

Universidad Nacional Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño



Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de nanopartículas metálicas de ZnO en células animales (fibroblastos de roedor) y células vegetales (*Dunaliella tertiolecta*), y sus propiedades antimicrobianas.

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE BIOINGENIERO

PRESENTA:

Dacia Samhaí Manríquez García

Ensenada, Baja California

Universidad Nacional Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de nanopartículas
metálicas de ZnO en células animales (fibroblastos de
roedor) y células vegetales (*Dunaliella tertiolecta*), y sus
propiedades antimicrobianas.

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOINGENIERO

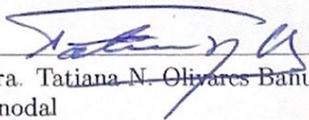
PRESENTA:

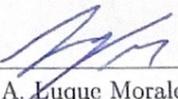
Dacia Samhaí Manríquez García

Aprobada por:


Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Directora


Dr. Dante A. Magdaleno Moncayo
Codirector


Dra. Tatiana N. Olivares Bañuelos
Sinodal


Dr. Priscy A. Luque Morales
Sinodal


Dr. Rubén Villarreal Sánchez
Sinodal

Agradecimientos

A mis abuelos, aunque no le entiendan, es para ustedes.

A la Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez por su dirección y paciencia en el desarrollo del presente proyecto.

Al Dr. Dante A. Magdaleno Moncayo por su apoyo durante la elaboración de esta investigación.

Agradezco el apoyo y financiamiento brindado a través de los proyectos: Análisis de metagenomas de lagunas hipersalinas de Baja California descubrimiento de nuevas enzimas con aplicación biotecnológica y Biosíntesis de nanopartículas para la degradación de contaminantes del agua apoyado en la 21a Convocatoria Interna de la UABC.

Índice general

0.1. Resumen	7
0.2. Introducción	8
0.3. Antecedentes	10
0.4. Justificación	12
0.5. Hipótesis	13
0.6. Objetivos	13
0.6.1. Objetivo general	13
0.6.2. Objetivos específicos	13
0.7. Metodología	14
0.7.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO	14
0.7.1.1. Grupos experimentales	14
0.7.1.2. Condiciones experimentales	14
0.7.1.3. Medio de cultivo	14
0.7.1.4. Obtención de cepa	15
0.7.1.5. Incubación	15
0.7.1.6. Monitoreo de crecimiento celular	15
0.7.2. Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de ZnO	15
0.7.2.1. Aislamiento de células (fibroblastos).	15
0.7.2.2. Conteo celular	17
0.7.2.3. Mantenimiento celular	17
0.7.2.4. Ensayo de citotoxicidad	18
0.7.2.5. Tratamiento estadístico	18
0.7.2.6. Prueba de solubilidad de nanopartículas de ZnO	18
0.8. Resultados	20

0.8.0.1.	Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 α en presencia de nanopartículas de ZnO	20
0.8.0.2.	Conteo celular del cultivo de fibroblastos de roedor en presencia de nanopartículas de ZnO	24
0.8.0.3.	Pruebas de solubilidad de las nanopartículas de ZnO en distintos solventes orgánicos.	26
0.9.	Discusión	27
0.10.	Conclusiones	31
0.11.	Referencias	32

Índice de figuras

1.	Número de muertes ocasionadas por resistencia ante antibióticos en el año 2019 y 2013 respectivamente (CDC, 2019; CDC, 2013).	9
2.	Curva de crecimiento del grupo C (<i>E. coli</i> DH5 α + medio LB) comparado con el crecimiento observado en la muestra blanco, durante un periodo de incubación de 14 horas a 37 °C y agitación continua. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos graficados.	21
3.	Curva de crecimiento del grupo E (<i>E. coli</i> DH5 α + medio LB + nanopartículas de ZnO), durante un periodo de incubación de 14 horas a 37 °C y agitación continua. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos graficados.	22
4.	Curva de crecimiento del grupo E (<i>E. coli</i> DH5 α + medio LB + nanopartículas de ZnO) comparado con el grupo C (<i>E. coli</i> DH5 α + medio LB), durante un periodo de incubación de 14 horas a 37 °C y agitación continua. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos graficados.	23
5.	Cultivo de células de roedor observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.	24
6.	Grupo experimental EC2 (células de roedor + nanopartículas de ZnO con un factor de dilución de 2) observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.	25
7.	Grupo experimental EC4 (células de roedor + nanopartículas de ZnO con un factor de dilución de 4) observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.	25

8.	Grupo experimental EC8 (células de roedor + nanopartículas de ZnO con un factor de dilución de 8) observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.	25
9.	Análisis estadístico de las diferencias encontradas entre el no. de células viables en el cultivo celular expuesto a distintas concentraciones de nanopartículas de ZnO. El símbolo de asterisco representa una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental EC8.	26
10.	Nanopartículas metálicas de ZnO en EtOH al 0.1% tras someterse a un periodo de agitación de 30 min a 185 rpm.	27
11.	Mecanismos de acción antimicrobianos y citotóxicos de las nanopartículas de ZnO (Dimapilis <i>et al.</i> , 2018).	29

Índice de tablas

1.	Descripción de los grupos experimentales empleados para evaluar la capacidad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO.	14
2.	Elementos y composición del medio 1 empleado.	16
3.	Elementos y composición del medio 2 empleado.	16
4.	Elementos y composición del medio 3 empleado.	16
5.	Composición de las muestras empleadas para la prueba de solubilidad 2.	19
6.	Composición de las muestras empleadas para la prueba de solubilidad 1.	19
7.	Valores de absorbancia del grupo E (n=3) (<i>E. coli</i> DH5 α + medio LB+ nanopartículas de ZnO) leídos a 600 nm.	20
8.	Valores de absorbancia del grupo C (n=3) (<i>E. coli</i> DH5 α + medio LB) leídos a 600 nm.	20
9.	Efecto en la concentración celular del cultivo primario de fibroblastos de roedor al exponerse a distintas concentraciones de nanopartículas de ZnO.	24
10.	Valores de absorbancia de la prueba de solubilidad de nanopartículas de ZnO disueltas en EtOH al 0.1 % leídas a 292 nm.	26
11.	Valores de absorbancia de la prueba de solubilidad de nanopartículas de ZnO disueltas en DMSO al 0.1 % leídas a 292 nm.	27

0.1. Resumen

Los agentes antimicrobianos han impactado la salud humana de manera positiva desde su descubrimiento hasta la actualidad, sin embargo, en los últimos tiempos, se ha detectado una problemática derivada del uso excesivo de los mismos, ya que esto ha dado lugar a microorganismos multiresistentes a dichos agentes. Con base a esto, ha surgido la necesidad de encontrar nuevas formas de tratamiento que permitan matar a los microorganismos invasores sin dañar a las células huésped. Entre las fuentes analizadas, se encuentran las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO), las cuales destacan por su potencial como agentes antibacterianos gracias a su capacidad para interactuar directamente con la superficie celular, lo cual da lugar a un cambio en la permeabilidad de la membrana, ocasionando una inhibición en el crecimiento celular. Por lo anterior, en este trabajo se evaluaron las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas de ZnO en la bacteria gram negativa *Escherichia coli* DH5 α y además, se estudiaron sus propiedades citotóxicas en células hepáticas de roedor y en células vegetales (*Dunaliella tertiolecta*). A través de la metodología seguida se pudo identificar que a una concentración de 0.45275 g/mL, las nanopartículas de ZnO presentan actividad antimicrobiana ante *E. coli* y son capaces de inhibir el crecimiento en el cultivo. Además, se identificó una disminución significativa en la viabilidad de las células de roedor entre los grupos que fueron expuestos a las nanopartículas de ZnO, en comparación con el grupo control. Por último, al evaluar la solubilidad de las nanopartículas de ZnO en distintos solventes orgánicos, se determinó que estas eran insolubles en dichos solventes. A partir de esto, se concluyó que era necesario evaluar las nanopartículas en condiciones distintas para encontrar el vehículo ideal para su aplicación.

0.2. Introducción

La introducción de agentes antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, dio lugar a un cambio significativo en el panorama de la salud humana, posicionándose como uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes en la historia de la medicina (de Souza *et al.*, 2019). Dicha importancia radica en su toxicidad selectiva, la cual les permite matar a los microorganismos invasores sin dañar a las células huésped (Rehman *et al.*, 2020). Sin embargo, el éxito de los antibióticos y de cualquier agente terapéutico, está limitado por la posibilidad de que se desarrolle algún tipo de resistencia hacia dicho compuesto (Davies & Davies, 2010). Estudios epidemiológicos han demostrado que hay una relación directa entre el consumo de antibióticos y la emergencia y diseminación de cepas bacterianas resistentes a los mismos (Ventola, 2015). En consecuencia, en los últimos tiempos se ha detectado una problemática derivada del uso excesivo y descontrolado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. De acuerdo al Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (2019), solo en los Estados Unidos, cada año fallecen más de 35,000 personas producto de una infección resistente a antibióticos, a diferencia de los 23,000 reportados en el año 2013 (Figura 1). A pesar de los problemas que se han identificado, el número de antibióticos que han aparecido en el mercado han decaído considerablemente, con solo cinco nuevos agentes antibacteriales aprobados en los Estados Unidos entre los años 2003 y 2007 (Moellering Jr., 2011). Por lo anterior, el encontrar estrategias en contra del desarrollo de la resistencia bacteriana ante estos agentes, se ha convertido en un desafío de salud pública global (Frieri *et al.*, 2017). Por esto, se deben preservar los agentes antibacteriales actuales mediante el uso apropiado de los mismos, así como, descubrir y desarrollar nuevos agentes (Powers, 2004).

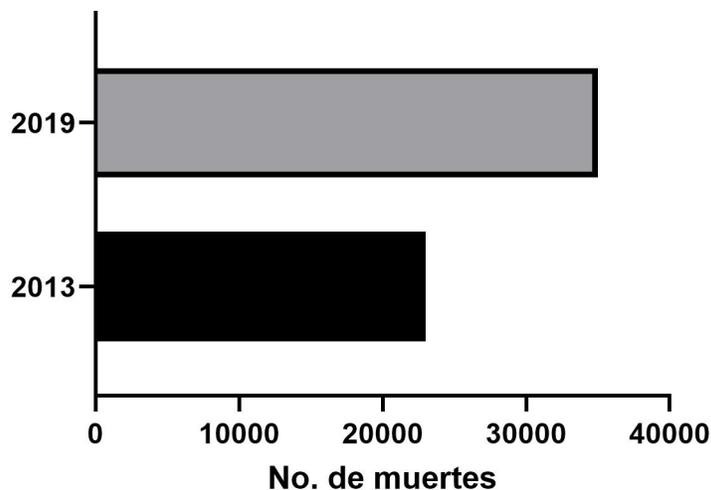


Figura 1: Número de muertes ocasionadas por resistencia ante antibióticos en el año 2019 y 2013 respectivamente (CDC, 2019; CDC, 2013).

Con base a la problemática planteada, se han establecido extensas investigaciones con el fin de aislar agentes antibacteriales de distintas fuentes, sin embargo, a pesar del progreso que se ha logrado alcanzar durante los últimos años en el desarrollo de este tipo de compuestos, aún se presenta una necesidad urgente de encontrar nuevas formas de tratamiento (Zorofchian *et al.*, 2014). Entre las fuentes analizadas, se encuentran las nanopartículas metálicas (NPs), las cuales presentan una ventaja significativa ante el uso de antibióticos tradicionales, debido a que la mayoría de los mecanismos mediante los cuales las bacterias adquieren resistencia, no son relevantes para las mismas (Wang *et al.*, 2017). Concretamente, se cree que la inhibición en el crecimiento de la población bacteriana se da debido a la habilidad de las nanopartículas de penetrar la pared celular, gracias a que poseen un tamaño menor al de los poros de la misma, ocasionando la destrucción de los componentes celulares, tales como las proteínas y el ácido desoxirribonucleico (ADN) celular (Dadi *et al.*, 2019). Específicamente, se ha mostrado un gran interés por las nanopartículas de óxidos metálicos, los cuales muestran un alto potencial como agentes antibacterianos. Esto se atribuye principalmente a su relativa baja toxicidad ante células humanas, su bajo

costo, la efectividad dependiente del tamaño que presentan ante un amplio rango de bacterias, su habilidad de prevenir la formación de biofilm, entre otras características. Además, dependiendo de como se obtengan, el método de obtención puede impactar positivamente el medio ambiente. Por ejemplo, la producción de NPs mediante síntesis verde se basa en reducir los metales empleando especies naturales con poder antioxidante, evitando así, emplear materiales tóxicos (Gómez-Garzón, 2018).

Sin embargo, a pesar de los atributos que poseen, es necesario realizar las investigaciones correspondientes para entender sus efectos citotóxicos y sus mecanismos de acción, para poder darles una aplicación segura en las distintas áreas de interés (Stankic *et al.*, 2016). Debido a la toxicidad que muestran algunas nanopartículas basadas en óxidos metálicos ante células humanas, aún surge la necesidad de desarrollar formulaciones basadas en nanopartículas que sean estables, robustas y durables, además de efectivas en la destrucción o eliminación de microorganismos (Jones *et al.*, 2006). Además de su evaluación ante células animales, es necesario estudiar el impacto de las nanopartículas en otros entornos para determinar su potencial en otras aplicaciones. Una manera de predecir dicho impacto en ecosistemas marinos, es evaluando los efectos de las NPs en fitoplancton marino (Manzo *et al.*, 2013). Las microalgas del género *Dunaliella* son organismos unicelulares pertenecientes a la clase Chlorophyceae, 20 especies componen al género *Dunaliella*, estas microalgas se han estudiado por más de 100 años y se distribuyen en todos los continentes en ambientes de agua dulce, océanos, lagunas hipersalinas y aguas ácidas (Polle *et al.*, 2009). El cultivo a gran escala de *Dunaliella sp.* se facilita ya que presenta una rápida tasa de crecimiento, bajos costos de producción, crece en condiciones estresantes como concentraciones de alta salinidad y bajas concentraciones de nitrógeno (Minhas *et al.*, 2016). La biomasa producida por cultivos de *Dunaliella sp.* tiene el potencial de ser utilizada como una alternativa a el uso de combustibles fósiles, ya que al someter el cultivo en condiciones estresantes, estas microalgas almacenan energía química en lípidos neutros y triglicéridos (Wijffels & Barbosa, 2010).

0.3. Antecedentes

Diversas investigaciones han explorado las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas. Shinde (2015), estudió la actividad antimicrobia-

na de las nanopartículas de ZnO ante bacterias y hongos. Para esto, evaluó concentraciones de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas con un tamaño de 20-25 nm, ante las bacterias *Staphylococcus aureus* (gram positiva) y *Salmonella typhimurium* (gram negativa), así como, ante la cepa de hongos *Aspergiillus*. Para medir el efecto de las nanopartículas en la viabilidad celular, los cultivos bacterianos fueron incubados en presencia de las diferentes concentraciones de nanopartículas por cuatro horas y posteriormente, el cultivo fue sembrado en placa. De manera similar, la actividad antimicótica fue estudiada empleando el método de dilución en caldo. Los resultados arrojados demostraron que las nanopartículas de ZnO poseían actividad antimicrobiana y antimicótica significativa, particularmente cuando se utilizaba una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De manera similar, Dadi *et al.*, (2019), compararon la actividad antibacteriana de las nanopartículas de ZnO y óxido de cobre (CuO) ante bacterias gram positivas y gram negativas utilizando el método de difusión de pozos y en disco. Mediante los estudios efectuados fueron capaces de determinar que ambas nanopartículas mostraban mayor efecto en la inhibición del crecimiento bacteriano durante la fase exponencial, mientras que poseían menor efectividad durante las fases lag y estacionaria. A pesar de que los dos tipos de nanopartículas mostraron resultados similares durante la fase exponencial, fue durante la fase estacionaria donde se identificaron comportamientos distintos ya que las nanopartículas de CuO fueron significativamente más efectivas que las nanopartículas de ZnO.

Por otro lado, Iqbal *et al.*, (2021), sintetizaron nanopartículas de ZnO cubiertas con plata mediante el método de síntesis verde, con el fin de evaluar sus propiedades antimicrobianas y antidiabéticas. Para evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano, expusieron a *E. coli* (gram negativa) y cepas de cocos (gram positiva) ante tres concentraciones distintas de nanopartículas (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) empleando el método de difusión de pozo. Mediante esto pudieron determinar que las nanopartículas mostraban un efecto inhibitorio mayor ante las cepas de coco que aquél encontrado en *E. coli*. Estos resultados fueron atribuidos a que las células de *E. coli* poseen una pared celular más gruesa y menos permeable que aquella presente en los cocos.

Por último, Reddy *et al.*, (2007) estudiaron las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de ZnO ante *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, así como, los efectos citotóxicos de las mismas ante células T humanas. A partir de las evaluaciones efectuadas, se pudo identificar que las nanopartículas inhibían com-

pletamente el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* a concentraciones menores o iguales a 3.4 mM y 1 mM, respectivamente. De igual forma, se realizaron ensayos de citometría de flujo, donde se determinó que el exponer a las células humanas a las nanopartículas ocasionaba un decremento significativo en la viabilidad celular de las mismas.

De acuerdo a lo observado en las investigaciones anteriores, es posible inferir que las nanopartículas de ZnO presentan potencial para su aplicación como agente antibacteriano, debido al efecto que estas tienen en la viabilidad de los cultivos de bacterias gram negativas y gram positivas, siendo capaces de inhibir completamente su crecimiento a ciertas concentraciones.

Por otro lado, la citotoxicidad de las nanopartículas metálicas ha sido igualmente explorada en microorganismos marinos. Manzo *et al.*, (2013), evaluaron las alteraciones en la curva y tasa de crecimiento de la microalga *Dunaliella tertiolecta* derivadas de la exposición de la misma ante nanopartículas de ZnO y ZnO a granel. Mediante esta investigación se determinó que la tasa de crecimiento de *D. tertiolecta* era afectada significativamente por la exposición ante las NPs. Particularmente, se encontró que la concentración media máxima eficaz (EC50) para las NPs de ZnO era de 0.78-2.31 mgZn/L, mientras que el ZnO a granel requería 2.77-4.80 mgZn/L para alcanzar la misma efectividad. A partir de esto, se pudo concluir que el ZnO a escala nanométrica presenta mayor toxicidad que el material a granel.

0.4. Justificación

Durante los últimos años, el interés en el estudio de las nanopartículas de ZnO ha ido en aumento. Esto se debe principalmente a las propiedades intrínsecas de este óxido metálico, las cuales lo hacen un material inorgánico versátil, funcional y prometedor, con un amplio rango de aplicaciones (Sirelkhatim *et al.*, 2015). Cuando este material disminuye a una escala nanométrica, tiende a mostrar propiedades biológicas mejoradas, a comparación de aquellos materiales de tamaño convencional (Espitia *et al.*, 2012). Específicamente, las nanopartículas de ZnO han mostrado un potencial significativo como agentes antibacterianos gracias a su capacidad para interactuar directamente con la superficie celular, lo cual da lugar a un cambio en la permeabilidad de la membrana, ocasionando una inhibición en el crecimiento celular (Bedi & Kaur, 2015). Esta propiedad permi-

te su aplicación en un gran número de áreas de interés, tales como, la industria alimenticia, donde actúa como un agente esterilizador y desinfectante en los paquetes de comida (Shi *et al.*, 2014). Así mismo, se ha identificado que poseen efectos antibacterianos ante numerosas bacterias patogénicas, lo cual permite su aplicación en el ámbito médico (Aldeen, Mohamed & Maaza, 2021). Sin embargo, a pesar de los extensos avances en el campo de la nanotecnología aún se requiere de investigaciones adicionales que permitan identificar los mecanismos de acción exactos de las nanopartículas de ZnO ante las bacterias, y el efecto citotóxico que estas tendrán al interactuar con tejidos biológicos (Stankicet *et al.*, 2016). Por lo anterior, en este trabajo se evaluaron las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas de ZnO en la bacteria gram negativa *Escherichia coli* DH5 α . Esta cepa modificada genéticamente es ampliamente utilizada en el laboratorio, principalmente debido a su capacidad para amplificar plásmidos exógenos (Chen *et al.*, 2018). Además, con el fin de profundizar en su uso como un agente antibacteriano, se estudiaron sus propiedades citotóxicas en células hepáticas de roedores y en la célula vegetal *Dunaliella tertiolecta*.

0.5. Hipótesis

Las nanopartículas metálicas de ZnO inhiben el crecimiento *in vitro* de la bacteria *Escherichia coli* debido a sus propiedades antimicrobianas, además, presentan nula citotoxicidad ante fibroblastos de roedor.

0.6. Objetivos

0.6.1. Objetivo general

- Evaluar las propiedades antimicrobianas y citotoxicidad *in vitro* de nanopartículas de ZnO en *Escherichia coli* y fibroblastos de ratón, respectivamente.

0.6.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las nanopartículas de ZnO en el crecimiento de *Escherichia coli* en medio líquido mediante espectrofotometría.

- Determinar la viabilidad celular *in vitro* del cultivo de células de mamífero en presencia de nanopartículas de ZnO mediante conteo celular.
- Evaluar la solubilidad de nanopartículas de ZnO en distintos solventes orgánicos mediante pruebas de solubilidad.

0.7. Metodología

0.7.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO

0.7.1.1. Grupos experimentales

Se establecieron tres grupos experimentales (N=3). El grupo control (C) (n=3), el cual se inoculó con 1.25 mL de cultivo (Sección 0.7.1.5), el grupo experimental (E) (n=3), al cual, además del inóculo, se le adicionaron 2.5 mL de nanopartículas de ZnO a partir de una solución madre con una concentración inicial de 0.1811 g/mL, y por último, el grupo blanco (B) el cual no se inoculó (Tabla 1).

Tabla 1: Descripción de los grupos experimentales empleados para evaluar la capacidad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO.

<i>Composición</i>	<i>Control (mL)</i>	<i>Experimental (mL)</i>	<i>Blanco (mL)</i>
<i>Medio</i>	100	100	100
<i>Inóculo</i>	1.25	1.25	—
<i>NP**</i>	—	2.5	2.5
<i>Concentración NP (g/mL)*</i>	0	0.45275	0.45275
<i>Agua destilada</i>	2.5	—	1.25
<i>Total</i>	103.75	103.75	103.75

*La concentración de nanopartículas presenta variación en comparación con los datos reportados. **Nanopartículas de ZnO.

0.7.1.2. Condiciones experimentales

0.7.1.3. Medio de cultivo

Se preparó medio LB líquido (Luria-Berthani), adicionando 12.5 g de medio LB deshidratado (Difco, cat. #11778902) a 500 mL de agua destilada. Poste-

riormente, se esterilizó a 121 °C durante 15 min y se dejó enfriar. Finalmente, se almacenó a 4 °C hasta su uso.

0.7.1.4. Obtención de cepa

La cepa *E. coli* DH5 α , se sembró en placas Petri con medio LB que se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Tras el periodo de incubación, se aisló una colonia, la cual se utilizó para inocular 100 mL de medio LB líquido (Sección 0.7.1.3).

0.7.1.5. Incubación

El cultivo en medio líquido (Sección 0.7.1.4) fue incubado durante un periodo de 12 horas a 37 °C sin agitación. Al finalizar dicho periodo, fue almacenado a 4 °C hasta su uso.

0.7.1.6. Monitoreo de crecimiento celular

Los grupos C y E se incubaron a 37 °C bajo agitación continua a 200 rpm durante tres horas. Posteriormente, se tomó la primera lectura de absorbancia con el espectrofotómetro UV-Vis Lambda 365 a una longitud de onda de 600 nm, empleando el grupo B como blanco. Tras la lectura inicial, las muestras continuaron en incubación durante periodos de una hora bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, tomando lecturas de absorbancia al finalizar cada periodo. Cada lectura se tomó por triplicado. Se monitoreó el crecimiento de *E. coli* hasta 14 horas después de su inoculación.

0.7.2. Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de ZnO

0.7.2.1. Aislamiento de células (fibroblastos).

Se aislaron fibroblastos a partir de tejido hepático de roedor. El tejido se colocó en 10 mL de medio 1 (la composición de cada medio se encuentra descrita en las tablas 2, 3, y 4), y se enjuagó repetidamente con el mismo. Posteriormente, se transfirió el tejido a un contenedor pequeño con el interior siliconado, al cual se le añadieron 10 mL del medio 2. El tejido se mantuvo en un baño de temperatura a 37 °C con agitación constante, durante 45 min. Al terminar, se

recuperó todo el contenido y este fue transferido a un tubo falcon con capacidad de 15 mL (T1), consecutivamente, se centrifugó y el sobrenadante obtenido, fue transferido al tubo T2. Después, se añadieron 10 mL del medio 2 al tubo T1 y se resuspendió el contenido repetidas veces, con el fin de disgregar el tejido. Una vez terminado este proceso, ambos tubos se centrifugaron por 10 min a 800 rpm y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, se añadió 1 mL del medio 3 al tubo T1, resuspendiendo el contenido del tubo y transfiriéndolo al tubo T2. Adicionalmente, se le añadieron 10 mL del medio 3 y se centrifugó nuevamente a 800 rpm por 10 min. Por último, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL del medio 3. La solución final se denominó CM.

Tabla 2: Elementos y composición del medio 1 empleado.

Medio 1	
Composición	Cantidad
Solución salina balanceada de Hank (biowest, Cat. # L0605-500)	100 mL
Albúmina	100 mg
L-Glutamina Penicilina/Estreptomicina (100 X) (Omega scientific, Cat. # PG-30)	1 mL

Tabla 3: Elementos y composición del medio 2 empleado.

Medio 2	
Composición	Cantidad
Solución salina balanceada de Hank (Omega west, Cat. # L0605-500)	100 mL
Albúmina	100 mg
L-Glutamina Penicilina/Estreptomicina (100 X)(Omega scientific, Cat. # PG-30)	1 mL
Tripsina-EDTA 10X (biowest, Cat. # X0930-100)	10 mL

Tabla 4: Elementos y composición del medio 3 empleado.

Medio 3	
Composición	Cantidad
Medio de Eagle modificado por Dulbecco alto en glucosa (DMEM) (biowest, Cat. # L0102-500)	100 mL
Suero fetal bovino (biowest)	10 mL
L-Glutamina Penicilina/Estreptomicina (100 X) (Omega scientific, Cat. # PG-30)	1 mL
Insulina 100 u/mL (PiSA)	1 mL

0.7.2.2. Conteo celular

Se tomaron 100 μL de la solución CM (Sección 0.7.2.1) y se diluyeron en 100 μL de azul tripano (Trypan Blue 0.5, biowest), posteriormente, se cargó dicha solución en una cámara de Neubauer y se realizó un conteo celular.

0.7.2.3. Mantenimiento celular

Se añadieron 3×10^6 de células en tres cajas de cultivo, y posteriormente, se añadió medio 3 hasta alcanzar un volumen final de 4 mL en cada caja. Al finalizar el cultivo, las cajas se incubaron a 37 °C y 5% CO_2 durante un periodo de 48 horas. Tras el periodo de incubación, se realizó un cambio de medio utilizando una bomba de vacío. Dicho procedimiento consistió en aspirar el medio de cada caja sin tocar el fondo para evitar despegar las células, y una vez que se aspiró todo el medio, se añadieron 4 mL de medio 3 a cada caja. Al finalizar, se observó el cultivo en el microscopio invertido Olympus para determinar si los fibroblastos se habían adherido a la superficie de la caja de cultivo. Posteriormente, se realizó otro cambio de medio en las siguientes 48 horas para evitar que las células se quedarán sin nutrientes. Tras terminar el cambio de medio, las células se incubaron nuevamente por una semana en las condiciones descritas anteriormente. Una vez que las células se mostraron confluentes, se realizó un pasaje celular. Primero se recolectó todo el medio de las cajas de cultivo y se distribuyó en volúmenes iguales en dos tubos falcon (T3 y T4, respectivamente). Sucesivamente, se depositó 1 mL de tripsina en cada caja de cultivo y se realizaron lavados al fondo de la caja con la misma, repitiendo el proceso tres veces en cada caja. Posteriormente, se recuperó el líquido de las tres cajas y se depositó en un tubo falcon (T5), el cual contenía medio 3 en un volumen similar al de los otros tubos. Los tubos se centrifugaron a 800 rpm por 10 min, y se retiró el sobrenadante dejando 1 mL en cada tubo. Después, se resuspendió el tubo T3, con el fin de pasar el contenido de dicho tubo al tubo T4 y finalmente, se transfirió al tubo T5. Este proceso dio lugar a que el contenido de los tres tubos se encontrara en un solo tubo falcon (tubo control). Posteriormente, se añadió 1 mL de medio 3 a uno de los tubos vacíos y se resuspendió suavemente. Después, el contenido de dicho tubo se paso al tubo control y este proceso se repitió para el tubo restante. Se añadió medio 3 al tubo control hasta llevarlo a un volumen final de 10 mL y, se centrifugó a

800 rpm por 10 min. Al terminar, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el contenido del tubo con 12.5 mL del medio 3, obteniendo la solución madre de células (SM).

0.7.2.4. Ensayo de citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad, se prepararon tres cajas de cultivo como control positivo (CP), las cuales contenían medio 3 y células provenientes de la solución SM en una proporción 3:1 para obtener un volumen final de 4 mL. Además, se establecieron tres grupos experimentales (EC2, EC4 Y EC8), a través de las cuales se evaluó el crecimiento de las células hepáticas, en presencia nanopartículas de ZnO a distintas concentraciones. Para esto, se añadió 1 mL de solución SM y, 3 mL de medio 3. Adicionalmente, se empleó la solución madre de nanopartículas (Sección 0.7.1.1), para obtener tres soluciones distintas con factores de dilución de dos, cuatro y ocho, respectivamente. Posteriormente, a cada muestra experimental se le añadieron 100 μ L de una de las soluciones, de manera que cada factor de dilución estuviera representado por una muestra. Finalmente, se establecieron nueve cajas como control negativo (CN), las cuales contenían medio 3 y nanopartículas en proporciones similares a aquellas encontradas en el grupo anterior. Al terminar de sembrar las células, se incubaron a 37 °C y 5% CO₂. El experimento se mantuvo en curso durante seis días, en los cuales se monitoreó el estado del cultivo. Al final del experimento, las cajas de cultivo se fotografiaron empleando un microscopio invertido. Después de obtener las fotografías, se realizó un conteo celular individual (Sección 0.7.2.2) para cada caja de cultivo que formaba parte del experimento y se registraron los datos obtenidos.

0.7.2.5. Tratamiento estadístico

Se empleó la prueba Kruskal Wallis para determinar si había diferencias significativas entre los grupos experimentales descritos en la tabla 9. Todos los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 9.2.0.

0.7.2.6. Prueba de solubilidad de nanopartículas de ZnO

Se llevó a cabo una prueba para evaluar la solubilidad de las nanopartículas en dos solventes distintos. Primeramente, se realizó el análisis en una solución

etanólica (EtOH) al 0.1 % (Tabla 5) y, posteriormente, se repitió el mismo procedimiento con una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.1 % (Tabla 6). Para preparar dichas soluciones, se utilizó medio DMEM como solvente y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener una solución al 0.1 %. Para la prueba 1 se evaluaron 5 concentraciones diferentes de nanopartículas por triplicado, a cada tubo de ensayo se le añadió la concentración correspondiente de nanopartículas y se añadió la solución etanólica hasta alcanzar un volumen final de 5 mL, y se colocó en un agitador de rotación circular a 185 rpm durante un periodo de 30 min. Una vez que finalizó el periodo de agitación, las muestras se sometieron a un proceso de sedimentación durante 20 min y finalmente, se llevaron al espectrofotómetro UV-Vis Lambda 365 donde se leyó absorbancia a 292 nm. Las pruebas 1 y 2 se realizaron de forma simultánea con procedimientos similares.

Tabla 5: Composición de las muestras empleadas para la prueba de solubilidad 2.

Composición	FD 2	FD 4	FD 8	FD 16	FD 32
EtOH 0.1 % (mL)	3	4.5	5.25	5.625	5.1825
NP (mL)	3	1.5	0.750	0.375	0.1875
Total(mL)	6	6	6	6	6

Tabla 6: Composición de las muestras empleadas para la prueba de solubilidad 1.

Composición	FD 2	FD 4	FD 8	FD 16	FD 32
DMSO 0.1 % (mL)	3	4.5	5.25	5.625	5.1825
NP (mL)	3	1.5	0.750	0.375	0.1875
Total(mL)	6	6	6	6	6

0.8. Resultados

0.8.0.1. Curva de crecimiento de *E. coli* DH5 α en presencia de nanopartículas de ZnO

Tabla 7: Valores de absorbancia del grupo E (n=3) (*E. coli* DH5 α + medio LB+ nanopartículas de ZnO) leídos a 600 nm.

<i>t(h)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Blanco</i>
10:00	0.1698	0.1266	0.0515	0.116	0.06	0.1218
12:00	0.012	0.0196	0.0164	0.016	0.00	0.1218
13:00	0.0138	0.0056	0.0511	0.024	0.02	0.1594
16:00	0.107	0.061	0.0468	0.072	0.03	0.1277
17:00	0.0697	0.1241	0.0647	0.086	0.03	0.1264
19:00	0.1325	0.2982	0.0913	0.174	0.11	0.1264
20:00	0.097	0.0974	0.1031	0.099	0.00	0.1264
21:00	0.2575	0.207	0.0966	0.187	0.08	0.1264

Tabla 8: Valores de absorbancia del grupo C (n=3) (*E. coli* DH5 α + medio LB) leídos a 600 nm.

<i>t(h)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Blanco</i>
10:00	0.01	0.0917	0.1757	0.092	0.07	0.1218
12:00	0.2042	0.2645	0.0814	0.183	0.08	0.1218
13:00	0.3754	0.421	0.1671	0.321	0.11	0.1594
16:00	0.7962	0.7163	0.3511	0.621	0.19	0.1277
17:00	1.0071	0.9463	0.5787	0.844	0.19	0.1264
19:00	1.6788	0.9937	1.23	1.301	0.28	0.1264
20:00	1.2717	1.22	1.2568	1.250	0.02	0.1264
21:00	1.2339	1.4488	1.3182	1.334	0.09	0.1264

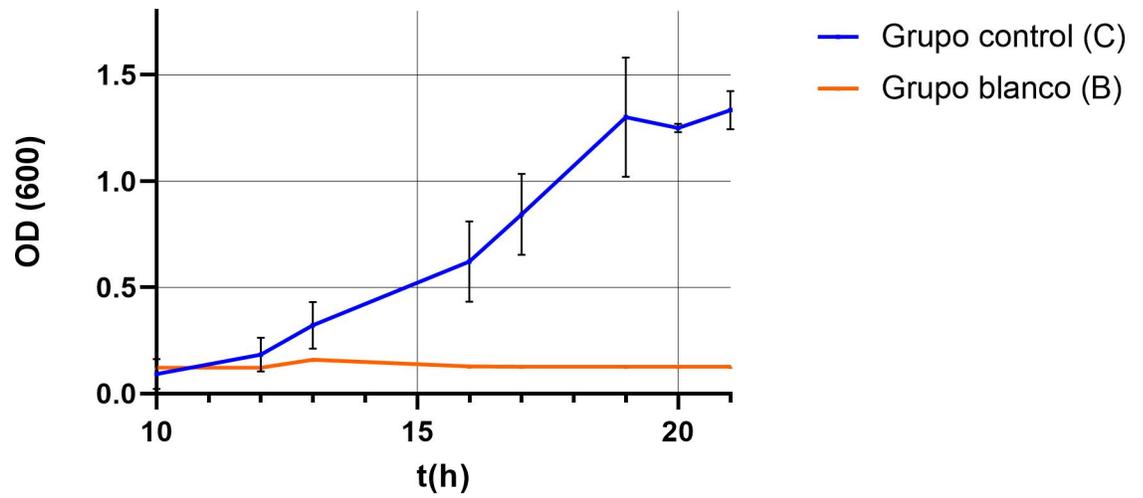


Figura 2: Curva de crecimiento del grupo C (*E. coli* DH5 α + medio LB) comparado con el crecimiento observado en la muestra blanco, durante un periodo de incubación de 14 horas a 37 °C y agitación continua. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos graficados.

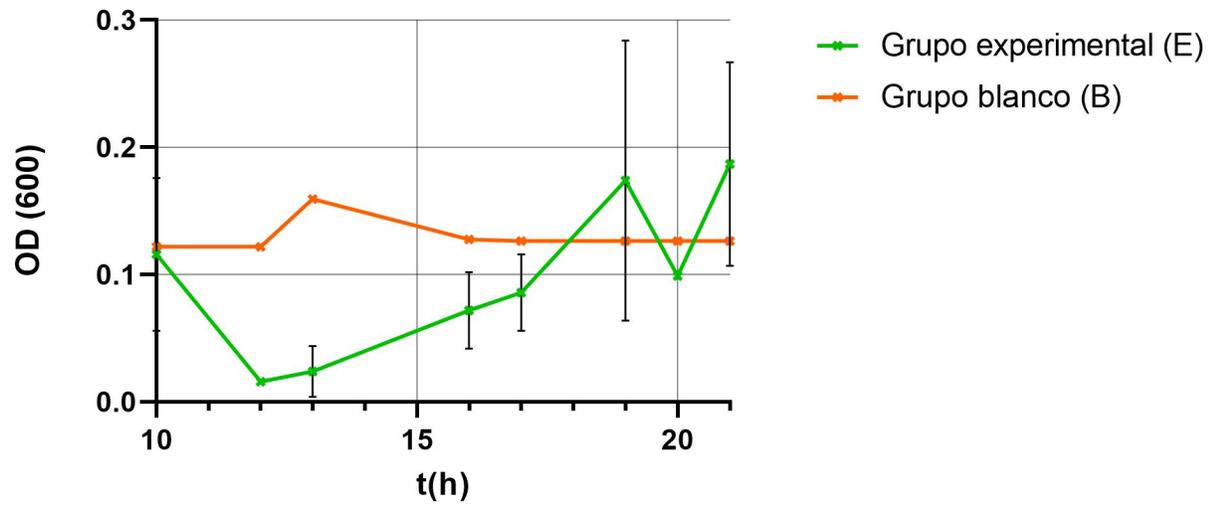


Figura 3: Curva de crecimiento del grupo E (*E. coli* DH5 α + medio LB + nanopartículas de ZnO), durante un periodo de incubación de 14 horas a 37 °C y agitación continua. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos graficados.

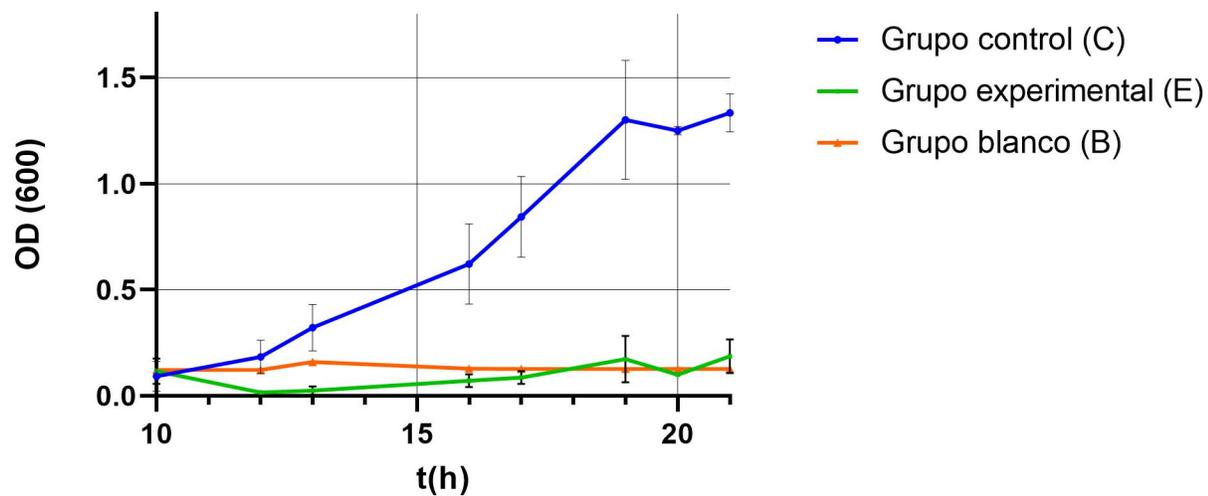


Figura 4: Curva de crecimiento del grupo E (*E. coli* DH5 α + medio LB + nanopartículas de ZnO) comparado con el grupo C (*E. coli* DH5 α + medio LB), durante un periodo de incubación de 14 horas a 37 °C y agitación continua. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos graficados.

0.8.0.2. Conteo celular del cultivo de fibroblastos de roedor en presencia de nanopartículas de ZnO

Tabla 9: Efecto en la concentración celular del cultivo primario de fibroblastos de roedor al exponerse a distintas concentraciones de nanopartículas de ZnO.

Grupo experimental	No. De muestra	No. De células	FD	Concentración (cel/mL)
Control	1	1265	199	5.05E+08
	2	532	199	7.36E+08
	Promedio	898.5	Promedio	6.21E+08
	Desviación estándar	518.31	Desviación estándar	1.63E+08
EC2	1	1314	100	1.64E+08
	2	1000	50.5	1.25E+08
	3	4107	199	2.59E+08
	Promedio	2140.3	Promedio	1.83E+08
EC4	Desviación estándar	1710.40	Desviación estándar	6.90E+07
	1	1265	199	3.15E+08
	2	532	199	1.32E+08
	3	584	199	1.45E+08
EC8	Promedio	793.6	Promedio	1.97E+08
	Desviación estándar	409.01	Desviación estándar	1.02E+08
	1	316	199	7.86E+08
	2	508	199	1.26E+08
ECS	3	523	199	1.30E+08
	Promedio	449	Promedio	3.48E+08
	Desviación estándar	115.43	Desviación estándar	3.80E+08

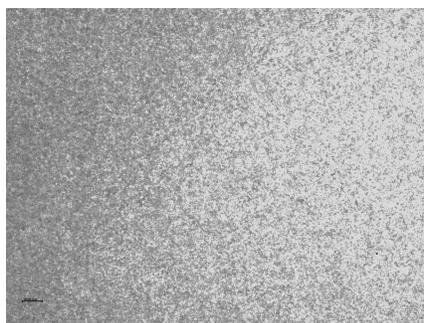


Figura 5: Cultivo de células de roedor observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.

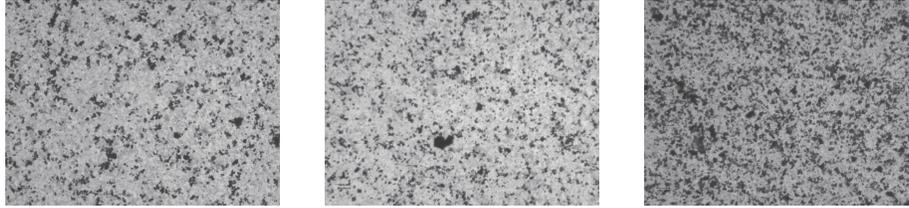


Figura 6: Grupo experimental EC2 (células de roedor + nanopartículas de ZnO con un factor de dilución de 2) observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.

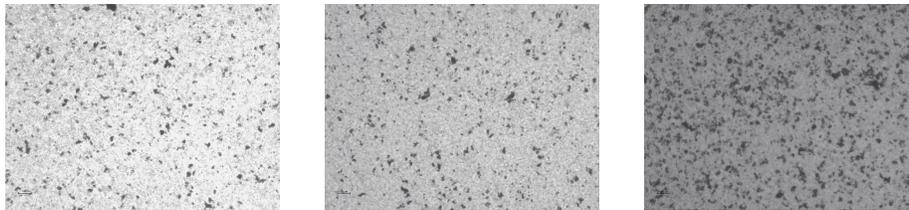


Figura 7: Grupo experimental EC4 (células de roedor + nanopartículas de ZnO con un factor de dilución de 4) observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.

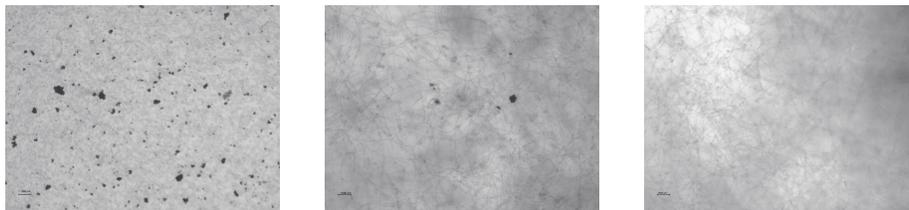


Figura 8: Grupo experimental EC8 (células de roedor + nanopartículas de ZnO con un factor de dilución de 8) observado con el microscopio invertido Olympus, con una magnificación de 10 x.

Tratamientos cultivo primario ratón + nanopartículas

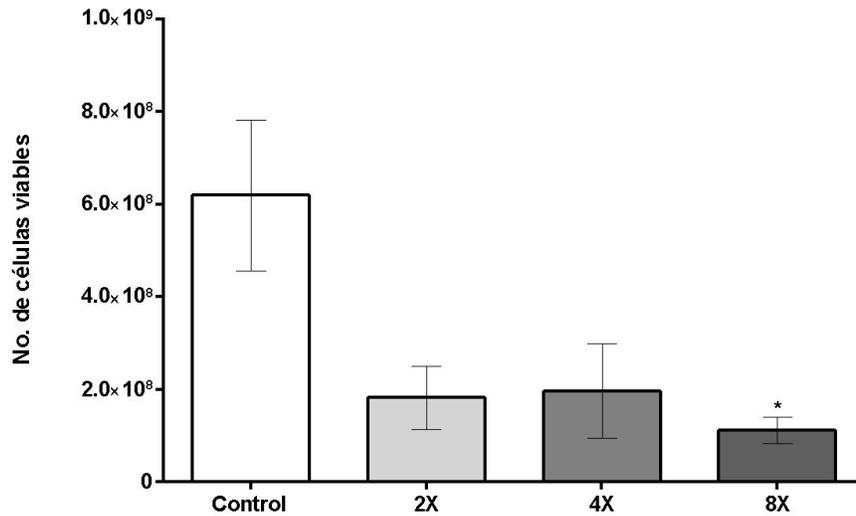


Figura 9: Análisis estadístico de las diferencias encontradas entre el no. de células viables en el cultivo celular expuesto a distintas concentraciones de nanopartículas de ZnO. El símbolo de asterisco representa una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental EC8.

0.8.0.3. Pruebas de solubilidad de las nanopartículas de ZnO en distintos solventes orgánicos.

Tabla 10: Valores de absorbancia de la prueba de solubilidad de nanopartículas de ZnO disueltas en EtOH al 0.1 % leídas a 292 nm.

Solvente: EtOH 0.1 %

Prueba 1	FD 2	FD 4	FD 8	FD 16	FD 32
1	0.077	0.136	-0.375	-0.474	-0.447
2	-0.0389	-0.436	-0.242	-0.257	-0.448
3	0.786	0.661	-0.458	-0.482	-0.241

Tabla 11: Valores de absorbancia de la prueba de solubilidad de nanopartículas de ZnO disueltas en DMSO al 0.1 % leídas a 292 nm.

Solvente: DMSO 0.1 %

Prueba 2	FD 2	FD 4	FD 8	FD 16	FD 32
1	-0.426	-0.166	-0.431	-0.375	-0.397
2	-0.314	-0.36	-0.155	-0.177	-0.156
3	-0.175	-0.126	-0.467	-0.396	-0.41



Figura 10: Nanopartículas metálicas de ZnO en EtOH al 0.1 % tras someterse a un periodo de agitación de 30 min a 185 rpm.

0.9. Discusión

La hipótesis establecida en este estudio plantea que las nanopartículas de ZnO son capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli in vitro*, bajo las condiciones experimentales establecidas, por lo que, al analizar los resultados obtenidos, es posible determinar que a una concentración de 0.45275 g/mL, las nanopartículas de ZnO presentan actividad antimicrobiana ante *E. coli*. El efecto de las nanopartículas de ZnO en el crecimiento bacteriano se puede observar en la

figura 3, donde el grupo C sigue una curva de crecimiento bacteriano típica ($\mu_m=2.1$ $td=0.33$) (Singh & Satyanarayana, 2017), mientras que, el grupo E mantiene valores similares a aquellos observados en el grupo B, el cual no fue inoculado con ningún microorganismo. Con base a esto, se puede establecer que hay una diferencia significativa entre el crecimiento observado en el grupo E y el grupo C, ya que, si bien, ambos cultivos fueron inoculados al mismo tiempo e iniciaron con valores de OD similares en la primera lectura, después de tres horas, se observó que los valores del grupo C aumentaron conforme el tiempo, a diferencia del grupo E, el cual mostró una disminución considerable después de la primera lectura. Estudios realizados anteriormente han demostrado comportamientos inhibitorios similares en nanopartículas de ZnO. En particular, Shinde (2015) evaluó las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de ZnO en un intervalo de concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a diferencia de los 0.452 mg/mL examinados en esta investigación. A pesar de que se estudió el comportamiento de las nanopartículas en condiciones distintas, ambas investigaciones arrojaron que la viabilidad del cultivo disminuía significativamente conforme aumentaba la concentración de las nanopartículas. Específicamente, se encontró que a concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el crecimiento bacteriano mostraba un comportamiento similar al del grupo experimental observado en este estudio.

Los resultados descritos anteriormente pueden ser atribuidos a la interacción entre las células cargadas negativamente y los iones de Zn^{2+} provenientes de las nanopartículas (Dadi *et al.*, 2019), ya que se ha demostrado que bacterias como *E. coli*, presentan mayor sensibilidad ante nanopartículas que actúan bajo este mecanismo, debido a las características de su pared celular (Aldeen, Mohamed & Maaza 2021). Dichas interacciones electro-estáticas facilitan la penetración de las nanopartículas a través de la pared celular, causando daño a los componentes celulares. De manera similar, el mecanismo descrito anteriormente, da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno, estas tienen la habilidad de permitir que los iones metálicos interactúen libremente con las estructuras celulares (tales como ADN, proteínas, membranas, etc.) interrumpiendo las funciones celulares (Sánchez-López *et al.*, 2020), lo cual ocasiona la muerte celular. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el decremento en el crecimiento bacteriano haya sido provocado por algún tipo de daño mecánico, producto de la agitación continua a la cual se sometió el cultivo y las nanopartículas de ZnO, por lo que, es

necesario evaluar su comportamiento en medio sólido, para identificar si hay diferencia significativa entre los resultados. Estudios previos han demostrado que las nanopartículas de ZnO presentan un efecto inhibitorio menor en comparación con otras nanopartículas de óxido metálico, cuando son evaluadas en placas (Dadi *et al.*, 2019).

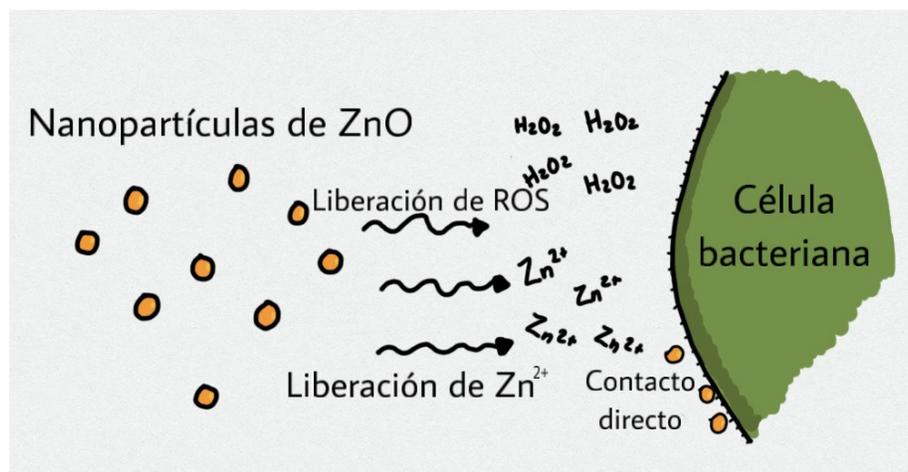


Figura 11: Mecanismos de acción antimicrobianos y citotóxicos de las nanopartículas de ZnO (Dimapilis *et al.*, 2018).

Por otro lado, se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas de ZnO en fibroblastos de roedor aislados de tejido hepático. Dentro de los cuatro grupos experimentales evaluados (Tabla 9), se observó una disminución considerable en la viabilidad celular entre los grupos que fueron expuestos a las nanopartículas de ZnO, en comparación con el grupo control. Además, tras el análisis estadístico (Figura 8), se pudo identificar que el grupo control fue significativamente diferente a los grupos expuestos a las nanopartículas, con base a esto, se puede inferir que las nanopartículas de ZnO afectan de alguna forma la funcionalidad celular del cultivo evaluado, sin embargo, se requieren análisis más profundos para poder determinar los efectos específicos. Al igual que con las propiedades antimicrobianas, el efecto citotóxico de las nanopartículas puede ser atribuido a la liberación de iones de Zn^{2+} , ya sea antes o después de que las nanopartículas entren a la célula (Brunner *et al.*, 2006), causando estrés oxidativo en la misma. Cabe mencionar que a pesar de que se atribuyan mecanismos de acción similares tanto en bacterias como en células animales, se pudieron identificar diferencias

en el efecto que las nanopartículas tenían sobre su crecimiento. Por ejemplo, fue posible identificar que a concentraciones de 0.45275 g/mL las nanopartículas detenían el crecimiento por completo, a diferencia del cultivo de células animales, en donde se pudo observar proliferación celular en todos los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de nanopartículas.

Además de lo descrito anteriormente, los resultados observados en la figura 8 muestran una diferencia significativa entre el grupo EC8 y los dos grupos expuestos a las nanopartículas. A pesar de que dicho grupo poseía una concentración menor de nanopartículas, los datos arrojados mostraron que había una cantidad menor de células viables que aquellas observadas en los grupos experimentales restantes. A través de estos resultados se puede determinar una relación entre la concentración de las nanopartículas y la toxicidad que muestran ante el cultivo celular. Se cree que este resultado es producto del hecho de que las partículas más pequeñas tienden a ser más tóxicas debido a que pueden penetrar con mayor facilidad la pared celular, ya que se ha demostrado que los conglomerados de nanopartículas muy grandes, no son capaces de entrar a la célula dando lugar a una adsorción no específica en la superficie celular. Cuando esto sucede, dichos conglomerados no presentan citotoxicidad y en su lugar, promueven el crecimiento celular (Cui, *et al.*, 2012; Patil & Kim 2016). La aglomeración de las nanopartículas en el grupo experimental EC8, se observa en la figura 8, donde se puede ver que las nanopartículas de ZnO se encuentran más dispersas, que aquellas presentes en las figuras 5, 6 y 7. A partir de esto, se puede inferir una correlación entre la concentración de las nanopartículas y su tendencia a formar aglomeraciones. Dicha tendencia representa un problema para la aplicación de las nanopartículas como un agente antibacteriano, debido a que su actividad biológica y reactiva es fuertemente dependiente de su tamaño (Espitia *et al.*, 2013). Con el fin de evaluar esta propiedad de las nanopartículas de ZnO, se realizaron pruebas de solubilidad en medio DMEM adicionado con distintos solventes orgánicos (Tabla 5, 6). Al analizar los resultados obtenidos, fue posible encontrar que los valores de absorbancia medidos no mostraron variabilidad entre las concentraciones de nanopartículas de ZnO evaluadas (Tabla 8, 7). Además, mediante el análisis visual de las muestras (Figura 10), se pudo observar que tras someter a las nanopartículas al periodo de agitación, estas aún tendían a precipitarse en el tubo de ensayo. A través de esto, se puede inferir que en los medios evaluados las nanopartículas presentan de baja a nula solubilidad.

Se estima que este comportamiento, puede ser atribuido al efecto que tiene el método de síntesis de las nanopartículas en sus propiedades, así como, las condiciones del ambiente en el que se encuentran, tales como; la presencia de materia orgánica, la fuerza iónica, o el pH del medio (Stebounova *et al.*, 2011). Dicho esto, es necesario evaluar las propiedades de solubilidad de las nanopartículas de ZnO en otras condiciones para encontrar el vehículo ideal para su aplicación, debido a su incapacidad para solubilizarse en condiciones biológicas.

0.10. Conclusiones

La hipótesis establecida en este estudio plantea que las nanopartículas de ZnO son capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli in vitro*, bajo las condiciones experimentales establecidas, por lo que, al analizar los resultados obtenidos, es posible determinar que a una concentración de 0.45275 g/mL, las nanopartículas de ZnO presentan actividad antimicrobiana ante *E. coli*. Los resultados descritos anteriormente pueden ser atribuidos a la interacción entre las células cargadas negativamente y los iones de Zn^{2+} provenientes de las nanopartículas.

Por otro lado, se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas de ZnO en fibroblastos de roedor aislados de tejido hepático. Dentro de los grupos experimentales evaluados, se observó una disminución considerable en la viabilidad celular entre los grupos que fueron expuestos a las nanopartículas de ZnO, en comparación con el grupo control. En contraste, los resultados descritos en la figura 8 muestran una diferencia significativa entre el grupo EC8 y los dos grupos expuestos a las nanopartículas. A pesar de que había una concentración menor de nanopartículas en este grupo, los datos arrojados muestran una cantidad menor de células viables que aquellas observadas en los grupos experimentales restantes.

Por último, se evaluó la solubilidad de las nanopartículas de ZnO en distintos solventes orgánicos (Tabla 5, 6). Ambas pruebas arrojaron lecturas de absorbancia similares (Tabla 8, 7) en todas las concentraciones de nanopartículas evaluadas, a través los cuales, se puede inferir que en los medios evaluados las nanopartículas presentan de baja a nula solubilidad. De igual manera, la inspección visual de las muestras (Figura 10) permitió confirmar que las nanopartículas no se solubilizaron en los solventes empleados y que estas se precipitaron en los tubos de ensayo. Dicho esto, es necesario evaluar las propiedades de

solubilidad de las nanopartículas de ZnO en otras condiciones para encontrar el vehículo ideal para su aplicación, debido a su incapacidad para solubilizarse en condiciones biológicas.

0.11. Referencias

Aldeen, T. S., Mohamed, H. E. A., & Maaza, M. (2021). ZnO nanoparticles prepared via a green synthesis approach: Physical properties, photocatalytic and antibacterial activity. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 110313.

Antoñanzas, F., & Goossens, H. (2019). The economics of antibiotic resistance: a claim for personalised treatments.

Bankier, C., Matharu, R. K., Cheong, Y. K., Ren, G. G., Cloutman-Green, E., & Ciric, L. (2019). Synergistic antibacterial effects of metallic nanoparticle combinations. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.

Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., ... & Stark, W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science & technology*, 40(14), 4374-4381.

Buszewski, B., Railean-Plugaru, V., Pomastowski, P., Rafińska, K., Szultka-Mlynska, M., Golinska, P., ... & Dahm, H. (2018). Antimicrobial activity of bio-silver nanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(1), 45-54.

CDC (2013). ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES, 2013. Recuperado el 20 Sep 2021, de <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

CDC (2019). ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES, 2019. Recuperado el 20 Sep 2021, de <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>

Chen, J., Li, Y., Zhang, K., & Wang, H. (2018). Whole-genome sequence of phage-resistant strain *Escherichia coli* DH5. *Genome announcements*, 6(10), e00097-18.

Cui, W., Li, J., Zhang, Y., Rong, H., Lu, W., & Jiang, L. (2012). Effects of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(1), 46-53.

Dadi, R., Azouani, R., Traore, M., Mielcarek, C., & Kanaev, A. (2019). Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram positive and gram negative strains. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109968. Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.

de Souza, M. E., Verdi, C. M., de Andrade, E. N., & Santos, R. C. (2019). Antiviral and antimicrobial (antibacterial) potentiality of nano drugs. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems* (pp. 327-342). Elsevier.

Dimapilis, E. A. S., Hsu, C. S., Mendoza, R. M. O., & Lu, M. C. (2018). Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research*, 28(2), 47-56.

Doran, P. M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles* Boston. Encyclopedia Britannica, Inc. (2016). Antimicrobial agent Encyclopedia Britannica. Recuperado 4 de junio de 2020, de <https://www.britannica.com>

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

Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F. F., Teófilo, R. F., Vitor, D. M., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., ... & Medeiros, E. A. A. (2013). Optimized

dispersion of ZnO nanoparticles and antimicrobial activity against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *Journal of nanoparticle research*, 15(1), 1-16.

Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. doi:10.1016/j.jiph.2016.08.00

Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2).

Gopal, J., Chun, S., Anthonydhasan, V., Jung, S., Mwang'ombe, B. N., Muthu, M., & Sivanesan, I. (2018). Assays evaluating antimicrobial activity of nanoparticles: a myth buster. *Journal of Cluster Science*, 29(2), 207-213.

Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008

Iqbal, Y., Malik, A. R., Iqbal, T., Aziz, M. H., Ahmed, F., Abolaban, F. A., ... & Ullah, H. (2021). Green synthesis of ZnO and Ag-doped ZnO nanoparticles using *Azadirachta indica* leaves: characterization and their potential antibacterial, antidiabetic, and wound-healing activities. *Materials Letters*, 130671.

Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., & Manna, A. C. (2008). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS microbiology letters*, 279(1), 71-76.

Liu, Y., & Breukink, E. (2016). The membrane steps of bacterial cell wall synthesis as antibiotic targets. *Antibiotics*, 5(3), 28. Moellering Jr, R. C. (2011). Discovering new antimicrobial agents. *International journal of antimicrobial agents*, 37(1), 2-9.

Manzo, S., Miglietta, M. L., Rametta, G., Buono, S., & Di Francia, G. (2013). Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Science of the Total Environment*, 445, 371-376.

Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7, 546.

Patil, M. P., & Kim, G.-D. (2016). Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 79–92. doi:10.1007/s00253-016-8012-8

Polle, J. E., Tran, D., & Ben-Amotz, A. (2009). History, distribution, and habitats of algae of the genus *Dunaliella Teodoresco* (Chlorophyceae). *The alga Dunaliella*, 1-14.

Powers, J. H. (2004). Antimicrobial drug development—the past, the present, and the future. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 23-31.

Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., & Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(21), 213902. doi:10.1063/1.2742324

Rehman, K., Niaz, S., Tahir, A., & Akash, M. S. H. (2020). Microorganisms and antibiotic production. *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*, 1–6. doi:10.1016/b978-0-12-818882-8.00001-2

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.

Sahu, D., Kannan, G. M., Tailang, M., & Vijayaraghavan, R. (2016). In vitro cytotoxicity of nanoparticles: a comparison between particle size and cell type. *Journal of Nanoscience*, 2016.

Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., ... & Souto, E. B. (2020). Metal-based nanoparticles as an-

timicrobial agents: an overview. *Nanomaterials*, 10(2), 292.

Shi, L. E., Li, Z. H., Zheng, W., Zhao, Y. F., Jin, Y. F., & Tang, Z. X. (2014). Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(2), 173-186.

Shinde, S. S. (2015). Antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi. *Sci Med Central*, 3, 1033.

Singh, B., & Satyanarayana, T. (2017). Basic Microbiology. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 1–31. doi:10.1016/b978-0-444-63668-3.00001-9

Singh, K., Mishra, A., Sharma, D., & Singh, K. (2019). Antiviral and antimicrobial potentiality of nano drugs. In *Applications of targeted nano drugs and delivery systems* (pp. 343-356). Elsevier.

Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., ... & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*, 7(3), 219-242.

Stankic, S., Suman, S., Haque, F., & Vidic, J. (2016). Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of nanobiotechnology*, 14(1), 1-20.

Stebounova, L.V., Guio, E. & Grassian, V.H. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *J Nanopart Res* 13, 233–244 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0022-3>

Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Morrell-Falvey, J. L., Gu, B., & Doktycz, M. J. (2012). Cytotoxicity Induced by Engineered Silver Nanocrystallites Is Dependent on Surface Coatings and Cell Types. *Langmuir*, 28(5), 2727–2735. doi:10.1021/la2042058

Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*, 12, 1227.

Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329(5993), 796-799.

Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed research international*, 2014.