales biodegradables y el cero uso de agentes químicos tóxicos. Así mismo, se menciona que el uso de un agente estabilizador natural, con un alto nivel de polifenoles y moléculas relacionadas, permiten un mecanismo de formación de nanopartículas más limpias y una red cristalina uniforme. Considerando esto, sería posible utilizar este método para favorecer el potencial de las nanopartículas para una actividad mayor en su uso en diferentes campos de investigación.

3.1 Caracterización

Espectroscopia Infrarroja por Transformada Rápida de Fourier (FTIR)

Con la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier se logra identificar grupos funcionales y su tipo de vibración característica. Con el fin de identificar probables grupos funcionales en biomoleculas contenidas en presencia de *Rubus ulmifolius* que se deba a la reducción del ion de zinc a NP's ZnO, se realizo un analisis infrarrojo por transformada de fourier. En la figura 9 la aparición de una banda en el espectro en el rango de 845 cm⁻¹ indica la presencia de ZnO, y los resultados son similares a la literatura.

Dado que, 500 a 1500 cm^{-1} se encuentra la region de la huella digital, dentro de esa region se puede encontrar enlaces sencillos como C-O entre otros.

En la region de 1500 a 2000 cm^{-1} se puede encontrar enlaces dobles.

En la region de 2000 a 3000 cm^{-1} se encuentran enlaces triples.

Para el óxido de zinc, un pico caracteristico comun es entre 400 y 800 $\rm cm^{-1}$ sin embargo, algunos estudios lo reportan que alcanza una absorbancia hasta 1,000 $\rm cm^{-1}$.

Degega et al. 2021 [81], reporta la síntesis verde de nanoparticulas de óxido de zinc. Mostrando en la figura 10 la aparición de una banda en el espectro en los rangos de 626 cm⁻¹a 1219 cm⁻¹indicando la formación de ZnO NPs.



Figura 9. Espectro FTIR de NP's ZnO Sintetizadas con Rubus ulmifolius.


Figura 10. Espectros FTIR de NP's de ZnO extraídos de cebolla, repollo, zanahoria y tomate mediante métodos de síntesis verde [81].

Espectroscopía de ultra violeta visible (UV-VIS)

El Ultravioleta visible se utilizó para confirmar que se obtuvo nanopartículas óxido de zinc, conociendo sus propiedades ópticas, en la figura 11 se muestran los espectros de absorbancia con la longitud de onda. El pico de absorción se muestra en 373nm donde comparado con la literatura el óxido de zinc muestra un pico de absorbancia entre 350 y 400 nm. Las 3 muestras preparadas a diferentes concentraciones de extracto, muestran la misma absorción.



Figura 11. Espectro UV-VIS de NP's ZnO Sintetizadas con Rubus ulmifolius.

Pudukudy et al. 2015 [82], menciona en sus resultados: "El espectro de absorbencia UV visible de las nanopartículas de ZnO dispersas en agua se muestra en El pico de absorción centrado en *378 nm es el pico característico del ZnO wurtzita hexagonal."



Figura 12. Espectro de absorción UV-VIS de las nanopartículas de ZnO [82].

Teniendo los resultados de absorbancia, se calculó la banda energética prohibida (band gap) para determinar la energía necesaria que requiere un electrón para pasar de la banda de valencia a la banda de conducción. Para el cálculo se utilizó el modelo de TAUC utilizando el espectro obtenido anteriormente.

La fórmula es:

$$\propto (v)hv = k (hv - E_a)^n$$

Donde \propto (*v*) es el coeficiente de absorción (Lambert beer).

hv: es la energía de incidencia del fotón.

K: es una constante.

 E_q : es la energía de la brecha energética prohibida.

n: 2 es la transición directa permitida.

El valor característico del material es de 3.7 eV.

En las figuras 13,14,15 se muestran las bandas prohibidas para cada muestra de nanopartículas sintetizadas con *Rubus ulmifolius* a distintas concentraciones de extracto. Mostrando un band gap de 2.6 eV para 0.1%, 2.9 eV para 0.25% y 3.0 eV para 0.5% siendo inferiores al band gap del ZnO a 3.37eV.

Pudukudy et al. 2015 [82]. Menciona que: "El valor calculado de la brecha de banda óptica es de 3,28 eV y es inferior al del ZnO a granel (3,37 eV). La disminución de la brecha óptica puede deberse a los efectos de confinamiento cuántico y a la presencia de defectos intrínsecos en el cristal intrínsecos del cristal".



Figura 13. Espectro de absorción UV-VIS de las nanopartículas de ZnO al 0.1% de extracto.



Figura 14. Espectro de absorción UV-VIS de las nanopartículas de ZnO al 0.1% de extracto.





3.2 Actividad antimicrobiana

Para los resultados de la actividad antimicrobiana, se realizaron varios antibiogramas, probando la reproducibilidad de la actividad antimicrobiana que ejerce las nanopartículas de óxido de zinc. En la figura 16 se observan los halos de inhibición probando las nanopartículas de óxido de zinc, teniendo de 19.5 mm el máximo y 15 mm el mínimo.

La Normas CLSI-NCCLS, 2005. indica, cuando un antimicrobiano es resistente o sensible. Para que un compuesto sea reconocido, debe mostrar un halo de inhibición mayor a 15 mm si no, se considera que el microorganismo es resistente al compuesto.

Por lo tanto, de acuerdo a la norma CLSI-NCCLS, 2005 y los resultados obtenidos, se determinó que las nanopartículas de óxido de zinc con un porcentaje de extracto del 1% y 0.5% muestran actividad antimicrobiana teniendo halos de inhibición mayores a 15mm de diámetro.



Figura 16. Halos de inhibición en *E. coli.* a) halos de inhibición con diámetro de 19.5mm en NP's ZnO a 1%, diámetro de 16mm con muestra de NP's ZnO a 0.5 %. b) halos de inhibición en No.20 con diámetro de 15mm a una concentración de 1mg/mL, con muestra de NP's ZnO a 2%. c) halo de inhibición de 19mm de diámetro a concentración de 100ug/mL con muestra de NP's de ZnO a 0.25% inhibición.

Para observar la actividad otro tipo de microorganismos, se utilizaron bacterias del suelo, donde también, se muestran las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de óxido de zinc. En la figura 17 se muestra los halos de inhibición que se obtuvieron con el antibiograma, mostrando un halo de inhibición de 19.5 mm a una concentración de 1mg/mL con muestra de extracto al 0.1%. dando así un indicio que a mayor concentración es igual a mayor actividad.



Figura 17. Antibiograma con bacterias del suelo. Halo de inhibición de 15mm de diámetro en concentración de 0.1 mg/ml. Halo de inhibición de 19.5mm de diámetro en concentración de 1mg/ml muestra de nanopartículas de óxido de zinc al 0.1% en cultivo de bacterias de suelo.

Las nanopartículas de óxido de zinc presentan una propiedad particular, la cual es, al incidir luz UV sobre las NP's ZnO, se activan y generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que son tóxicos para las células bacterianas. Para observar este comportamiento de las NP's, se planteó utilizar una lampara de luz UV que es incapaz de matar a *E. coli* para activar las NP's ZnO (cabe mencionar, que un método de esterilización, es la incidencia de luz UV sobre la superficie deseada). En la figura 18 se presenta el resultado del ensayo, se observó primeramente una irregularidad provocada por el calor generado de la exposición a la lampara UV, derritiendo el agar, eso obstruyo el resultado esperado. Se percibió en algunas áreas de la placa de agar el crecimiento de *E. coli*. Sin embargo, en las áreas donde se colocaron las nanopartículas de óxido de zinc no hay muestra de halos de inhibición. La longitud de onda de la lampara UV no tiene la suficiente energía para activar las nanopartículas.



Figura 18. Cultivo de *E. coli* con muestra de nanopartículas de óxido de zinc a distintas concentraciones expuesta a lampara de luz ultravioleta que no mata E. coli.

Se realizaron ensayos de antibiogramas líquidos. En la figura 19 se muestra una gráfica, exponiendo *E. coli* a distintas concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc con extracto de *Rubus ulmifolius* durante 24 horas. Se corrieron usando una dilución seriada 1:2. La grafica muestra que la mayor actividad inhibitoria fue dada por las NP's ZnO a 1% de extracto. Se atribuye que el extracto al poseer propiedades antimicrobianas, las nanopartículas adoptaran parte de las características del extracto, y a mayor concentración de nanopartículas, mayor actividad inhibitoria.



Figura 19. Exposición de *E. coli* a nanopartículas de óxido de zinc con extracto de zarzamora a distintos porcentajes de extracto durante 24 h.

Para contrastar en la figura 20 se muestran los resultados de una muestra de nanopartículas de óxido de zinc con extracto de mandarina, midiendo su absorbancia cada 2 horas para observar la actividad inhibitoria a 3 concentraciones de nanopartículas. La grafica señala una inhibición entre el intervalo de 0-20% de inhibición.

Aun así, a mayor concentración mayor actividad, esto destaca que el extracto de mandarina, no tiene cualidades antimicrobianas, por lo tanto, se esperaba, que, al utilizarla en estos ensayos, no tuviera la misma actividad que lo tendría *Rubus ulmifolius*. Podría atribuirse, a su forma cristalina, las nanopartículas de óxido de

zinc al tomar 3 formas distintas en fases cristalinas, la más reconocida con propiedades antimicrobianas se atribuye a la forma wurtzita.



Figura 20. Exposición de *E. coli* a nanopartículas de óxido de zinc con extracto de mandarina a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc.

Con respecto a la actividad de las nanopartículas en la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana se obtuvieron resultados destacables en algunos experimentos, donde se observan halos de inhibición bastante grandes, comparados con un antibiótico concentrado de amplio espectro. Sin embargo, las nanopartículas no manejan una fiabilidad en su uso, dado que, los ensayos se realizaron por triplicados, en algunos casos y se elaboraron por un largo tiempo, evaluando, a distintas concentraciones, en distintas cepas, los ensayos se expusieron a luz visible y ultravioleta visible, por las características que tienen las nanopartículas de óxido de zinc para su activación. Esto no mostro una replicación en su uso. Las muestras que se observan con halos de inhibición destacables, muestran una alta sensibilidad a las nanopartículas.

Arumugam et al. 2021 [83] - Reporta la síntesis verde de nanopartículas, concluyendo que las nanopartículas de óxido de zinc tuvieron un desempeño mejor como bactericidas contra *B.cereus, K. pneumoniae, S.aureus, E.coli.* con un diámetro de inhibición de 15mm a una concentración de 100 µL.

Vijayakumar et al. 2022 [84] – Reporta síntesis verde de nanopartículas de óxido de zinc utilizando *Anoectochilus elatu.* Sus resultados se muestran en la siguiente tabla.

S.	microorganismos	Zona de inhibición (mm)				
No.		100 µg/ml	75 μg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	
bacterias grampositivas						
1.	Bacillus subtilis	25	23	20	15	
2.	estafilococo aureus	19	17	15	13	
3.	enterococo faecalis	20	18	16	11	
4.	Micrococcus luteus	17	16	14	12	
Bacterias Gram-negativo						
5.	E. coli	24	20	17	14	
6.	Pseudomonas	19	17	14	10	
	aeruginosa					
7.	Serratiamercescens	21	16	17	13	
8.	Shigellaflexneri	22	19	16	12	

Tabla 3. Halos de inhibición expuestas a nanopartículas de óxido de zinc utilizando extracto de Anoectochilus elatu [84].

Chandrasekaran et al. 2022 [85]. Hicieron una comparación del método de síntesis químico y método de síntesis verde para observar cual método provee una mayor actividad antimicrobiana. El resultado arrojo que las nanopartículas sintetizadas por síntesis verde tuvieron una mayor eficacia que las sintetizadas químicamente. Ver resultados en tabla 4

Síntesis química								
Nombre								
del	100mg	50mg	25mg	std				
organismo								
S. aureus	6	3	-	12				
B. substilis	4	2	-	8				
S. typhi	3	2	-	9				
E. coli	6	4	3	9				
C. albicans	2	1	-	14				
Un negro	11	7	4	21				
Síntesis verde								
Nombre								
del	100mg	50mg	25mg	std				
organismo								
S. aureus	9	7	5	6				
B. substilis	8	6	4	3				
S. typhi	8	5	5	5				
E. coli	9	7	4	10				
C. albicans	7	6	4	12				
Un negro	10	8	3	14				

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de diferentes cepas de NP's SQ-ZnO y SV- ZnO [85].

Mallikarjunaswamy et al. 2022 [86]. Probaron nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas a partir de extracto de vaina de lluvia en cepas grampositiva (*S.aureus, B.subtilis, P.aeruginosa, K.pneumoniae*). los resultados obtenidos en sus estudios muestran un halo de inhibición sobre todas las cepas grampositivas en una mínima de 14mm y una máxima de 24 mm, comparado con el antibiótico con un halo de inhibición mínimo de 18mm y máximo de 27mm. Lo cual muestra una actividad prometedora para tratamiento de infecciones bacterianas.

Elumalai et al. 2015 [87] sintetizaron nanopartículas de óxido de zinc a partir del extracto de hoja de *Azadirachta indica* por síntesis verde. Evaluaron su actividad antimicrobiana sobre cepas grampositivas y gramnegativas. Los halos de inhibición sobre *C. tropicalis* fue de 14.1mm a concentración de 200 µL /mL, en el caso de *S.aureus* tuvo un halo de inhibición de 23mm a 200 µL /mL la cual fue la más prometedora comparada con el control de ampicilina B que mostro un halo de 32mm a 100 unidades /disco. Concluyendo que "las NP de ZnO sintetizadas en verde fueron más potentes que el ZnO desnudo y la hoja de *A. indica*".

Imade et al. 2022 [88] estudiaron la actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas mediante síntesis verde a partir del extracto de cascara de planta. Utilizaron cepas grampositivas y gramnegativas transmitidas por alimentos. El resultado sobre *S.aureus* mostro un halo de inhibición de 27mm mientras que en *S.enterica* tuvo un halo de inhibición de 10mm lo cual observaron que la eficiencia de la actividad antimicrobiana fue de la siguiente manera: *S. aureus* \Rightarrow *B. cereus* \Rightarrow *K. pneumoniae* \Rightarrow *S. entérica*. Por lo tanto, los desechos de plátano pueden ser útiles en la síntesis de nanopartículas.

3.3 Ensayo de viabilidad celular

Las nanopartículas de óxido de zinc se evaluaron en células cancerígenas, para contrastar su actividad se utilizó un cultivo primario de ratón y una línea celular C-6 perteneciente a glioma de ratón. En las figuras 21, 22 se muestran los resultados obtenidos.

La mayor muestra de actividad se ve en las concentraciones de 2500 mg/mL hasta 160 mg/mL en ambos casos. Sin embargo, estudios reportan que las NP's ZnO tienen una ligera interacción específica sobre las células cancerosas, que las células sanas, por lo que, en los resultados se puede observar que ligeramente el menor porcentaje de viabilidad celular se muestra en las células de cáncer de glioma. Vistas de forma general se observa una mayor inhibición en las de cerebro, pero comparadas por concentraciones, las viabilidades más bajas las tiene las de cáncer, Comparándose todas las concentraciones.

La estadística muestra mayor significancia entre las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con porcentaje de extracto de 0.25% y 0.1%.

Las nanopartículas no tienen la capacidad de tener repetibilidad sin embargo si contienen reproducibilidad, ya que, los experimentos se realizaron por triplicado, bajo las mismas condiciones.

Los diferentes estudios en diferentes líneas celulares también muestran una actividad de parte de las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con diferente extracto.

Celulas cerebro expuestas a ZnO 48 hrs



Figura 21. Ensayo MTT de cultivo primario de cerebro. El * muestra un p<0.05 de significancia.



Celulas glioma expuestas a ZnO 48 hrs

Figura 22. Ensayo MTT de línea celular glioma C-6. El * muestra un p<0.05 de significancia.

Diversos estudios han demostrado la actividad de las NP's ZnO en líneas celulares de cáncer, como propuestas alternas a las terapias actuales.

En el caso de los resultados, se puede observar una característica propia del ensayo MTT, la cual, permite observar el color amarillo de (bromuro de 3-(4, dimetiltiazol-2i-il)-2,5 difenil tetrazolio, un tetrazol) para pasar a reducirse a formazán purpura en las mitocondrias de las células vivas (Figura 23). Esto permite visualizar de forma directa el metabolismo de las células vivas y muertas para corroborar la actividad de las células vivas y muertas.



Figura 23. Reducción del bromuro de 3-(4, dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio a formazán

En las imágenes capturadas mediante el microscopio óptico invertido, se observa una similitud al comparar en control positivo de células tratadas con DMSO durante 48 horas de la figura 29, con las células tratadas con 2500 μ L /ml de NP's ZnO con 0.5% de extracto de *Rubus ulmifolius* de la figura 32 (ver anexos) tomando un color blanco /transparentoso. Asumiendo que el color se toma debido a la baja viabilidad. De la misma forma, en las figuras 30,31 (ver anexos), se toma el mismo comportamiento comparando el control negativo que son células en crecimiento durante 48 horas sin ningún tratamiento, y las células tratadas con NP's ZnO a una concentración de 10 μ L /ml a 0.5% de extracto, las cuales toman un color rojizo vistas desde el microscopio. En cada imagen, se observó un crecimiento celular muy similar, indicando que no hay una muerte celular, si no lo contrario habiendo una viabilidad similar al pozo que estaba con células sin tratamiento (control negativo).

A través del microscopio se observa las células y las nanopartículas en el medio, pero no hubo una respuesta metabólica, indicando una muerte celular.

Saber et al. 2021 [89] En este estudio se realizó citotoxicidad in vitro de nanopartículas de óxido de zinc en germen de ovario de ratón. Los resultados mostrados indican una estadística significativa en una concentración de 30 ug/ml teniendo un porcentaje de viabilidad del 20%. "En conclusión, los presentes resultados indicaron que las ZnO-NP's tienen efectos citotóxicos en las OGC de ratón de forma dependiente de la concentración y del tiempo, lo que justifica una

aplicación más cuidadosa de estas nanopartículas en la medicina y la industria. Además, incluso a bajas concentraciones, las nanopartículas de ZnO alteraron la meiosis y la capacidad de desarrollo de las OGC. Se necesitan más investigaciones para dilucidar los mecanismos que subyacen a los efectos tóxicos de las ZnO-NP en las OGC".



Figura 24. Tratamiento de células con varias concentraciones (10,20,30 mg/ml) NP's ZnO durante uno y siete días (A, B) [89].

Umamaheswari et al. 2021 [90]. Para probar la actividad de las nanopartículas de ZnO se realizó una síntesis verde de nanopartículas de óxido de zinc utilizando extractos de hojas de *Raphanus sativus var. Longipinnatus* y evaluaron su propiedad anticancerígena en líneas celulares A549. Realizaron un estudio de actividad anticancerígena con un ensayo de MTT mostrando unos resultados descendientes, comenzando con el control en una viabilidad del 100% hasta un porcentaje de viabilidad del 40% aproximadamente. Relacionado con la concentración de menor a mayor comenzando de 5 ug/ml hasta 50 µL /ml. La figura muestra la actividad anticancerígena de una síntesis verde de NP's ZnO mostrando una significancia de p<0.0001.



Figura 25. Resultados con el control en una viabilidad del 100% hasta un porcentaje de viabilidad del 40% aproximadamente. Relacionado con la concentración de menor a mayor comenzando de 5 µg/ml hasta 50 µg/ml. La figura muestra la actividad anticancerígena de una síntesis verde de NP's ZnO mostrando una significancia de p<0.0001 [91].

Norouzi Jobie et al. 2021 [91] Síntesis verde de nanopartículas de óxido de zinc utilizando extracto de corteza de tallo de *Amygdalus scoparia spach.*

Los resultados indicaron una disminución considerable de la viabilidad celular con una concentración creciente de NP's de ZnO de 20 a 120 µL /mL (Figura 26). Utilizando la concentración máxima de NP's de ZnO (120mg/mL), se demostró que más del 80,3, 83,1, 78,3 y 21% de las líneas celulares Hela, MCF-7, LS180 y Vero murieron, respectivamente. La concentración inhibitoria semimáxima (IC50) de las NP's de ZnO contra las líneas celulares Hela, MCF-7, LS180 y Vero fue de 69, 64,3, 71,5 y 301,2mg/ml, respectivamente. Las NP's de ZnO mostraron buenos efectos inhibitorios en las líneas celulares cancerígenas, mientras que no tuvieron ningún efecto tóxico en la línea celular normal Vero (citotoxicidad selectiva). La capacidad de la línea celular normal Vero de tolerar el Zn.

Concluyendo que: "Nuestros resultados demostraron que el extracto de corteza de tallo de *A. scoparia* desempeña un papel fundamental en la formación de NPs de ZnO. Las NPs de ZnO también mostraron una notable influencia inhibidora sobre las líneas celulares de cáncer, mientras que no tuvieron ningún efecto tóxico sobre la línea celular normal Vero. Las NPs de ZnO mostraron un efecto antidiabético más potente que el extracto de *A. scopariastem*".



Figura 26. La concentración inhibitoria semimáxima (IC50) de las NPs de ZnO contra las líneas celulares Hela, MCF-7, LS180 y Vero fue de 69, 64,3, 71,5 y 301,2mg/ml, respectivamente. Las NPs de ZnO mostraron buenos efectos inhibitorios en las líneas celulares cancerígenas, mientras que no tuvieron ningún efecto tóxico en la línea celular normal Vero (citotoxicidad selectiva). La capacidad de la línea celular normal Vero de tolerar el Zn [91].

4. CONCLUSIÓNES

En el presente trabajo, se realizó un estudio de nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas con *Rubus ulmifolius,* y su aplicación como antimicrobiano y anticancerígeno.

La caracterización de FTIR permitió comprobar que efectivamente las muestras eran óxido de zinc.

La caracterización por UV-Vis brindo las propiedades y características del óxido de zinc.

Se sintetizo correctamente nanopartículas de óxido de zinc por síntesis verde utilizando *Rubus ulmifolius.*

La caracterización comprobó la presencia de nanopartículas de óxido de zinc.

Rubus ulmifolius mejoro la toxicidad de las nanopartículas de óxido de zinc.

Las nanopartículas muestran reproducibilidad.

El efecto inhibitorio sobre la cepa *E. coli* es dependiente a las concentraciones a mayor concentración mayor efecto.

Las nanopartículas tienen una ligera preferencia sobre las células cancerosas.

La estadística mostro significancia con respecto al porcentaje utilizado de extracto en la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc.

Las nanopartículas de óxido de zinc también tuvieron efecto en células gram positivas.

Las nanopartículas de óxido de zinc al 0.5% mostraron mayor actividad antimicrobiana y anticancerígena a comparación de los otros porcentajes de extractos.

Se requieren más estudios para la extrapolación a tratamientos en seres humanos.

La síntesis verde comprueba que se puede utilizar cualquier extracto, fruta, u hoja, para producir nanopartículas de óxido de zinc, mientras posea compuestos fenólicos, flavonoides u otra molécula derivada de los antioxidantes.

Los polifenoles de *Rubus ulmifolius* si actuaron como estabilizadores en la reacción de síntesis.

Las NP's de ZnO expuestas a luz UV 15 minutos antes en los ensayos de viabilidad celular, activaron las nanopartículas de óxido de zinc.

Las nanopartículas presentan un problema al momento de ser utilizadas debido a su aglomeración.

El tamaño, forma y funcionalización mejoran los efectos en sus aplicaciones biomédicas.

El porcentaje de extracto influyó considerablemente en su actividad antimicrobiana y anticancerígena.

5. REFERENCIAS

- [1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, "The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine," *Molecules*, vol. 25, no. 1. MDPI AG, 2020. doi: 10.3390/molecules25010112.
- [2] N. Baig, I. Kammakakam, W. Falath, and I. Kammakakam, "Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges," *Materials Advances*, vol. 2, no. 6. Royal Society of Chemistry, pp. 1821–1871, Mar. 21, 2021. doi: 10.1039/d0ma00807a.
- [3] "The Bakerian lecture experimental relations of gold (and other metals) to light Phil.".
- [4] J. E. Hulla, S. C. Sahu, and A. W. Hayes, "Nanotechnology: History and future," *Human and Experimental Toxicology*, vol. 34, no. 12. SAGE Publications Ltd, pp. 1318–1321, Dec. 01, 2015. doi: 10.1177/0960327115603588.
- [5] M. Benelmekki, "An introduction to nanoparticles and nanotechnology," in Designing Hybrid Nanoparticles, Morgan & Claypool Publishers, 2014. doi: 10.1088/978-1-6270-5469-0ch1.
- [6] K. E. Drexler, "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology Chapter 1: ENGINES OF CONSTRUCTION." [Online]. Available: http://www.foresight.org/EOC/EOC_Chapter_1.html
- [7] P. Uikey and K. Vishwakarma, "REVIEW OF ZINC OXIDE (ZNO) NANOPARTICLES APPLICATIONS AND PROPERTIES," 2016.
- [8] A. M. Ealias and M. P. Saravanakumar, "A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application," in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Dec. 2017, vol. 263, no. 3. doi: 10.1088/1757-899X/263/3/032019.
- [9] T. A. Singh, J. Das, and P. C. Sil, "Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 286. Elsevier B.V., Dec. 01, 2020. doi: 10.1016/j.cis.2020.102317.
- [10] K. S. Siddiqi, A. ur Rahman, Tajuddin, and A. Husen, "Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes," *Nanoscale Research Letters*, vol. 13. Springer New York LLC, 2018. doi: 10.1186/s11671-018-2532-3.
- [11] S. v. Gudkov, D. E. Burmistrov, D. A. Serov, M. B. Rebezov, A. A. Semenova, and A. B. Lisitsyn, "A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO

Nanoparticles," *Frontiers in Physics*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Mar. 11, 2021. doi: 10.3389/fphy.2021.641481.

- [12] J. Jiang, J. Pi, and J. Cai, "The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications," *Bioinorganic Chemistry and Applications*, vol. 2018. Hindawi Limited, 2018. doi: 10.1155/2018/1062562.
- [13] M. Naseer, U. Aslam, B. Khalid, and B. Chen, "Green route to synthesize Zinc Oxide Nanoparticles using leaf extracts of Cassia fistula and Melia azadarach and their antibacterial potential," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-65949-3.
- [14] S. Talam, S. R. Karumuri, and N. Gunnam, "Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles," *ISRN Nanotechnology*, vol. 2012, pp. 1–6, May 2012, doi: 10.5402/2012/372505.
- [15] H. R. Dihom, M. M. Al-Shaibani, R. M. S. Radin Mohamed, A. A. Al-Gheethi, A. Sharma, and M. H. bin Khamidun, "Photocatalytic degradation of disperse azo dyes in textile wastewater using green zinc oxide nanoparticles synthesized in plant extract: A critical review," *Journal of Water Process Engineering*, vol. 47. Elsevier Ltd, Jun. 01, 2022. doi: 10.1016/j.jwpe.2022.102705.
- [16] P. J. P. Espitia, N. de F. F. Soares, J. S. dos R. Coimbra, N. J. de Andrade, R. S. Cruz, and E. A. A. Medeiros, "Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 5, no. 5. pp. 1447–1464, Jul. 2012. doi: 10.1007/s11947-012-0797-6.
- [17] Hadis. Morkoç and U. Özgür, *Zinc oxide : fundamentals, materials and device technology*. Wiley-VCH, 2009.
- [18] Y. Saeed, A. Shaukat, N. Ikram, and M. Tanveer, "Structural and electronic properties of rock salt phase of ZnO under compression," *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 69, no. 7, pp. 1676–1683, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.jpcs.2007.12.009.
- [19] G. Sangeetha, S. Rajeshwari, and R. Venckatesh, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties," *Materials Research Bulletin*, vol. 46, no. 12, pp. 2560– 2566, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.materresbull.2011.07.046.
- [20] S. Sabir, M. Arshad, and S. K. Chaudhari, "Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: Synthesis and applications," *Scientific World Journal*, vol. 2014. Hindawi Limited, 2014. doi: 10.1155/2014/925494.
- [21] I. Ijaz, E. Gilani, A. Nazir, and A. Bukhari, "Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of

nanoparticles," *Green Chemistry Letters and Reviews*, vol. 13, no. 3. Taylor and Francis Ltd., pp. 59–81, Jul. 02, 2020. doi: 10.1080/17518253.2020.1802517.

- [22] A. Rana, K. Yadav, and S. Jagadevan, "A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity," *Journal of Cleaner Production*, vol. 272. Elsevier Ltd, Nov. 01, 2020. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122880.
- [23] C. Dhand *et al.*, "Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: A comprehensive overview," *RSC Advances*, vol. 5, no. 127. Royal Society of Chemistry, pp. 105003–105037, Nov. 26, 2015. doi: 10.1039/c5ra19388e.
- [24] N. Salah *et al.*, "High-energy ball milling technique for ZnO nanoparticles as antibacterial material.," *Int J Nanomedicine*, vol. 6, pp. 863–869, 2011, doi: 10.2147/ijn.s18267.
- [25] S. C. Singh and R. Gopal, "Zinc nanoparticles in solution by laser ablation technique," 2007.
- [26] "Review on synthesis and applications of zinc oxide nanoparticles".
- [27] Ö. A. Yildirim and C. Durucan, "Synthesis of zinc oxide nanoparticles elaborated by microemulsion method," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 506, no. 2, pp. 944–949, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.jallcom.2010.07.125.
- [28] S. Mohan, M. Vellakkat, A. Aravind, and U. Reka, "Hydrothermal synthesis and characterization of Zinc Oxide nanoparticles of various shapes under different reaction conditions," *Nano Express*, vol. 1, no. 3, Dec. 2020, doi: 10.1088/2632-959X/abc813.
- [29] D. S. Jung, Y. N. Ko, Y. C. Kang, and S. bin Park, "Recent progress in electrode materials produced by spray pyrolysis for next-generation lithium ion batteries," *Advanced Powder Technology*, vol. 25, no. 1. Elsevier, pp. 18–31, 2014. doi: 10.1016/j.apt.2014.01.012.
- [30] T. Ghoshal, S. Biswas, M. Paul, and S. K. De, "Synthesis of ZnO nanoparticles by solvothermal method and their ammonia sensing properties," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 9, no. 10, pp. 5973–5980, Oct. 2009, doi: 10.1166/jnn.2009.1290.
- [31] M. Ghaffari-Moghaddam and R. Hadi-Dabanlou, "Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using Crataegus douglasii fruit extract," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 20, no. 2, pp. 739–744, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.jiec.2013.09.005.

- [32] H. Chang, M.-H. Tsai, H. Chang, and M.-H. Tsai, "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF ZnO NANOPARTICLES HAVING PRISM SHAPE BY A NOVEL GAS CONDENSATION PROCESS," 2008.
- [33] G. Sharma *et al.*, "Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review," *Journal of King Saud University* - *Science*, vol. 31, no. 2. Elsevier B.V., pp. 257–269, Apr. 01, 2019. doi: 10.1016/j.jksus.2017.06.012.
- [34] S. Iravani, "Green synthesis of metal nanoparticles using plants," Green Chemistry, vol. 13, no. 10, pp. 2638–2650, Jan. 2011, doi: 10.1039/c1gc15386b.
- [35] J. Singh, T. Dutta, K. H. Kim, M. Rawat, P. Samddar, and P. Kumar, "Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., Oct. 30, 2018. doi: 10.1186/s12951-018-0408-4.
- [36] P. Kurhade, S. Kodape, and R. Choudhury, "Overview on green synthesis of metallic nanoparticles," *Chemical Papers*, vol. 75, no. 10. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 5187–5222, Oct. 01, 2021. doi: 10.1007/s11696-021-01693-w.
- [37] S. Ahmad *et al.*, "Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles — An ecofriendly approach," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14. Dove Medical Press Ltd., pp. 5087–5107, 2019. doi: 10.2147/IJN.S200254.
- [38] H. Agarwal, S. Venkat Kumar, and S. Rajeshkumar, "A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach," *Resource-Efficient Technologies*, vol. 3, no. 4, pp. 406–413, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.reffit.2017.03.002.
- [39] V. L. Martin-Albarracin, "Rulbus ulmifolius Schott." [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/311322829
- [40] "NOMBRES VULGARES."
- [41] M. F. D'Agostino, V. Sicari, A. M. Giuffrè, and A. C. Soria, "Blackberries (Rubus ulmifolius Schott) from Calabria (Italy): a comprehensive characterisation," *European Food Research and Technology*, vol. 248, no. 3, pp. 905–916, Mar. 2022, doi: 10.1007/s00217-021-03922-8.
- [42] L. P. da Silva *et al.*, "Rubus ulmifolius Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties," *Food Research International*, vol. 119, pp. 34–43, May 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.052.

- [43] N. Ali, M. Shaoib, S. W. A. Shah, I. Shah, and M. Shuaib, "Pharmacological profile of the aerial parts of Rubus ulmifolius Schott," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1186/s12906-017-1564-z.
- [44] Happy Agarwal, S. Menon, S. Venkat Kumar, and S. Rajeshkumar, "Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 286. Elsevier Ireland Ltd, pp. 60–70, Apr. 25, 2018. doi: 10.1016/j.cbi.2018.03.008.
- [45] J. Xu, Y. Huang, S. Zhu, N. Abbes, X. Jing, and L. Zhang, "A review of the green synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and their prospects for application in antibacterial textiles," *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, vol. 16. SAGE Publications Ltd, 2021. doi: 10.1177/15589250211046242.
- [46] M. Bandeira, M. Giovanela, M. Roesch-Ely, D. M. Devine, and J. da Silva Crespo, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation," *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 15. Elsevier B.V., Mar. 01, 2020. doi: 10.1016/j.scp.2020.100223.
- [47] A. Jayachandran, A. T.R., and A. S. Nair, "Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using Cayratia pedata leaf extract," *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 26, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100995.
- [48] S. M. Roopan, A. Bharathi, R. Kumar, V. G. Khanna, and A. Prabhakarn, "Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of aqueous extract of Annona squamosa L peel as biomaterial for the reduction of palladium salts into nanoparticles," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 92, pp. 209–212, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.11.044.
- [49] S. M. Roopan *et al.*, "Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using Cocos nucifera coir extract and its larvicidal activity," *Industrial Crops and Products*, vol. 43, no. 1, pp. 631–635, May 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.08.013.
- [50] M. Sundrarajan and S. Gowri, "GREEN SYNTHESIS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES BY NYCTANTHES ARBOR-TRISTIS LEAVES EXTRACT The microbial enzyme or the plant phytochemicals with antioxidant or reducing properties are usually responsible for the," 2011.
- [51] T. Santhoshkumar *et al.*, "Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using Psidium guajava extract and its antibacterial and antioxidant properties," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 7, no. 12, pp. 968–976, Dec. 2014, doi: 10.1016/S1995-7645(14)60171-1.

- [52] A. A. Zahir *et al.*, "Green synthesis of silver and titanium dioxide nanoparticles using Euphorbia prostrata extract shows shift from apoptosis to G0/G1 arrest followed by necrotic cell death in Leishmania donovani," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 59, no. 8, pp. 4782–4799, Aug. 2015, doi: 10.1128/AAC.00098-15.
- [53] K. Velayutham *et al.*, "Evaluation of Catharanthus roseus leaf extractmediated biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles against Hippobosca maculata and Bovicola ovis," *Parasitology Research*, vol. 111, no. 6, pp. 2329– 2337, Dec. 2012, doi: 10.1007/s00436-011-2676-x.
- [54] R. P. Singh, V. K. Shukla, R. S. Yadav, P. K. Sharma, P. K. Singh, and A. C. Pandey, "Biological approach of zinc oxide nanoparticles formation and its characterization," *Advanced Materials Letters*, vol. 2, no. 4, pp. 313–317, Oct. 2011, doi: 10.5185/amlett.indias.204.
- [55] N. Durán and A. B. Seabra, "Metallic oxide nanoparticles: State of the art in biogenic syntheses and their mechanisms," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 95, no. 2. pp. 275–288, Jul. 2012. doi: 10.1007/s00253-012-4118-9.
- [56] G. Sangeetha, S. Rajeshwari, and R. Venckatesh, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties," *Materials Research Bulletin*, vol. 46, no. 12, pp. 2560– 2566, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.materresbull.2011.07.046.
- [57] J. Qu, X. Yuan, X. Wang, and P. Shao, "Zinc accumulation and synthesis of ZnO nanoparticles using Physalis alkekengi L.," *Environmental Pollution*, vol. 159, no. 7, pp. 1783–1788, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.envpol.2011.04.016.
- [58] S. Phokha et al., "Indium oxide (In2O3) nanoparticles using Aloe vera plant extract: Synthesis and optical properties Indium oxide (In 2 O 3) nanoparticles using Aloe vera plant extract: Synthesis and optical properties," 2008. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/237548361
- [59] "Review on synthesis and applications of zinc oxide nanoparticles".
- [60] B. L. Guo et al., "The Antibacterial Activity of Ta-doped ZnO Nanoparticles," Nanoscale Research Letters, vol. 10, no. 1, Dec. 2015, doi: 10.1186/s11671-015-1047-4.
- [61] J. Pasquet, Y. Chevalier, E. Couval, D. Bouvier, and M. A. Bolzinger, "Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 479, no. 1, pp. 88–95, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.031.

- [62] N. Padmavathy and R. Vijayaraghavan, "Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles - An antimicrobial study," *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 9, no. 3, Jul. 2008, doi: 10.1088/1468-6996/9/3/035004.
- [63] S. Jadoun, R. Arif, N. K. Jangid, and R. K. Meena, "Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 19, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 355–374, Feb. 01, 2021. doi: 10.1007/s10311-020-01074-x.
- [64] B. Abebe, E. A. Zereffa, A. Tadesse, and H. C. A. Murthy, "A Review on Enhancing the Antibacterial Activity of ZnO: Mechanisms and Microscopic Investigation," *Nanoscale Research Letters*, vol. 15, no. 1. Springer, 2020. doi: 10.1186/s11671-020-03418-6.
- [65] A. Sirelkhatim *et al.*, "Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism," *Nano-Micro Letters*, vol. 7, no. 3. SpringerOpen, pp. 219–242, Apr. 19, 2015. doi: 10.1007/s40820-015-0040-x.
- [66] C. R. Mendes *et al.*, "Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens," *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-06657-y.
- [67] K. R. Raghupathi, R. T. Koodali, and A. C. Manna, "Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles," *Langmuir*, vol. 27, no. 7, pp. 4020–4028, Apr. 2011, doi: 10.1021/la104825u.
- [68] K. Hirota, M. Sugimoto, M. Kato, K. Tsukagoshi, T. Tanigawa, and H. Sugimoto, "Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions," *Ceramics International*, vol. 36, no. 2, pp. 497–506, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.ceramint.2009.09.026.
- [69] R. Borda D'Água *et al.*, "Efficient coverage of ZnO nanoparticles on cotton fibres for antibacterial finishing using a rapid and low cost: In situ synthesis," *New Journal of Chemistry*, vol. 42, no. 2, pp. 1052–1060, 2018, doi: 10.1039/c7nj03418k.
- [70] U. Kadiyala, E. S. Turali-Emre, J. H. Bahng, N. A. Kotov, and J. Scott Vanepps, "Unexpected insights into antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant: Staphylococcus aureus (MRSA)," *Nanoscale*, vol. 10, no. 10, pp. 4927–4939, Mar. 2018, doi: 10.1039/c7nr08499d.
- [71] J. Pasquet, Y. Chevalier, E. Couval, D. Bouvier, and M. A. Bolzinger, "Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 479, no. 1, pp. 88–95, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.031.

- [72] W. S. Cho *et al.*, "Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn2+dissolution inside lysosomes," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 8, Sep. 2011, doi: 10.1186/1743-8977-8-27.
- [73] J. Zhou, N. Xu, and Z. L. Wang, "Dissolving behavior and stability of ZnO wires in biofluids: A study on biodegradability and biocompatibility of ZnO nanostructures," *Advanced Materials*, vol. 18, no. 18, pp. 2432–2435, Sep. 2006, doi: 10.1002/adma.200600200.
- [74] C. Hanley *et al.*, "Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 29, Jul. 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/29/295103.
- [75] O. R. Vasile *et al.*, "Influence of the size and the morphology of ZnO nanoparticles on cell viability," *Comptes Rendus Chimie*, vol. 18, no. 12, pp. 1335–1343, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.crci.2015.08.005.
- [76] G. Bisht and S. Rayamajhi, "ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent," *Nanobiomedicine*, vol. 3. SAGE Publications Ltd, Apr. 20, 2016. doi: 10.5772/63437.
- [77] R. A Rama Narsimha and S. L, "Evaluation of In Vitro Cytotoxicity of Zinc Oxide (Zno) Nanoparticles Using Human Cell Lines," *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, vol. 4, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.23937/2572-4061.1510009.
- [78] V. Vodyanoy, Y. Daniels, O. Pustovyy, W. A. Maccrehan, S. Muramoto, and G. Stan, "Engineered metal nanoparticles in the sub-nanomolar levels kill cancer cells," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 11, pp. 1567–1576, Apr. 2016, doi: 10.2147/IJN.S101463.
- [79] M. Pandurangan and D. H. Kim, "In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 17, no. 3. Kluwer Academic Publishers, Mar. 01, 2015. doi: 10.1007/s11051-015-2958-9.
- [80] T. A. Singh, J. Das, and P. C. Sil, "Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 286. Elsevier B.V., Dec. 01, 2020. doi: 10.1016/j.cis.2020.102317.
- [81] A. Degefa *et al.*, "Green Synthesis, Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles, and Examination of Properties for Dye-Sensitive Solar Cells Using Various Vegetable Extracts," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/3941923.
- [82] M. Pudukudy and Z. Yaakob, "Facile Synthesis of Quasi Spherical ZnO Nanoparticles with Excellent Photocatalytic Activity," *Journal of Cluster Science*, vol. 26, no. 4, pp. 1187–1201, Jul. 2015, doi: 10.1007/s10876-014-0806-1.

- [83] J. Arumugam *et al.*, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Ficus carica leaf extract and their bactericidal and photocatalytic performance evaluation," *Chemical Physics Letters*, vol. 783, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.cplett.2021.139040.
- [84] N. Vijayakumar *et al.*, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Anoectochilus elatus, and their biomedical applications," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 29, no. 4, pp. 2270–2279, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.sjbs.2021.11.065.
- [85] S. Chandrasekaran, S. Anusuya, and V. Anbazhagan, "Anticancer, antidiabetic, antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: A comparative analysis," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1263, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.molstruc.2022.133139.
- [86] C. Mallikarjunaswamy, J. S. Vidya, H. N. Deepakumari, G. Nagaraju, M. A. Sangamesha, and V. Lakshmi Ranganatha, "Larvicidal and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized from rain tree pod aqueous extract," *Materials Today: Proceedings*, 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2022.02.422.
- [87] K. Elumalai and S. Velmurugan, "Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of Azadirachta indica (L.)," *Applied Surface Science*, vol. 345, pp. 329–336, 2015, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.03.176.
- [88] E. E. Imade, T. O. Ajiboye, A. E. Fadiji, D. C. Onwudiwe, and O. O. Babalola, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using plantain peel extracts and the evaluation of their antibacterial activity," *Sci Afr*, vol. 16, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.sciaf.2022.e01152.
- [89] M. Saber, R. S. Hayaei-Tehrani, S. Mokhtari, P. Hoorzad, and F. Esfandiari, "In vitro cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in mouse ovarian germ cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 70, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.tiv.2020.105032.
- [90] A. Umamaheswari, S. L. Prabu, S. A. John, and A. Puratchikody, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using leaf extracts of Raphanus sativus var. Longipinnatus and evaluation of their anticancer property in A549 cell lines," *Biotechnology Reports*, vol. 29, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.btre.2021.e00595.
- [91] F. Norouzi Jobie, M. Ranjbar, A. Hajizadeh Moghaddam, and M. Kiani, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Amygdalus scoparia Spach stem bark extract and their applications as an alternative antimicrobial, anticancer, and anti-diabetic agent," *Advanced Powder Technology*, vol. 32, no. 6, pp. 2043–2052, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.apt.2021.04.014.

- [92] N. Ali, M. Shaoib, S. W. A. Shah, I. Shah, and M. Shuaib, "Pharmacological profile of the aerial parts of Rubus ulmifolius Schott," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 17, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1186/s12906-017-1564-z.
- [93] M. Schulz *et al.*, "Blackberry (Rubus ulmifolius Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages," *Food Research International*, vol. 122, pp. 627–634, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.034.
- [94] M. Bandeira *et al.*, "Mechanism of formation, characterization and cytotoxicity of green synthesized zinc oxide nanoparticles obtained from llex paraguariensis leaves extract," *Nano-Structures and Nano-Objects*, vol. 24, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.nanoso.2020.100532.
- [95] A. Jayachandran, A. T.R., and A. S. Nair, "Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using Cayratia pedata leaf extract," *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 26, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100995.
- [96] N. Matinise, X. G. Fuku, K. Kaviyarasu, N. Mayedwa, and M. Maaza, "ZnO nanoparticles via Moringa oleifera green synthesis: Physical properties & mechanism of formation," *Applied Surface Science*, vol. 406, pp. 339–347, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.apsusc.2017.01.219.
- [97] V. v Makarov *et al.*, "'Green' Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants," 2014.
- [98] A. López Peraza Asesores and M. Guillermo Amaya Parra Priscy Alfredo Luque Morales, "Universidad Autónoma de Baja California," 2021.
- [99] C. Alberto Soto Robles TUTOR Priscy Alfredo Luque Morales, "Universidad Autónoma de Baja California."
- [100] F. de Ingeniería and A. Y. Diseño, "Universidad Autónoma de Baja California."
- [101] J. Singh, T. Dutta, K. H. Kim, M. Rawat, P. Samddar, and P. Kumar, "Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., Oct. 30, 2018. doi: 10.1186/s12951-018-0408-4.
- [102] B. L. da Silva *et al.*, "Relationship between structure and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: An overview," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14. Dove Medical Press Ltd., pp. 9395–9410, 2019. doi: 10.2147/IJN.S216204.
- [103] R. P. Pandey *et al.*, "Potential of nanoparticles encapsulated drugs for possible inhibition of the antimicrobial resistance development," *Biomedicine and*

Pharmacotherapy, vol. 141. Elsevier Masson s.r.l., Sep. 01, 2021. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111943.

- [104] L. Vimercati *et al.*, "Nanoparticles: An Experimental Study of Zinc Nanoparticles Toxicity on Marine Crustaceans. General Overview on the Health Implications in Humans," *Frontiers in Public Health*, vol. 8, May 2020, doi: 10.3389/fpubh.2020.00192.
- [105] M. Ahmar Rauf, M. Oves, F. Ur Rehman, A. Rauf Khan, and N. Husain, "Bougainvillea flower extract mediated zinc oxide's nanomaterials for antimicrobial and anticancer activity," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 116, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108983.
- [106] M. Nikzamir, A. Akbarzadeh, and Y. Panahi, "An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 61. Editions de Sante, Feb. 01, 2021. doi: 10.1016/j.jddst.2020.102316.
- [107] S. Sruthi, J. Ashtami, and P. v. Mohanan, "Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles," *Materials Today Chemistry*, vol. 10. Elsevier Ltd, pp. 175–186, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.mtchem.2018.09.008.
- [108] M. Saliani, R. Jalal, and E. K. Goharshadi, "Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells," *Nanomed. J*, vol. 3, no. 1, pp. 1–14, 2016, doi: 10.7508/nmj.2016.01.001.
- [109] Z. Li *et al.*, "Zinc oxide nanoparticles induce human multiple myeloma cell death via reactive oxygen species and Cyt-C/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 signaling pathway in vitro," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 122, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109712.

6. ANEXOS

Mecanismo de reacción de síntesis.

Para la realización de la síntesis, se consideró *Rubus ulmifolius*, por sus propiedades antioxidantes y la cantidad de biomoléculas presentes en la fruta. Para ello, se corroboro a través de la literatura sus compuestos y la cantidad presente de biomoléculas en la zarzamora, la mayor cantidad son los polifenoles, específicamente los ácidos fenólicos y los flavonoides. Dentro de los ácidos fenólicos destaca en una futa madura, el ácido gálico y en los flavonoides la quercetina [92], [93].

En el mecanismo de reacción, es bien conocido, que el zinc puede formar complejos coordinados con ligandos, N, S, O, halógenos. La participación del grupo hidroxilo perteneciente en los compuestos polifenólicos del extracto natural, interactúan como reductor con el precursor nitrato de zinc hexahidratado, ocasionando una reacción de hidrólisis. Con una desprotonación de los grupos hidroxilo presentes en los fenoles del extracto, y la complejación del zinc, que se lleva a cabo en la reducción del compuesto fenólico, donando un electrón π del grupo carboxilo llevando un complejo Zn^{2+} a Zn con valencia 0, Inicia el proceso de nucleación que entra en la micelización inversa y estabilización de la nanopartícula. Para finalizar ocurre un tratamiento térmico de descomposición directa, calcinando a una temperatura de 400°c resultando la liberación de las nanopartículas de óxido de [94]–[101].



Figura 27. Propuesta de mecanismo de reacción en síntesis de nanopartículas de óxido de zinc con *Rubus ulmifolius*

Mecanismo de acción antimicrobiana y anticancerígeno

Las nanopartículas de óxido de zinc poseen características esenciales, algunas de ellas son la liberación de iones de Zn^{2+} , y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La producción de especies reactivas de oxígeno tiene lugar por la banda prohibida del óxido de zinc, si la interacción de la radiación es mayor que la banda prohibida del ZnO se forman pares electrón-hueco, estos electrones son promovidos a la banda de conducción (CB) y el hueco generado en la banda de valencia (VB) adquiere un carácter fuertemente oxidante, creando sitios oxidantes. Estos son capas de oxidar moléculas de agua o aniones hidróxidos, generando fuertes

especies oxidantes. Las especies reactivas de oxígeno son formadas por radicales hidroxilos (OH), iones de peróxido de hidroxilo (HO_2), anión radical superóxido (O_2^-). Cuando reacciona con iones de hidrogeno producen peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

Para la actividad antimicrobiana, se atribuye las siguientes interacciones:

- Contacto directo de NP's ZnO con la pared celular ocasionando la destrucción de la integridad de la membrana bacteriana.
- Liberación de iones de zinc
- Formación de ROS
- Interacción electrostática

La interacción de la generación de especies reactivas de oxígeno provoca la destrucción de los componentes celulares como el ADN, proteínas y lípidos. El peróxido de hidrógeno puede atravesar la pared celular e internalizándose.

No es necesario que el peróxido de hidrogeno internalice, puede interactuar desde afuera con la mermaban y lo iones de peróxido de hidroxilo (HO_2), anión radical superóxido (O_2^-) provocando daños directos.

En el caso de la liberación de iones de Zn^{2+} los ácidos teicoico y lipoteicoico actúan como un agente quelante sobre los iones Zn^{+2} , que luego son transportados por difusión pasiva a través de las proteínas de la membrana.

Las cargas positivas de las NP de ZnO son atraídas a la superficie celular por interacciones electrostáticas, y la diferencia en el gradiente electrostático provoca daños en la superficie celular [64]–[66], [102], [103].



Figura 28. Mecanismo propuesto de actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinc. 1.-Daño del material genético por la interacción del peróxido de hidrogeno producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS). 2.- Muerte por alteración del sistema enzimático por liberación de iones de Zn^{2+} . 3.- daño de la superficie celular por diferencia de gradiente electrostático.

Las nanopartículas ejercen una actividad anticancerígena por distintos mecanismos de acción:

- Especies reactivas de oxígeno (ROS)
- Liberación de iones de Zn²⁺
- Interacción física

El mecanismo de citotoxicidad inducido por las nanopartículas de óxido de zinc tiene diversas propuestas, entre ellas, destacan las mencionadas anteriormente.

Las nanopartículas de óxido de zinc entran a la célula por dos formas distintas, que son: Difusión directa y endocitosis. Una vez dentro se desencadena la interacción en el sistema biológico induciendo la generación de ROS y ocasionando estrés oxidativo. El ROS incluye principalmente el radical aniónico superóxido, el radical hidroxilo, el oxígeno mono molecular y el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrogeno es una molécula capaz de enviar una señal para la via apoptótica e inducir estrés oxidativo, y ese estrés oxidativo se atribuye a un mecanismo de acción de muchos nanomateriales.

Hay diferentes formas de introducir el mecanismo de producción de ROS

- 1. Interacción directa (de las NP's ZnO) con los compartimentos ácidos (como los lisosomas) liberando iones tóxicos produciendo ROS por reacción química.
- 2. Las NP's ZnO interactúan con la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la fosforilación oxidativa, generando ROS.
- 3. Las NP's ZnO interactúan con enzimas redox activas como la nicotianamina adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, provocando estrés oxidativo.
- 4. Las NP's ZnO interactúan con los receptores celulares, desencadenando vías de señalización posteriores, como la activación del factor nuclear kB (NF-kB).

En la interacción de liberación de iones de Zn^{2+} por el metal, alterar la homeostasis celular, interfiriendo con la actividad enzimática.

Las NP's ZnO pueden interactuar en el espacio perinuclear provocando fallo del funcionamiento del proceso de transcripción y traducción de las células.

Algunas enzimas estabilizadoras del ARNm tienen dominios susceptibles a los metales, ocasionando que se activen en presencia de iones desencadenando la perturbación del transcriptoma.

Las NP's siguen la siguiente reacción en soluciones acuosas.

 $ZnO(s) + H_2O(1) \leftrightarrow Zn(OH)_2$ $(s)Zn(OH)_2 \leftrightarrow Zn(OH)^+(aq)$ $Zn(OH)^+(aq) \leftrightarrow Zn^{2+}(aq) + OH^-(aq)$

Estos iones liberados por disolución interactúan con la mitocondria y retículo endoplasmático, (ER) ocasionando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de las vías de la proteína quinasa actividad por mitógenos (MAPK), terminando en apoptosis.

Para las vías de señalización hay varios caminos

- 1. Redox pathway: Las NP's ZnO provocan un aumento de la generación de ROS.
- 2. P53 pathway: El ZnO inicia la activación del p53 ocasionando una apoptosis dependiente de la caspasa mediante la regulación de proteínas proapoptóticas como la bax y la regulación disminuida provoca la bcl-2.
- 3. MARK pathway: El ZnO activa la quinasa regulada por señal extracelular, y los iones Zn^{+2} desencadenan la principal via apoptótica SAP/JNK.
- 4. NF-kB pathway: Las nanopartículas se involucran con el factor nuclear kB, la cual es un grupo de factores encargados en la transcripción, controlando genes asociados con la inflamación, la respuesta al estrés, supervivencia celular e inmunidad adaptativa.
- PINK1 pathway: El ZnO regula la expresión de la proteína PINK1 y el nivel de parkina mitocondrial. Al despolarizar la membrana mitocondrial no importa PINK1 a la membrana interior, acumulándose en la exterior, y esto, conlleva a que la parkina acumulada induzca autofagia [12], [79], [104]–[109].

S.No.	Source	Part	Shape/morph ology	Size	Reference
1.	Zingiber officinale R.	Root	Spherical	30- 50nm	(Anand Raj and Jayalakshmy, 2015)
2.	Nigella sativa	Seeds	Spherical and elongated rod shape	24nm	(Naseer et al., 2020)
3.	Hibiscus subdariffa	Leaves	Dumbbell	190-250nm	(Bala et al., 2015)
4.	Citrus Sinensis	Peel	Spherical	10-20nm	(Doan Thi et al., 2020)
5.	Sambucus ebulus	Leaves	Spherical	40-45nm	(Alamdari et al., 2020)
6.	Catharanthus roseus (I.) G. Don.	Leaves	Spherical	23-57nm	(Savithramma and Bhumi, 2014)
7.	Cassia alata	Leaves	Spherical	60-80nm	(Agarwal et al., 2019)
8.	Coriander sativum	Leaves	Spherical	40nm	(Pratap Goutam et al., 2017)
9.	Trachyspermum ammi	Seeds	Hexagonal plates	41nm	(Saravanakkumar et al., 2016)
10.	Elettaria Cardamomum	Seeds	Spherical	18.72n m	(Vinotha et al., 2020)
11.	Foeniculum Vulgare	seeds	Spherical	22-51nm	(Alsalhi et al., 2020)
12.	Punica granatum L	Peel	Crystal	42.87nm	(Husain, 2019)
13.	Allium cepa	Bulbs	-	20-100nm	(Stan et al., 2016)
14.	Anchusa italic	Aerial part	Hexagonal	50nm	(Azizi et al., 2016)
15.	Ocimum tenuiflorum	Leaves	Hexagonal	11-25nm	(Raut et al., 2013)
16.	Artemisia annua	Stem barks	Spherical	20nm	(Wang et al., 2020)

Tabla 5. Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc usando extractos de plantas [59]
17.	Syzgium aromaticum Linn	Buds	Hexagonal	50nm	(Anvarinezhad et al., 2020)
18.	Crocus sativus	Flowers	Spherical	75nm	(Shashanka, 2020)
19.	Strychnos nux- vomica L.	Leaves	Quasi- spherical	10-20nm	(Steffy et al., 2018)
20.	Camellia sinensis	Leaves	-	30-40nm	(Irshad et al., 2018)
21.	Senna alata	Leaves	Needle	412nm	(Adebayo-Tayo et al., 2020)
22.	Aleo Barbadensis	Leaves	Hexagonal	10.35n m	(Parthasarathy G et al., 2017)
23.	Mentha spicata	Leaves	Spherical	11- 80nm	(Abdelkhalek and Al- Askar, 2020)
24.	Daucus carota	Roots	polyhedral	16-21nm	(Luque et al., 2018)
25.	Ipomoea pes- caprea L.	Leaves	-	10-100nm	(Venkateasan et al., 2017)
26.	Azadirachta indica A.Juss.	Leaves	Spherical	20-40nm	(Singh et al., 2019)
27.	Boerhavia diffusa	Leaves	Spherical	140nm	(Joseph et al., 2016)
28.	Lycopersicon esculentum	Fruit	Spherical	40-100nm	(Sutradhar and Saha, 2016)
29.	Mangifera indica	Leaves	-	26nm	(Narayan, 2018)
30.	Andrographis paniculata	Leaves	Hexagonal	20.23n m	(Kavitha et al., 2017)
31.	Lawsonia inermis	Leaves	Hexagonal	75-100nm	(Kiruba Daniel et al., 2013)
32.	Trifolium pratense	Flower	-	100-190nm	(Dobrucka and Długaszewska, 2016)
33.	Carica papaya	Leaves	Spherical	50nm	(Rathnasamy et al., 2017)
34.	Solanum nigrum	Leaves	Spherical	20-30nm	(Ramesh et al., 2015)
35.	Plectranthus amboinicus	Leaves	Spherical and Hexagonal	20-50nm	(Vijayakumar et al., 2015)
36.	Rosa Canina	Fruit	Spherical	<50nm	(Jafarirad et al., 2016)
37.	Terminalia chebula	Fruit	Spherical	20nm	(Rana et al., 2016)
38.	Pongamia pinnata	Leaves	Spherical	100nm	(Sundrarajan et al., 2015)
39.	Boswellia ovalifoliolata	Stem barks	Spherical	20nm	(Supraja et al., 2016)

Order	Plant origin	Nanoparticle Size (nm)		Morphology	
1	<i>Aloe barbadensis</i> Miller (Aloe vera)	Gold and silver	10–30	Spherical, triangular	
2	<i>Aloe barbadensis</i> Miller (Aloe vera)	Indium oxide	5–50	Spherical	
3	Acalypha indica	Silver	20–30	Spherical	
4	Apiin extracted from henna leaves	Silver and gold	39	Spherical, triangular, and quasi- spherical	
5	Avena sativa (oat)	Gold	5–20 (pH 3 and 4),	Rod-shaped	
6	Azadirachta indica (neem)	Gold, silver and silver- gold alloys	5–35 and 50– 100	Spherical, triangular, hexagonal	
7	<i>Camellia sinensis</i> (black tea leaf extracts)	Gold and silver	20	Spherical, prism	
8	Brassica juncea (mustard)	Silver	2–35	Spherical	
9	Cinnamomum camphora (camphor tree)	Gold and silver	55-80	Triangular, spherical (Au), and quasi- spherical (Ag)	
10	<i>Carica papaya</i> (papaya)	Silver	60-80	Spherical	
11	Citrus limon (lemon)	Silver	< 50	Spherical, spheroidal	
12	<i>Coriandrum sativum</i> (coriander)	Gold	6.75–57.91	Spherical, triangular, truncated triangular, decahedral	
13	Cymbopogon flexuosus (lemongrass)	Gold	200–500	Spherical, triangular	
14	Cycas sp. (cycas)	Silver	2–6	Spherical	
15	Diospyros kaki (persimmon)	bimetallic gold/silver	50-500	Cubic	
16	<i>Emblica officinalis</i> (indian gooseberry)	Gold and silver	(10–20) and (15–25)	-	
17	<i>Eucalyptus citriodora</i> (neelagiri)	Silver	20	Spherical	
18	Eucalyptus hybrida (safeda)	Silver	50-150	Crystalline, spherical	
19	<i>Garcinia mangostana</i> (mangosteen)	Silver	35	Spherical	
20	<i>Gardenia jasminoides Ellis</i> (gardenia)	Palladium	3–5	-	
21	<i>Syzygium aromaticum</i> (clove buds)	Gold	5-100	Irregular	
22	<i>Jatropha curcas</i> (seed extract)	Silver	15–50	Spherical	
23	<i>Ludwigia adscendens</i> (ludwigia)	Silver	100–400	Spherical	
24	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Gold	2–40	Irregular, tetrahedral, hexagonal platelet, decahedral, icosahedral	
25	<i>Mentha piperita</i> (peppermint)	Silver	5–30	Spherical	
26	Medicago sativa (alfalfa)	Iron oxide	2–10	Crystalline	
27	Morus (mulberry)	Silver	15–20	Spherical	
27	Nelumbo nucifera (lotus)	Silver	25-80	Spherical, triangular, truncated triangular, decahedral	
28	<i>Ocimum sanctum</i> (tulsi; root extract)	Silver	10 ± 2 and 5 ± 1.5 nm	Spherical	

Tabla 6. Síntesis verde de nanopartículas metálicas de varios extractos de plantas [101].

29	Pear fruit extract	Gold	200–500	Triangular, hexagonal
30	<i>Pelargonium roseum</i> (rose geranium)	Gold	2.5–27.5	Crystalline
31	<i>Psidium guajava</i> (guava)	Gold	25–30	Mostly spherical
32	Sedum alfredii Hance	Zinc oxide	53.7	Hexagonal wurtzite and pseudo- spherical
33	<i>Tanacetum vulgare</i> (tansy fruit)	Gold and silver	11, 16	Triangular, spherical
34	<i>Terminalia catappa</i> (almond)	Gold	10–35	Spherical



Figura 29. Células muertas como control positivo en ensayo MTT expuestas a 50ul de Dimetilsulfóxido (DMSO).



Figura 30. Células vivas como control negativo en ensayo MTT.



Figura 31. Células de cáncer expuestas a 10ug/ml de nanopartículas de óxido de zinc a porcentaje de extracto del 0.5%.



Figura 32. Células de cáncer expuestas a 2500ug/mL de nanopartículas de óxido de zinc con porcentaje de extracto del 0.5%.



Figura 33. Foto capturada con smartphone. Ensayo de viabilidad celular con línea celular de cáncer de cerebro después de 4 horas de incubación.



Figura 34. Fotografía tomada con smartphone del ensayo de viabilidad celular con cultivo celular sano de cerebro después de 4 horas de incubación.