

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO**

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



TESIS

**Síntesis, caracterización y citotoxicidad de nanopartículas semiconductoras
de óxido de zinc**

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

Leslie Patrón Romero

Director:

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Codirector:

Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes

Ensenada, Baja California, México, diciembre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO


Síntesis, caracterización y citotoxicidad de nanopartículas semiconductoras de óxido de zinc

TESIS


Que para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS
presenta:


Leslie Patrón Romero


Aprobada por:


Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Director de tesis


Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes
Codirector de tesis


Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Miembro del comité


Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez
Miembro del comité


Dr. Ricardo Valdez Castro
Miembro del comité

Ensenada, Baja California, México, diciembre, 2022

I. DEDICATORIA

A mis mentores el Dr. Alfredo Luque y Dr. Horacio Almanza, porque sin su guía, este proyecto no sería una realidad. Dedico también este logro académico a mis profesoras y profesores de la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, me quedo con todo el aprendizaje compartido en las aulas, pero también con su pasión por la enseñanza y dedicación a la investigación. Dedico este logro a mis abuelos y abuelas, a mis progenitores, a mis hijas Natalia y Rebecca.

II. AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente al Dr. Alfredo Luque y al Dr. Horacio Almanza, por confiar en mí, desde la gestación de esta investigación hasta su culminación, no solo me quedo con el conocimiento científico que compartieron conmigo, sino me quedó también, con su calidad humana, su entusiasmo por la investigación, por fomentar el avance de la ciencia en nuestro país y por formar día con día a otros estudiantes. Extiendo con este escrito mi gran admiración al Dr. Almanza y al Dr. Luque por ser grandes investigadores e innovadores de ciencia.

Agradezco al comité que me permitió ingresar al programa, que me permitió ganar aprendizaje y experiencia en esta línea de investigación tan relevante. Agradezco también a la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme realizar el Doctorado en Ciencias y así alcanzar otros de mis sueños académicos.

Finalmente agradezco a mis progenitores, sin su apoyo este logro hubiese sido imposible, gracias también a mis hijas porque aun siendo pequeñas me apoyan incondicionalmente.

III. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A549	Células derivadas de carcinoma bronco-alveolar humano
C	Centígrado
C2C12	Células musculares de mioblasto de ratón de la cepa C3H
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
HRTEM	Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución
ICDD	International Centre for Diffraction Data (1978)
IR	Infrarrojo
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards (1969)
L929	Células de tejido adiposo de ratón de la cepa C3H
h	Hora
µg	Microgramo
mL	Mililitro
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nm	Nanómetro
NP	Nanopartícula
NPs	Nanopartículas
ROS	Especies reactantes de oxígeno
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta-visible
XRD	Difracción rayos X
ZnO	Óxido de zinc
ZnONPs	Nanopartículas de óxido de zinc

IV. RESUMEN

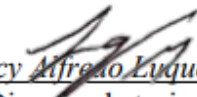
RESUMEN de la tesis de **LESLIE PATRÓN ROMERO** presentada como requisito parcial para la obtención del grado DOCTOR EN CIENCIAS del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México, diciembre del 2022.

Síntesis, caracterización y citotoxicidad de nanopartículas semiconductoras de óxido de zinc

El uso de nanopartículas (NPs) ha aumentado considerablemente debido a sus aplicaciones casi universales, como los campos de la electrónica, la óptica, la farmacéutica, la biomédica y la energía, que se han expandido rápidamente durante las últimas décadas. Debido a las aplicaciones generalizadas de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs), ha aumentado la exposición potencial de trabajadores, consumidores y científicos a estas partículas. En este proyecto de tesis doctoral, realizamos la síntesis de ZnONPs a través de un método ecológico, sustentable y de bajo costo, donde el extracto de *Beta vulgaris* se utilizó como agente reductor. En este estudio, evaluamos la toxicidad de ZnONPs *in vitro* en dos líneas celulares de fibroblastos de ratón C2C12 y líneas celulares de mioblastos L929 y linfocitos humanos de sangre periférica (HLPB), utilizando el método de exclusión de colorante azul tripán. El método de ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) solo se utilizó en las líneas celulares C2C12 y L929 después de 24 h de exposición. Los resultados muestran que el tamaño de las ZnONPs es entre 16 y 24 nm, con estructura cristalina hexagonal y morfología semiesférica. Los efectos tóxicos de las ZnONPs se analizaron en las dos líneas celulares después de un período de incubación de 24 y 48 h. El valor de TC_{50} ZnONPs se calculó después de una exposición de 24 h, que se encontró entre 28 y 37 $\mu\text{g/mL}$ y 20–30 $\mu\text{g/mL}$ con una exposición de 48 h. El valor de viabilidad se reportó como no tóxico a concentraciones de 1×10^{-6} – 1×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$.

Palabras clave: Zinc oxide; Síntesis verde; Nanopartículas; *Beta vulgaris*; citotoxicidad

Aprobada por:


Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Director de tesis

ÍNDICE

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	3
1.2. ANTECEDENTES	5
1.2.1. Clasificación de nanopartículas	5
1.2.2. Propiedades generales de las nanopartículas	7
1.2.3. Métodos de biosíntesis de ZnONPs	8
1.2.4. Citotoxicidad de las ZnONPs.....	10
1.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	12
1.3.1. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	12
1.3.2. Espectro FTIR del óxido de zinc	15
1.3.3. Difracción de rayos X (XRD).....	16
1.3.4. Patrón de difracción experimental de las ZnONPs.....	17
1.3.5. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)	17
1.4. APLICACIONES DE LAS ZnONPs.....	20
1.4.1. Industria alimentaria	20
1.4.2. Detección de bacterias mediante nanopartículas bioconjugadas	20
1.4.3. Liberación de fármacos con ZnONPs.....	22
1.4.4. Liberación de ácidos nucleicos (ADN/ARN) con nanomateriales de ZnO	23
1.4.5. Nanopartículas de zinc y actividad antitumoral.....	24
1.5. JUSTIFICACIÓN	26
1.6. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	28
1.6.1. Objetivo general.....	28
1.6.2. Objetivos específicos	28
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1.1. Síntesis de ZnONPs	30
2.1.2. Caracterización de ZnONPs.....	30
2.1.3. Ensayo de viabilidad celular	30
2.1.4. Determinación de la viabilidad celular	31
2.1.5. Metodología experimental	31
2.1.6. Tratamiento de las líneas celulares	31
2.1.7. Método de exclusión con el colorante azul de tripáno.....	32
2.1.8. Análisis estadístico.....	32
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1. Caracterización de las ZnONPs por FTIR	34
3.2. Caracterización de las ZnONPs por XRD	35
3.3. Caracterización de las ZnONPs por HR-TEM.....	36
3.4. Ensayo de viabilidad celular	37
3.5. Exclusión con el colorante azul de tripáno	38
3.6. Cinética celular de ZnONPs en líneas celulares L929 y C2C12	39
3.7. DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	44
CAPÍTULO V. REFERENCIAS	46

CAPÍTULO VI. ANEXOS.....6

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Síntesis verde de ZnONPs y agentes reductores.....9
Tabla 2. Estudios de citotoxicidad en diferentes líneas celulares de eucariotas.11
Tabla 3. Líneas celulares tumorales expuestas a ZnONPs para análisis de citotoxicidad y
daño mitocondrial25
Tabla 4. Citotoxicidad de ZnONPs (ensayo de azul tripáno).39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones.....6
Figura 2. Clasificación de los nanomateriales según su morfología.....8
Figura 3. Síntesis verde de ZnONPs mediada por plantas y extractos..10
Figura 4. Esquema de un espectrofotómetro de doble haz de radiación IR.....13
Figura 5. Espectros FTIR de extracto acuoso de hoja de *S. officinalis*.....14
Figura 6. Espectros FTIR de ZnONPs a 400 °C a 30, 60, 120 min y 240 min.....15
Figura 7. Patrón XRD para las ZnONPs.....17
Figura 8. Esquema y fotografía del microscopio electrónico de transmisión.....18
Figura 9. Imagen HR-TEM de las ZnONPs e histograma de distribución del tamaño.19
Figura 10. HR-TEM de bacteria incubadas con NPs bioconjugadas.....21
Figura 11. Espectro FTIR de ZnONPs obtenidas de extracto de betabel.34
Figura 12. Patrón de difracción de rayos X de las ZnONPs.....35
Figura 13. Estudio de morfología de las ZnONPs,36
Figura 14. Líneas celulares expuestas a ZnONPs..... 37
Figura 15. Estudio de cinética celular de las ZnONPs en células L929.....40
Figura 16. Estudio de cinética celular de las ZnONPs en células C2C12.....41

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La exploración de diversos métodos de síntesis ha facilitado fabricar y procesar diversos nanomateriales, nanopartículas (NPs) y nanoestructuras, el estudio, síntesis, caracterización y aplicación de estos métodos es conocido como nanotecnología. Los materiales nanoestructurados son aquellos, con una dimensión o escala del orden de nanómetros (nm). Aunque se ha observado que solo aquellos menores o iguales a 100 nm presentan cambios en sus propiedades físicas como consecuencia del tamaño, también se ha encontrado que dimensiones mayores poseen propiedades particulares y son importantes por múltiples aplicaciones [1]. Las NPs metálicas, poseen propiedades únicas a escala macroscópica; entre ellas, la conductividad eléctrica, propiedades magnéticas, ópticas y catalíticas, lo que las hacen candidatas a innumerables aplicaciones en todos los campos de la tecnología. Dentro de las más empleadas, se encuentran las NPs de plata, oro, cobre y zinc. Las aplicaciones de las NPs metálicas han impactado, prácticamente todos los aspectos de la vida diaria, generando múltiples líneas de investigación y dando como resultado un crecimiento exponencial en el número de publicaciones y evidencia científica en las últimas cuatro décadas [1-4].

Dentro de la industria de las NPs metálicas, la producción de las NPs de óxido de zinc (ZnO) es la tercera más prolífica. Las múltiples aplicaciones de las NPs de ZnO (ZnONPs) han proporcionado avances en la elaboración de productos electrónicos, sanitarios, cosméticos y además en la industria alimentaria, proporcionando mayor seguridad y estabilidad, que la que poseen los productos orgánicos convencionales. En el área de la microbiología, las ZnONPs poseen múltiples aplicaciones, debido a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. En el campo médico, las ZnONPs también ha facilitado el desarrollo de nuevas terapias coadyuvantes en tratamientos oncológicos, debido a sus propiedades antitumorales [5-9]. Numerosa evidencia científica, muestra la eficacia de las ZnONPs *in vitro* e *in vivo* para enfermedades tumorales, considerando el tamaño, dosis y tiempo de exposición a las ZnONPs reduce la viabilidad celular en líneas oncológicas.

La importancia del uso ZnONPs está relacionada con los avances en la generación de nuevos materiales en medicina, así como sus múltiples aplicaciones, tales como, en el transporte de fármacos, liberación de ácidos nucleicos (ADN y ARN), industria química, terapia

fotodinámica y biotecnología entre otros [5-9]. Debido a las numerosas aplicaciones de las ZnONPs en la vida cotidiana, la exposición a estas es inevitable, por lo tanto, hacen necesaria la realización de estudios con el objetivo de evaluar su toxicidad y determinar si existe un riesgo para la salud en el ser humano u otros sistemas biológicos.

Lin W, y colaboradores en 2009, reportaron que las ZnONPs redujeron significativamente la viabilidad celular de una manera dependiente de dosis, en células derivadas de carcinoma bronco-alveolar humano (A549) [10]. Heng y colaboradores en 2011, estudiaron la toxicidad y el potencial inflamatorio de ZnONPs en líneas celulares derivadas de ratón y humano (RAW-264.7 y BEAS-2B), los resultados demostraron, que la citotoxicidad fue dependiente de la concentración y la morfología de las ZnONPs para todas las líneas celulares evaluadas [11]. Jingyuan Li, y colaboradores en 2010, estudiaron el efecto citotóxico de las ZnONPs en las líneas SMMC-7721, confirmando que, a mayor dosis y tiempo de exposición, menor viabilidad celular [12]. Recientemente Zhao C, y colaboradores en 2018, concluyeron que las ZnONPs promueven citotoxicidad dependiente de la concentración frente a líneas celulares de cáncer de páncreas [13].

Como se describió anteriormente se han realizado una gran cantidad de estudios sobre la toxicidad de las ZnONPs con diferentes líneas celulares; sin embargo, algunos resultados reportados son contradictorios, en particular en términos de tamaño de las NPs que condicionan su citotoxicidad. Por lo tanto, la toxicidad de las ZnONPs aún queda por esclarecerse, y hace necesaria, una evaluación toxicológica más extensa para confirmar los diferentes resultados *in vitro*. El presente trabajo de investigación tiene como objetivo sintetizar ZnONPs por metodología de química verde, caracterizarlas y evaluar su citotoxicidad *in vitro* usando líneas celulares de fibroblastos de ratón (C2C12 y L929), además de linfocitos humanos.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Clasificación de nanopartículas

Las NPs se clasifican considerando su dimensionalidad, morfología, alineación, regularidad y acumulación. La estructura, composición y la morfología de las NPs es de

suma relevancia puesto que determina su funcionalidad y efecto tóxico sobre el medio ambiente y los seres humanos. En función de la dimensionalidad, las NPs pueden clasificarse en cero-dimensionales, unidimensionales, bidimensionales y tridimensionales como se muestra en la Figura 1. Las NPs unidimensionales contienen películas finas que se utilizan en dispositivos electrónicos y sensores. Las nanopartículas bidimensionales comprenden nanotubos de carbono que tienen una gran capacidad de adsorción y estabilidad. Como ejemplo de las NPs tridimensionales se encuentran los dendrímeros y policristales. Por lo tanto, dependiendo de la morfología, las nanopartículas pueden tener una estructura plana, esférica y cristalina. Además, pueden estar presentes en forma simple o en forma de nanocompuestos. Según su origen, se clasifican en naturales o artificiales [14].

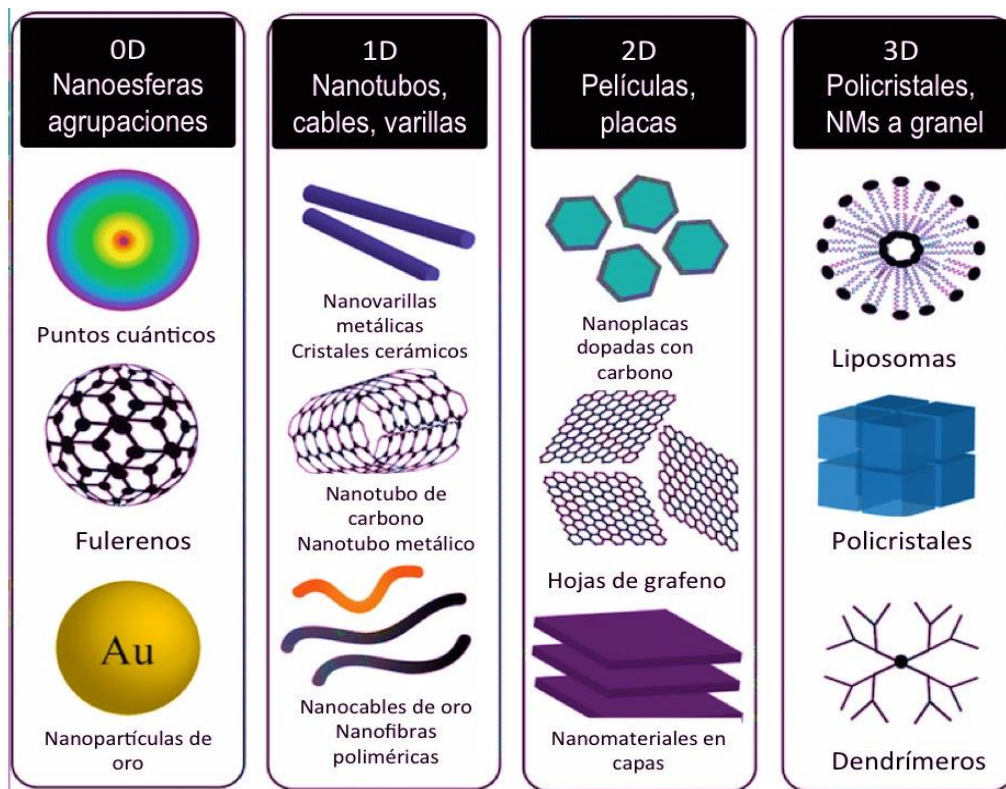


Figura 1. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones. Imagen modificada de Poh y colaboradores 2018, donde se muestra la clasificación de diferentes nanomateriales según sus dimensiones [15].

1.2.2. Propiedades generales de las nanopartículas

Las principales propiedades de las NPs son las siguientes:

- a. **Superficie.** Se ha comprobado que las propiedades varían con el tamaño de las partículas, es decir entre más pequeña la NPs mayor es el efecto y toxicidad, debido a mayor superficie de reactividad [16].
- b. **Tamaño:** Las propiedades de las NPs cambian con el tamaño. Los notables cambios en la estructura electrónica hacen que numerosas propiedades de los objetos manométricos dependan de su tamaño. Por ejemplo, la fase cristalina más estable y las propiedades electrónicas del material dependen del tamaño.
- c. **Propiedades ópticas.** Las nanopartículas tienden a tener propiedades ópticas particulares, ya que son lo suficientemente pequeñas como para limitar el grosor de la capa de electrones común de los metales; este fenómeno genera efectos cuánticos.
- d. **Uniformidad.** Los racimos, agregados o filamentos, es decir, los conjuntos moleculares o atómicos que forman las NPs, se definen por la interacción de fuerzas entre las moléculas o los átomos de una partícula y las fuerzas de interacción entre las partículas.
- e. **Funcionalización.** Las nanopartículas de cualquier tipo pueden unirse a entidades microbiológicas al azar a través de procesos naturales que ocurren en la atmósfera, el agua o la superficie de la tierra. Las nanopartículas se dirigen entonces a los organismos vivos, a los orgánulos celulares y a las moléculas individuales de proteínas o ARN. Esta propiedad está relacionada tanto con los efectos nocivos de las nanopartículas en el reino vivo como con los estudios farmacéuticos o bioquímicos realizados voluntariamente, a nivel de moléculas peptídicas.
- f. **Confinamiento cuántico.** Los cambios de propiedades dependientes del tamaño también incluyen el confinamiento cuántico, un fenómeno que provoca propiedades

espontáneas de semiconductividad, conductividad o aislamiento eléctrico para partículas vecinas de menos de 10 nm de diámetro [16].

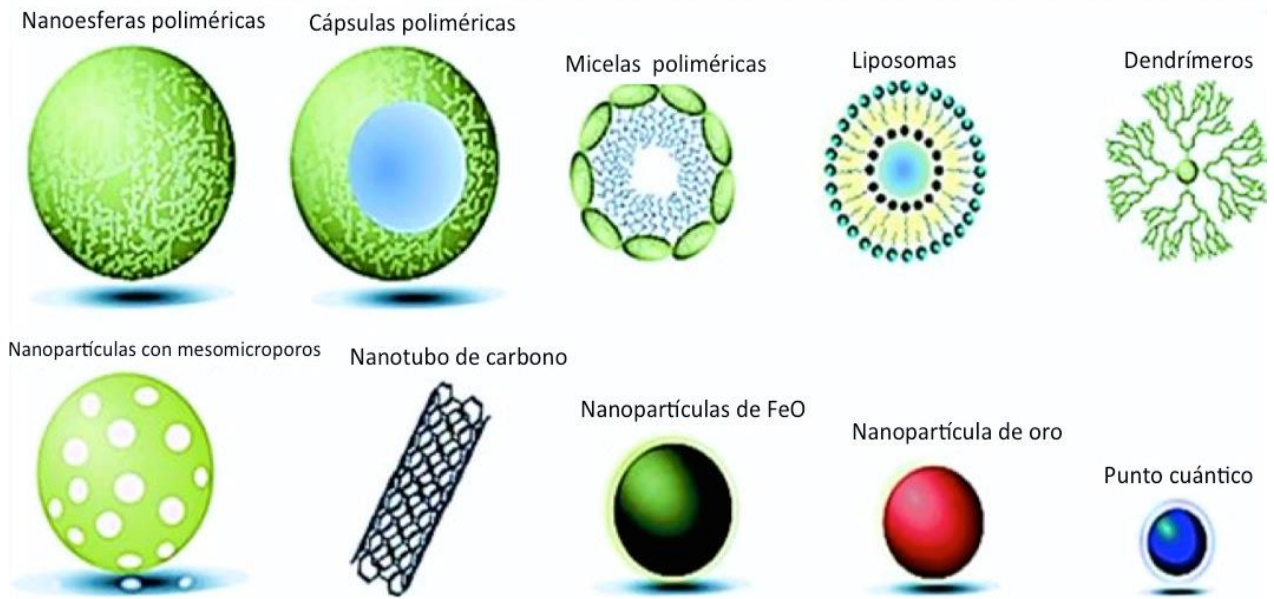


Figura 2. Clasificación de los nanomateriales según su morfología. Imagen modificada de Hadeel J. y colaboradores 2021, donde se muestra la clasificación de diferentes nanomateriales según sus morfologías [17].

1.2.3. Métodos de biosíntesis de ZnONPs

Para la biosíntesis de nanopartículas se utilizan dos métodos: ascendente y descendente. En el caso del método ascendente, la reacción más importante que se produce es la oxidación/reducción. El método de biosíntesis es un método amigable con el medio ambiente, ya que no genera residuos nocivos, las condiciones de síntesis normalmente implican que se lleven a cabo a temperatura ambiente y usualmente no se requiere de equipos sofisticados, obteniéndose a un bajo costo. Una de las principales características es el uso de plantas, tejidos vegetales, extractos de plantas o vegetales, incluso pueden ser utilizados microorganismos como bacterias, hongos y algas. De los agentes reductores se obtienen las sustancias activas, dichas sustancias son derivadas de metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios derivan de la fotosíntesis y los metabolitos secundarios están formados por componentes bioactivos como son los hidratos de carbono y flavonoides presentes en los sistemas biológicos.

Los metabolitos secundarios se extraen para ser utilizados como agentes reductores proporcionando estabilidad y facilitando el control de la velocidad de reacción. Las técnicas de química verde han permitido el desarrollo de nanomateriales dando un giro medioambientalista. A continuación, se muestra la Tabla 1, los agentes reductores más utilizados para la biosíntesis de ZnONPs [18].

Tabla 1. Síntesis verde de ZnONPs y agentes reductores.

Tipo de síntesis verde	Material/organismo	Tamaño (nm)	Morfología de las NPs	Efecto estudiado
Mediada por plantas	<i>Limonia acidissima</i>	12–53	Esféricas	Antibacterial
	<i>Couroupita guianensis</i>	57	Hexagonales	Antibacterial
Mediada por algas marinas	<i>Sargassum myriocystum</i>	36	Esféricas	Antibacterial
	<i>Ulva lactuca</i>	10–50	Hexagonales	Fotocatalítico, antibacteriano y larvicida
Mediada por microorganismo	<i>Aspergillus fumigatus</i>	60–80	Esféricas	Antibacterial
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	57	Esféricas y semiesféricas	Antibacterial

Tabla modificada de V. N. Kalpana y colaboradores en 2018, donde se muestra los diferentes tipos de síntesis verde de nanopartículas de ZnO, los agentes reductores, su tamaño, la morfología y los efectos biológicos estudiados [18].

Los principales pasos de la preparación de NPs que deben evaluarse desde el punto de vista de la química verde son:

- a) El medio disolvente utilizado para la síntesis.
- b) El agente reductor empleado no debe ser dañino para el medio ambiente.
- c) El material para la estabilización de las nanopartículas no debe ser tóxico.

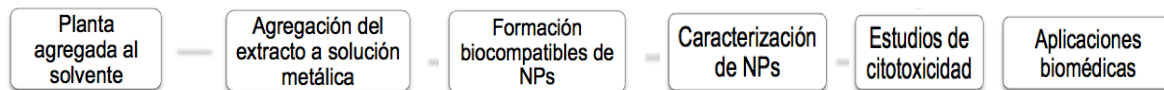


Figura 3. Síntesis verde de ZnONPs mediada por plantas y extractos. Figura modificada de V. N. Kalpana y colaboradores en 2018, donde se muestra el esquema de la síntesis verde de nanopartículas de ZnO por plantas y extractos [18].

La mayoría de los métodos químicos y físicos mencionados hasta ahora dependen en gran medida de los disolventes orgánicos. Esto se debe principalmente a la hidrofobicidad de los agentes de recubrimiento utilizados [19].

1.2.4. Citotoxicidad de las ZnONPs

Debido al constante incremento en la aplicaciones de las NPs y a su liberación en el medio ambiente, es necesario determinar si existen efectos secundarios a la exposición. El análisis de citotoxicidad en sistemas biológicos marinos, organismo unicelulares, modelos biológicos con alta homología humana y por supuesto células humanas, incluso en diferentes etapas del desarrollo, como en células embrionaras y fetales cobra alta relevancia, tanto en su impacto al medio ambiente como sus implicaciones a la salud. La toxicidad de las ZnONPs depende de múltiples factores entre ellos, el tamaño de la NPs, dosis y el tiempo de exposición. A continuación, se presenta en la Tabla 2, diversas líneas celulares de organismos unicelulares y multicelulares, expuestas a ZnONPs, se describe el tamaño de la NPs, tiempo de exposición, rangos de ZnONPs administrados, así como la dosis en las que se alcanzó el IC_{50} (índice citotóxico, es la concentración que causa el 50% de muerte celular).

Tabla 2. Estudios de citotoxicidad en diferentes líneas celulares de eucariotas.

Línea celular	Tamaño (nm)	Tiempo de exposición (h)	Dosis mg/L	IC ₅₀	Referencia
Células renales embrionarias de humano (HEK293T) Células embrionarias de pollo (cresta neural) HH10)	<50 nm	12 h	12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL	50 µg/mL ND*	[20]
Cardiomiocitos humanos (hiPSC-CMs)	40 nm-60 nm	0,2,6 h	0- 200 µg/mL	62.5 µg/mL	[21]
<i>S. Cerevisiae</i> (levadura BY4743)	20 nm-80 nm	3 h	5-20 µg/mL	10 µg/mL	[22]
<i>S. Cerevisiae</i> (levadura BY4741)	20 nm-80 nm	3 h	10 µg/mL	10 µg/mL	[23]
Células endoteliales de aorta humana	70 nm	12 o 24h	8–50 µg/mL	50 µg/mL	[24]
Fibroblastos de tendón humano	56 nm	24 h 48 h 72 h	0-6.0 µg/mL	1.51 µg/mL 1.03 µg/mL 0.57 µg/mL	[25]
Eritrocitos humanos	47.8-52.5 nm	1 h	50-500 µg/mL	200 µg/mL	[26]
Monocito humano (U-937) Promielocito humano (HL-60) Linfocito B humano (COLO-720L) Linfocito T humano (HUT-78)	15 nm	24h	1.6-25 µg/mL	6.25 µg/mL 25 µg/mL 12.5 µg/mL 12.5 µg/mL	[27]
Monocito humano (U-937) Promielocito humano (HL-60) Linfocito B humano (COLO-720L) Linfocito T humano (HUT-78)	100-130 nm	24 h	0-25 µg/mL	25 µg/mL 6.25 µg/mL 12.5 µg/mL 25 y 12.5 µg/mL	[28]
Hepatocito humano (HL-7702) Colonocitos humanos (Caco-2)	<100 nm	3h	0.665 µg/mL	NS* NS*	[29]
Linfocito humano Fibroblasto de ratón (C2C12) Mioblasto de ratón (L929)	16-24 nm	24 h 48 h 24 h 48 h	1 ×10 ⁻⁶ 100µg/mL	37 µg/mL 30µg/mL 32 µg/mL 23µg/mL	[30]
Macrófago de ratón (J774A1)	140±6 nm	24 h	200 µg/mL	8 µg/mL	[31]
Embrión de pollo HHO Células neurales	50 nm	24 h 12 h 12 h	12.5-50 µg/mL 0-50 µg/mL	ND* 25 µg/mL 25 µg/mL	[32]
Células de Leydig de ratón Células de Sertoli de ratón	70 nm	24 h 24 h	0, 5, 10, 15, y 20 µg/mL	15 µg/mL 15 µg/mL	[33]
Ovocitos de ratona (CHO-K1)	80 nm	24h 1d 168h 7d	10, 20 y 30 µg/mL	30 µg/mL 10 µg/mL	[34]
Células de microglia BV-2 de ratón	20 nm	6 h 24 h	0-80 µg/mL	20 µg/mL 10 µg/mL	[35]

ND* No determinado; NS* No significativa a la dosis máxima de ZnONPs administrada

1.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Los inicios de la nanociencia y la nanotecnología, en 1965, trajeron consigo gran un desafío para mejorar las técnicas de caracterización, desde 1936, con la invención de la microscopía de transmisión, permitiendo una resolución a nivel atómico. Desde entonces diversas técnicas analíticas e instrumentos han evolucionado contantemente facilitando la caracterización y el estudio de los nanomateriales. A continuación, se da una breve descripción de las características y fundamentos de las más representativas para determinar estructura, tamaño de partícula, así como distribución [30].

1.3.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica ampliamente utilizada que permite identificar y determinar los grupos funcionales presentes en una muestra (gas, líquido y sólido), con la ayuda de un haz de radiación infrarrojo (IR). La espectroscopia infrarroja mide la absorción de la radiación IR realizada por cada enlace, presente en la molécula y como resultado, da un espectro que se designa comúnmente como % de transmitancia frente al número de onda (cm^{-1}). Diversos materiales que contienen enlaces covalentes absorben la radiación electromagnética dentro del intervalo de la región IR [36].

Para determinar los grupos funcionales de una molécula, ésta debe ser activa por IR. Una molécula activa por IR es la que tiene momento dipolar. Cuando la radiación IR interactúa con el enlace covalente de los materiales que tienen un dipolo eléctrico, la molécula absorbe energía y el enlace comienza a oscilar hacia adelante y hacia atrás. Por lo tanto, la oscilación que causó el cambio en el momento dipolar neto de la molécula debe absorber las radiaciones IR. Esta absorción se relaciona precisamente con la naturaleza de los enlaces presentes en la molécula. Hay que tener en cuenta que una determinada frecuencia IR, será absorbida por un enlace en concreto de la molécula, ya que cada enlace tiene su propia frecuencia de vibración natural.

Por ejemplo, una molécula como el ácido acético (CH_3COOH) que contiene varios enlaces (C-C, C-H, C-O, O-H y C=O), todos estos enlaces son absorbidos en una longitud de onda específica y no son afectados por otro enlace. Por lo que podemos decir que dos moléculas

con estructuras diferentes no tienen el mismo espectro infrarrojo, aunque en algunas, las frecuencias puedan ser iguales [37]. En la Figura 4, se muestra el diagrama de funcionamiento del FTIR. Imagen tomada de principios de análisis instrumental [38], donde se muestra el esquema de un espectrofotómetro de doble haz. Las líneas gruesas y oscuras indican una conexión mecánica; las líneas delgadas una conexión eléctrica; las líneas de trazos indican la trayectoria de la radiación.

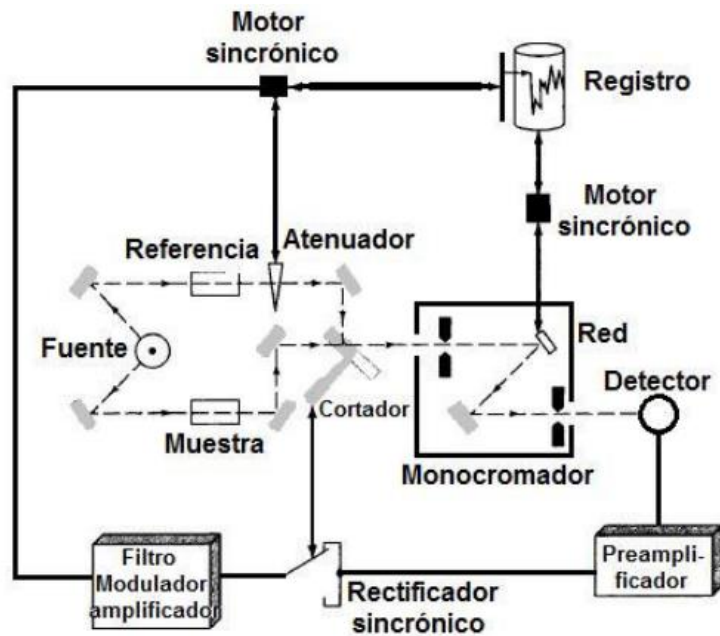


Figura 4. Esquema de un espectrofotómetro de doble haz de radiación IR.

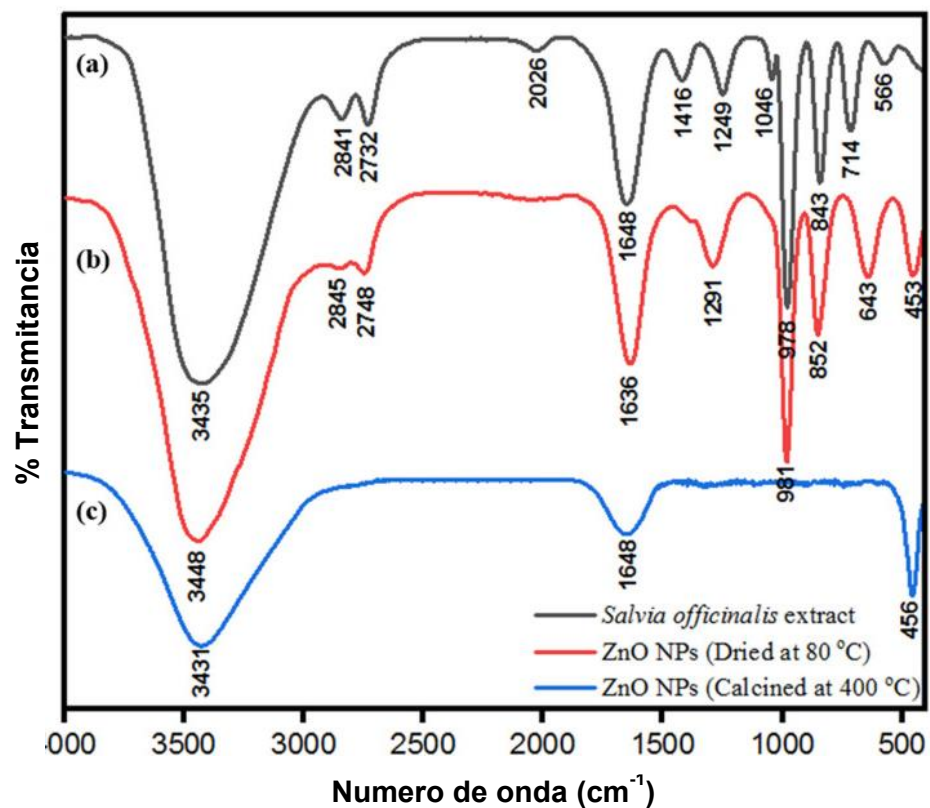


Figura 5. Espectros FTIR de extracto acuoso de hoja de *S. officinalis*, ZnONPs secados a 80 °C y ZnONPs calcinado a 400 °C.

May Abdullah y colaboradores en el 2021, realizaron el análisis por FTIR de (a) extracto acuoso de hoja de *S. officinalis*, (b) ZnONPs secados a 80 °C y (c) ZnONPs calcinado a 400 °C. Tomada de la referencia [39].

Los rangos de frecuencia se miden como números de onda, normalmente en el intervalo de 4000-500 cm⁻¹. Antes del análisis de la muestra, se registra el fondo, para evitar los picos de contaminación por aire y vapor de agua. La proporción del fondo y el espectro de la muestra están directamente relacionados con el espectro de absorción de la muestra. El espectro de absorción indica varias vibraciones de los enlaces presentes en la molécula de la muestra, de esta manera se identifica el grupo funcional en una molécula. En el análisis de las ZnONPs, el polvo se coloca bajo la energía del fotón láser del microscopio [39].

1.3.2. Espectro FTIR del óxido de zinc

En el caso del ZnO, el pico de absorción a 656-432 cm^{-1} se asigna a la banda de Zn-O. El pico a 1086 cm^{-1} , se debe al estiramiento C-O. El pico amplio en la región de mayor energía a 3439 cm^{-1} se debe al estiramiento OH y el pico a 1625 cm^{-1} se debe a la flexión OH de la humedad adsorbida en la muestra [40-41].

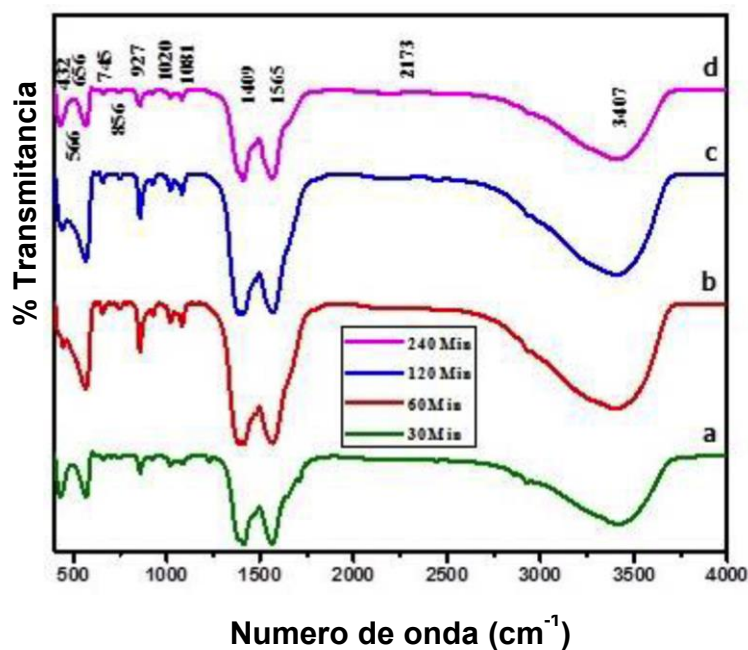


Figura 6. Espectros FTIR de ZnONPs a 400 °C a 30, 60, 120 min y 240 min.

P. Rameshy colaboradores en el 2021, realizaron el análisis por FTIR de ZnONPs a 400°C de temperatura de recocido con diferente tiempo (a) 30 min (b) 60 min (c) 120 min y (d) 240 min. Tomada de la referencia [41].

La técnica de FTIR también puede ser utilizada para monitorizar los grupos funcionales presentes en una mezcla en suspensión, [42]. Además, de la FTIR también pueden utilizarse otras técnicas para análisis de la composición química como lo es EDX y XPS empleada para evaluar el estado de oxidación de las muestras.

1.3.3. Difracción de Rayos X (XRD)

La XRD por sus siglas en inglés, fue descrita en 1913, es la técnica más empleada para la caracterización de estructuras cristalinas. Esta técnica no destructiva permite identificar fases, orientación, propiedades estructurales, tamaño del grano, transformación orden-desorden y expansión térmica, permite también medir el grosor de películas delgadas o en presentación de multicapas, e incorpora información referente al arreglo atómico. Permite determinar el promedio de espacio entre capas o columnas de átomos. Determina la orientación de un solo grano de cristal, puede describir la estructura cristalina de un material desconocido, también puede realizarse *in situ*. Los picos de difracción de rayos X se producen por interferencia constructiva de un haz monocromático de rayos X dispersos en ángulos específicos desde cada conjunto de planos de celosía en una muestra. Las intensidades máximas están determinadas por la distribución de átomos dentro de la red. En consecuencia, el patrón de difracción de rayos X es la huella digital de arreglos atómicos periódicos en un material dado [43]. Para realizar el cálculo del tamaño de partícula o tamaño cristalino, y comprobar que se están formando ZnONPs, se recurrió a la tradicional ecuación de Scherrer, que se presenta a continuación:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Donde D es el tamaño promedio del cristal, K es una función de forma la cual tiene un valor de 0.94 para partículas esféricas, λ es la longitud de onda de los rayos X utilizados (1.5406 Å), β fue determinado de la integración del ancho medio del pico experimental (FWHM) y θ es el ángulo de incidencia de difracción. Aplicando la ecuación se pudo determinar el tamaño de partícula o tamaño cristalino de las ZnONPs por síntesis verde.

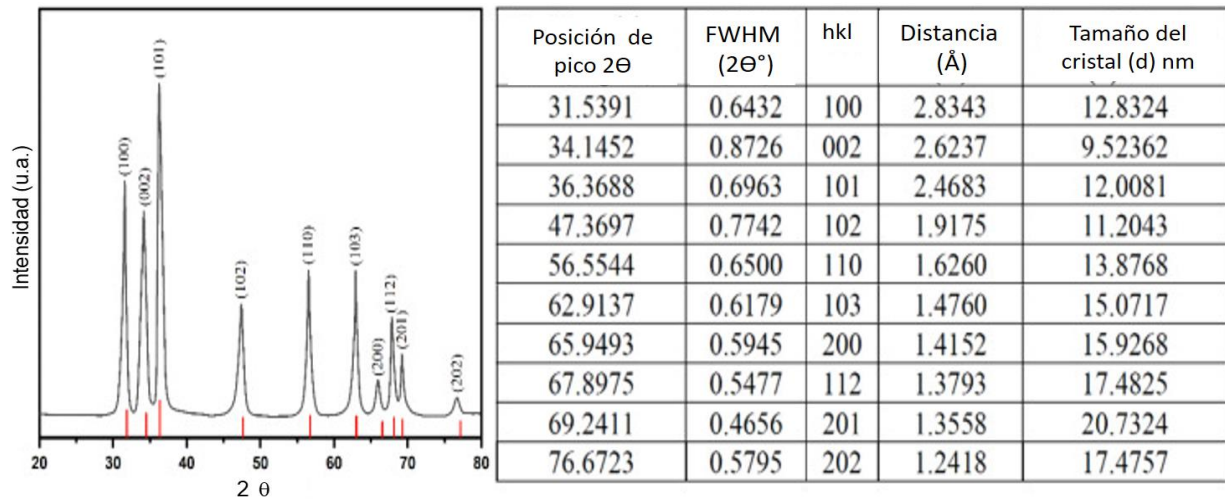


Figura 7. Patrón XRD para las ZnONPs donde se incluye los datos de difracción de rayos X y el análisis del tamaño de las partículas [39].

May Abdullah y colaboradores en el 2021, realizaron el análisis por XRD para las ZnONPs biofabricadas, incluidos los datos de difracción de rayos X y el análisis del tamaño de las partículas. Tomada de la referencia [39].

1.3.4. Patrón de difracción experimental de las ZnONPs

En el análisis de muestras que contienen a las ZnONPs, usualmente se observa con homología que se obtienen múltiples picos con valores en 2θ con rangos similares a 31.62, 34.33, 36.12, 47.33, 56.31, 62.64, 66.03, 67.64 y 68.73 pueden atribuirse a los planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) y (201), respectivamente. Todos los picos concuerdan con la estructura hexagonal Wurtzita del ZnO, que coincide con los datos teóricos (JCPDS 36-1451). El ensanchamiento de los picos de la XRD confirma la naturaleza nanocrystalina del óxido de zinc en la muestra analizada [41,44].

1.3.5. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

La revolución en el área de la microscopía inicio en los 30s cuando se crea el primer microscopio electrónico con una resolución teórica de 10 nm y para mediados de los 40s se logró una resolución de 2 nm, considerando que la resolución de un microscopio óptico de luz tiene una resolución de 200 nm. Para finales de la década de los 60s, la Microscopía Electrónica

de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés), se empleó para la descripción de materiales con una resolución de entre 1 y 5 nm. Años más tarde en 1986, Ruska es galardonado con el Premio Nobel en física por el desarrollo de la microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), sin duda el aumento en el voltaje de aceleración del haz de electrones mejoró la resolución, así como las mejoras en la tecnología de lentes minimizaron la distorsión proporcionando imágenes más claras. Esta herramienta es utilizada para obtener imágenes de minerales a gran aumento y determinar así el tamaño y forma entre otras características [45].

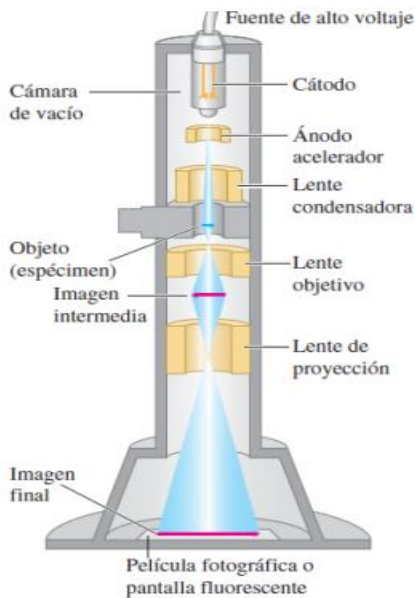


Figura 8. Esquema y fotografía del microscopio electrónico de transmisión. Fuente: *Central Microscopy University of Iowa*

En la figura 8 se muestra un esquema representativo e imagen del HR-TEM. En esta herramienta con ayuda de un haz de electrones de alta energía sobre una muestra delgada, se construye una imagen o patrón de difracción, en el que tanto el haz de electrones incidente como los haces difractados de la muestra contribuyen a la imagen. El que un espécimen o muestra sea delgada significa que es "transparente a los electrones"; es decir, deben transmitir suficientes electrones para que la intensidad que caiga sobre la pantalla de un tubo de rayos catódicos o un detector de electrones adecuado, como un detector semiconductor, sea suficiente para dar una imagen interpretable. Este requisito es una función de la energía de los electrones, también del número atómico medio y el grosor de la muestra. En el modo de alta

resolución (HR-TEM), el microscopio electrónico de transmisión es la herramienta preferida para obtener imágenes de detalles de cristales menores de dos unidades de Ångstrom, incluyendo la revelación de posiciones atómicas en minerales [46].

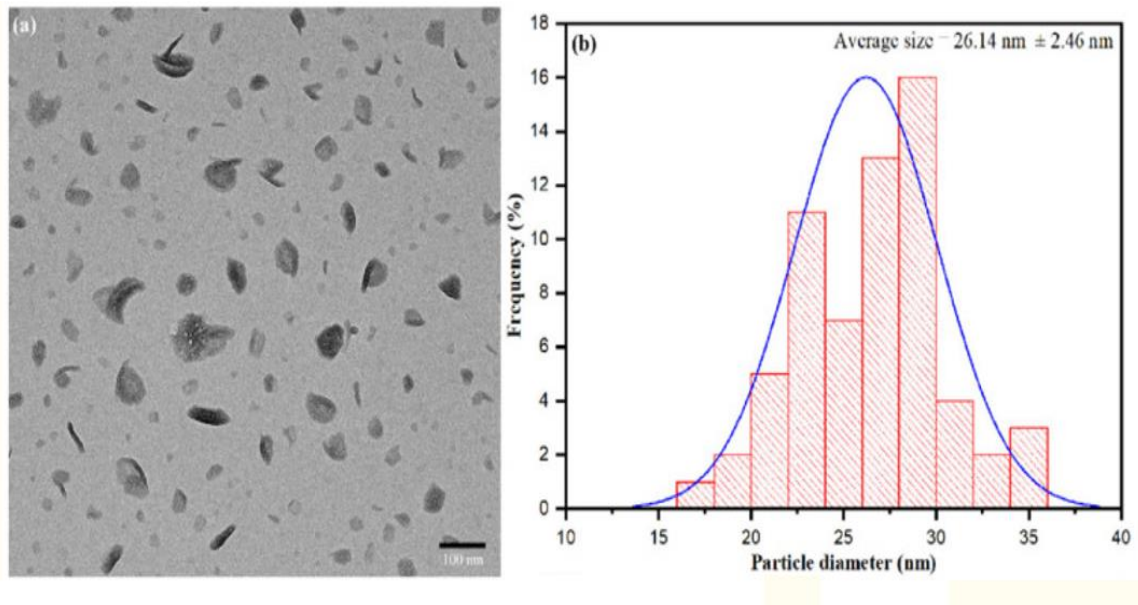


Figura 9. Imagen HR-TEM de las ZnONPs e histograma de distribución del tamaño de partículas.

Abomuti May y colaboradores en el 2021, realizaron el análisis por microscopio electrónico de transmisión (TEM) para la imagen de las ZnONPs biofabricadas (a) y el histograma de distribución del tamaño de partículas. Tomada de la referencia [39].

La HR-TEM permite determinar el tamaño de cada NP, así como estimar la distribución con ayuda de los histogramas, también permite analizar cómo se modifican las características al modificar la temperatura sobre la muestra [47]. La resolución práctica del TEM está limitada por la aberración de la lente, puede alcanzar valores tan bajos como 0.2-0.1 nm. Los electrones de alta energía que colisionan con la muestra delgada son dispersados produciendo una amplia gama de señales secundarias que pueden clasificarse a grandes rasgos en elásticas o inelásticas. Debido a los procesos de dispersión, los electrones que emergen de la superficie de salida de la muestra están distribuidos de forma no uniforme. Esta distribución no uniforme contiene toda la información estructural y química de la muestra. La construcción del microscopio electrónico muestra esta distribución no uniforme de dos maneras diferentes: (1) la distribución angular que puede verse como un patrón de difracción y (2) la distribución espacial de la dispersión que

genera contraste en la imagen de la muestra. Todos los antecedentes teóricos relevantes de la TEM se basan en el dualismo partícula/onda de los electrones. Desde los inicios de la microscopia, la teoría y la instrumentación se han desarrollado y los HR-TEM modernos se han convertido en una herramienta fundamental para la ciencia de los materiales [48,49].

1.4. APLICACIONES DE LAS ZnONPs

Desde las civilizaciones antiguas ya se utilizaban las NPs, aprovechando sus propiedades ópticas y minerales. La cultura egipcia utilizó nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y la salud; la civilización china, además de utilizarlas con fines curativos, las aplicaba como colorantes inorgánicos en la porcelana. Las aplicaciones universales de las NPs cobran cada vez mayor relevancia, a continuación, se resumen las aplicaciones biomédicas actuales de las ZnONPs.

1.4.1. Industria alimentaria

En la industria alimentaria está buscando maneras de mejorar la eficiencia de la producción, inocuidad y preservar lo mayor posible los alimentos. Para una industria donde la competencia es intensa y la innovación es vital, la nanotecnología ha surgido como una ayuda potencial para mejorar la producción de alimentos y la calidad de estos. Las aplicaciones de los nanomateriales en la alimentación se pueden encontrar en el procesado de alimentos, aditivos alimentarios y en materiales en contacto con alimentos (empacado), algunas aplicaciones ya se comercializan y otras aún están en proceso de desarrollo. La adición de las ZnONPs a gomas y ceras para fabricar cubiertas comestibles en diversos alimentos como en plátanos y mangos, los protege de su rápido deterioro por virus, hongos y bacterias [50, 51]. Sus múltiples aplicaciones radican en su efectividad como preservativo alimenticio y además por su actividad antibacterial contra patógenos como *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* y *E. Coli*, principales agentes causantes de infecciones gastrointestinales [52].

1.4.2. Detección de bacterias mediante nanopartículas bioconjugadas

La detección de bacterias usando anticuerpos no es nueva, pero la tecnología convencional no presenta la sensibilidad que pueden ofrecer las nanotecnologías. Frente a las

técnicas tradicionales que ligan una molécula fluorescente a un anticuerpo, las técnicas modernas, como la desarrollada por la Fundación de Investigación de la Universidad de Florida, permiten asociar a un anticuerpo con muchas moléculas que pueden generar una señal muy intensa facilitando con ello la captación de la imagen. El fundamento de estas técnicas consiste en asociar a materiales bioconjugados constituidos por NPs y anticuerpos no a una sino miles de moléculas fluorescentes de tal forma que al quedar adosadas a cada bacteria varias de estas NPs se consigue una imagen clara, que permite identificar una sola bacteria. Para la formación de las NPs bioconjugadas se utiliza un gel de sílice en el que se encuentran partículas de fluorescentes encerradas en una delgada cáscara.

La microemulsión contiene NPs de 60 nm de tamaño con múltiples moléculas fluorescentes. Finalmente, se crea la conjugación entre un anticuerpo y la NP formando un material bioconjugado que, gracias al anticuerpo, es capaz de detectar la presencia de tan solo una bacteria, fácilmente reconocible gracias a la intensidad de la señal fluorescente emitida por las NPs. Esta técnica tiene potencial aplicación entre otras en la identificación de bacterias o virus en carne y en los controles de calidad de agua.

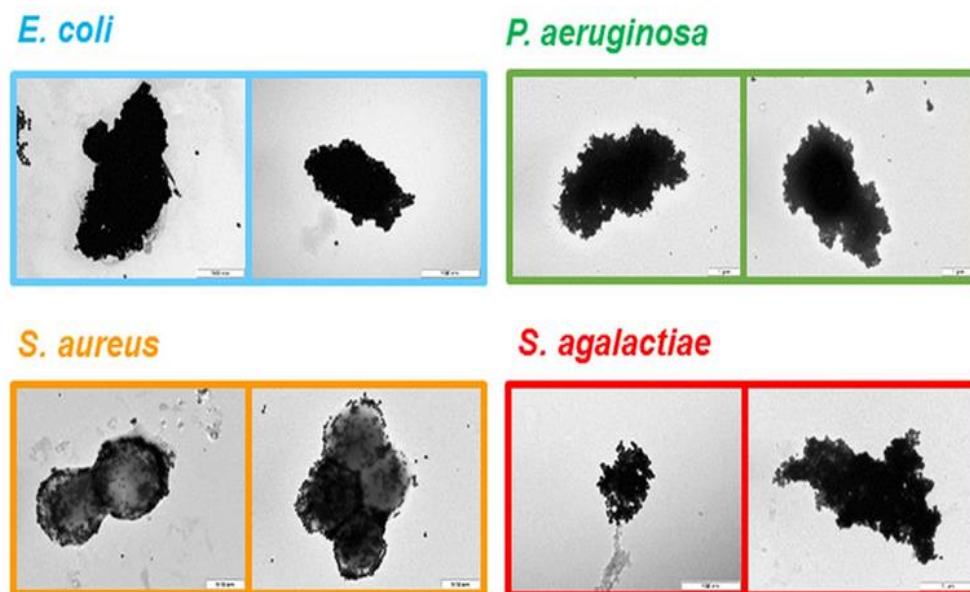


Figura 10. HR-TEM de bacteria incubadas con NPs bioconjugadas. Figura tomada de Pazos y colaboradores 2016, donde se muestran *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Aureus* y *S. agalactiae* incubadas con NPs bioconjugadas por SEM [53,54].

1.4.3. Liberación de fármacos con ZnONPs

Los tratamientos farmacológicos con fines terapéuticos son complejos, y poco efectivos para algunas enfermedades como cáncer. Las complicaciones más frecuentes son los efectos tóxicos y nocivos en los tejidos sanos. La biotecnología abre la posibilidad de suministrar dosis de medicamentos más bajas al paciente para conseguir los mismos efectos, al mejorarse la termo-estabilidad, el tiempo de vida y la protección de estos medicamentos frente a los tradicionales, dando luz a un nuevo campo, la nanomedicina [55].

La formulación de fármacos en forma de nanoestructura aumenta su solubilidad y eficacia, por lo que ya existen en el mercado más de cien fármacos de este tipo y muchos otros están en desarrollo. Por ejemplo, en el caso de los fármacos antitumorales, el uso de nanoestructuras conduce a dosis suministradas menores que las típicamente aplicadas en quimioterapia y, si la sustancia se dirige de modo directo al tumor, las cantidades efectivas aplicadas pueden ser entre diez y mil veces mayores que las vías de administración tradicionales, evitando de este modo los efectos secundarios no deseados típicos de la quimioterapia. Las NPs que se utilizan para este propósito son sintetizadas a partir de materiales orgánicos (lípidos, polímeros y liposomas). También se encuentran en investigación nanotransportadores inorgánicos (partículas magnéticas, puntos cuánticos de semiconductor, oro coloidal y NPs de fosfato cálcico). Por ejemplo, la tecnología *Nanocure* de la empresa *Avidimer therapeutics* está basada en el uso de NPs inorgánicas que transportan un fármaco antitumoral a través de la barrera hematoencefálica. *Novartis pharma* también está investigando el uso de dendrímeros para prevenir la respuesta autoinmune durante el trasplante de órganos [56].

Al emplear ZnONPs como liberador de fármacos, su principal beneficio radica en sus propiedades, una de ellas es debido al tamaño pequeño por las NPs que pueden penetrar fácilmente por los capilares y llegar a las células diana. Numerosas investigaciones con resultados alentadores han sido publicadas, como el de Dhivya y colaboradores en 2017, donde las ZnONPs fueron cargadas con cúrcuma y posteriormente encapsuladas en un co-polímero, una vez realizada la caracterización del nanohíbrido fue estudiado su potencial citotóxico en células de cáncer gástrico [57].

Una investigación realizada por Yang y colaboradores en 2018 presenta la metodología, para sintetizar ZnONPs cargada con doxorubicina para ser utilizada en células tumorales de glioblastoma de la línea U87MG, en este experimento se observó la selectividad de las ZnONPs para las células U87MG y no para las células HeLa, que también son células tumorales (cáncer cervicouterino), la liberación del fármaco fue del 70.6% después de 48 h de la exposición [58]. Un año más tarde, Sadhukhan y colaboradores en 2017, diseñaron ZnONPs sensibles a pH cargadas con quercetina, para el tratamiento del cáncer de mama, los estudios *in vitro* mostraron que el nanohíbrido incrementó el potencial citotóxico de la quercetina en las células tumorales y los estudios *in vivo* en modelo de ratón evidenció menor toxicidad hepática, renal y esplénica [59]. Las ZnONPs han sido estudiadas para liberación de benzoato de metronidazol, donde fue evidente que en presencia de las NPs facilitó su paso por la membrana [60].

1.4.4. Liberación de ácidos nucleicos (ADN/ARN) con nanomateriales de ZnO

Investigaciones recientes, reportan que diversas nanoestructuras de ZnO, pueden ser utilizadas como vectores no virales para liberación de material genético [61]. La primera investigación, en esta línea fue publicada hace ya más de una década y consintió en liberar el gen pEGFPN1 (gen que codifica para la proteína verde fluorescente) en células de melanoma humano A375. A través de interacciones electrostáticas, el pDNA (ADN plasmídico) se unió a nanoestructuras de ZnO (con configuración de tetrápodo tridimensional), para la liberación de esta secuencia dentro de las células, las tres prolongaciones en forma de aguja facilitaron la internalización de las puntas. Además, se evidenció que la geometría tridimensional, contribuyó en niveles bajos citotoxicidad. La superficie del nanomaterial desempeña un papel importante, para que la liberación de ácidos nucleicos sea eficaz.

Según una investigación, los *quantums dots* de ZnO recubiertos con polímeros de poli(2-(dimetilamino)metacrilato de etilo) (PDMAEMA), son empleados para condensar el pDNA. Los *quantums dots* de ZnO presentaron una citotoxicidad significativamente menor en asociación con la aplicación de PDMAEMA como vector del gen. La disminución de la citotoxicidad se debió a la existencia de polimetacrilato con carga negativa en los *quantums dots* que favoreció a la estabilización de las cargas positivas [62].

Otro estudio de relevancia en el tema fue el trabajo publicado por Lin y colaboradores en 2022, para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson (EP). Es conocido que la acumulación de la α -sinucleína es parte de la fisiopatología de la EP. Por lo tanto, la inhibición de la expresión de la α -sinucleína es una propuesta terapéutica prometedora. En esta investigación se desarrolló una nanoplataforma de *quantum dots* de ZnO dirigida a las células nerviosas para liberación de el gen que codifica para una RNA corto (shARN) para interferir la expresión de la α -sinucleína, en células del sistema nervioso central. Los *quantums dots* modificados con glutatión y cargados con el gen, fueron posteriormente cargados con el factor de crecimiento nervioso (NGF) y utilizados *in vitro* e *in vivo* (ratones) para el tratamiento de EP. Los resultados del rastreo fluorescente indicaron que los compuestos de *quantum dots* de ZnO podían liberar la secuencia génica en el cerebro a través de la barrera hematoencefálica y posteriormente liberar el gen a través del escape lisosomal. Además, los resultados *in vitro* e *in vivo* demostraron que los *quantums dots* de ZnO cargados del gen y el NGF podían proporcionar eficientemente neuroprotección y revertir el proceso neurodegenerativo, con baja toxicidad [63].

1.4.5. Nanopartículas de Zinc y actividad Antitumoral

Las aplicaciones en el área de la salud de las ZnONPs son numerosas, hace más de una década, se describió el potencial para condicionar la muerte selectiva de células tumorales. Aún no se conocen en su totalidad, las vías que causan la citotoxicidad. Se han realizado numerosos estudios de investigación desarrollados en diferentes líneas celulares tumorales tanto en modelos animales como en líneas celulares tumorales humanas. Dentro de las vías hasta ahora descritas se mencionan a las especies reactantes de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y el daño al material genético que aún sigue en debate si la toxicidad puede ser atribuida a las NPs como tal o a los iones de zinc disueltos dentro de las células tumorales causando daño en otras estructuras celulares.

Wiesman y colaboradores, en 2019, investigaron los mecanismos involucrados en la destrucción de células tumorales con especial enfoque para diferenciar entre apoptosis y necrosis. Utilizaron 6 líneas celulares de diferentes orígenes: A549 adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas (APCNP), células HeLa (carcinoma de cérvix), HNSCCUM-02T (carcinoma de lengua y células escamosas), T24 (carcinoma urotelial), RPMI-2650 (adenocarcinoma nasal de células escamosas) y FaDu (adenocarcinoma de células escamosas)

de faringe). También se utilizó la línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello HNSCCUM-02T y como células control se utilizaron fibroblastos aislados de mucosa oral de individuos sanos. Las líneas celulares, se expusieron a ZnONPs, con un tamaño entre 5 a 15 nm y de forma esférica. Se sintetizaron ZnONPs cubiertas con SiO₂ y marcadas con FICT para poder facilitar el seguimiento por microscopia de fluorescencia, así como ZnONPs sin cubierta. Sus resultados mostraron que las ZnONPs causaron efectos citotóxicos en todas las células tumorales, esto atribuido a la liberación de iones, así como a la interacción directa entre las NPs y las células.

En este estudio se propone que las ROS se pueden generar directamente de las ZnONPs. Los iones liberados del ZnO causan disrupción de la homeostasis iónica intracelular, daño a organelos vitales como la mitocondria y a biomoléculas como el ADN [64]. A continuación, se presenta en la Tabla 3, una recopilación de estudios de citotoxicidad, viabilidad celular y efecto molecular posterior a la administraron las ZnONPs, en diversas líneas celulares tumorales humanas y de modelo animal.

Tabla 3. Líneas celulares tumorales expuestas a ZnONPs para análisis de citotoxicidad y daño mitocondrial

Línea celular	Tamaño (nm)	Tiempo de exposición (h)	Dosis mg/L	IC ₅₀	Vía mitocondrial estudiada	Referencia
Carcinoma epidermoide humano A431	ZON1 40nm ZON2 <20nm	24h 24h	0-25 µg/mL	24 µg/mL 15 µg/mL	Función mitocondrial, niveles de ROS y caspasa-3	[65]
Carcinoma de colon humano (HCT116)	30-48.5nm	24h 48h	0,25–200 µg/mL	82 y 60µg/mL	Niveles de Ca ²⁺ , niveles de ROS, expresión de P53, caspasa3, caspasa-8, caspasa-9, Cyt-c, BAX, BCL-2, PARP.	[66]
Leucemia mielocítica humana (K562)		24h 48h		55 y 35µg/mL		
Carcinoma gingival humano (Ca9-22)	100nm	24h	0-100 µg/mL	17.4±0.6 µg/mL	Daño oxidativo mitocondrial y señalización de p70S6K, caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9 y activación de PARP.	[67]
Carcinoma gingival humano (OECM-1)			51.0±0.6 µg/mL			
Cáncer oral humano (CAL 27)	50nm	24h	0-100 µg/mL	25 µg/mL	MMP, Parkin, mito-Parkin, cyto-Parkin and PINK1 expression	[68]
Carcinoma hepático humano (Huh7)	18nm	8h	0-60 µg/mL	40 µg/mL	Niveles de ROS y potencial de MM	[69]
Cáncer de mama humano (MCF-7)	~13 ± 2 nm	24 y 48h	0-100 µg/mL	25 µg/mL	Caspasa-3, caspasa-9, BAX, expresión de P53	[70]
Cáncer de mama humano (MCF-7)	41nm hojuelas	24h	1-5 µg/mL	3 µg/mL	Niveles de ROS y liberación de lactato deshidrogenasa	[71]

Cáncer de mama humano (MCF-7)	43nm	24h	0-100 µg/mL	44 µg/mL	Niveles de ROS, expresión de caspasa-3, caspasa-9, BAX, BCL-2, P53	[72]
Cáncer de mama humano (MCF-7)	63.7±6.5 nm	24 h 48 h	0.5-20 µg/mL	20 µg/mL 10 µg/mL	Expresión de caspasa-3, caspasa-8 y 9, BAX, BCL-2	[73]
Mieloma múltiple humano	30 nm	24 h 48 h	0-60 µg/mL	34 µg/mL 29 µg/mL	Expresión de caspasa-3, caspasa-9, Apaf-1, Cyt-c, ATP	[74]
Cáncer cervicouterino humano (SiHa)	20-50 nm	24 h	0-200 µg/mL	35 µg/mL	Generación de ROS	[75]
Cáncer cervicouterino humano (HeLa)	10-70 nm	24 h	5-80 µg/mL	20 µg/mL	Niveles de ROS caspasa-3, BAX, p53, caspasa-9, citocromo-c	[76]
Cáncer cervicouterino humano (HeLa) Cáncer de colon humano (HT-29)	30 nm	24 h	25-00 µg/mL	101.7 µg/mL 124.3 µg/mL	Generación de ROS y actividad antioxidante	[77]
Carcinoma ovárico humano (SKOV3)	20 nm	24 h	0-30 µg/mL	20-30 µg/mL	Niveles de ROS, caspasa-9, BAX, BCL-2	[78]
Cáncer gástrico humano AGS	100 nm	24 h	0-25 µg/mL	10 µg/mL	Niveles de ROS y Apoptosis	[79]
Osteosarcoma humano (MG-63)	10-12 nm	24 h	5- 80µg/mL	30 µg/mL	Niveles de ROS, BAX, caspasa-3 y caspasa-9	[80]
Neuroblastoma humano (SH-SY5Y)	50 nm	12 h	0-50 µg/mL	25 µg/mL	Niveles de Ca ²⁺ · caspasa-3, apoptosis, morfología mitocondrial por TEM	[81]
Neuroblastoma humano (SH-SY5Y)	24-30 nm	24 h	10-20 µg/mL	15 µg/mL	Niveles de ROS	[82]

Fuente: elaboración propia realizada de la búsqueda sistemática de artículos sobre citotoxicidad en diversas líneas tumorales expuestas a ZnONPs para análisis de citotoxicidad y daño mitocondrial.

1.5 JUSTIFICACIÓN

El uso de nanopartículas (NPs) ha aumentado considerablemente debido a sus aplicaciones casi universales, como en los campos de la electrónica, la óptica, la farmacéutica, la biomédica y la energía, que se han expandido rápidamente durante las últimas décadas. Debido a las aplicaciones generalizadas de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs), ha aumentado la síntesis verde de ZnONPs alternativo al método químico, donde se excluye el uso de agentes químicos reductores y estabilizantes que en su mayoría son tóxicos y que no permiten estudios de citotoxicidad celular de las ZnONPs producidas.

Por lo tanto, la realización de NPs tiene que ir acompañada de bajo costo, procesos de producción ecológicos e innovadores, con costos relativamente menores, sencillas de fabricar, ofreciendo una alternativa relevante para su producción, con una generación baja o nula de residuos tóxicos, para evitar el uso de sustancias químicas peligrosas y minimizar la generación de desechos peligrosos. Aunado a ello, el uso de extractos vegetales de

especies que poseen alguna actividad biológica, como el extracto de *Beta vulgaris*, que es conocido por sus propiedades medicinales y terapéuticas, representaría una ventaja adicional en el uso de síntesis verde al permitir obtener ZnONPs con propiedades biológicas adicionales.

El presente trabajo de investigación propone una alternativa accesible a la creciente necesidad de encontrar materiales eficaces, baratos y eficientes para aplicaciones como mejorar la calidad de síntesis verde de ZnONPs a través de un método de bajo costo, ecológico y sustentable, donde el extracto de *Beta vulgaris* se utilizará como agente reductor. La caracterización de las ZnONPs se realizará mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y análisis de difracción de rayos X (XRD) para obtener las propiedades morfológicas.

Con el objetivo de evaluar la toxicidad de ZnONPs *in vitro* en dos líneas celulares de fibroblastos de ratón C2C12 y líneas celulares de mioblastos L929 y linfocitos humanos de sangre periférica (HLPB). Todas estas consideraciones justifican la necesidad de prestar atención y profundizar en el conocimiento de la síntesis verde de ZnONPs para determinar la asociación entre dosis y la citotoxicidad, en distintas líneas celulares de relevancia científica.

1.6. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.6.1. Objetivo general

- I. Realizar la síntesis verde de ZnONPs empleando extracto de *Beta vulgaris*, caracterización y evaluación de la citotoxicidad inducida por ZnONPs en diversas líneas celulares de origen murino y linfocitos de sangre periférica de humano sano.

1.6.2. Objetivos específicos

- I. Sintetizar ZnONPs por método de química verde utilizando *Beta vulgaris* como agente reductor.
- II. Caracterizar las ZnONPs por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD) y por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM).
- III. Determinar la viabilidad y cinética celular por el método MTT en las líneas celulares C2C12 y L929 de origen murino y en linfocitos B humanos obtenidos de sangre periférica.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó extracto de betabel, como agente reductor y nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de Sigma-Aldrich como precursor de Zn.

2.1.1. Síntesis de ZnONPs

El proceso de síntesis de ZnONPs se realizó utilizando 2 g de nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), como precursor de Zn, en 42 mL de extracto de betabel y se colocan en agitación hasta que se disolvió completamente el precursor. Posterior a esto la muestra se pone en un baño de agua a 60 °C hasta que presenten una consistencia uniforme y se calcinan a 400 °C durante 60 minutos.

2.1.2. Caracterización de ZnONPs

Las ZnONPs sintetizadas fueron caracterizadas con ayuda de la Espectroscopia de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) para conocer los grupos funcionales presentes en la muestra; Difracción de rayos X (XRD) para el estudio y descripción de la estructura cristalina, y Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (en inglés, *High-resolution Transmission Electron Microscopy*, o HR-TEM) para determinar tamaño, forma y estructura de las NPs obtenidas.

2.1.3. Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular fue realizado empleando placas de 96 pocillos de fondo plano con las líneas celulares C2C12 y L929 a una densidad de 2×10^4 células / pozo en un volumen de 100 μL , posteriormente, fueron incubados en atmósfera de 5% en CO_2 a 37 °C durante 24 h. Al cabo de este tiempo, se realizó un cambio de medio, en este caso fueron adicionados 100 μL del medio de cultivo, en el cual fueron disueltos previamente las ZnONPs de manera que se obtuviera la concentración deseada (1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/mL). A continuación, las células fueron incubadas en presencia de las ZnONPs durante 24 h. El crecimiento celular fue comparado con células cultivadas en ausencia de producto como controles negativos, las cuales representaron el 100% de crecimiento.

2.1.4. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad de las células cultivadas se determinó mediante el método de reducción del bromuro (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazan. Después del periodo de incubación de 24 h se adicionaron 10 μ L de una solución estéril de MTT (5 mg/mL en PBS estéril) a cada pocillo y se incubaron durante 4 h a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ las diferentes concentraciones de ZnONPs, posteriormente se añadieron 100 μ L de dimetilsulfóxido. La absorbancia fue medida utilizando un lector de microplacas de Biorad®. Se utilizó como referencia la lectura a una longitud de onda de 570 nm. Con los valores de absorbancia determinados, se calculó el porcentaje de viabilidad celular, utilizando la siguiente expresión; % de viabilidad = $(\text{abs}_{\text{tratados de células 570 nm}}/\text{abs}_{\text{control de células 570 nm}}) \times 100$. Se muestran resultados procedentes de 3 experimentos independientes con 6 réplicas en cada caso [14].

2.1.5. Metodología experimental

Se evaluó la citotoxicidad de las ZnONPs en tres líneas celulares, linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica, células musculares de mioblasto de ratón de la cepa C3H (C2C12) y células de tejido adiposo de ratón de la cepa C3H (L929) que fueron empleadas usando el ensayo azul tripán. Los efectos tóxicos de las ZnONPs se analizaron después a las 24 y 48 h de incubación con estas tres líneas celulares.

2.1.6. Tratamiento de las líneas celulares

Las dos líneas celulares C2C12 (CRL-1772) y L929 (CCL-1) fueron obtenidas del *American Type Culture Collection (ATCC®)*. Estas líneas celulares se cultivaron con medio DMEM, suero bovino fetal 10%, 1% L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina. Las células fueron sembradas en frascos de 25 cm² hasta que la monocapa alcanzó una confluencia del 70%, fueron separadas utilizando tripsina y sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano a una confluencia de 1×10^4 células / pozo en un volumen de 100 μ L. A las 24 horas después de la siembra las células se lavaron por tres veces con medio DMEM sin ningún aditivo para evaluarse las ZnONPs. Para la obtención de las células mononucleares de sangre periférica se solicitó el consentimiento informado de individuos sanos, tras punción venosa la sangre se pasó por un gradiente de densidad con *Ficoll-Hipaque* por centrifugación a 500 g por 25 min a

temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron en tres ocasiones, con medio RPMI 1640 a 400 g durante 8 min. La viabilidad inicial de las células mononucleares fue controlada por el método de exclusión con azul de tripán, y en todos los casos fue superior del 95%. Las células mononucleares de sangre periférica se sembraron en placas de 96 pozos con medio RPMI 1640 suplemento de 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina- estreptomycin a una confluencia de 1×10^5 células / pozo. Los experimentos de citotoxicidad se realizaron con las tres líneas celulares a las 24 y 48 h a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a diferentes concentraciones de ZnONPs que van desde 0 a 100 µg/mL. Cada ensayo de citotoxicidad por exclusión de azul tripán fue replicado por tres veces a las mismas condiciones, y se obtuvieron resultados comparables.

2.1.7. Método de exclusión con el colorante azul de tripán

Se utilizó el método de exclusión con colorante azul de tripán, sembrando por triplicado en cada una de las líneas celulares las diferentes concentración ensayada (0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 µg/mL), colocando controles y al finalizar la exposición con las ZnONPs a las 24 y 48 h las células C2C12, L929 y células mononucleares de sangre periférica, en el caso de las células que forman monocapa, se descartó el medio de todos los pozos y se lavaron con 200 µL de solución de tampón fosfato, posteriormente todos los pozos fueron tripsinizados con un volumen de 100 µL. En este paso, a las tres líneas celulares se les agregaron 100µL del colorante azul de tripán a 0.4 w/v bien mezclado. Posteriormente se contaron las células viables en el hemocitómetro para cada réplica de cada concentración y de los controles. Los ensayos de viabilidad celular se replicaron, al menos, tres veces y los conteos los hicieron, dos personas experimentadas para minimizar la subjetividad inherente al método.

2.1.8. Análisis estadístico

Se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las células C2C12, L929 y linfocitos humanos con respecto a los valores del control para cada concentración ensayada de las ZnONPs y se construyeron curvas dosis-respuesta. Los datos fueron analizados y graficados con el programa *Graph Pad Prism* versión 7. El cálculo de la concentración letal 25, 50 y 75 (TC₂₅, TC₅₀ y TC₇₅) se realizó con el programa *Trimmed Spearman-Kärber* versión 1.5.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de las ZnONPs por FTIR

En la Figura 11, se puede observar el análisis espectroscópico FTIR para detectar los enlaces de los grupos funcionales presentes en las ZnONPs que fueron sintetizadas biológicamente a partir de extracto de betabel.

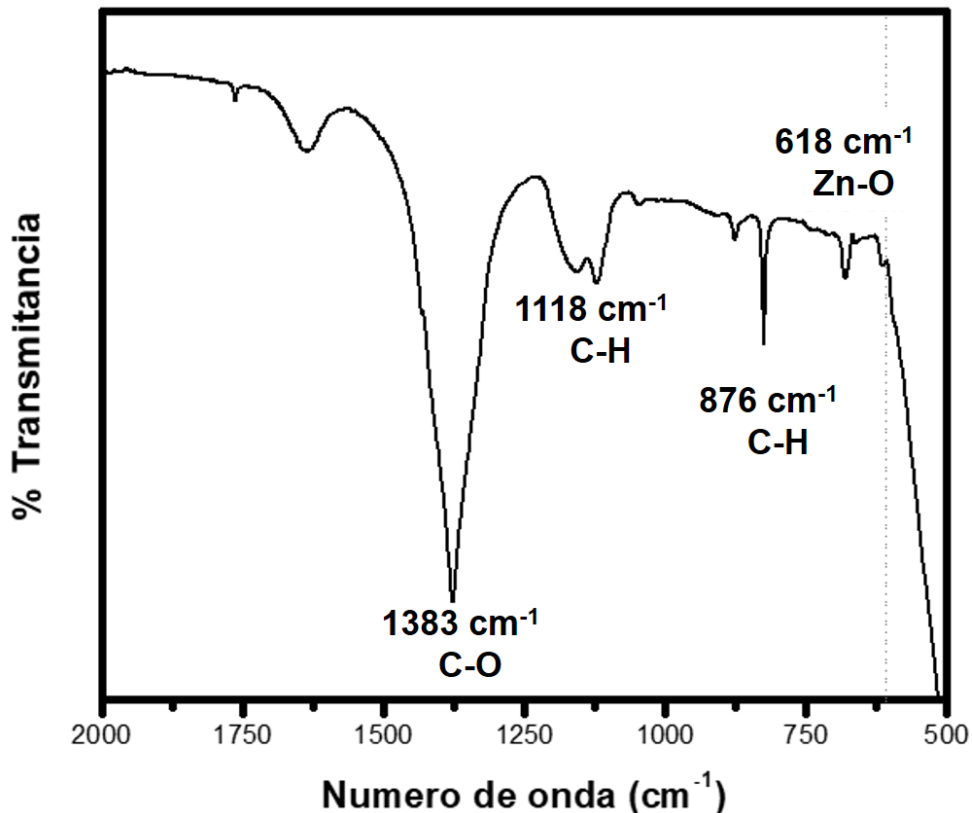


Figura 11. Espectro FTIR de ZnONPs obtenidas de extracto de betabel.

En la Figura 11, se pueden observar los picos principales que aparecen en los espectros a 1383 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} , 876 cm^{-1} , 825 cm^{-1} , 680 cm^{-1} y 618 cm^{-1} . La banda en 1383 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento del enlace C-O. Las siguientes bandas a 1118 cm^{-1} , 876 cm^{-1} y 825 cm^{-1} se asocian a enlaces de anillos aromáticos (C-H), los cuales están presentes en el extracto de la planta FTIR-X1. Por último, el pico en la región de 618 cm^{-1} es característico del enlace Zn-O FTIR-X2.

3.2. Caracterización de las ZnONPs por XRD

En la Figura 12. se muestran los resultados del patrón de XRD, donde podemos observar la presencia de varios picos de difracción en 31.66, 34.34, 36.17, 47.54, 56.60, 62.81 y 67.92, que se asignan al (100), (002), (101), (102), (110), (103) y (112) planos de cristal, respectivamente. Todos los picos anteriores se pueden indexar a la fase cristalina de Wurtzita del ZnO (ficha cristalográfica JCPDS 36-1451). Del gráfico de XRD podemos confirmar que las ZnONPs se encuentran sin la presencia de ninguna otra fase cristalina.

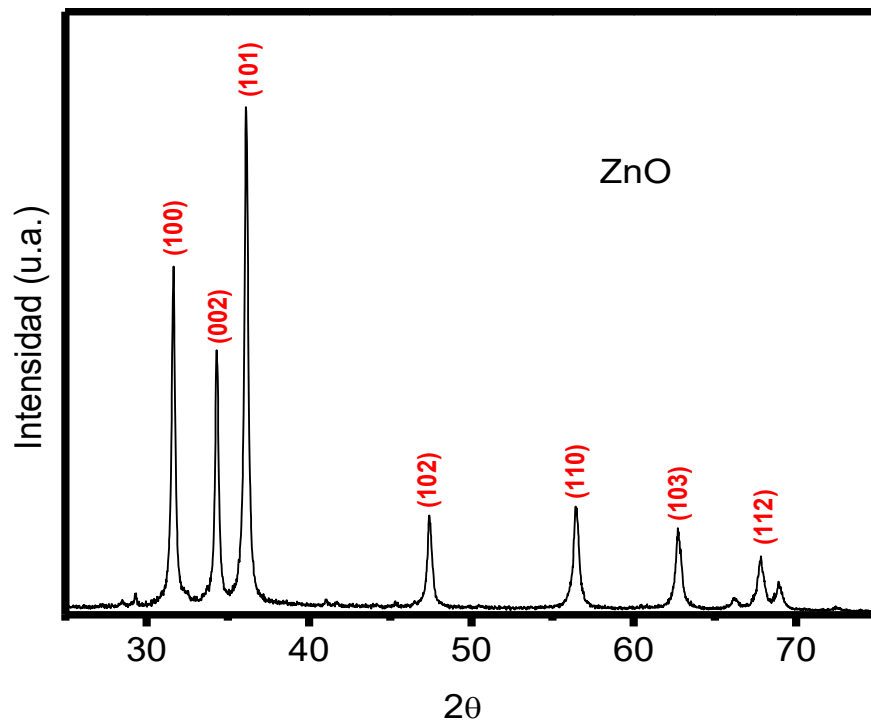


Figura 12. Patrón de difracción de rayos X de las ZnONPs.

3.3. Caracterización de las ZnONPs por TEM

En la micrografía de TEM que se muestra en la Figura 13a, podemos apreciar la morfología de la superficie y el tamaño de las ZnONPs.

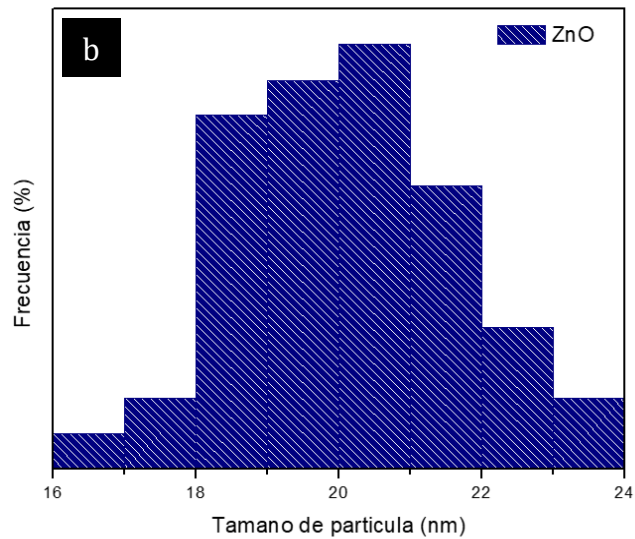
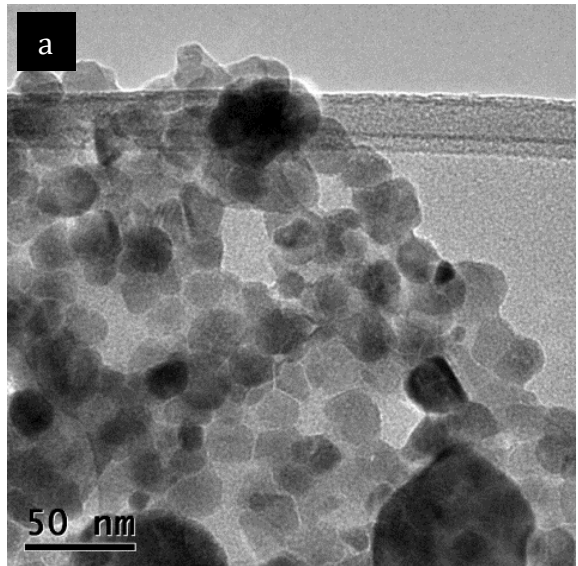


Figura 13. Estudio de morfología de las ZnONPs, a) TEM y b) distribución de tamaño de partículas.

En la imagen se aprecia que la mayoría de las NPs presenta una forma esférica y algunas son hexagonales. El tamaño de partícula promedio es de 20 nm, como se observa en el histograma, con rangos entre 16-24 nm.

3.4. Ensayo de viabilidad celular

Para determinar el efecto de las ZnONPs sobre la viabilidad celular se utilizaron las líneas celulares C2C12 y L929 de origen murino. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ZnONPs (1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/mL) durante 24 h. El crecimiento de las células expuestas fue comparado con células cultivadas en ausencia de las NPs (control negativo), estas últimas representaron el 100% de crecimiento. En la Figura 14, se muestran los resultados del porcentaje de viabilidad celular de las células expuestas a las ZnONPs respecto al control no tratado.

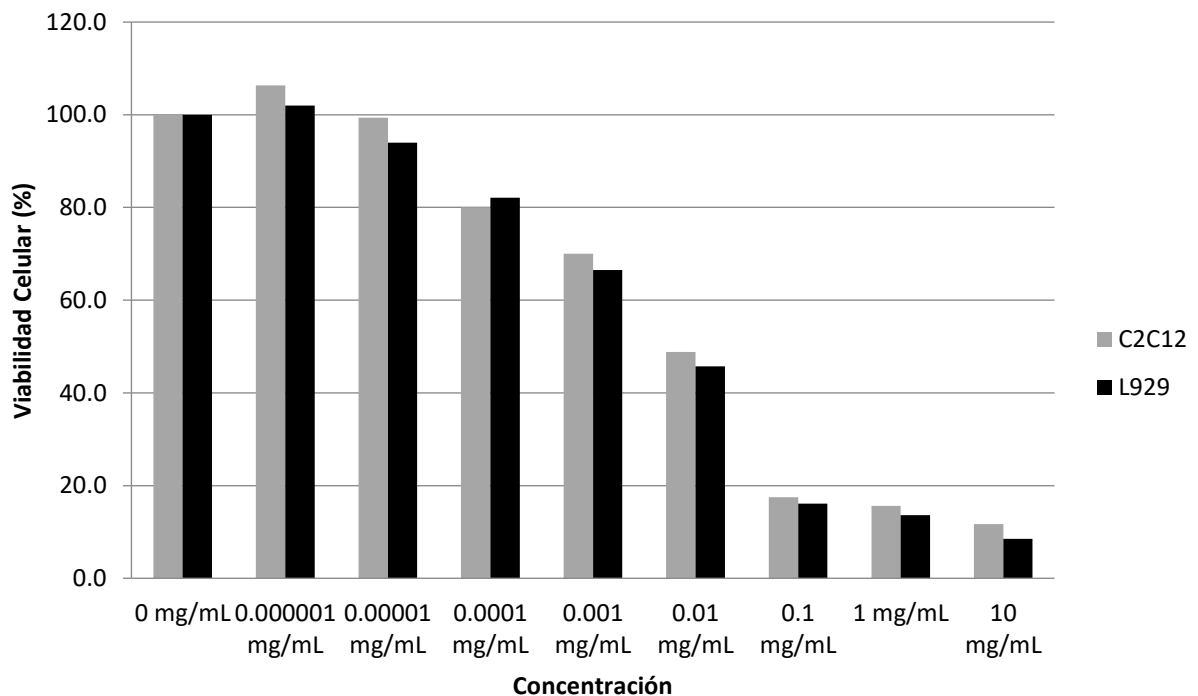


Figura 14. Líneas celulares expuestas a ZnONPs, relación entre concentración y viabilidad celular.

En Figura 14, se muestra el efecto de las ZnONPs sobre la viabilidad celular a concentraciones entre 0 y 10 mg/mL durante 24 h. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT utilizando el 100% de viabilidad celular las células cultivadas en medio de cultivo en ausencia de las ZnONPs. Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad celular para las células C2C12 y L929 que representan los valores medios \pm de 6 réplicas realizadas en tres experimentos independientes.

La exposición de las dos líneas celulares de a las ZnONPs durante 24 horas provocó una disminución significativa de la viabilidad celular, con un efecto similar en ambas líneas celulares. Se observó que a partir de una concentración de 0.0001 mg/mL de ZnONPs se condicionó una disminución de la viabilidad celular aproximada al 20%, con diferencia significativa ($p < 0.05$) a comparación de las células controles con 0mg/mL de exposición. La viabilidad celular, se redujo drásticamente en un 80%, a comparación de las líneas controles, a concentraciones de 0.1 mg/mL de ZnONPs. Para confirmar el efecto de las ZnONPs sobre la disminución de la viabilidad celular, se utilizó el método de exclusión con colorante azul de tripán.

3.5. Exclusión con el colorante azul de tripán

Los resultados de la citotoxicidad inducida por las ZnONPs utilizando el ensayo de exclusión de colorante de azul de tripán en tres líneas celulares se presentan en la Tabla 4. La exposición a ZnONPs en las diferentes líneas celulares produjo una disminución en la viabilidad celular dependiente de dosis y tiempo de exposición. Las TC de 25, 50 y 75 a las 24 h de exposición fueron de 15.5–18.5 $\mu\text{g/mL}$, 28.1–37.5 $\mu\text{g/mL}$ y 46.8–61.4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para las 3 líneas celulares expuestas. En las líneas celulares expuestas 48 h, se determinó el rango de TC_{25} en 8.4–10.8 $\mu\text{g/mL}$, TC_{50} entre 20.3–30.1 $\mu\text{g/mL}$ y TC_{75} se determinó entre 35.8–52.5 $\mu\text{g/mL}$. Los linfocitos humanos requirieron concentraciones mayores de ZnONPs en la exposición a 48 h para tener TC_{50} y TC_{75} de citotoxicidad, a diferencia de las células de origen murino.

Tabla 4. Citotoxicidad de ZnONPs (ensayo de azul tripáno).

Nanopartículas	Línea celular	Tiempo	TC₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)	TC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	TC₇₅ ($\mu\text{g/mL}$)
ZnO	Linfocitos humanos	24h	15.5	37.5	61.4
		48h	10.8	30.1	52.5
	C2C12	24 h	18.5	32.4	46.8
		48 h	10.3	23.5	37.5
	L929	24 h	16.5	28.1	47.3
		48 h	8.4	20.3	35.8

Fuente: elaboración propia realizada para calcular la citotoxicidad de las ZnONPs en ensayo de azul tripáno.

Las concentraciones y el tiempo de exposición para inducir citotoxicidad del TC₂₅, TC₅₀ y TC₇₅ fue similar en ambas líneas celulares de origen murino sin diferencia significativa.

3.6. Cinética celular de ZnONPs en líneas celulares L929 y C2C12

Para el estudio morfológico de las líneas celulares C2C12 y L929 se incubaron con ZnONPs a concentraciones de 0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Después de incubar durante 0, 6, 12 y 24 h, las imágenes al microscopio, mostraron que las células expuestas a ZnONPs en dosis más altas se volvieron de tamaño anormal, mostrando contracción celular y adquiriendo una forma irregular. La Figura 15 muestra la cinética celular de la línea L929 derivada de tejido adiposo de ratón macho, expuesta durante 0, 6, 12 y 24 h, mostrando la morfología del grupo control y del grupo expuesto a ZnONPs a 0, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

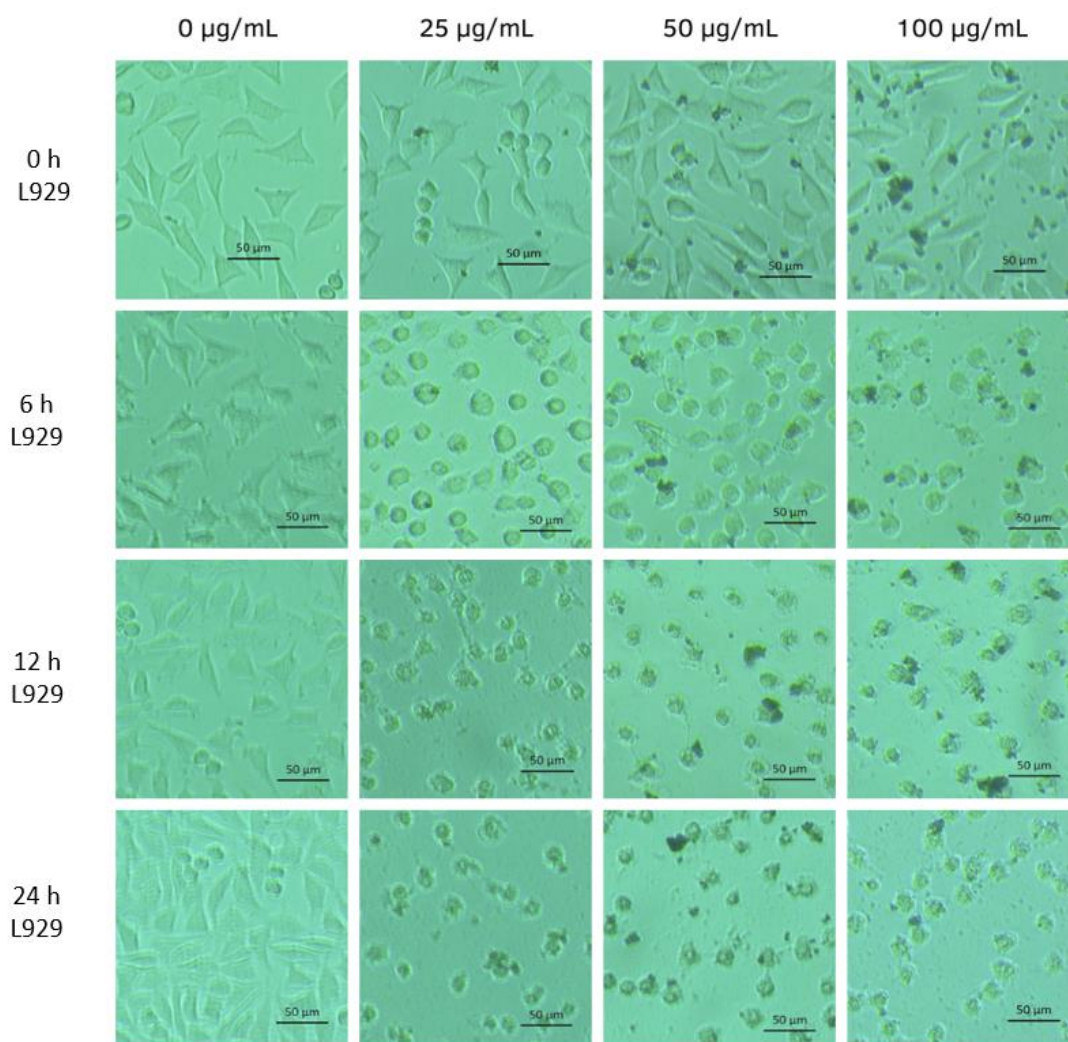


Figura 15. Estudio de cinética celular de las ZnONPs en células L929.

Las imágenes de TEM presentadas en la primera columna, corresponden a la línea celular control, que no fue expuesta a las ZnONPs, se observa el mantenimiento de la división celular. A medida que aumenta la concentración de ZnONPs, se puede observar la aglomeración del material sintetizado, con modificación de la morfología celular, reducción del citoplasma y ausencia de adhesión celular. La curva de crecimiento de las células cultivadas en condiciones de control muestra un aumento del 30% a las 6 h, del 60% a las 12 h y del 100% a las 24 h, respectivamente. Esto confirma que el medio de cultivo es adecuado y permite la tasa de división celular sin alcanzar una fase de división estacionaria, al momento de finalizar el análisis de la cinética celular.

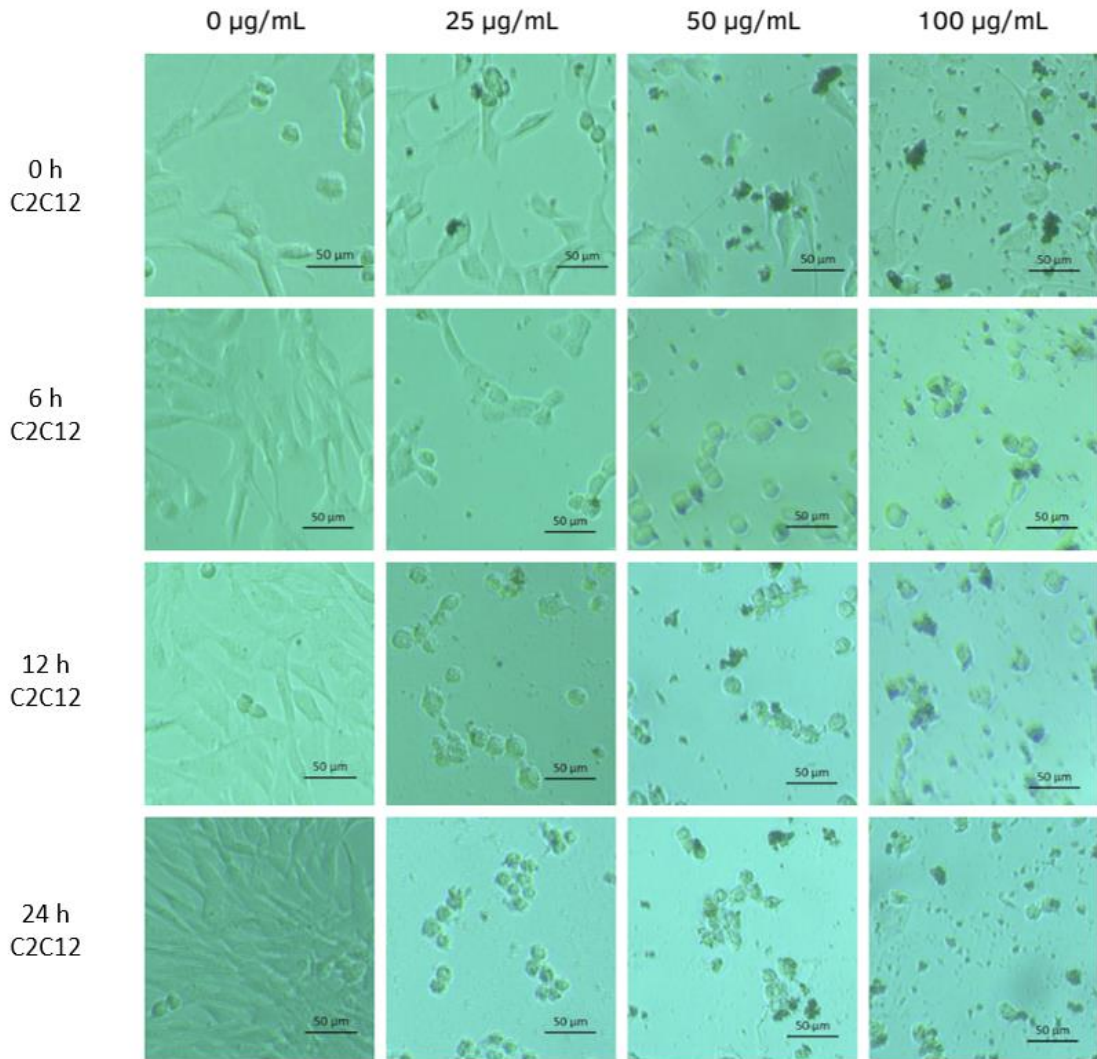


Figura 16. Estudio de cinética celular de las ZnONPs en células C2C12.

La línea celular C212 corresponde a mioblastos de ratón (células musculares) con modo de crecimiento adherente. Como se muestra en la Figura 16, la cinética celular se obtuvo a las 0, 6, 12 y 24 h de exposición, mostrando la morfología de los mioblastos de control y ZnONPs expuestos a 0, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La primera columna corresponde a la línea de control, donde es evidente que los mioblastos mantienen la división celular. A medida que aumenta la concentración de ZnONPs, se observa la aglomeración del material, con modificación de la morfología celular, reducción del citoplasma y ausencia de adhesión celular de los mioblastos. La curva de crecimiento de mioblastos cultivados en condiciones de control muestra un aumento del 25% a las 6 h, del 60% a las 12 h y del 100% a las 24 h, respectivamente.

Esto sugiere que el medio es adecuado y continúa con la tasa de división celular sin llegar a una fase de división estacionaria. En las primeras horas de exposición, la muerte celular es evidente a una concentración de 50 a 100 µg/mL.

3.7 DISCUSIÓN

Esta investigación se realizó utilizando ZnONPs sintetizada por método de química verde, con la ayuda de *Beta vulgaris* como sustrato para la generación de las nanopartículas, posteriormente estas fueron caracterizadas. Se analizó la citotoxicidad a diferentes concentraciones en tres líneas celulares; dos de ellas de origen murino y una línea celular de humano. Como se ha documentado previamente, la citotoxicidad *in vitro* en modelos celulares es dependiente de múltiples factores, tales como, el tamaño de partícula, morfología, forma de exposición, la concentración, las líneas celulares empleadas, la relación entre la cantidad de partícula con el volumen celular y el tipo de NPs, incluso si estas NPs se conjugan con otras moléculas como antioxidantes o fármacos. Las concentraciones en las que la presencia de ZnONPs comienza a reducir la viabilidad celular como se presenta en los resultados en este estudio concuerdan en general con lo reportado en la literatura [10-13]. Los resultados del ensayo MTT demostraron que las ZnONPs disminuyen la viabilidad celular de una manera dosis dependiente en las dos líneas células probadas. Los resultados obtenidos no demuestran diferencias significativas entre los dos tipos de líneas celulares (C2C12 y L929) en las diferentes dosis (0 y 10 mg/mL) de ZnONPs empleadas.

El ensayo MTT correlaciona la funcionabilidad mitocondrial y la supervivencia de células, en donde diferentes mecanismos se han señalado sobre efectos tóxicos como el estrés oxidativo, efectos de coordinación y efectos no homeostáticos, ya que las ZnONPs pueden ser internalizadas a través de la membrana de las células animales, los canales iónicos y las proteínas transportadoras permiten que las NPs, o sus iones, crucen la membrana plasmática, cuando el tamaño de la partícula es pequeña y sus iones son positivos. La reducción del MTT fue mayor a dosis entre 0.01 mg/mL y 10 mg/mL respectivamente. Algunas NPs entran por vía de endocitosis ya que la membrana las envuelve y las vesículas con NPs son transportadas al interior de las células. Las NPs pueden interactuar directamente con orgánulos oxidativos como las mitocondrias, las proteínas redox activas estimulan la producción de las especies reactivas

de oxígeno (ROS) en las células, y los iones Zn^{2+} generados por las NPs pueden inducir ROS mediante reacciones químicas. Las ROS pueden inducir daños en el ADN, y afectar la expresión génica. Además, los iones Zn^{2+} tienen la capacidad de formar quelatos con biomoléculas o desplazar a los iones metálicos en metaloproteínas específicas que podría resultar en la inactivación funcional de la proteína. Además, el aumento de ROS inducido por las NPs puede causar mutaciones puntuales en el ADN o inducir rupturas de cadena simple o doble. Otra respuesta importante al estrés oxidativo es la liberación del Ca^{2+} intracelular, que conduce a la perturbación mitocondrial y la muerte celular [15,83].

En el estudio de la citotoxicidad en células C2C12, L929 y linfocitos humanos de sangre periférica, se expusieron a concentraciones de 0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 y 48 h. Los resultados mostraron que la citotoxicidad es dependiente de la dosis y proporcional al tiempo de exposición, obteniendo valores de TC_{50} en el rango de 37.5 - 28.1 $\mu\text{g/mL}$ y de 30.1–20.3 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 y 48 h, respectivamente. Los estudios microscópicos demostraron que las células expuestas a las NPs en dosis más altas se volvieron de tamaño anormal, mostrando una contracción celular, pérdida de adhesión y adquirieron una forma irregular. El mecanismo de la toxicidad de ZnONPs puede ser provocado por el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos que probablemente juegan un papel importante en la ruptura de la membrana celular, el daño al ADN y posteriormente la muerte celular [16]. La citotoxicidad está determinada por múltiples factores, como se ha venido explicando a lo largo del escrito, influyen numerosas variables como el tamaño y morfología de la NPs, la concentración, tiempo de exposición y finalmente pero no menos importante el linaje celular, como se presenta en la tabla 2 y 3, algunas células eucariotas de origen humano, como los hepatocitos toleran mayores concentraciones por mayor tiempo a diferencia de células embrionarias humanas [27,29-30].

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

Se estableció un método de síntesis de nanopartículas de ZnO, se sintetizaron a partir de un método de química verde, en el que se utilizó extracto de *Beta vulgaris* betabel, como agente reductor.

La caracterización por HR-TEM mostró que la mayoría de las ZnONPs presentaron una forma esférica y algunas hexagonales, con un tamaño de NP promedio de 20 nm, con un rango entre 16-24nm.

La caracterizaron por FTIR, reportó picos en los espectros correspondientes a enlaces C-O, C-H y Zn-O en las bandas 1383 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} , 876 cm^{-1} y 825 cm^{-1} y 618 cm^{-1} respectivamente. La caracterización de las ZnONPs por XRD, mostró la presencia de varios picos que concuerdan con la estructura hexagonal Wurtzita del ZnO.

La citotoxicidad inducida por las ZnONPs en tres líneas celulares (C2C12, L929 y linfocitos humanos), fue dependiente de dosis y tiempo de exposición. La viabilidad celular se redujo en un 80% con las líneas celulares C2C12 y L929, a concentraciones de 0.1 mg/mL de ZnONPs.

A una concentración de $0.000001\text{ }\mu\text{g/mL}$ por 24 h, se observó un incremento en la viabilidad celular, en ambas líneas celulares, probablemente por el efecto antimicrobiano de las ZnONPs. Mientras que a una concentración de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ por 24 h, se observó la desintegración total de las células, lo cual se evidenció por la ausencia de restos celulares en el medio de cultivo.

CAPÍTULO V. REFERENCIAS

REFERENCIAS

- 1.- Fouda A, El-Din Hassan S, Salem SS, Shaheen TI. In-Vitro cytotoxicity, antibacterial, and UV protection properties of the biosynthesized Zinc oxide nanoparticles for medical textile applications. *Microb Pathog.* Sep 18;125:252-261(2018). doi: [10.1016/j.micpath.2018.09.030](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.030).
- 2.- Mishra PK, Mishra H, Ekielski A, Talegaonkar S, Vaidya B. *Drug Discov Today.* Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. Dec; 22(12):1825-1834, (2017). doi: [10.1016/j.drudis.2017.08.006](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.006).
- 3.- Beltran-Huarac, J., Tomar, M., Singh, S., Perales-Perez, O., Rivera, L., & Peña, S. Multifunctional Fe₃O₄/ZnO core-shell nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanotech,* 3(2), 405-409(2010).
- 4.- Rizwan M, Ali S, Ali B, Adrees M, Arshad M, Hussain A, Zia Ur Rehman M, Waris AA. Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere.* Sep 22;214:269-277, (2018) doi: [10.1016/j.chemosphere.2018.09.120](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120).
- 5.- Jose A, Sunaja Devi KR, Pinheiro D, Lakshmi Narayana S.J *Photochem Photobiol B.* Electrochemical synthesis, photodegradation and antibacterial properties of PEG capped zinc oxide nanoparticles. Oct;187:25-34(2018). doi: [10.1016/j.jphotobiol.2018.07.022](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.022).
- 6.- Subramaniam VD, Prasad SV, Banerjee A, Gopinath M, Murugesan R, Marotta F, Sun XF, Pathak S. Health hazards of nanoparticles: understanding the toxicity mechanism of nanosized ZnO in cosmetic products. *Drug Chem Toxicol.* Aug 13:1-10.(2018). doi: [10.1080/01480545.2018.1491987](https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1491987). PMID: 30103634.
- 7.- Sardella D, Gatt R, Valdramidis VP. *Mycology.* Assessing the efficacy of zinc oxide nanoparticles against *Penicillium expansum* by automated turbidimetric analysis. Sep 6;9(1):43-48(2017). doi: [10.1080/21501203.2017.1369187](https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1369187). eCollection 2018. PMID: 30123660.

- 8.-Wiesmann N, Klueker M, Demuth P, Brenner W, Tremel W, Brieger J. J Trace Elem Med, Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent. Biol. Aug 7. pii: S0946-672X(17)31015-5(2018). doi: [10.1016/j.jtemb.2018.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.08.002). PMID: 30115501.
- 9.- Clement, K., Iseli, A., Karote, D., Cremer, J., & Rajagopalan, S. Nanostructured materials: industrial applications. In Handbook of industrial chemistry and biotechnology (pp. 265-306). Springer, Boston, MA,(2012).
- 10.- Lin W, Xu Y, Huang CC, Ma Y, Shannon KB, Chen DR, Huang YW. Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. J Nanopart Res 2009;11:25-39. doi: [10.1007/s11051-008-9419-7](https://doi.org/10.1007/s11051-008-9419-7).
- 11.- Heng BC, Zhao X, Tan EC, Khamis N, Assodani A, Xiong S, Ruedl C, Ng KW, Loo JS. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. Arch Toxicol. Dec;85(12):1517-28(2011). doi: [10.1007/s00204-011-0722-1](https://doi.org/10.1007/s00204-011-0722-1). PMID: 21656222.
- 12.- Li J, Guo D, Wang X, Wang H, Jiang H, Chen B. The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation In Vitro. Nanoscale Res Lett. Apr 16;5(6):1063-71, (2010). doi: [10.1007/s11671-010-9603-4](https://doi.org/10.1007/s11671-010-9603-4).
- 13.- Zhao C, Zhang X, Zheng Y.J, Photochem Photobiol B. 2018 Jun;183:142-146. doi: [10.1016/j.jphotobiol.2018.04.031](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.031). Epub 2018 Apr 18.
- 14.- Rajasekhar Reddy Chokkareddy y Gan Redhi, Green Synthesis of Metal Nanoparticles and its Reaction Mechanisms: Synthesis, Characterization and Their Applications (pp.113-139), October 2018, DOI:[10.1002/9781119418900.ch4](https://doi.org/10.1002/9781119418900.ch4)
- 15.- Poh, T. Y., Ali, N. A. B. M., Mac Aogáin, M., Kathawala, M. H., Setyawati, M. I., Ng, K. W., & Chotirmall, S. H. Inhaled nanomaterials and the respiratory microbiome: clinical, immunological and toxicological perspectives. Particle and Fibre Toxicology, 15(1) (2018). doi:[10.1186/s12989-018-0282-0](https://doi.org/10.1186/s12989-018-0282-0)

- 16.- N., Demetrovici, L., Dragos, D., & Lungu, M. Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties. *Nanoparticles' Promises and Risks*, Strambeanu, (2014)., 3-8. doi:[10.1007/978-3-319-11728-7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-11728-7)
- 17.- Imran, H. J., Hubeatir, K. A., Aadim, K. A., & Abd, D. S. Preparation Methods and Classification Study of Nanomaterial: A Review. *Journal of Physics: Conference Series*, (2021). 1818(1), 012127. doi:[10.1088/1742-6596/1818/1/012127](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1818/1/012127)
- 18.- Kalpana, V. N., & Devi Rajeswari, V. A Review on Green Synthesis, Biomedical Applications, and Toxicity Studies of ZnO NPs. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1-12. doi:[10.1155/2018/3569758](https://doi.org/10.1155/2018/3569758)
- 19.- Mirzaei, H., & Darroudi, M. Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications, *Ceramics International*, 43(1), 907-914(2017). doi:[10.1016/j.ceramint.2016.10.051](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.10.051)
- 20.- Y. Yan, G. Wang, J. Huang, Y. Zhang, X. Cheng, M. Chuai, B. Brand-Saberi, G. Chen, X. Jiang, X. Yang, Zinc oxide nanoparticles exposure-induced oxidative stress restricts cranial neural crest development during chicken embryogenesis, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 194 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110415>.
- 21.- Y. Li, F. Li, L. Zhang, C. Zhang, H. Peng, F. Lan, S. Peng, C. Liu, J. Guo, Zinc oxide nanoparticles induce mitochondrial biogenesis impairment and cardiac dysfunction in human ipsc-derived cardiomyocytes, *Int. J. Nanomedicine*. 15, 2669-2683(2020). <https://doi.org/10.2147/IJN.S249912>.
- 22.- P.K. Babel, P.K. Thakre, R. Kumawat, R.S. Tomar, Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Chemosphere*. 213 (2018) 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.028>.

- 23.- P. Kumar Babele, Zinc oxide nanoparticles impose metabolic toxicity by de-regulating proteome and metabolome in *Saccharomyces cerevisiae*, *Toxicol. Reports.* 6 (2019) 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.12.001>.
- 24.- S. Liang, K. Sun, Y. Wang, S. Dong, C. Wang, L.X. Liu, Y.H. Wu, Role of Cyt-C/caspases-9,3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid, *Chem. Biol. Interact.* 258 (2016) 40-51. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.08.013>.
- 25.- L. Wang, D. Guo, Z. Wang, X. Yin, H. Wei, W. Hu, R. Chen, C. Chen, Zinc oxide nanoparticles induce human tenon fibroblast apoptosis through reactive oxygen species and caspase signaling pathway, *Arch. Biochem. Biophys.* 683 (2020) 108324. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108324>.
- 26.- M. Khan, A.H. Naqvi, M. Ahmad, Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles, *Toxicol. Reports.* 2 (2015) 765-774. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.02.004>.
- 27.- A. Czyżowska, B. Dyba, E. Rudolphi-Szydło, A. Barbasz, Structural and biochemical modifications of model and native membranes of human immune cells in response to the action of zinc oxide nanoparticles, *J. Appl. Toxicol.* 41, 458–469(2021). <https://doi.org/10.1002/jat.4057>.
- 28.- A. Czyżowska, A. Barbasz, Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles to innate and adaptive human immune cells, *J. Appl. Toxicol.* 41 (2021) 1425-1437. <https://doi.org/10.1002/jat.4133>.
- 29.-J. Li, Y. Song, R.D. Vogt, Y. Liu, J. Luo, T. Li, Bioavailability and cytotoxicity of Cerium- (IV), Copper- (II), and Zinc oxide nanoparticles to human intestinal and liver cells

through food, Sci. Total Environ. 702 (2020) 134700.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134700>.

30.- L. Patrón-Romero, P.A. Luque, C.A. Soto-Robles, O. Nava, A.R. Vilchis-Nestor, V.W. Barajas-Carrillo, C.E. Martínez-Ramírez, J.R. Chávez Méndez, J.A. Alvelais Palacios, M. Leal Ávila, H. Almanza-Reyes, Synthesis, characterization and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles by green synthesis method, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 60 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101925>.

31.- C. Aude-Garcia, B. Dalzon, J.L. Ravanat, V. Collin-Faure, H. Diemer, J.M. Strub, S. Cianferani, A. Van Dorsselaer, M. Carrière, T. Rabilloud, A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages, J. Proteomics. 134 174-185(2016).
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.013>.

32.- Y. Yan, G. Wang, X. Luo, P. Zhang, S. Peng, X. Cheng, M. Wang, X. Yang, Endoplasmic reticulum stress-related calcium imbalance plays an important role on Zinc oxide nanoparticles-induced failure of neural tube closure during embryogenesis, Environ. Int. 152 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106495>.

33.- Z. Han, Q. Yan, W. Ge, Z.G. Liu, S. Gurunathan, M. De Felici, W. Shen, X.F. Zhang, Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells, Int. J. Nanomedicine. 11 (2016) 5187-5203. <https://doi.org/10.2147/IJN.S111447>.

34.- M. Saber, R.S. Hayaei-Tehrani, S. Mokhtari, P. Hoorzad, F. Esfandiari, In vitro cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in mouse ovarian germ cells, Toxicol. Vitr. 70 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105032>.

35.-S. Sruthi, T. Nury, N. Millot, G. Lizard, Evidence of a non-apoptotic mode of cell death in microglial BV-2 cells exposed to different concentrations of zinc oxide nanoparticles, Environ. Sci. Pollut. Res. 28 ,12500-12520(2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11100-8>

- 36.- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K., & Asiri, A. M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. *Handbook of Materials Characterization*, 317-344(2018). https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_9
- 37.- M.M. Mata-Miranda, C.I. Guerrero-Robles, M. Rojas-López, R.J. Delgado-Macuil, C.A. González-Díaz, V. Sánchez-Monroy, D. G. Pérez-Ishiwara, G.J. Vázquez-Zapién, Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas, *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 225-234(2017). <HTTPS://dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17>
- 38.- SKOOG, D.A.; Leary J.J., Holler F. James; PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL, 5° ed.; Ed. McGraw-Hill (1998), págs. 409-461. <http://www.aist.go.jp>
- 39.- Abomuti, May A., Ekram Y. Danish, Ahmad Firoz, Nazim Hasan, and Maqsood A. Malik. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Salvia officinalis* Leaf Extract and Their Photocatalytic and Antifungal Activities, 2021 " *Biology* 10, no. 11: 1075. <https://doi.org/10.3390/biology10111075>
- 40.- Upadhyay, P. K., Jain, V. K., Sharma, S., Shrivastav, A. K., & Sharma, R., Green and chemically synthesized ZnO nanoparticles: A comparative study, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 798, 012025. (2020).doi:[10.1088/1757-899x/798/1/012025](https://doi.org/10.1088/1757-899x/798/1/012025)
- 41.- Ramesh, P., Saravanan, K., Manogar, P., Johnson, J., Vinoth, E., & Mayakannan, M., Green synthesis and characterization of biocompatible zinc oxide nanoparticles and evaluation of its antibacterial potential., *Sensing and Bio-Sensing Research*, 31, 100399. (2021). doi:[10.1016/j.sbsr.2021.10039](https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.10039)
- 42.- D., Zahara, H. L., Widjanarko, P. I., Joni, I. M., & Panatarani, C., Preparation and

FTIR spectroscopic studies of SiO₂-ZnO nanoparticles suspension for the development of carrageenan-based bio-nanocomposite film, Praseptianga, *3RD INTERNATIONAL CONFERENCE ON CONDENSED MATTER AND APPLIED PHYSICS (ICC-2019)*. (2020). doi:[10.1063/5.0003434](https://doi.org/10.1063/5.0003434)

43. - Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, & Aboul-Enein, H. Y., X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), 289-299. (2015) doi:[10.1080/10408347.2014.949616](https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616)

44.- Ezz elregal, E. M., Ahmed, M. A., Abdel-Messih, M. F., & Abou-Gamra, Z. M., Synthesis of novel ZnO nanoparticles with exceptional crystalline and photocatalytic features toward recalcitrant pollutant: Fluorescein dye. *Optical Materials*, 111, 110597. (2021). doi:[10.1016/j.optmat.2020.1105](https://doi.org/10.1016/j.optmat.2020.1105)

45. - Thomas, G., The impact of electron microscopy on materials research. In *Impact of Electron and Scanning Probe Microscopy on Materials Research* (pp. 1-24). Springer, Dordrecht(1999). https://doi.org/10.1007/978-94-011-4451-3_1

46.-Johan P.R. de Villiers, Peter R. Buseck, *Mineralogy and Instrumentation*, in *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition), 2003.

47.-de Almeida, W. L., Ferreira, N. S., Rodembusch, F. S., & de Sousa, V. C., Study of structural and optical properties of ZnO nanoparticles synthesized by an eco-friendly tapioca-assisted route. *Materials Chemistry and Physics*, 258, 123926 (2021).<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123926>

48.- Miroslaw Jonasz, Georges R. Fournier, in *Light Scattering by Particles in Water*, Chapter 5 - The particle size distribution Pages 267-445 (2007).

49.- *Handbook of Clay Science*, T. Kogure, in *Developments in Clay Science*, Chapter 2.9 - Electron Microscopy T. Kogure Pages 275-317 (2013).

- 50.- Duc D. La, Phuong Nguyen-Tri, Khoa. H. Le, Phuong T.M. Nguyen, M. Dac-Binh Nguyen, Anh T.K. Vo, Minh T.H. Nguyen, S. Woong Chang, Lam D. Tran, W. Jin Chung, D. Duc Nguyen, Effects of antibacterial ZnO nanoparticles on the performance of a chitosan/gum arabic edible coating for post-harvest banana preservation, *Progress in Organic Coatings*, Volume 151, 106057(2021), ISSN 0300-9440,<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106057>
- 51.- Bayu Meindrawan, Nugraha Edhi Suyatma, Ata Aditya Wardana, Vega Yoesepa Pamela, Nanocomposite coating based on carrageenan and ZnO nanoparticles to maintain the storage quality of mango, *Food Packaging and Shelf Life*, Volume 18, 2018, Pages 140-146, ISSN 2214-2894,<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.10.006>.
52. - *Colloids and Surfaces*, G. Devanand Venkatasubbu, R. Baskar, T. Anusuya, C. Arun Seshan, Ramachandran Chelliah, B: Toxicity mechanism of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against food pathogens, *Biointerfaces*, Volume 148, 2016, Pages 600-606, ISSN 0927-7765, (2016). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.042>.
- 53.- Pazos-Perez, N.; Pazos, E.; Catala, C.; Mir-Simon, B.; Gómez-De Pedro, S.; Sagales, J.; Villanueva, C.; Vila, J.; Soriano, A.; Javier García De Abajo, F.; et al. Ultrasensitive Multiplex Optical Quantification of Bacteria in Large Samples of Biofluids. *Sci. Rep.* 2016, 6, 29014. doi: [10.1038/srep29014](https://doi.org/10.1038/srep29014)
- 54.- Catala, C.; Mir-Simon, B.; Xiaotong, F.; Cardozo, C.; Pazos-Perez, N.; Pazos, E.; Gómez-de Pedro, S. Online SERS Quantification of *Staphylococcus Aureus* and the Application to Diagnostics in Human Fluids. *Adv. Mater. Technol.* 2016, 1, 1600163. DOI:[10.1002/admt.201600163](https://doi.org/10.1002/admt.201600163)
55. - Ventola, C Lee. . P & T: *Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs* , peer-reviewed journal for formulary management vol. 42,12 (2017): 742-755.
- 56.- Tomalia, D. A., Nixon, L. S., & Hedstrand, D. M. Engineering critical nanoscale design parameters (CNDPs): A strategy for developing effective nanomedicine therapies and assessing

quantitative nanoscale structure-activity relationships (QNSARs). *Pharmaceutical Applications of Dendrimers*, 3–47 (2020). doi:[10.1016/b978-0-12-814527-2.00001-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814527-2.00001-9)

57. - Dhivya, R., Ranjani, J., Rajendhran, J., Mayandi, J., & Annaraj, J. Enhancing the anti-gastric cancer activity of curcumin with biocompatible and pH sensitive PMMA-AA/ZnO nanoparticles, *Materials Science and Engineering: C*, 82, 182–189 (2018). doi:[10.1016/j.msec.2017.08.058](https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.058)

58.-Yang, X., Zhang, C., Li, A., Wang, J., & Cai, X. (2018). Red fluorescent ZnO nanoparticle grafted with polyglycerol and conjugated RGD peptide as drug delivery vehicles for efficient target cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*. doi:[10.1016/j.msec.2018.10.066](https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.066)

59.-Sadhukhan, P., Kundu, M., Chatterjee, S., Ghosh, N., Manna, P., Das, J., & Sil, P. C. Targeted delivery of quercetin via pH-responsive zinc oxide nanoparticles for breast cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*. 100, 129-140. (2019). doi:[10.1016/j.msec.2019.02.0](https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.0)

60.- J. Vaishnav, V. Subha, S. Kirubanandan, M. Arulmozhi, and S. Renganathan, “Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Celosia argentea* and its characterization,” *Journal of Optoelectronic and Biomedical Materials*, vol. 9, pp. 59–71, (2017). https://chalcogen.ro/59_VaishnavJ.pdf

61.- L. Wei, X.Y. Guo, T. Yang, M.Z. Yu, D.W. Chen, J.C. Brain tumor-targeted therapy by systemic delivery of siRNA with Transferrin receptor-mediated core-shell nanoparticles, Wang, *Int. J. Pharm.*, 510 (2016), pp. 394-405 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.127>

62.-P. Zhang, W. Liu, ZnO QD@ PMAA-co-PDMAEMA nonviral vector for plasmid DNA delivery and bioimaging. *Biomaterials*, 31, pp. 3087-3094 (2010)<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.007>

- 63.- Lin, D., Li, M., Gao, Y., Yin, L., & Guan, Y. Brain-targeted gene delivery of ZnO quantum dots nanoplatfrom for the treatment of Parkinson disease. *Chemical Engineering Journal*, 429, 132210 (2022). [doi:10.1016/j.cej.2021.132210](https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.132210)
- 64.- Wiesmann, N., Klueker, M., Demuth, P., Brenner, W., Tremel, W., & Brieger, J. Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 51, 226-234. (2018). [doi:10.1016/j.jtemb.2018.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.08.002)
- 65.-M.F. Khan, S. Siddiqui, Q. Zia, E. Ahmad, A. Jafri, M. Arshad, A. Jamal, M.M. Alam, S. Banawas, B.A. Alshehri, A. Baazeem, F. Althobaiti, A.H. Ansari, A.A. Mohammadi, J. Environ. Characterization and in vitro cytotoxic assessment of zinc oxide nano-particles in human epidermoid carcinoma cells, *Chem. Eng.* 9 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105636>.
- 66.-A.A. Ahlam, V.S. Shaniba, P.R. Jayasree, P.R. Manish Kumar, *Spondias pinnata* (L.f.) Kurz, Leaf Extract Derived Zinc Oxide Nanoparticles Induce Dual Modes of Apoptotic-Necrotic Death in HCT 116 and K562 Cells, *Biol. Trace Elem. Res.* 199 (2021) 1778–1801. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02303-8>.
- 67.-S.W. Wang, C.H. Lee, M.S. Lin, C.W. Chi, Y.J. Chen, G.S. Wang, K.W. Liao, L.P. Chiu, S.H. Wu, D.M. Huang, L. Chen, Y.S. Shen, ZnO nanoparticles induced caspase-dependent apoptosis in gingival squamous cell carcinoma through mitochondrial dysfunction and p70s6K signaling pathway , *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–16. (2020) <https://doi.org/10.3390/ijms21051612>.
68. -J. Wang, S. Gao, S. Wang, Z. Xu, L. Wei, Zinc oxide nanoparticles induce toxicity in CAL 27 oral cancer cell lines by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy, *Int. J. Nanomedicine*. 13, 3441–3450(2018). <https://doi.org/10.2147/IJN.S165699>.
- 69.-R. Ananthalakshmi, S.R.X.R. Rathinam, A.M. Sadiq, Apoptotic Signalling of Huh7 Cancer Cells by Biofabricated Zinc Oxide Nanoparticles, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 31, 1764–1773(2021). <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01852-8>.

70.-R. Wahab, M.A. Siddiqui, Q. Saquib, S. Dwivedi, J. Ahmad, J. Musarrat, A.A. Al-Khedhairy, H.S. Shin, ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 117, 267–276(2014). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.038>.

71.-M.V. Arasu, A. Madankumar, J. Theerthagiri, S. Salla, S. Prabu, H.S. Kim, N.A. Al-Dhabi, S. Arokiyaraj, V. Duraipandiyar, Synthesis and characterization of ZnO nanoflakes anchored carbon nanoplates for antioxidant and anticancer activity in MCF7 cell lines, *Mater. Sci. Eng. C*. 102, 536–540(2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.068>.

72.-M.J. Akhtar, H.A. Alhadlaq, A. Alshamsan, M.A. Majeed Khan, M. Ahamed, Aluminum doping tunes band gap energy level as well as oxidative stress-mediated cytotoxicity of ZnO nanoparticles in MCF-7 cells, *Sci. Rep.* 5 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep13876>.

73.-M. Farasat, F. Niazvand, L. Khorsandi, Zinc oxide nanoparticles induce necroptosis and inhibit autophagy in MCF-7 human breast cancer cells, *Biologia (Bratisl)*. 75, 161–174(2020). <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00325-9>.

74.-Z. Li, D. Guo, X. Yin, S. Ding, M. Shen, R. Zhang, Y. Wang, R. Xu, 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, *Biomed. Pharmacother.* 122 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109712>.

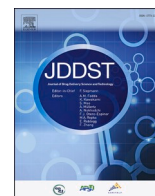
75.-M.A. R., G. B., M.J. Mohamed, A. G., S. N., Anticancer potential of zinc oxide nanoparticles against cervical carcinoma cells synthesized via biogenic route using aqueous extract of *Gracilaria edulis*, *Mater. Sci. Eng. C*. 103 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109840>.

76.-H. Chen, L. Luo, S. Fan, Y. Xiong, Y. Ling, S. Peng, Zinc oxide nanoparticles synthesized from *Aspergillus terreus* induces oxidative stress-mediated apoptosis through modulating apoptotic proteins in human cervical cancer HeLa cells, *J. Pharm. Pharmacol.* 73, 221–232 (2021). <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa043>.

- 77.- K. Dulta, G. Koşarsoy Ağçeli, P. Chauhan, R. Jasrotia, P.K. Chauhan, A Novel Approach of Synthesis Zinc Oxide Nanoparticles by *Bergenia ciliata* Rhizome Extract: Antibacterial and Anticancer Potential, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 31, 180–190. (2021). <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01684-6>.
78. -D.P. Bai, X.F. Zhang, G.L. Zhang, Y.F. Huang, S. Gurunathan, Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 6521–6535. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140071>.
- 79.-Q. Tang, H. Xia, W. Liang, X. Huo, X. Wei, Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Morus nigra* and its anticancer activity of AGS gastric cancer cells, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 202 (2020) 111698. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111698>.
- 80.- J. Cheng, X. Wang, L. Qiu, Y. Li, N. Marraiki, A.M. Elgorban, L. Xue, Green synthesized zinc oxide nanoparticles regulates the apoptotic expression in bone cancer cells MG-63 cells, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 202 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111644>.
- 81.- Y. Yan, G. Wang, X. Luo, P. Zhang, S. Peng, X. Cheng, M. Wang, X. Yang, Endoplasmic reticulum stress-related calcium imbalance plays an important role on Zinc oxide nanoparticles-induced failure of neural tube closure during embryogenesis, *Environ. Int.* 152 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106495>.
- 82.- F. Li, L. Song, X. Yang, Z. Huang, X. Mou, A. Syed, A.H. Bahkali, L. Zheng, Anticancer and genotoxicity effect of (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) Peel ZnONPs on neuroblastoma (SH-SY5Y) cells through the modulation of autophagy mechanism, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 203 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111748>.
- 83.- Patrón-Romero, L., Luque-Morales, P. A., Loera-Castañeda, V., Lares-Asseff, I., Leal-Ávila, M. Á., Alvelais-Palacios, J. A., & Almanza-Reyes, H. Mitochondrial Dysfunction

Induced by Zinc Oxide Nanoparticles. Crystals, 12(8), 1089. (2022).
<https://doi.org/10.3390/cryst12081089>

CAPÍTULO VI. ANEXOS



Research paper

Synthesis, characterization and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles by green synthesis method

L. Patrón-Romero^{a,b}, P.A. Luque^{b,*}, C.A. Soto-Robles^c, O. Nava^b, A.R. Vilchis-Nestor^d, V. W. Barajas-Carrillo^{a,e}, C.E. Martínez-Ramírez^{a,f}, J.R. Chávez Méndez^g, J.A. Alvelais Palacios^g, M.Á. Leal Ávila^g, H. Almanza-Reyes^{a,**}

^a Faculty of Medicine and Psychology, Autonomous University of Baja California, Tijuana, Mexico

^b Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño-Universidad Autónoma de Baja California, C.P. 22860, Ensenada, Baja California, Mexico

^c Tecnológico Nacional de México /I.T. de Los Mochis, C.P.81259, Los Mochis, Sinaloa, Mexico

^d Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, UAEM-UNAM, Toluca, Mexico

^e Faculty of Chemical Sciences and Engineering- Autonomous University of Baja California, Tijuana, Mexico

^f School of Medicine, University Studies Center Xochicalco, Tijuana, Baja California, Mexico

^g School of Health Sciences, Valle de Las Palmas, Autonomous University of Baja California, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Zinc oxide
Green synthesis
Nanoparticles
Cytotoxicity

ABSTRACT

The use of engineered nanoparticles (NPs) has increased considerably because of their almost universal applications, such as electronics, optical, pharmaceutical, biomedical and energy fields, which have been expanding rapidly during the past few decades. Due to the widespread applications of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs), the potential exposure of workers, consumers and scientists to these particles has increased. We conducted a ZnONPs synthesis through a low cost, eco-friendly and sustainable method, where *Beta vulgaris* extract was utilized as a reducing agent. Characterization of ZnONPs was conducted by High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analysis (XRD) to obtain the morphological properties. In this study, we evaluate ZnONPs toxicity *in vitro* in two mouse fibroblast cell lines C2C12 and L929 myoblast cell lines and human lymphocytes from peripheral blood (HLPB), using Trypan blue dye exclusion method. MTT assay method only in cell lines C2C12 and L929 after 24 h of exposure. The results show the ZnONPs size was between 16 and 24 nm, with hexagonal crystal structure and semi-spherical morphology. The toxic effects of ZnONPs were analyzed in the two cell lines after a 24 and 48 h incubation period. The value of TC50 ZnONPs was calculated after a 24 h exposure, which was found to be between 28 and 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20–30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at a 48 h exposure. The viability value was reported non toxic at concentrations of 1×10^{-6} – 1×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1. Introduction

Due to the almost universal application of NPs, the nanoindustry has become one of the fastest-growing industries after the industrial revolution. Scientific literature defines nanoparticles as a particle with a dimension between 1 and 100 nm [1–5]. In nanoscale, materials acquire different properties to its “bulk” conventional state. The relative increase of surface area of the NPs increases its reactivity. Within the largest production of NPs there are Silicon Oxide, Titanium, Zinc, Iron, Silver, Aluminium, as well as Carbon nanotubes. By 2013, the ZnONPs

production was estimated at 33,400 tons, ending up in the third place of the global nanoindustry [6]. Considering the amount of ZnONPs production, a green synthesis method is reliable yet eco-friendly compared to any chemical or physical processes [7]. Nanoparticles have unique physical and chemical properties, what makes its application more efficient and in some cases more harmful and toxic. The potential exposure of workers, consumers, and scientists to these NPs has increased considerably. Therefore to assure its biological security, it is essential to conduct toxicity and cytotoxicity studies both *in vitro* and *in vivo*, in order to define if its administration is safe in biological systems.

* Corresponding author. Carr. Transpeninsular 3917, U.A.B.C., 22860 Ensenada, B.C, Mexico.

** Corresponding author. Calzada Universidad # 14418, Parque Industrial Internacional Tijuana, Tijuana, B.C, C.P. 22427, Mexico.

E-mail addresses: pluque@uabc.edu.mx (P.A. Luque), almanzareyes@uabc.edu.mx (H. Almanza-Reyes).

The impact of Nanoparticles has been such that in 2004 Donaldson and co-workers proposed to use the term nanotoxicity, they also expressed the need for the development of a new discipline: Nanotoxicology. By 2016, 2729 publications related to the toxicity of ZnONPs in uni or multicellular biological systems were published [8–13]. Recently, Zhao C, and colleagues demonstrated that ZnONPs presented cytotoxicity concentration-dependent against pancreatic cancer cells [14]. Jia Liu and colleagues also reported that ZnONPs had significant toxic effects in human neuroblastoma SHSY5Y cells [15]. Therefore, we aimed to investigate the toxic effects of ZnONPs in mouse adipose and myoblast cell lines (C2C12 and L929), human peripheral blood lymphocytes (HPBL) cells and their cytotoxic effects, under *in vitro* conditions. Meanwhile, we discuss the toxic effects of ZnONPs with different concentrations.

2. Experimental

2.1. Materials

The materials used for the synthesis of ZnONPs were *Beta vulgaris* extract as a reducing agent and Zinc Nitrate as the zinc precursor ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

To perform cytotoxicity analysis, two mouse cell lines C2C12 and L929 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC®), MTT (Sigma-Aldrich), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Dimethyl Sulfoxide, Trypan blue dye and water from Milli-Q® Integral (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). The HPBL were obtained from two healthy individuals.

2.2. Preparation of the *Beta vulgaris* extract and green synthesis method of ZnONPs

For the extraction process, *Beta vulgaris* sample was homogenized by cutting it into pieces of approximately 1 cm and left to dry for 12 h in a food dehydrator. Afterwards, the extraction was carried out with 50 mL of distilled water and 1 gr of *Beta vulgaris* (2% weight-volume); this solution was placed on a shaker with constant stirring at room temperature for 2 h. After this, the solution was placed in sous-vide at 60 °C for 1 h. Lastly, the mixture was filtered using vacuum filtration and the extracts were stored.

The synthesis of ZnONPs process was prepared using 2 g of Zinc Nitrate ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) as a Zn precursor, added to 42 mL of *Beta vulgaris* extract and was placed in a round-bottomed flask (100 mL) and stirred until it was completely dissolved. Following this, the sample was placed in a water bath at 60 °C until the sample presented a pasty consistency and later was calcined at 400 °C for 1 h.

2.3. Characterization of ZnONPs

The materials obtained were characterized using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) to observe functional groups present in these materials, X-Ray diffraction (XRD) to study the crystal structure, High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM) to study nanoparticles morphology and size distribution present in the material.

2.3.1. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The FT-IR specters were obtained manipulating an infrared spectrophotometer Spectrum Two (PerkinElmer) with a direct detector in transmittance mode and at 0.5 cm^{-1} resolution. The ZnONPs were placed in contact with horizontal attenuated total reflectance (HATR) at room temperature (20 °C) and the specters were achieved using Version 6.0 of Spectrum Lab software. The analysis was done using a 4 cm^{-1} resolution and a frequency range of 2000–500 cm^{-1} .

2.3.2. X-ray diffraction analysis

The X-Ray diffraction analysis was implemented using an X-Ray

diffractometer (D2-Phaser, Bruker). The ZnONPs sample was grinded in an agate mortar and was carried out and placed in a quartz plaque for radiation exposure of Cu K- α at a wave length of 1.5406 Å. The diffractometer operated at 30 kV, 10 mA in range of 2θ de 25–75°, with a step size of 0.02°, and a count time of 1s/step.

2.3.3. High-Resolution Transmission Electron Microscopy analysis

For this analysis, samples of synthesized ZnONPs using *Beta vulgaris* extract were dispersed in isopropyl alcohol through ultrasound. Immediately after, a small amount was placed in a carbon coated copper grid to dry under environmental conditions and then examined under transmission electron microscopy. The mean size was calculated using Image J software.

2.4. Cell viability assay

Cellular viability assay was performed using C2C12 and L929 cells. Cells were seeded in each well in 96-well plates with 2×10^4 cell/well in a 100 μL volume. Then, the cells were incubated at 5% CO_2 atmosphere at 37 °C for 24 h. ZnONPs were added in 100 μL to obtain desired concentration (1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The cells were incubated in presence of ZnONPs for 24 h. The control group was untreated. MTT assay (Sigma-Aldrich)/Dulbecco's Modified Eagle Medium was added to each well and was incubated for 4 h. The MTT solution was aspirated and dimethyl sulfoxide was added. Purple MTT crystals were formed and its absorbance was measured at 570 nm using microplate reader (Bio-Rad microplate). Cell growth was compared to cultivated cells in the absence of product as negative controls, which represented growth in 100%. With determined levels of absorbance, percentage of cell viability was calculated using the following formula: % of viability = $(\text{abs}_{\text{treated cells 570nm}}/\text{abs}_{\text{cell control 570nm}}) \times 100$. The results of three previous independent experiments are shown.

2.5. Cytotoxicity evaluation

Cytotoxicity of ZnONPs was evaluated using three cell lines, HLPB obtained from peripheral blood, muscular cells from mouse myoblast C3H (C2C12) strain and cells from mouse adipose tissue C3H (L929) strain using Trypan blue dye. Toxic effects of ZnONPs were analyzed after for a 24 and 48 h period incubation in these three cell lines.

2.5.1. Cell line treatment

The two cell lines C2C12 (CR-1772) and L929 (CCL-1) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC®). These cell lines were cultivated in a DMEM medium, 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Cells were seeded in 25 cm^2 flask until monolayer reached 70% confluence, then were separated using trypsin and again seeded in 96 well plates to a confluence 1×10^4 cells/well added to a 100 μL volume. After 24 h of cell seeding, these were rinsed 3 times in DMEM without any additive to evaluate ZnONPs. In order to obtain lymphocytes from peripheral blood, a consent form was signed by healthy patients. After venous puncture, blood was passed through a density gradient with Ficoll-Hipaque by centrifugation at 500g at room temperature for 25 min. Afterwards, it was rinsed 3 times with RPMI 1640 medium at 400 g for 8 min. The initial viability of HPBL cells was controlled by Trypan blue dye exclusion method and in all cases, it was above 95%. HPBL were inoculated in 96 well plates in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum supplement and 1% penicillin-streptomycin in a 1×10^5 cells/well confluence. Cytotoxicity experiments were performed in three cell lines at a temperature of 37 °C in 24 and 48 h period, 5% CO_2 atmosphere and at different ZnONPs concentrations that vary from 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Every Trypan blue dye exclusion method cytotoxicity assay was replicated three times under the same conditions and comparative results were obtained.

2.5.2. Trypan blue dye exclusion method

Trypan blue dye exclusion method was used, by seeding in triplicate each of the cell lines at different concentrations tested (0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), placing controls and at the end of expiation with ZnONPs, at 24 h and 48 h, with C2C12, L929 and HPBL. When cells formed a monolayer, the medium was discarded in all wells and washed with 200 μL of phosphate buffer solution. Subsequently, all wells were trypsinized with 100 μL . In this step, 100 μL of Trypan blue dye was added and mixed to the two cell lines and to human lymphocytes from peripheral blood at 0.4 w/v. Viable cells for each replica at different concentrations and for the controls were counted using a hemocytometer calculator. Cell viability assays were replicated at least three times.

2.6. Statistical analysis

Percentage of cell viability of C2C12, L929 and HPBL was obtained within the values of control at each ZnONPs concentration tested and dose-response graphs were generated. Data was analyzed and graphed using Graph Pad Prism version 7 software. Using Trimmed Spearman-Kärber version 1.5 lethal concentrations was calculated at 25, 50 and 75 (TC25, TC50 and TC75).

2.7. Cell morphology analysis

For the morphological study, cells were incubated with ZnONPs at concentrations 0, 12.5, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After incubation for 0, 12, and 24 h, morphological cell changes were evaluated using Nikon inverted microscope (Nikon Diaphot 300). Triplicate experiments were performed.

3. Results

3.1. Mechanism for the formation of ZnONPs

Fig. 1 shows the ZnONP formation mechanism; where the compounds present in *Beta vulgaris* (Betacyanins and Betaxanthins) [16] react with the zinc nitrate to form complexes with Zn^{+2} . The biomolecules present in the *Beta vulgaris* extract form coordinated metal complexes with the Zn^{+2} to subsequently form the ZnONPs; later, the complex is decomposed through heat treatment (calcination) [17].

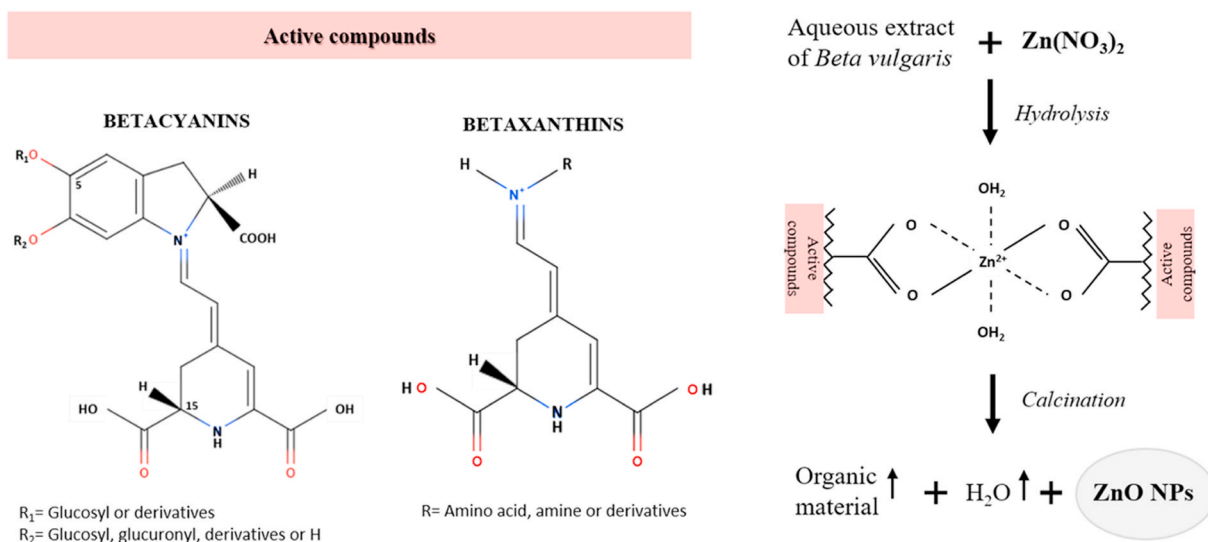


Fig. 1. Possible ZnONP formation mechanism using *Beta vulgaris* extract.

3.2. Characterization

3.2.1. FTIR

In Fig. 2, FT-IR spectroscopy analysis can be observed, used to detect functional groups bonds present in ZnONPs biologically synthesized from *Beta vulgaris* extract. In Fig. 2 main peaks can be observed in wavelength of 1640 cm^{-1} , 1377 cm^{-1} , 1157 cm^{-1} , 1122 cm^{-1} , 825 cm^{-1} , 680 cm^{-1} y 618 cm^{-1} . Vibrations appear at a frequency from 1800 to 650 cm^{-1} , and corresponds to different functional groups present in *Beta vulgaris* extract, where at 1640 cm^{-1} an amine group appears (N-H) and at peak 1377 cm^{-1} corresponds to C-N stretching mode bonds. Wavelengths at 1200 to 680 cm^{-1} are associated with aromatic bonds C-H and C-O-C [18]. Finally, the peak in region 618 cm^{-1} is characteristic of a Zn-O bond.

3.2.2. XRD and structural study

In Fig. 3 XRD pattern results are shown, where we can observe the presence of several diffraction peaks at 31.66, 34.34, 36.17, 47.54, 56.60, 62.81 and 67.92, which correspond to (100), (002), (101), (102), (110), (103) y (112) crystal planes respectively. All peaks mentioned before can be indexed in crystalline phase of Wurtzita (JCPDS No. 36-1451 Card) [19,20]. From XRD graphic, the ZnONPs were present without any other crystalline phase. The average size of ZnONPs from

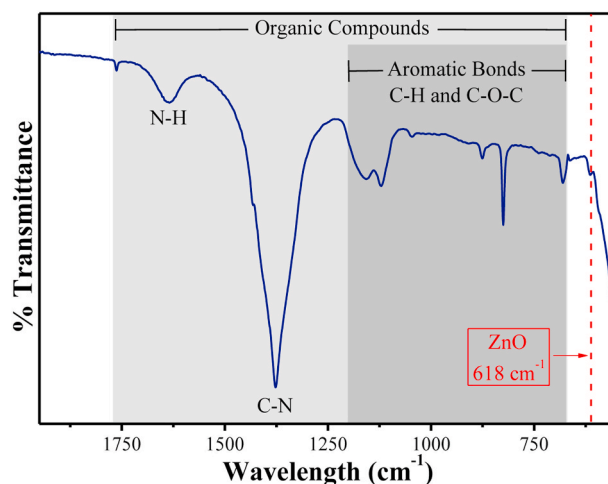


Fig. 2. FT-IR analysis of ZnONPs obtained from *Beta vulgaris* extract.

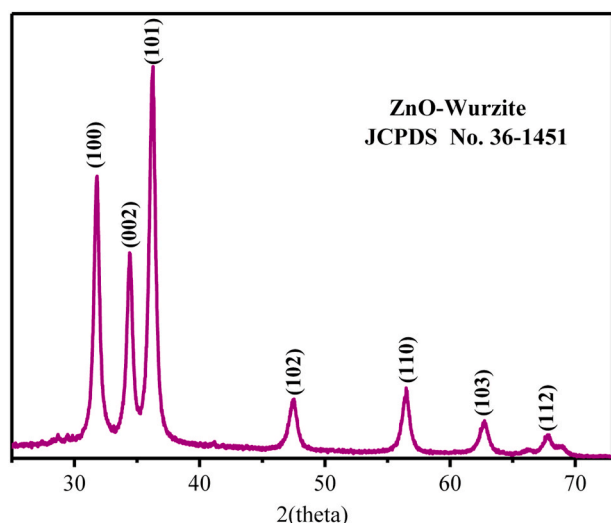


Fig. 3. ZnONPs XRD.

Beta vulgaris extract was determined to be 20 nm, using Scherrer's equation: $\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$ Where τ is the crystal's mean size, K is a dimensionless shape factor with a constant value of 0.9, λ is the X-ray wavelength, β is the mean value of its maximum peak usually called FWHM and θ corresponds to Bragg's angle [21].

3.2.3. Morphological study

Images from HR-TEM revealed that the hydrodynamic diameter of ZnONPs was between 16 and 24 nm with morphology similar to a sphere (Fig. 4 A), however, some have hexagonal structure. From our sample images, 200 particles were measured randomly, and the average size of a particle was determined to be 20 nm, as it can be observed in the particles size distribution histogram (Fig. 4 B). Size distribution behaviour was similar when calculated using Scherrer's equation in XRD analysis.

3.3. Cellular viability assay

The ZnONPs effect over cell viability was evaluated in cell lines C2C12 and L929 at different concentrations (1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) during a period of 24 h. The growth of exposed cells was compared to cultured cells in the absence of the product, the latter presented growth in 100%. Fig. 5 shows the results of the percentage of cell viability of the cells exposed to ZnONPs in regards to untreated control. The exposure of ZnONPs in both cell lines used in the study over a 24 h period, prompted a significant decrease in cell viability; the sensitivity in the different cell lines was very similar. It was observed that a low toxicity occurred from 1×10^{-6} and 1×10^{-5} $\mu\text{g}/\text{mL}$, with a cell viability between 95 and 98% respectively, compared to concentrations of 0.001 and 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which exhibited high toxicity levels, with a cell viability of 45 and 65%. At concentrations of 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, after 24 h exposure cell viability of C2C12 and L929 resulted in high mortality rates, approximately 90% and 95%, respectively. To confirm the effect of the ZnONPs over the decrease in cell viability, Trypan blue dye exclusion method was utilized to avoid interference with the ZnONPs during its absorbance reading.

Fig. 5 shows the ZnONPs effects on cell viability at concentrations between 0 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay, using 100% of cell viability of cultured cells in a culture medium in absence of ZnONPs. The graphs show the percentage of cell viability of C2C12 and L929, which represent the mean values \pm of 6 replicas done in three independent experiments.

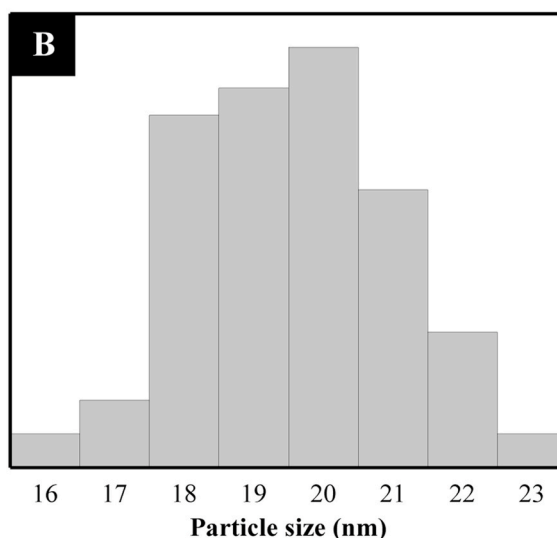
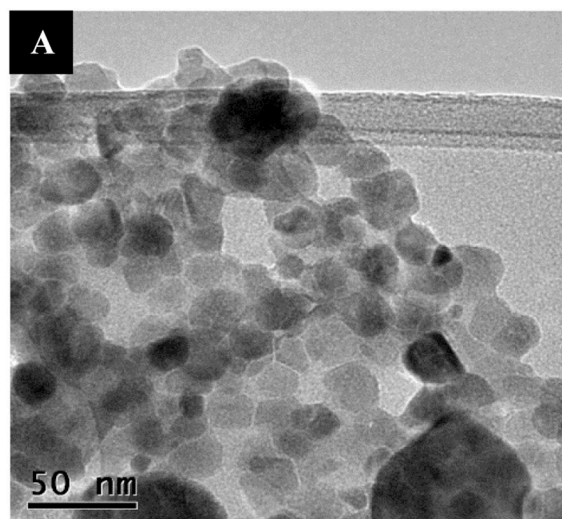


Fig. 4. Morphological study of ZnONPs: a) TEM micrograph showing ZnONPs form and size at 50 nm scale, and b) Histogram to determine particles size distribution.

3.4. Cytotoxicity assay: Trypan blue dye exclusion method

The cytotoxicity results of the ZnONPs using the Trypan blue dye exclusion method in three cell lines is presented in Table 1. The ZnONPs exposure in different cell lines caused inhibition in cellular viability dependent on dosage and time of exposure.

The TC50 of ZnONPs at 24 h of exposure was 28.1–37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas the TC25 in the same period was between 15.5 and 18.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and TC75 was estimated between 46.8 and 61.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the 48 h exposure of ZnONPs, the range of TC50 was between 30.1 and 20.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TC25 resulted between 10.8 and 8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and TC75 was between 52.5 and 35.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.5. Cell morphology study

For the morphological study of C2C12 and L929 cells were incubated with ZnONPs at concentrations of 0, 12.5, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After incubating for 0, 6, 12, and 24 h, microscopic studies showed that cells exposed to ZnONPs at higher dosage became abnormally sized, showing cellular contraction and acquiring an irregular form.

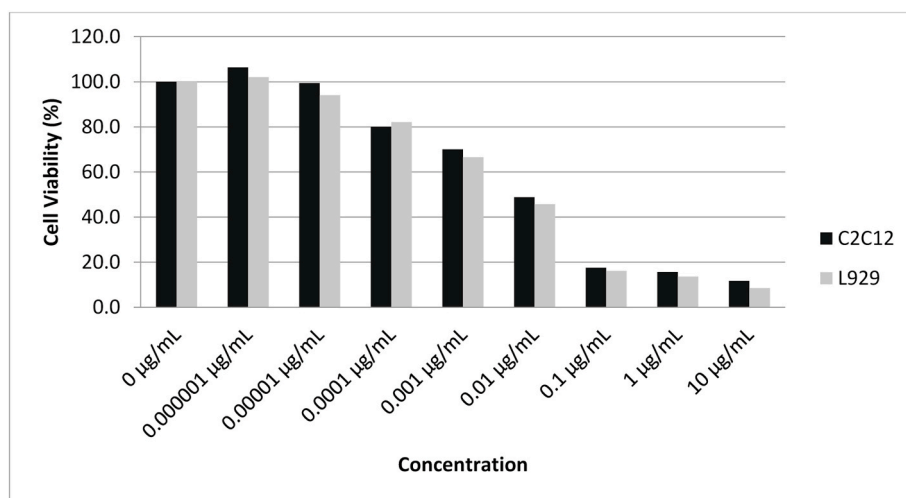


Fig. 5. ZnONPs effects on cell viability.

Table 1

ZnONPs cytotoxicity (Trypan blue assay).

Nanoparticles	Cell Type	Time	TC25 (µg/mL)	TC50 (µg/mL)	TC75 (µg/mL)
ZnO	Human lymphocytes	24 h	15.5	37.5	61.4
		48 h	10.8	30.1	52.5
	C2C12	24 h	18.5	32.4	46.8
		48 h	10.3	23.5	37.5
L929	24 h	16.5	28.1	47.3	
	48 h	8.4	20.3	35.8	

L929 cell line derived from normal subcutaneous areolar and adipose tissue of a 100-day-old male C3H/An mouse, commonly used for cytotoxicity studies. As it is shown in Fig. 6, cellular kinetic is exposed at 0, 6, 12, and 24 h, showing morphology of control group and ZnONPs exposed group at 0, 25, 50 and 100 µg/mL. As it can be observed in the control's first column, maintenance of cell division, which is expected for the medium culture where they are located. As ZnONPs concentration rises, agglomeration of the material can be observed, with cellular morphology modification as well as cytoplasm reduction and absence of cellular adhesion. Images are presented at 50 µm scale. Cultivated cells growth curve under control conditions show an increase of 30% at 6 h, 60% at 12 h and 100% at 24 h respectively. This suggests that the medium is adequate and continue with cellular division rate without reaching a stationary division phase.

Cell line C2C12 corresponds to mouse myoblast (muscle cells) with adherent growth mode. As it is shown in Fig. 7, cellular kinetic is exposed at 0, 6, 12, and 24 h, showing morphology of control myoblasts and ZnONPs exposed at 0, 25, 50 and 100 µg/mL. As it can be observed in the control's first column, myoblasts maintain cell division, which is expected for the medium culture where they are located. As ZnONPs concentration rises, agglomeration of the material can be observed, with cellular morphology modification as well as cytoplasm reduction and absence of myoblasts cellular adhesion. Images are presented at 50 µm scale. Cultivated myoblasts growth curve under control conditions show an increase of 25% at 6 h, 60% at 12 h and 100% at 24 h respectively. This suggests that the medium is adequate and continue with cellular division rate without reaching a stationary division phase. Within first hours of exposure, cell death is evident at a concentration of 50–100 µg/mL.

4. Discussion

In this experiment, we use an eco-friendly method known as 'Green synthesis' to obtain ZnONPs with *Beta vulgaris* to reduce metal salt into nanoparticles. The "green synthesis" approach is gaining great attention in current research because it provides minimization of waste, reduction of pollution, and the use of non-toxic solvent [22]. Thus, characterization was conducted by High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analysis (XRD), to determine the size and morphology of the ZnONPs. The ZnONPs cytotoxicity effect *in vitro* with two cell lines and HPBL depend on different factors such as size, form, concentration, cell lines used and type of ZnONPs. The concentrations in which the presence of ZnONPs begin to reduce cell viability, as its observed in this study, is consistent with previous reports in the literature. To our knowledge, a few studies have been done in HPBL, with different size and concentrations of nanomaterials, Shalini et al. reported the effect of size and shape on toxicity of ZnONPs in HPBL, with an average diameter of 187 nm and with spherical-shaped ZnONPs. They also administered other ZnO nanomaterial and found that the NPs and the nanorods (NRs) possessed higher level of oxidative potential and reactive oxide species (ROS) generation capacity than microparticles (MPs) and microrods (MRs). They report a correlation between the size and the DNA damage, the smaller the NPs are, the higher genotoxic effect, while larger MRs and MPs were more cytotoxic. This confirms that the morphology of the ZnONPs has an effect in cellular viability [23]. MTT assay and Trypan blue method results showed that ZnONPs decrease cell's viability capacity in a dose-dependent manner in three cell lines tested. Results obtained do not demonstrate significant differences in two types of cell lines (C2C12 and L929) at different doses (0 and 10 mg/mL) of ZnONPs used. MTT reduction was higher at ZnONPs concentrations between 0.01 µg/mL and 10 µg/mL. MTT assay correlates mitochondrial functionality and cell survival. Different mechanisms have been pointed out about toxic effects such as oxidative stress, coordination effects and non-homeostatic effects. The ZnONPs can be internalized through the cell membrane, ion channels or transport proteins. Also some ZnONPs get into the cell via endocytosis. Zinc nanoparticles can interact directly with organelles, such as the mitochondria and redox-active proteins. Toxicity's mechanism of ZnONPs can also be triggered by oxidative stress and lipid peroxidation, that probably play an important role in cellular membrane rupture, following DNA damage and cell death [24]. ROS can induce DNA damage and affect genetic expression. Moreover, Zn²⁺ ions have the capacity to form chelates with biomolecules or displace metal ions in specific metalloproteins that could result in functional inactivation of the protein. In addition, the increase in ROS

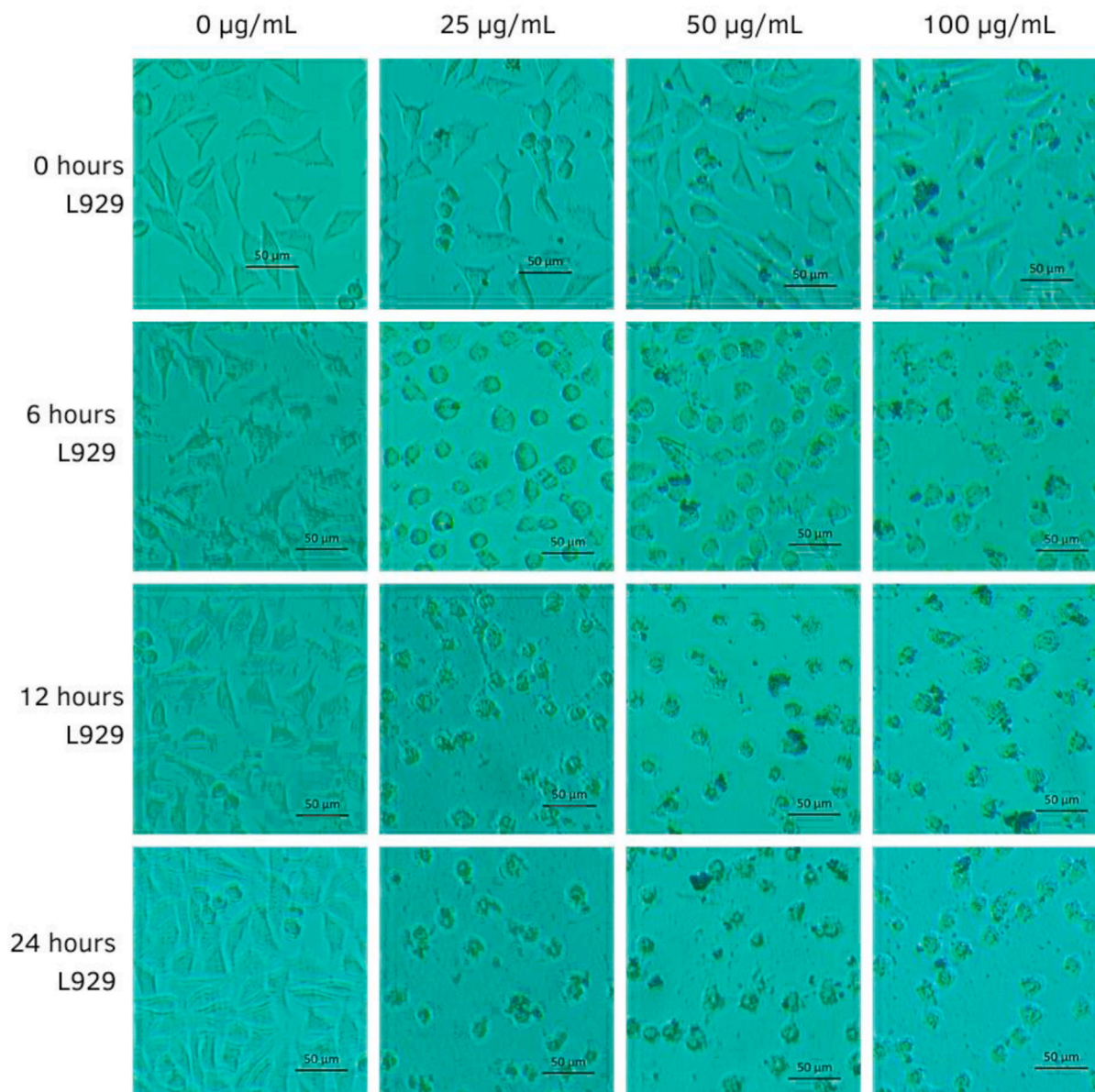


Fig. 6. Images of L929 cell with 0 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL at 0, 6, 12 and 24 h respectively.

levels, induced by ZnONPs can cause DNA point mutations or induce single and double strand breaks. Another important response to oxidative stress is the intracellular liberation of Ca^{2+} , that leads to mitochondrial perturbation and cell death [25]. This phenomenon suggests a cell death mechanism by necrosis. Although specific cytotoxicity mechanisms are unknown, these may well involve changes in membrane's permeability or in mitochondrial enzyme activity that would lead to cell death. These observations are in accordance with reports by Yang and col. (2010), who documented that ZnONPs are highly toxic to NIH/3T3 cells, since cells lose their viability by causing membrane leaks and morphological changes [25,26]. Our results indicate the need to continue investigations in human cells, particularly mononuclear cells from peripheral blood. This will allow us to elucidate ZnONPs biochemical targets, because when concentrations of 100 µg/mL were used, we were able to observe a cytopathic effect on cells, which was evidenced by the absence of cell debris in the culture medium.

5. Conclusion

Many studies have been conducted in different cell lines on ZnONPs toxicity; however, some reported results are contradictory, particularly in terms of the size of NPs that affect their cytotoxicity. Therefore, ZnONPs toxicity remains to be clarified, needing an extensive toxicological evaluation to confirm different *in vitro* results.

CRedit authorship contribution statement

L. Patrón-Romero: Investigation. **P.A. Luque:** Conceptualization, Writing - review & editing. **C.A. Soto-Robles:** Conceptualization, Methodology. **O. Nava:** Conceptualization, Investigation. **A.R. Vilchis-Nestor:** Conceptualization. **V.W. Barajas-Carrillo:** Methodology. **C.E. Martínez-Ramírez:** Visualization, Investigation. **J.R. Chávez Méndez:** Conceptualization, Methodology. **J.A. Alvelais Palacios:** Conceptualization, Methodology. **M.A. Leal Ávila:** Conceptualization, Methodology. **H. Almanza-Reyes:** Writing - review & editing, Data curation, Writing - original draft.

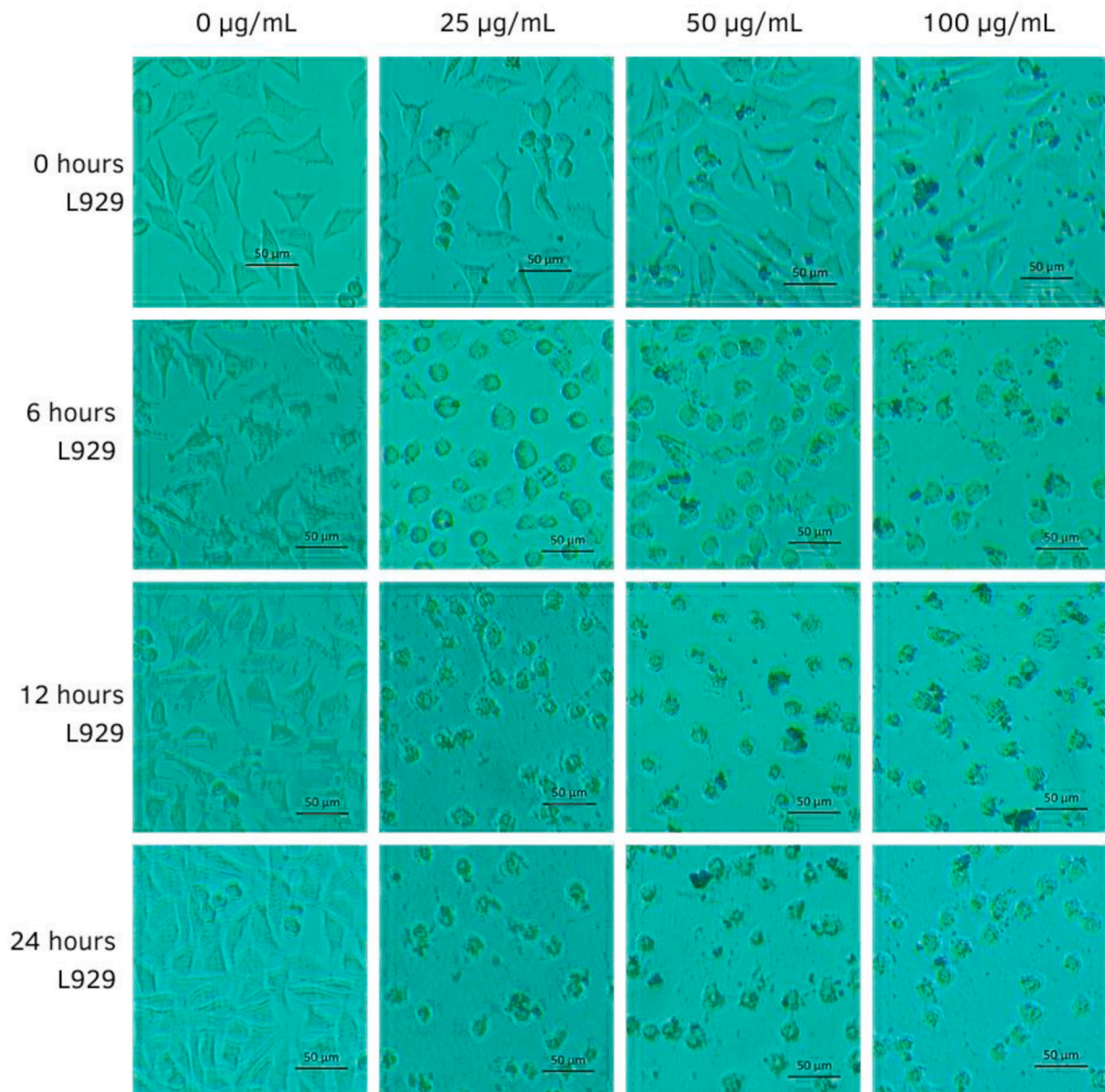


Fig. 7. Images C212 cells with 0 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL at 0, 6, 12 and 24 h respectively.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Authors thank to CONACYT for financial support (Grant No. 295075 Infrastructure, Grant 4940 National Problems) and to the Autonomous University of Baja California for project number 676.


References

- [1] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science* 311 (2006) 622–627, <https://doi.org/10.1126/science.1114397>.
- [2] P.K. Mishra, H. Mishra, A. Ekielski, S. Talegaonkar, B. Vaidya, Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications, *Drug Discov. Today* 22 (2017) 1825–1834, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.006>.
- [3] M.S. Tomar, S.P. Singh, O. Perales-perez, L. Rivera, P. Rico, Department of Engineering Science & Materials, University of Puerto Rico at Mayagüez ; Mayagüez- Multifunctional Fe₃O₄/ZnO Core-Shell Nanoparticles for Photodynamic Therapy Characterization Techniques, vol. 3, 2010, pp. 405–408.
- [4] P.G. Jamkhande, N.W. Ghule, A.H. Bamer, M.G. Kalaskar, Metal nanoparticles synthesis: an overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 53 (2019) 101174, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>.
- [5] A. Jose, K.R. Sunaja Devi, D. Pinheiro, S. Lakshmi Narayana, Electrochemical synthesis, photodegradation and antibacterial properties of PEG capped zinc oxide nanoparticles, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 187 (2018) 25–34, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.022>.
- [6] O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, A. Kahru, Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 1181–1200, <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>.
- [7] S.E. Jin, H.E. Jin, Synthesis, characterization, and three-dimensional structure generation of zinc oxide-based nanomedicine for biomedical applications, *Pharmaceutics* 11 (2019), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110575>.
- [8] V.D. Subramaniam, S.V. Prasad, A. Banerjee, M. Gopinath, R. Murugesan, F. Marotta, X.-F. Sun, S. Pathak, Health hazards of nanoparticles: understanding the toxicity mechanism of nanosized ZnO in cosmetic products, *Drug Chem. Toxicol.* 42 (2019) 84–93, <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1491987>.
- [9] D. Sardella, R. Gatt, V.P. Valdramidis, Assessing the efficacy of zinc oxide nanoparticles against *Penicillium expansum* by automated turbidimetric analysis, *Mycology* 9 (2018) 43–48, <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1369187>.

- [10] N. Wiesmann, M. Kluecker, P. Demuth, W. Brenner, W. Tremel, J. Brieger, Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 51 (2019) 226–234, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.08.002>.
- [11] A.C. Gomathi, S.R. Xavier Rajarathinam, A. Mohammed Sadiq, S. Rajeshkumar, Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous fruit shell extract of *Tamarindus indica* on MCF-7 human breast cancer cell line, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 55 (2020) 101376, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101376>.
- [12] W. Lin, Y. Xu, C.-C. Huang, Y. Ma, K.B. Shannon, D.-R. Chen, Y.-W. Huang, Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 25–39, <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9419-7>.
- [13] S. Balasubramanian, S.M.J. Kala, T.L. Pushparaj, Biogenic synthesis of gold nanoparticles using *Jasminum auriculatum* leaf extract and their catalytic, antimicrobial and anticancer activities, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 57 (2020) 101620, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101620>.
- [14] B.C. Heng, X. Zhao, E.C. Tan, N. Khamis, A. Assodani, S. Xiong, C. Ruedl, K.W. Ng, J.S.-C. Loo, Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 1517–1528, <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0722-1>.
- [15] C. Zhao, X. Zhang, Y. Zheng, Biosynthesis of polyphenols functionalized ZnO nanoparticles: characterization and their effect on human pancreatic cancer cell line, *J. Photochem. Photobiol., B* 183 (2018) 142–146, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.031>.
- [16] J. Liu, Y. Kang, S. Yin, B. Song, L. Wei, L. Chen, L. Shao, Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner, *Int. J. Nanomed.* 12 (2017) 8085–8099, <https://doi.org/10.2147/IJN.S149070>.
- [17] T.S. Kujala, M.S. Vienola, K.D. Klika, J.M. Lopenon, K. Pihlaja, Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars, *Eur. Food Res. Technol.* 214 (2002) 505–510, <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0478-6>.
- [18] A. Król, V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, B. Buszewski, Phytochemical investigation of *Medicago sativa* L. extract and its potential as a safe source for the synthesis of ZnO nanoparticles: the proposed mechanism of formation and antimicrobial activity, *Phytochem. Lett.* 31 (2019) 170–180, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.04.009>.
- [19] R. Parameshwaran, S. Kalaiselvam, R. Jayavel, Green synthesis of silver nanoparticles using *Beta vulgaris*: role of process conditions on size distribution and surface structure, *Mater. Chem. Phys.* 140 (2013) 135–147, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.03.012>.
- [20] T. Bhuyan, K. Mishra, M. Khanuja, R. Prasad, A. Varma, Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from *Azadirachta indica* for antibacterial and photocatalytic applications, *Mater. Sci. Semicond. Process.* 32 (2015) 55–61, <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2014.12.053>.
- [21] L. Fu, Z. Fu, *Plectranthus amboinicus* leaf extract-assisted biosynthesis of ZnO nanoparticles and their photocatalytic activity, *Ceram. Int.* 41 (2015) 2492–2496, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.10.069>.
- [22] H. Anwar, B. Rana, Y. Javed, G. Mustafa, M. Ahmad, Y. Jamil, H. Akhtar, Effect of ZnO on photocatalytic degradation of Rh B and its inhibition activity for *C. Coli* bacteria, *Russ. J. Appl. Chem.* 91 (2018) 143–149, <https://doi.org/10.1134/S1070427218010226>.
- [23] J. Singh, T. Dutta, K.-H. Kim, M. Rawat, P. Samddar, P. Kumar, 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation, *J. Nanobiotechnol.* 16 (2018) 84, <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>.
- [24] R. Guan, T. Kang, F. Lu, Z. Zhang, H. Shen, M. Liu, Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 602, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-602>.
- [25] Y.N. Chang, M. Zhang, L. Xia, J. Zhang, G. Xing, The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles, *Materials* 5 (2012) 2850–2871, <https://doi.org/10.3390/ma5122850>.
- [26] S.-T. Yang, J.-H. Liu, J. Wang, Y. Yuan, A. Cao, H. Wang, Y. Liu, Y. Zhao, Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles: importance of microenvironment, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 8638–8645, <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2491>.

Review

Mitochondrial Dysfunction Induced by Zinc Oxide Nanoparticles

Leslie Patrón-Romero ^{1,2}, Priscy Alfredo Luque-Morales ^{2,*}, Verónica Loera-Castañeda ³, Ismael Lares-Asseff ³, María Ángeles Leal-Ávila ⁴, Jorge Arturo Alvelais-Palacios ⁵, Ismael Plasencia-López ^{6,7} and Horacio Almanza-Reyes ^{1,7,*} 

- ¹ Faculty of Medicine and Psychology, Autonomous University of Baja California, Tijuana 22390, Baja California, Mexico
- ² Faculty of Engineering, Architecture and Design, Autonomous University of Baja California, Ensenada 22860, Baja California, Mexico
- ³ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Unidad Durango, Durango 34220, Durango, Mexico
- ⁴ University Center for Health Education, Autonomous University of Baja California, Tijuana 22010, Baja California, Mexico
- ⁵ School of Health Sciences, Valle de Las Palmas, Autonomous University of Baja California, Tijuana 22260, Baja California, Mexico
- ⁶ Faculty of Accounting and Administration, Autonomous University of Baja California, Tijuana 22390, Baja California, Mexico
- ⁷ Bioeconomy Cluster of Baja California, A.C., Tijuana 22040, Baja California, Mexico
- * Correspondence: pluque@uabc.edu.mx (P.A.L.-M.); almanzareyes@uabc.edu.mx (H.A.-R.)



Citation: Patrón-Romero, L.; Luque-Morales, P.A.; Loera-Castañeda, V.; Lares-Asseff, I.; Leal-Ávila, M.Á.; Alvelais-Palacios, J.A.; Plasencia-López, I.; Almanza-Reyes, H. Mitochondrial Dysfunction Induced by Zinc Oxide Nanoparticles. *Crystals* **2022**, *12*, 1089. <https://doi.org/10.3390/cryst12081089>

Academic Editors: Yamin Leprince-Wang, Guangyin Jing and Basma El Zein

Received: 1 July 2022
Accepted: 26 July 2022
Published: 4 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The constant evolution and applications of metallic nanoparticles (NPs) make living organisms more susceptible to being exposed to them. Among the most used are zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs). Therefore, understanding the molecular effects of ZnO-NPs in biological systems is extremely important. This review compiles the main mechanisms that induce cell toxicity by exposure to ZnO-NPs and reported in vitro research models, with special attention to mitochondrial damage. Scientific evidence indicates that in vitro ZnO-NPs have a cytotoxic effect that depends on the size, shape and method of synthesis of ZnO-NPs, as well as the function of the cells to which they are exposed. ZnO-NPs come into contact with the extracellular region, leading to an increase in intracellular [Zn²⁺] levels. The mechanism by which intracellular ZnO-NPs come into contact with organelles such as mitochondria is still unclear. The mitochondrion is a unique organelle considered the “power station” in the cells, participates in numerous cellular processes, such as cell survival/death, multiple biochemical and metabolic processes, and holds genetic material. ZnO-NPs increase intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and, in particular, superoxide levels; they also decrease mitochondrial membrane potential (MMP), which affects membrane permeability and leads to cell death. ZnO-NPs also induced cell death through caspases, which involve the intrinsic apoptotic pathway. The expression of pro-apoptotic genes after exposure to ZnO-NPs can be affected by multiple factors, including the size and morphology of the NPs, the type of cell exposed (healthy or tumor), stage of development (embryonic or differentiated), energy demand, exposure time and, no less relevant, the dose. To prevent the release of pro-apoptotic proteins, the damaged mitochondrion is eliminated by mitophagy. To replace those mitochondria that underwent mitophagy, the processes of mitochondrial biogenesis ensure the maintenance of adequate levels of ATP and cellular homeostasis.

Keywords: mitochondria; apoptosis; zinc oxide; nanoparticles

1. Introduction

The almost universal applications of metallic nanoparticles (NP) in daily life increase the probability of being in constant contact with them; therefore, investigating the beneficial and harmful effects is of particular relevance. Due to their multiple areas of application, among the most relevant NPs are zinc oxide NPs (ZnO-NPs). Its usefulness in the biomedical field is undoubtedly among the most relevant and promising advances. Within the

nanotechnology industry, it is among the most synthesized NPs, ranking below silver and gold NPs [1,2]. Even though ZnO-NPs offer essential benefits in many areas, such as the pharmacological, medical, biochemical, and microbiological, some studies show that ZnO-NPs can cause harmful effects compared to other metallic NPs such as Fe₃O₄, Al₂O₃, and TiO₂ [3–6]. Unlike their therapeutic applications in the oncology field, toxicological studies have shown that ZnO-NPs can represent a severe danger to specific tissues and organs, such as the lungs, skin, or muscles, to name a few [6–8]. Therefore, investigating the potential health risk due to increased exposure has recently generated concern. ZnO-NPs can enter indirectly through contact or consumption of previously exposed water, plants, and animals, or they can enter directly through inhalation, dermal contact, ingestion, or absorption.

ZnO-NP morphology depends on the synthesis process. They may be nanospheres, nanoplates, nanowires, nanotubes, nanorings, nanocages, nanoflowers, nanoflakes, or hexagonal. ZnO-NPs penetrate the cell membrane by multiple mechanisms, the most studied are ion channels (located both in the cell membrane and in the mitochondrial membrane), specific receptors for metal ions, endocytosis and by direct uptake of ZnO-NPs. Size and shape play a crucial role. The smaller the ZnO-NPs, the more easily they enter the cells and the greater the cytotoxic effect (<50 nm), due to the higher surface area/volume ratio. Morphology plays another relevant role—for example, spherical and hexagonal shapes penetrate easier than tubular shapes. In terms of surface charge, positively charged ZnO showed high cellular uptake compared to ZnO with negative charge. Additionally, the toxicity of nanoparticles, releasing toxic ions, has been considered. Since zinc oxide is amphoteric in nature, it reacts with both acids and alkalis, giving Zn²⁺ ions.

Once ZnO-NPs are internalized in the cell, they are distributed in all the organelles, particularly in the mitochondria [9,10]. The mitochondria is a unique organelle considered the “energy supply center” of the cell, present in all eukaryotic organisms and all mammalian cells. Mitochondria are responsible for numerous cellular processes, such as β-oxidation of fatty acids, amino acid metabolism, pyridine synthesis, phospholipid modifications, generation of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress homeostasis, cell death/survival, and senescence. It is also well known that, in multicellular organisms, the number of mitochondria is variable. The number of mitochondria will depend on energy demands, function, and stage of development [11].

At the structural level, mitochondria are composed of an outer membrane and an inner membrane; the latter contains proteins involved in the electron transfer chain (ETC). The integrity of the ETC is crucial for ATP generation; as a result of its activation, reactive oxygen species (ROS) are generated. ROS are responsible for causing cellular stress, mutations and induce apoptosis [4]. The mitochondria carries a unique genetic material, which is characterized by having a circular double-strand (without ends) of nucleic acids called mitochondrial DNA (mtDNA), containing information to encode 37 genes—of which 13 genes encode for messenger RNA (mRNA), from which 13 mitochondrial proteins are subsequently obtained. Two genes encode ribosomal RNA (rRNA), and 22 genes synthesize transference RNA (tRNA). This smaller but no less critical genome is replicated, transcribed, and translated within the mitochondrial matrix, independently of cell cycle phases. Like nuclear genetic material, mtDNA is susceptible to genotoxicity produced by chemical (ZnO-NPs) and physical agents [12]. This review compiles the most relevant mechanisms leading to mitochondrial dysfunction caused by ZnO-NP exposure.

This review compiles the multiple mitochondrial pathways affected by toxicity after exposure to ZnO-NPs, among which loss of mitochondrial membrane potential, depletion of ATP synthesis due to electron transport chain abnormality, mtDNA synthesis, mitochondrial biogenesis, cell survival and apoptosis are mentioned in detail. The cytotoxicity induced by ZnO-NPs depends on numerous factors, such as ZnO-NPs synthesis methodology, nanoparticle size, morphology, concentration, exposure time and, not least, the type of cell exposed. Factors associated with cellular response include the stage of differentiation, e.g., a differentiated cell versus a cell of embryonic origin and whether the cell is healthy or

tumorigenic. In the case of differentiated human cells, liver, neuronal, cardiac, epidermal, fibroblast, blood and other cells were included; and for tumor models: hepatocyte cancer cell, breast cancer, multiple myeloma cell, cervical cancer, etc. The maximum inhibitory concentration (IC₅₀) and biological methods to obtain it were investigated. Finally, a concise discussion was made on the most relevant factors involved in the mitochondrial and cellular response after exposure to ZnO-NPs found in the most updated literature.

ZnO-NPs penetrate the cell membrane via four mechanisms: the first mechanism involves receptors associated with effector proteins that activate multiple signaling pathways. In the second mechanism, ion channels located in the mitochondrial membrane and cell membrane facilitate entry into the cytoplasm. The third mechanism is endocytosis—in this process, a fragment of the lipid cell membrane covers ZnO-NPs, allowing the formation of vacuoles, which later merge with the membranes of other organelles such as the nucleus and the mitochondria. The fourth mechanism is direct absorption, in which ZnO-NPs (depending on their size and shape) penetrate the cellular lipid bilayer. The entry of ZnO-NPs is also facilitated by two specialized zinc transporters—ZnT1 and ZnT2. Zinc dissociation also occurs, and zinc can penetrate as zinc ions.

2. Impairment of Mitochondrial Biogenesis Induced by ZnO-NPs

Mitochondrial biogenesis is essential to maintain the proper mitochondrial population and cellular functioning. In humans, it is estimated that >50% of the cytoplasm volume is occupied by the mitochondrial mass, >30% in cardiomyocytes and >25% in fibroblasts [13]. Under physiological conditions, the induction of mitochondrial biogenesis is associated with the activation of transcription factors that act on nuclear DNA (nDNA) and mtDNA to control local (within mitochondria) or cytoplasmic protein synthesis [14]. For example, exercise increases mitochondrial protein synthesis, resulting in mitochondrial biogenesis in skeletal muscles [15]. The half-life of mitochondria depends on multiple factors, such as ATP demand and cellular function. Severely damaged mitochondria will be eliminated by mitophagy to prevent the release of pro-apoptotic proteins. The fine coordination between these two opposing processes will determine mitochondrial homeostasis [16,17]. Some of the factors involved in mitochondrial biogenesis are mitochondrial fission protein 1 (FIS1) and mitochondrial fission factor (MFF), which promote mitochondrial fission by recruiting GTPase dynamin-related protein 1 (DRP1) [18,19].

Other factors involved in regulating mitochondrial biogenesis include mitochondrial transcription factor A (mtTFA), which drives mtDNA transcription and replication. The expression of mtTFA is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator 1 α (PGC-1 α) and PGC-1 β , which are the main regulatory proteins of mitochondrial biogenesis [20]. More recently, the involvement of NF-E2-p45-related factor 2 (NRF2), encoded by the NFE2L2 gene, has gained attention. Free NRF2 translocates to the nucleus, where it targets the promoters of genes that induce mitochondrial biogenesis [21]. Li et al., [22] in 2013, reported the adverse effects caused in mature human cardiomyocytes derived from human stem cells after exposure to ZnO-NPs. They proposed that ZnO-NPs could alter mitochondrial biogenesis, as shown by decreased mitochondrial density, altered mtDNA copy number, and inhibition of the PGC-1 α pathway that eventually lead to mitochondrial depletion. The mtDNA replication and transcription system is activated to counteract oxidative damage inflicted on the mitochondrial respiratory chain under mild oxidative stress. When cellular stress increases, mitochondrial biogenesis intervenes to maintain cellular homeostasis.

Yousef et al., [23] reported similar results in 2019, where they performed a quantitative analysis of mtTFA and PGC-1 α expression in rat-derived liver and kidney cells. The results showed significant suppression of hepatic mtTFA expression by approximately 62% relative to the control value and, similarly, suppression in PGC-1 α expression by approximately 51% relative to the control group, following ZnO-NP exposure. In addition, increased expression of the tumor suppressor gene p53, which is involved in the induction of apoptosis, was documented. On the other hand, mitochondria are highly dynamic

organelles, constantly undergoing fission and fusion processes in response to changing energy demands and cellular stress environments. Mitochondrial fusion is mediated by proteins such as mitofusin 1 (MFN1) and mitofusin 2 (MFN2), located on the outer mitochondrial membrane [24]. Phosphatidylserine decarboxylase (PSD1), located in the inner mitochondrial membrane, is involved in the biosynthesis of phosphatidylcholine, which in turn regulates mitochondrial fusion. Another protein involved is optic atrophy 1 (OPA1), which participates in the inner membrane fusion and apoptosis [25,26].

In 2018, Babele et al., [27] reported that exposure to ZnO-NPs conditioned the release of mitochondrial PSD1 into the cytosol. This indicated loss of integrity in the inner mitochondrial membrane, decreased levels in biogenesis, and defects in lipid metabolism. A year later, to expand on the toxic effects of ZnO-NPs, Babele et al. combined a proteome and metabolome analysis. He identified 46 metabolites (including seven unknown). Among those affecting the oxidative pathway were Super Oxide Dismutase 1 (SOD1), Super Oxide Dismutase 2 (SOD2), and yeast AP-1 (YAP1). The metabolites involved in lipid biosynthetic pathways were transcription factor 2 requiring INOsitol (INO2), transcription factor 4 requiring INOsitol (INO4), CHoline requiring CHO1, cardiolipin synthase (CRD1), and PSD1. The aforementioned metabolites are involved in crucial mitochondrial processes, i.e., glycolysis, the tricarboxylic acid cycle (TCA), pentose phosphate pathway, and central carbon metabolism (CCM) in the *Saccharomyces cerevisiae* model [28]. Up to 10% of the proteins encoded by the human genome interact with zinc ions. Approximately 3000 proteins interact with zinc ions, acting mainly as a cofactor [29]. Therefore, determining how ZnO-NP are internalized, transported, and distributed within the cell and mitochondria is of particular interest. Zinc transporter 2 (ZnT2) was the first zinc transporter found. In 2020, Chevallet et al., [30] reported a 30- to 40-fold dose-dependent overexpression of ZnT2 in human hepatocytes (HepG2) with a dose-dependent effect. This proposed active sequestration of ZnO-NPs into mitochondria by ZnT2. Abnormalities in mitochondrial morphology were also reported, suggesting disruptions in mitochondrial fission and fusion dynamics after exposure to ZnO-NPs. Skin cells are among the most exposed tissues due to the use of sunscreens and beauty products. In 2013, Yu et al. showed in normal mouse-derived skin the alteration of mitochondria; ZnO-NP exposure negatively affects mitochondrial network and biogenesis after 48 h of exposure [31]. In 2020, Khan et al. proposed that dose-dependent abnormalities in mitochondrial morphology and a significant increase in apoptotic behavior in human skin carcinoma A431 cells compared to normal renal epithelial NRK-52E cells may be due to a higher expression of anionic membrane phospholipids in cancer cells [32]. Table 1, presents numerous cytotoxicity studies in various biological systems, both in embryonic cell lines and in differentiated human and non-human cells, healthy and tumor cells, exposed to ZnO-NPs. Morphological characteristics are described, as well as dose, time and molecular analysis, to facilitate comparative analysis.

Figure 1, shows a compilation of the main molecular pathways involved by exposure to ZnO-NPs, including their entry into the membrane, effect on the cell nucleus, mitochondria and, finally, activation of apoptosis.

Table 1. Cell models exposed to dose-time-dependent ZnO-NPs and the mitochondrial pathway analyzed.

Cell Type	Size and Shape of ZnO-NP	Synthesis and Characterization of ZnO-NPs	Time of Exposition (h)	Doses mg/L	IC50	Biological Characterization	Mitochondrial Pathway	Reference
Human embryonic kidney cells (HEK293T) Chicken embryo (cranial neural crest cells HH10)	<50 nm Spherical shape	Synthesis method ND/OC. TEM, SEM-EDS, DLS	12 h	12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL	50 µg/mL ND *	Cell culture, CCK-8, CNCCs, ARS, IHC, RNA-seq, q-PCR, DAPI, FM/IFA	Ion release triggered ROS production, which further induced cell toxicity, inflammation and apoptosis, which are mediated by NF-κB signaling cascades and mitochondria dysfunction. Increase in the expression of Nrf2, HO-1, NQO1, Cat, GLXR and NOS. Increase in Pax7 and Casp-3 expression.	[8]
Human cardiomyocytes (hiPSC-CMs)	40 nm–60 nm Spheroid and rod shaped	Synthesis method ND/OC. TEM, DLS	0, 2, 6 h	0–200 µg/mL	62.5 µg/mL	Cell culture, LDH, HCA, CCK-8, MMP, ROS, q-PCR, WB, MEA	ROS generation and induced mitochondrial dysfunction. Impair mitochondrial biogenesis and inhibit the PGC-1α pathway. Cardiac electrophysiological alterations.	[22]
Human epidermoid carcinoma cell A431 Normal kidney epithelial NRK-52E cells	<40 nm Hexagonal structure	Chemical synthesis by reduction Zinc acetate dyhydrate XRD, TEM, SEM, UV-Vis	24 h 24 h	0–25 µg/mL	24 µg/mL 15 µg/mL NS *	Cell culture, MTT, FM, ROS, DAPI, Casp-3 and cell morphology	The anti-proliferative activity, morphological changes, ROS generation, nuclear apoptosis and caspase-3 in a dose-dependent manner.	[32]
Human aortic endothelial cells (HAECs)	70 nm Rod shaped	Synthesis method ND/OC. TEM, XRD	12 or 24 h	8–50 µg/mL	50 µg/mL	Cell culture, MTT, LDH, ROS, FM, MMP, LA, CACAK, Cas-3, Cas-9, Cyt-c, ICC, IFA	Apoptosis was confirmed using reactive oxygen species (ROS). Decrease in MMP. Increased release of Cyt-c. Caspase-3, caspase-9, BAX, BCL-2 and FAS receptor expression. The antioxidant LA was able to protect HAECs from apoptosis induced by ZnO-NPs.	[33]
Human tenon fibroblast (HTF)	56 nm ND	Synthesis method ND/OC. TEM	24 h 48 h 72 h	0–16.0 µg/mL	1.51 µg/mL 1.03 µg/mL 0.57 µg/mL	Cell culture, CCK-8, RT-CES, ROS, FM, MMP, qPCR, FC, Apaf-1, Cas-3, Cas-9, FSP-1	Inhibit the viability of HTFs and decrease MMP. Elevated ROS, caspase-3, caspase-9, and apoptotic Apaf-1 expression. Decrease the levels of FSP-1, collagen III, and E-cadherin expression, leading to HTF apoptosis.	[34]
Human erythrocytes	47.8–52.5 nm Rod shaped	Chemical synthesis by Pechini method XRD, TEM, FTIR	1 h	50–500 µg/mL	200 µg/mL	Cell culture, H, SOD, CAT, LPO, GST, GSH, ROS, OH, O2, CA, IFA/FM	Concentration-dependent hemolytic activity to human erythrocytes. ROS generation. Depletion of glutathione and GST levels. Increased SOD, CAT and lipid peroxidation in dose-dependent manner.	[35]

Table 1. Cont.

Cell Type	Size and Shape of ZnO-NP	Synthesis and Characterization of ZnO-NPs	Time of Exposition (h)	Doses mg/L	IC50	Biological Characterization	Mitochondrial Pathway	Reference
Human monocytes U-937 Human promyelocytes HL-60 Human B lymphocytes COLO-720L Human T lymphocytes HUT-78	15 nm ND	Synthesis method ND/OC. TEM, DLS	24 h	1.6–25 µg/mL	1.5625 µg/mL 3.125 µg/mL 6.25 µg/mL 12.5 µg/mL 25 µg/mL	Cell culture, MTT, LDH, MDA	ZnO-NPs caused lipid peroxidation of all cells and correlated with apoptosis. The level of cholesterol in membranes strongly modifies the effect exerted by ZnO-NPs.	[36]
Human monocytes U-937 Human promyelocytes HL-60 Human B lymphocytes COLO-720L Human T lymphocytes HUT-78	100–130 nm ND	Synthesis method ND/OC. TEM	24 h	0–25 µg/mL	1.56 µg/mL 3.12 µg/mL 6.25 µg/mL 12.5 µg/mL 25 µg/mL	Cell culture, MTT, LDH, NO, MDA, Casp-9, IL-6, TNF-α	Activation of the mitochondrial apoptosis pathway. TNF-α concentration increased for both cell lines. IL-6 concentration rose on average 5-fold in HL-60 cells in all experimental variants, the opposite trend was observed for COLO-720L. ZnO-NPs are cytotoxic to immune system and cause peroxidation of membrane lipids.	[37]
Human colon carcinoma (HCT116) Human myelogenous leukemic (K562)	30–48.5 nm Hexagonal structure	Green Synthesis method (<i>Spondias pinnata</i>) UV-Vis, FTIR, XRD, FESEM, HRTEM, EDX	24 and 48 h	0.25–200 µg/mL	82 and 60 µg/mL 55 and 35 µg/mL	Cell culture, MTT, IFA/FM, VWH, MMP, FC, CA, DNaf, RT-qPCR, WB, H	Upregulation of pro-apoptotic (PUMA, Bax, Cyt-c, cas-9, cas-3, and PARP) and downregulation of anti-apoptotic (Bcl-2 and survivin) genes. Elevation in the expression of Cyt-c, cas-9, and cas-3 genes involved in mitochondrial (intrinsic) apoptotic pathway.	[38]
Human keratinocytes (HaCaT) Human gingival fibroblast (HGF-1) Human gingival carcinomas (Ca9-22) Human gingival carcinomas (OECM-1)	100 nm ND	Synthesis method ND/OC. SEM	24 h	0–100 µg/mL	100 µg/mL 100 µg/mL 17.4 ± 0.6 µg/mL 51.0 ± 0.6 µg/mL	Cell culture, MTT, ROS, MMP, WB, ZXA, FC	Mitochondrial oxidative damage and p70S6K signaling pathway inhibition, caspase-3, caspase-8, caspase-9 and PARP activation. Induce sub-G1 arrest of the cell cycle followed by apoptosis in human GSCC. ROS is essential for the anti-cancer activity. Did not affect the expression of pro-survival Bcl-2 members (Bcl-2, Bcl-xl, and Mcl-1) as well as pro-apoptosis Bcl-2 members (Bax, Bad, and Bid).	[39]
Human oral cancer (CAL 27)	50 nm Hexagonal prism	Synthesis method ND/OC. TEM, XRD and DLS	24 h	0–100 µg/mL	25 µg/mL	Cell culture, CCK-8, LC3, P62, GAPDH, PINK1, Parkin, IHC, ROS, MDC, MMP, WB, JC-I, ROS	Increased ROS levels, decreased MMP and mitochondrial dysfunction time-dependent manner. Increased levels of LC3-II, PINK1, mito-Parkin and decreased P62 and Parkin.	[40]

Table 1. Cont.

Cell Type	Size and Shape of ZnO-NP	Synthesis and Characterization of ZnO-NPs	Time of Exposition (h)	Doses mg/L	IC50	Biological Characterization	Mitochondrial Pathway	Reference
Human hepatocytes (HepG2)	237 nm 79 nm Rod shaped and spherical	Synthesis method ND/OC. TEM, ICP-AES, EDX and DLS	24 h	0–300 µg/mL	>150 µg/mL	Cell culture, qRT-PCR, AVO, MMP, TBEA, SOD, CAT	Increased mitochondrial zinc transporter 1 and 2 expression levels. Response and the upregulation of MET, ZnT1, ZnT2, no change in CAT, SOD1 and SOD2 expression, nor in the enzymatic activities of catalase and SOD, implying a minimal activation of oxidative stress. Abnormal mitochondria morphologies and autophagy vesicles in response to ZnO-NPs.	[30]
Human hepatocytes (HL-7702) Human colorectal (Caco-2)	<100 nm ND	Synthesis method ND/OC. ICP-MS, TEM, SEM	3 h	0.665 µg/mL	NS * NS *	Cell culture, MTT, LDH, MMP, ROS, qRT-PCR	Increased ROS levels due to NP exposure, overexpression of HMOX1 in response to the increased oxidative stress. The cytotoxicity induced by high ROS levels, oxidative stress and depolarization of mitochondrial membrane.	[41]
Huh7 hepatocytes cancer cell line	18 nm Polycrystalline nature	Green synthesis (<i>Luffa acutangula</i>) UV-Vis, HRTEM, SAED	8 h	0–60 µg/mL	40 µg/mL	Cell culture, MTT, ROS, MMP, DNAf. FM	Huh 7 liver cancer cells undergo apoptosis as a result of generation of ROS molecules. Stimulation of apoptotic signaling pathway in a dose-dependent manner. Condensed chromatin and fragmented DNA.	[42]
Human hepatocytes (HepG2) Human breast cancer (MCF-7)	~13 ± 2 nm ND	Chemical synthesis by reduction Zinc acetate dihydrate FESEM, TEM, XRD, FTIR, UV-Vis	24 and 48 h	0–100 µg/mL	25 and 10 µg/mL 25 µg/mL	FC, MTT, FACS, qRT-PCR, cell morphology, Casp-3, p53, Bax, Bcl-2	Significant upregulation of mRNA expression levels of Bax, p53, and caspase-3 and the downregulation of the anti-apoptotic gene Bcl-2.	[43]
Human breast cancer (MCF-7)	41 nm flakes Hexagonal	Chemical synthesis Triethanolamine XRD, FESEM, EDS	24 h	1–5 µg/mL	3 µg/mL	Cell culture, MTT, DPPH, AO/EB, PI	Dose-dependent loss of cell viability. ZnO-NP exposure increases necrosis and apoptosis of MCF cells.	[44]
Human breast cancer (MCF-7)	43 nm Spherical	Synthesis using sol-gel method. XRD, HR-TEM, EDS, TEM, XRD	24 h	0–100 µg/mL	44 µg/mL	Cell culture, MTT, LDH, ROS, GSH, TSH, MMP, IFA/FM, q-PCR	Upregulation of apoptotic genes (p53, Bax/Bcl2 ratio, caspase-3 and caspase-9). Loss of MMP and apoptosis in MCF-7 cells through the mitochondrial pathway.	[45]

Table 1. Cont.

Cell Type	Size and Shape of ZnO-NP	Synthesis and Characterization of ZnO-NPs	Time of Exposition (h)	Doses mg/L	IC50	Biological Characterization	Mitochondrial Pathway	Reference
Human breast cancer (MCF-7) Human Non-tumorigenic human mammary epithelial cell line (MCF-10A)	63.7 ±6.5 nm Spherical	Synthesis method ND/OC. DLS, AFM	24 and 48 h	0.5–20 µg/mL	20 and 10 µg/mL >90% IC50 with max doses	MTT, DAPI, qRT-PCR, IFA/FM and cell morphology	The increased expression of Bax/Bcl-2 ratio confirmed the induction of apoptosis in MCF-7 cells. ZnO-NPs induced casp3- and casp-8 upregulation.	[46]
Human multiple myeloma cell (RPMI8226) Peripheral blood mononuclear cell	30 nm	Synthesis method ND/OC. TEM	24 and 48 h	0–60 µg/mL	34 and 29 µg/mL 120 and 79 µg/mL	ROS, FC, q-PCR, ATP assay, cell morphology	Increase expression and proteins levels of caspase-3, caspase-9, Apaf-1, and Cyt-c, decrease ATP levels in time- and dose-dependent manner, ROS generation.	[47]
Human cervical cancer cell (SiHa)	20–50 nm	Green synthesis (<i>Gracilaria edulis</i>) UV-Vis, FTIR, XRD, FESEM, XPS, SEM, EDS, EDX and HRTEM	24 h	0–200 µg/mL	35 µg/mL	MTT, FC, ROS, MMP AO/EB, IFA/FM, CA, JC-I	Apoptotic and necrotic effect. ROS elevation, DNA damage, activation of mitochondrial intrinsic pathway.	[48]
Human cervical cancer cell line (HeLa)	10–70 nm	Green synthesis (<i>Aspergillus terreus</i>) UV-Vis, XRD, EDX, FTIR and TEM.	24 h	5–80 µg/mL	20 µg/mL	MTT, WB, SOD, CAT, ROS, MMP, p53, BAX, casp-3, casp-9, Cyt-c. Cell morphology.	Reduced SOD, CAT and GPO, increased ROS, diminished MMP. Upregulation of p53, casp-9, BAX, RAD51 and downregulation of BCL-2.	[49]
Human cervical cancer (HeLa) Human colon cancer (HT-29)	30 nm	Green synthesis (<i>Bergenia ciliata</i>) UV-Vis, FTIR, DLS, EDX, XDR and SEM	24 h	25–200 µg/mL	101.7 µg/mL 124.3 µg/mL	MTT, DPPH and ABTS assay	Increased ROS and cytotoxicity against cancer cells.	[50]
Human ovarian cancer (SKOV3)	20 nm	Synthesis method ND/OC. UV-Vis, TEM, XRD, FTIR and AFM	24 h	0–30 µg/mL	20–30 µg/mL	Cell morphology, MTT, ICC, JC-I assay, TUNEL, WB, ROS levels and IFA/FM	Genotoxicity, double DNA strand breaks and apoptosis. Loss of MMP, ROS increased levels. Upregulation of p53, casp-9, BAX, RAD51 and downregulation of BCL-2.	[51]
AGS gastric cancer cells	100 nm	Green synthesis (<i>Morus nigra</i>) UV-Vis, TEM, SEM, FT-IR, EDX and XDR	24 h	0–25 µg/mL	10 µg/mL	MTT, MMP, AO/EB, ROS, FC, CAT, TBARS, GSH SOD, RT-PCR	MMP decreased. Apoptosis induced by ROS generation and gene expressions of apoptosis markers effects, increased lipid peroxidation, cell cycle arrest.	[52]
Human osteosarcoma cell line (MG-63)	10–12 nm	Green synthesis (<i>Radix Rehmanniae</i>) UV-Vis, TEM, XRD and FTIR	24 h	5–80 µg/mL	30 µg/mL	MTT, MMP, WB. ROS, BAX, casp-3 and casp-9 levels. Morphology assay AO/EB	Increased levels of BAX, casp-3, casp-9. MMP decreased and ROS generation.	[53]

Table 1. Cont.

Cell Type	Size and Shape of ZnO-NP	Synthesis and Characterization of ZnO-NPs	Time of Exposition (h)	Doses mg/L	IC50	Biological Characterization	Mitochondrial Pathway	Reference
Human lymphocytes Mouse fibroblast cell (C2C12) Mouse myoblast cell (L929)	16–24 nm	Green synthesis (<i>Beta vulgaris</i>) HRTEM, FTIR, XRD	24 and 48 h	1×10^{-6} 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	37 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 32 and 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 28 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	MTT, TBEA, cell kinetic and morphology assay	Abnormal cell morphology, adherence and viability manner. Mitochondrial function. Increased doses-dependent mortality rate.	[54]
Mouse macrophage line (J774A1)	140 ± 16 nm	Synthesis method ND/OC. TEM, SEM DLS	24 h	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	IFA/FM, MMP, GAPDH assay, mass spectrometry, HPLC, 2D and SDS electrophoresis.	Mitochondrial proteomics abnormalities, MMP proteins loss, nuclear DNA damage, genotoxic effect. GAPDH inhibition, increased levels of methylglyoxal-associated DNA damage.	[55]
Chicken embryo HHO Neural stem cells Neuroblastoma SH-SY5Y cell	50 nm	Synthesis method ND/OC. TEM, SEM, EDS and DLS	24 h 12 h 12 h	12.5–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 0–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 0–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ND * 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Cell/embryo IFA, FC, WB, RNA-seq, q-PCR, IFA/FM	Endoplasmic reticulum stress, increased Ca^{2+} levels, Casp-3, increased levels, abnormal mitochondrial morphology. ZnO-NPs induced failure of neural tube closure.	[56]
Neuroblastoma SH-SY5Y cell	24–30 nm	Green synthesis (<i>Clausena lansium</i>) UV-Vis, XRD, FT-IR and TEM	24 h	10–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Cell viability, MTT, ROS levels, WB, CA (DNA damage)	Increased ROS levels, increased levels of BAX, caspase-3, and BCL-2 proteins. Autophagy (beclin-1, LC3-I, LCEII and ATG4B) increased levels. DNA loss and damage. NAC prevents ROS in SH-SY5Y.	[57]
Mouse Leydig cells Mouse Sertoli cells	70 nm	Synthesis method ND/OC. TEM, AFM, XRD, FTIR, UV-Vis, DLS	24 h 24 h	0, 5, 10, 15, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	MTT, LDH, ROS levels, TUNEL and JC-1 assay, WB, sperm morphology	Increased ROS levels, MMP abnormalities, increased apoptotic proteins, loss of MMP, nuclear DNA damage and breakage.	[58]
Mouse ovarian germ cells (CHO-K1)	80 nm	Co-precipitation method SEM, TEM	24 h (1 day) 168 h (7day)	10, 20 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	IFA/FM; FC. Quantification of ROS. qRT-PCR of Prdm1, Dppa3, Ifitm3, Ddx4 and Dazl	ROS level, cell membrane integrity. Significant increase in expression of premeiotic germ cells markers but a decrease in meiotic and post-meiotic markers.	[59]
Murine microglial BV-2 cells	20 nm	Synthesised by using the wet chemical method. TEM, SEM, XRD, XPS	6 h 24 h	0–80 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	MTT, TBEA, FC, MMP, ROS levels, PMP levels, cell cycle analysis, WB	Absence of caspase-3 cleavage and PARP fragmentation. Mitochondrial dysfunction and lysosomal alteration increased PMP. Accumulation of ROS. Non-apoptotic hallmarks, necrotic markers in BV-2 cells.	[60]

Table 1. Cont.

Cell Type	Size and Shape of ZnO-NP	Synthesis and Characterization of ZnO-NPs	Time of Exposition (h)	Doses mg/L	IC50	Biological Characterization	Mitochondrial Pathway	Reference
<i>S. Cerevisiae</i> (yeast BY4743)	20–80 nm	Synthesis method ND/OC. SEM, HRFESEM, UV-Vis and DLS analysis.	3 h	5–20 µg/mL	10 µg/mL	Cell death assay. WB, ROS levels, chitin and lipid droplets measurement. Vacuolar organelle morphology. RT-PCR	Mitochondrial morphology and lipid homeostasis abnormalities, ROS elevation. Perturbations in peripheral endoplasmic reticulum. ZnO-NPs do not affect histone epigenetic marks. Increased levels of Hog1. Inhibition of cell growth due alterations in CWI and HOG signaling pathway.	[27]
<i>S. Cerevisiae</i> (yeast BY4741)	20–80 nm	Synthesis method ND/OC. SEM, HRFESEM, UV-Vis	3 h	10 µg/mL	10 µg/mL	Cell culture, WB, HNMR, RT-PCR. RNA and metabolites identification/quantification	Mitochondrial expression of PSD1, SOD1, SOD2, KGD1 TCA cycle genes (ACO1 and KDG1) Oxidative pathway abnormalities (SOD1, SOD2 and YAP1) Lipid biosynthesis pathway abnormalities (INO2, INO4, CHO1, PSD1 and CRD1)	[28]

ND/OC: not determined/obtained commercially; NS *: not significant at the maximum doses of ZnO-NP exposure; TEM: transmission electron microscopy; XRD: x-ray diffraction; MTT: [3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; LDH: lactate dehydrogenase; LA: antioxidant alpha-lipoic acid; ROS: reactive oxygen species; FM: fluorescence microscopy; MMP: mitochondrial membrane potential; CACAk: Caspase Apoptosis Colorimetric Assay Kit; Cyt-c: measurements of Cyt-c release; ICC: immunocytochemistry; IFA: immunofluorescence; SEM-EDS: scanning electron microscope-energy dispersive spectroscopy; DLS: Dynamic Light Scattering; CNCCs: primary culture of cranial neural crest cells; ARS: Alizarin red staining; IHC: immunohistochemistry; RNA-seq: RNA sequencing transcript profiling; q-PCR: quantitative polymerase chain reaction; DHE: dihydroethidium staining; HCA: High-Content Analysis; CCK-8: cell viability was analyzed by using the Cell Counting Kit-8; WB: Western Blot; MEA: Microelectrode Assay; RT-CES: real-time cell electronic sensing system; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FC: flow cytometry; FSP-1: fibroblast-specific protein-1; Apaf-1: protease-activating factor-1; FTIR: Fourier transform infrared; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; LPO: lipid peroxidation; GST: glutathione-S-transferase; GSH: glutathione estimation; OH: hydroxyl radicals; O₂⁻: superoxide radical; UV-Vis: UV-visible spectroscopy; DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole; Cas-3: caspase-3; Cas-9: caspase-9; H: hemolysis; MDA: determination of lipid peroxidation; NO: nitric oxide production; IL-6: interleukin 6; TNF-α: tumor necrosis factor α; HRTEM: high-resolution transmission electron microscopy; FESEM: field-emission scanning electron microscope; VWH: Vitro Wound Healing; CA: Comet Assay; DNAf: DNA Fragmentation; RT-qPCR: Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction; FACScan: fluorescence associated cell sorter scan; ZXA: Zebrafish Xenograft Assay; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MDC: Autophagic Vacuole Indicator Monodansylcadaverine; ICP-AES: inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; AVO: acidic vesicular organelles; ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy; SAED: Selected Area Electron Diffraction; AO/EB: acridine orange/ethidium bromide; PI: propidium iodide; HNMR: hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy; HR-FESEM: high-resolution field-emission scanning electron microscope; CWI: cell wall integrity; TCA: tricarboxylic acid cycle; XPS: X-ray photoelectron spectroscopy; TBEA: trypan blue exclusion assay; PMP: plasma membrane permeability; HPLC: high-performance liquid chromatography; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid.

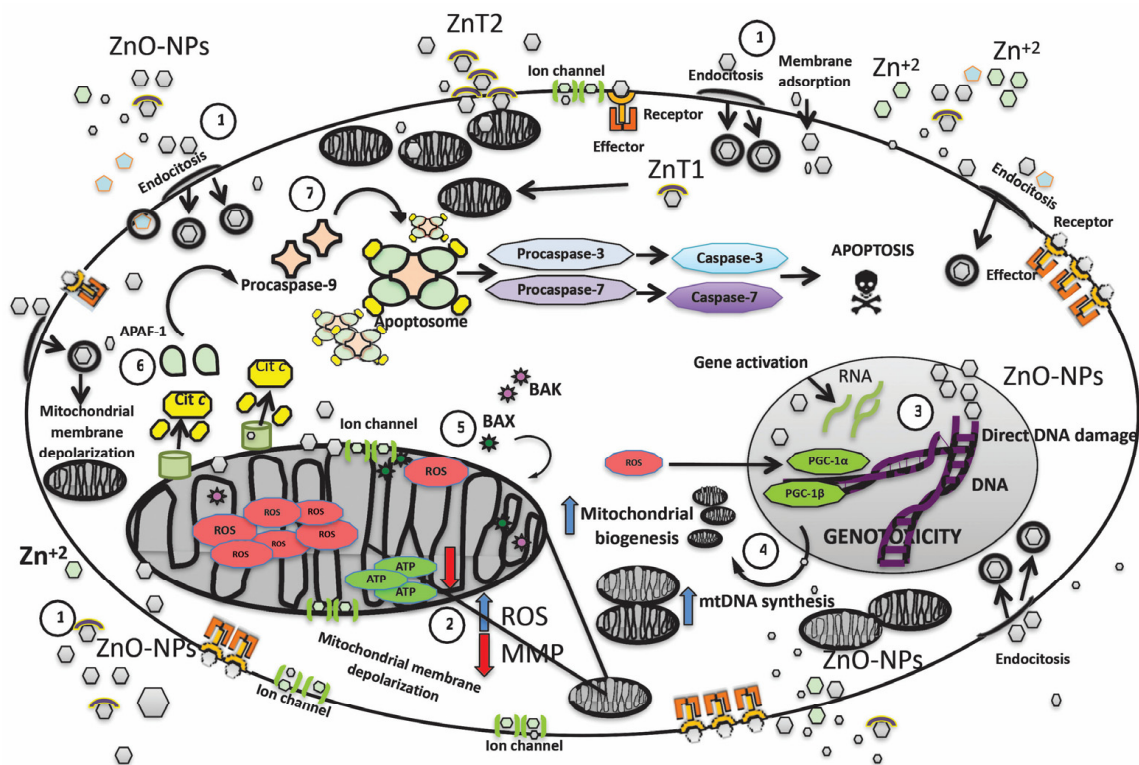


Figure 1. An integrated overview of the molecular pathways activated by ZnO-NP exposure inside the cell, while also summarizing the initial mitochondrial effects such as increased mitochondrial biogenesis, the potential depolarization of the mitochondrial membrane, increased ROS production, and the cumulative effects of ZnO-NPs leading to activation of the intrinsic (mitochondrial) pathway of programmed cell death. 1. ZnO-NPs penetrate the cell membrane via four mechanisms: the first mechanism occurs when ZnO-NPs interact with receptors embedded in the cell membrane, which, in association with the effector, function as second messengers, activating other signaling pathways. The second mechanism occurs when ion channels facilitate entry into the cytoplasm. The third mechanism is endocytosis—in this process, a fragment of the lipid cell membrane covers ZnO-NPs, allowing the formation of vacuoles, which later merge with the membranes of other organelles such as the nucleus and the mitochondria. The fourth mechanism is direct absorption, in which ZnO-NPs (depending on their size and shape) penetrate the cellular lipid bilayer. The entry of ZnO-NPs is also facilitated by two specialized zinc transporters, called ZnT1 and ZnT2. Zinc dissociation also occurs, and zinc can penetrate as zinc ions. The effects of ZnO-NPs depend on the dose, the exposure time, the size of the nanoparticles—as mentioned above, the smaller the size, the greater the cytotoxic effect—and also the shape (spherical, hexagonal, tubular, etc.) [9,10,36] 2. ZnO-NPs, such as Zn ions, readily enter all cellular compartments, including mitochondria, mainly through mitochondrial ion channels, conditioning the voltage change and depolarization of the inner mitochondrial membrane. Within the inner membrane, there is also the protein complex that constitutes the electron transport chain responsible for the synthesis of ATP. ZnO-NPs not only induce a decrease in MMP due to ion channel damage but also cause a decrease in ATP production and an increase in ROS production [13]. 3. The increase in ROS levels in the cell nucleus causes direct damage to the genetic material (double-strand breaks and the oxidation of nitrogenous bases), induces a greater expression of the PGC-1 α and PGC-1 β factors in the nucleus, and promotes mitochondrial biogenesis, to compensate for the increased energy demands [15,16,21] 4. mtDNA replication and transcription pathways are simultaneously activated. mtDNA number is significantly increased in cells exposed to ZnO-NP to counteract mitochondrial oxidative damage under mild oxidative stress [31]. 5. As cellular stress increases, the pathways to compensate for the damage trigger the release of pro-apoptotic proteins, such as BCL-associated protein X-2 (BAX) and/or BCL antagonist/killer-2 (BAK). Activated BAX or BAK

forms pores in the mitochondrial membrane, leading to the release of apoptogenic molecules [34,35,47]. 6. leads to the release of pro-apoptotic proteins, including cytochrome-c and Apaf-1. 7. Finally, pro-caspase-9 is added, to form the apoptosome, which promotes the activation of pro-caspase-3 and pro-caspase-7 and conversion to caspase-3 and caspase-7, respectively; this protein complex will initiate cell dismantling and lead to apoptosis. ROS: reactive oxygen species; MMP: mitochondrial membrane potential; ZnO-NPs: zinc oxide nanoparticles; Cit-c: cytochrome-c; APAF-1: apoptosis protease-activating factor-1; ZnT1, ZnT2: Zinc transporter 1/2; mtDNA: mitochondrial DNA; BAX: BCL-2-associated X protein; BAK: BCL-2 antagonist/killer; PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator 1 α and 1 β [61–63].

3. Apoptosis Induction ZnO-NPs

To maintain normal tissue function, damaged or aged cells are constantly eliminated by apoptosis. There are two routes to initiate apoptosis: the extrinsic pathway, conditioned by the binding of extracellular factors to the receptors present in the plasma membrane, and the intrinsic pathway, mediated by the action of mitochondrial factors [64]. The intrinsic apoptosis pathway is activated by physical (radiation), chemical (ZnO-NPs), or biological (viruses) stimuli. The BCL-2 family proteins orchestrate the regulation and execution of this pathway, which includes both pro-apoptosis and pro-survival proteins [65]. To initiate apoptosis, cellular stress or damage signals turn on the cascade of pro-apoptotic proteins, such as BCL-2-associated protein X (BAX) and/or BCL-2 antagonist/killer (BAK). Once activated, BAX or BAK induces mitochondrial pore formation. Provoking the release of apoptogenic molecules, which includes the second mitochondria-derived caspase activator (SMAC), serine proteases called caspases, and cytochrome-c derived from the mitochondrial intermembrane space. The mitochondrial release of cytochrome-c into the cytoplasm leads to the formation of apoptosomes. These events promote the activation of the initiator caspase (caspase-9) and executioner caspases (caspases-3, 6, and 7) for the orderly dismantling of the cell [61,62,66]. Considering the complexity of cancer treatment and that ZnO-NPs activate the intrinsic apoptosis pathway and caspases, the study of the cytotoxic response to ZnO-NP exposure in tumor cells is promising. A study performed on gingival squamous cell carcinomas (GSCC) in two human cell lines (Ca9-22 and OECM-1). Showed that ZnO-NPs induced growth inhibition of GSCCs, and did not cause damage to normal human keratinocytes (HaCaT cells) or gingival fibroblasts (HGF-1 cells). ZnO-NPs caused apoptotic death of GSCC cells in a concentration-dependent manner, increased intracellular ROS and specifically superoxide levels. Importantly, antioxidant and caspase inhibitors prevent ZnO-NP-induced cell death, indicating that humans' superoxide-induced mitochondrial dysfunction is related to caspase-mediated apoptosis. On the other hand, treatment of ZnO-NPs in a dose-dependent condition triggered the expression of p53, BAX, and cytochrome-c in ovarian and cervical tumor cells. The expression of caspase-9, caspase-3, cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 in HeLa cells was increased in cells treated with ZnO-NPs, compared with control cells. Multiple experiments in carcinogenic human hepatocytes HepG2 and HL-7702 cells, human hepatocytes cancer Huh7 cells, chronic myelogenous leukemia cells, Human colorectal Caco-2, colon carcinoma HCT116 cells, human cervical cancer SiHa cells and HeLa cells, cell models such as human ovarian cancer SKOV3, and neuroblastoma SH-SY5Y cells, breast cancer MDAMB-23 and MCF-7 cells, human head, and neck squamous cell carcinoma FaDu cells, showed a dose-dependent effect after treatment with ZnO-NPs [38,53,67–69], resulting in stimulation of the intrinsic pathway of apoptosis with very similar patterns.

ZnO-NPs induced similar changes in transcript levels of diverse proteins, such as p53, BAX, BCL-2, CYT-c, CAS-9, CAS-8 and CAS-3, with significant differences versus control cell models. They also documented the induction of apoptosis through oxidative stress-mediated Ca²⁺ release, ROS generation, and loss of mitochondrial membrane potential. Tumor cells have an increased susceptibility to ZnO-NP exposure. ZnO-NPs also induce

apoptosis in germ ovarian germ cells CHO-K1, male germ Leydig and Sertoli cells (mouse model), causing time-dose-dependent damage, genotoxicity caused by increased ROS, and loss of mitochondrial membrane potential was reported. In addition, injection of ZnO-NPs into male mice caused structural alterations in the seminiferous epithelium and sperm abnormalities [58,59]. In 2020, Sruthi et al. [60], proposed a non-apoptotic mode of cell death following exposure of ZnO-NPs in murine microglial BV-2 cells. By triggering an accumulation of ROS favoring altered and increased plasma membrane permeability and also loss of mitochondrial membrane potential, leading to the formation of “ghost cells” without apoptotic features, there was no caspase-3 or PARP fragmentation in BV-2 cells. However, an adaptive response involving increased mitochondrial biogenesis cannot be excluded.

4. Caspases Expression and ZnO-NPs

The caspases are at the core of executing apoptosis by orchestrating cellular destruction with a proteolytic mechanism. Caspases are a family of at least a dozen cysteine proteases; they are expressed as inactive proteases [70–72]. Caspase activation occurs by cleavage of the pro-domain and inter-subunit linker, the latter of which is most critical. The mature enzyme is formed by a dimer containing a small and a large subunit that generates an active site on each side. Apoptotic caspases are functionally subdivided into initiator (caspases-8, 9, and 10) and effector (caspases-3, 6, and 7). Apaf-1 attaches to cytochrome-*c* and procaspase-9 to form a proteic complex called the apoptosome that activates the caspase-3, which finally initiates apoptosis. Because caspase-3 is involved in the final molecular steps, it is used as a molecular marker to confirm apoptosis. It is well documented that mRNA levels of caspase-3, caspase-9, and Apaf-1 increase dose-dependent mode after ZnO-NP exposure. Thus, ZnO-NPs induce caspase signaling-related protein expression. In a study by Cheng et al. in bone cancer cells, there is a substantial increase in the protein levels of BAX, caspase-3 and caspase-9 when treated with ZnO-NPs, compared with control cells. Control cells displayed a decreased rate of apoptosis.

Cells administered with 50 µg/mL of ZnO-NPs exhibited a higher rate of apoptosis than cells supplemented with 30 µg/mL of ZnO-NPs [53,73–75]. Tumor cells show greater susceptibility to apoptosis after exposure to ZnO-NPs. Considering that the molecular changes in cancer cells include resistance to apoptosis, which can lead to immortality and a high rate of cellular division, ZnO-NPs undoubtedly constitute a very promising line of therapeutic research. Pro-apoptotic and anti-apoptotic molecules, such as p53 and the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family, closely regulate apoptosis. ZnO-NPs treatment causes a significant increase in mRNA expression of cell cycle checkpoint proteins p53, BAX, and caspase-3 and downregulates anti-apoptotic BCL-2 proteins in epidermoidal carcinoma cells. A similar effect in the overexpression of p53 was reported in hepatocytes and kidney tissue after oral administration in rats with ZnO-NPs. ROS induces the translocation, phosphorylation, and cleavage of pro-apoptosis BCL-2 members, leading to the induction of apoptosis. Caspase-9 and caspase-3 activation can be completely abolished by the presence of antioxidants, which confirms that is a ROS-dependent pathway in ZnO-NP-induced apoptosis [33,76]. On the other hand, there are reported differences in apoptotic gene expression between fresh and aged ZnO-NPs. Wang et al., in 2020, reported at least a dozen apoptosis genes that were significantly overexpressed in fresh ZnO-NP-exposed cells, compared to only half of the genes overexpressed in human peripheral blood T lymphocyte cells after addition of aged ZnO-NPs; interestingly, the expression of caspase-3 was not significantly changed [77]. ZnO-NPs are used in numerous dermatological products, cosmetics and sunscreens. Application of ZnO to the skin increases the level of zinc ions in the epidermis, then in the systemic circulation, and finally in the urine; although the amount that penetrates the skin and enters the circulation is low, it can be detected in urine and blood. Therefore, in vivo studies on blood cells, including erythrocytes, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and platelets, are essential. In a study using 100–130 nm ZnO-NPs, lymphocytes were found to be the most sensitive to the action of the NPs. Human B lym-

phocyte and human monocyte cell lines were the most susceptible to the activity of 100 nm diameter nanoparticles. In contrast, human T lymphocytes and human promyelocytes were slightly more sensitive to 130 nm ZnO-NPs. Human promyelocytes are the most resistant to ZnO nanoparticles, while human monocytes are the most sensitive. When exposed to ZnO-NPs with a diameter of 15–24 nm, human lymphocytes display a dose-dependent decrease in mitochondrial activity. Khan et al., [35] in 2015, found ROS elevation and hemolytic action conditioned by ZnO-NPs in human erythrocytes. In contrast, in human eosinophils, ZnO-NPs delays apoptosis through caspase suppression and de novo protein synthesis. This evidence demonstrates that although caspases are ubiquitous proteins in all multicellular systems, cell type, energetic demands and their functions play an important role and influence susceptibility to apoptosis [35–37,78].

5. Effect of ZnO-NPs in Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential (MMP) maintains efficient ATP synthesis and an appropriate proton gradient across its lipid bilayer; also its integrity plays a vital role in inducing apoptosis. The effects of ZnO-NPs on MMP are widely studied. Pro-apoptosis BCL-2 family proteins also induce the permeabilization of the outer mitochondrial membrane, as well as modulate mitochondrial homeostasis for contributing to the loss of MMP. There is a strong correlation between MMP and ROS production and it is widely accepted that mitochondria produce more ROS at a high membrane potential. Depolarization of MMP produced either by a closure of the mitochondrial permeability transition pore or inhibition of ATP synthase is associated with increased ROS production. Additionally, the mitochondrial permeability transition pore has been demonstrated to induce depolarization of MMP, release of apoptogenic factors and loss of oxidative phosphorylation. Wang et al., in 2018, reported that ZnO-NPs increased the intracellular ROS level and decreased MMP in CAL 27 oral cancer cell lines. Similar results were reported in AGS gastric cancer cells, with significantly reduced MMP levels; this diminution of MMP after inner mitochondrial membrane permeabilization stimulates the release of several apoptotic factors [40,52,78].

6. Conclusions

This systematic review aimed to include the most recent scientific evidence concerning the cytotoxic effect of ZnO-NPs in biological models and in particular on mitochondrial damage in multiple biological models. Since mitochondria are among the most complex and relevant organelles for cellular homeostasis, it is indispensable to define the most relevant mechanisms leading to cell dysfunction/death. Although the applications of ZnO-NPs have revolutionized modern life with unprecedented advances in the medical field, their harmful and cytotoxic effects cannot be neglected. The unique properties of ZnO-NPs are dependent on morphology, size, concentration, and exposition period.

The contribution and usefulness of ZnO-NPs in medical oncology is of great interest; in particular, their contribution in the therapeutic area is increasingly relevant due to the immense potential in the public health sector because cancer remains among the leading causes of death worldwide. Tumor cells show a different cytotoxic effect compared to healthy cells of the same lineage, and the response also varies depending on the exposure time, size and shape of ZnO-NPs. Due to the heterogeneity in research design, more *in vitro* investigations are required, to determine the exact mechanisms of cytotoxicity, and further clarify the anti-cancer effect of ZnO-NPs. Therefore, it is imperative to perform further *in vitro* trials with different tumor lines from the same tissue—for example, the human cervical cancer cell SiHa and the cervical cancer cell line HeLa—at different concentrations to properly examine the cytotoxic properties of ZnO-NPs. More emphasis should be given to the correlation between the size (5–100 nm) and structural shapes, including spherical, oval, elongated, irregular, and hexagonal, of ZnO-NPs and their mitochondrial toxicity. Because ZnO-NPs can act as anti-cancer agents against different tumor lines resistant to conventional chemotherapeutic treatments, they provide a talented substitute approach to chemotherapies.

On the other hand, other important characteristic of ZnO-NPs, with the same impact on public health, are the possible teratogenic effects in embryonic cell models, affecting migration, cell–cell interaction and cell differentiation as well as intervening in mitochondrial pathways, as already mentioned.

Since we are certainly in daily contact with ZnO-NPs, more attention needs to be addressed to them, since bioaccumulation of these elements can occur in plants, food and aquatic species, with a direct impact on human and environmental health. Table 2 aims to summarize the most relevant factors involved in the mitochondrial and cellular response after exposure to ZnO-NPs found in the most relevant literature. We believe that this systematic review provides information on correlation and impact on future research.

Table 2. Effects triggered after exposure to ZnO-NPs.

Mitochondrial Pathway	ZnO-NPs Effect
Mitochondrial biogenesis	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mDNA replication and transcription systems. ↑ PSD1 to mitochondrial maintenance. ↑ Mitochondrial biogenesis by PGC-1. ↑ Mitophagy.
Apoptosis induction	<ul style="list-style-type: none"> ↑ p53, BAX, BAK, SMAC and cytochrome-c levels to induce apoptosis. ↑ DNA fragmentation and cytoplasmic reduction. ↑ Anti-BCL2.
Caspases induction	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Pro-caspases-9 and pro-caspase-3 to convert in activated caspase-9. ↑ Apaf-1. ↑ Apoptosome.
Mitochondrial membrane potential	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Mitochondrial membrane potential. ↑ ATP synthase. ↑ Reactive oxygen species. ↑ Mitochondrial pore abnormalities with delivery of pro-apoptotic proteins.

↑: Increase; mDNA: mitochondrial DNA; PSD1: phosphatidylserine decarboxylase 1; PGC-1: peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ; p53: p53 protein; BAX; Bax protein; BAK: Bak protein; SMAC: second mitochondria-derived activator of caspase; BCL2: B-cell lymphoma-2 proteins; Apaf-1: Apoptotic Peptidase-Activating Factor 1; ATP synthase: adenosine triphosphate synthase.

Author Contributions: L.P.-R., V.L.-C., I.L.-A., M.Á.L.-Á., J.A.A.-P. and I.P.-L. gathered the research data. L.P.-R., P.A.L.-M. and H.A.-R. analyzed these data and wrote this review paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data is in this review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Mathew, E.N.; Hurst, M.N.; Wang, B.; Murthy, V.; Zhang, Y.; De Long, R.K. Interaction of Ras Binding Domain (RBD) by chemotherapeutic zinc oxide nanoparticles: Progress towards RAS pathway protein interference. *PLoS ONE* **2020**, *15*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bharathi, D.; Bhuvaneshwari, V. Synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using pure bioflavonoid rutin and their biomedical applications: Antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities. *Res. Chem. Intermed.* **2019**, *45*, 2065–2078. [[CrossRef](#)]
- Danielsen, P.H.; Cao, Y.; Roursgaard, M.; Møller, P.; Loft, S. Endothelial cell activation, oxidative stress and inflammation induced by a panel of metal-based nanomaterials. *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 813–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, N.; Tang, M. Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles. *J. Appl. Toxicol.* **2020**, *40*, 16–36. [[CrossRef](#)]

5. Hu, X.; Cook, S.; Wang, P.; Hwang, H.-M. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 3070–3072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sharma, V.; Shukla, R.K.; Saxena, N.; Parmar, D.; Das, M.; Dhawan, A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. Lett.* **2009**, *185*, 211–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Donaldson, K.; Stone, V.; Clouter, A.; Renwick, L.; Macnee, W. Ultrafine particles. *Occup. Environ. Med.* **2001**, *58*, 211–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Yan, Y.; Wang, G.; Huang, J.; Zhang, Y.; Cheng, X.; Chuai, M.; Brand-Saberi, B.; Chen, G.; Jiang, X.; Yang, X. Zinc oxide nanoparticles exposure-induced oxidative stress restricts cranial neural crest development during chicken embryogenesis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *194*, 110415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Wang, M.; Wang, J.; Liu, Y.; Wang, J.; Nie, Y.; Si, B.; Liu, Y.; Wang, X.; Chen, S.; Hei, T.K.; et al. Subcellular Targets of Zinc Oxide Nanoparticles during the Aging Process: Role of Cross-Talk between Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress in the Genotoxic Response. *Toxicol. Sci.* **2019**, *171*, 159–171. [[CrossRef](#)]
10. Limo, M.J.; Sola-Rabada, A.; Boix, E.; Thota, V.; Westcott, Z.C.; Puddu, V.; Perry, C.C. Interactions between Metal Oxides and Biomolecules: From Fundamental Understanding to Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 11118–11193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Popov, L.D. Mitochondrial biogenesis: An update. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 4892–4899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhao, L.; Sumberaz, P. Mitochondrial DNA Damage: Prevalence, Biological Consequence, and Emerging Pathways. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33*, 2491–2502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yu, S.B.; Pekkurnaz, G. Mechanisms Orchestrating Mitochondrial Dynamics for Energy Homeostasis. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 3922–3941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wang, F.; Zhang, D.; Zhang, D.; Li, P.; Gao, Y. Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 675465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yokokawa, T.; Kido, K.; Suga, T.; Isaka, T.; Hayashi, T.; Fujita, S. Exercise-induced mitochondrial biogenesis coincides with the expression of mitochondrial translation factors in murine skeletal muscle. *Physiol. Rep.* **2018**, *6*, e13893. [[CrossRef](#)]
16. Holt, A.G.; Davies, A.M. The significance of mitochondrial DNA half-life to the lifespan of post-mitotic cells. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
17. Byrne, J.J.; Soh, M.S.; Chandhok, G.; Vijayaraghavan, T.; Teoh, J.S.; Crawford, S.; Cobham, A.E.; Yapa, N.M.B.; Mirth, C.K.; Neumann, B. Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 1967–1985. [[CrossRef](#)]
18. Yu, R.; Lendahl, U.; Nistér, M.; Zhao, J. Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 374. [[CrossRef](#)]
19. Zhang, C.S.; Lin, S.C. AMPK promotes autophagy by facilitating mitochondrial fission. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 399–401. [[CrossRef](#)]
20. Wu, Z.; Puigserver, P.; Andersson, U.; Zhang, C.; Adelmant, G.; Mootha, V.; Troy, A.; Cinti, S.; Lowell, B.; Scarpulla, R.C.; et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **1999**, *98*, 115–124. [[CrossRef](#)]
21. Gureev, A.P.; Shaforostova, E.A.; Popov, V.N. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: Interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Li, Y.; Li, F.; Zhang, L.; Zhang, C.; Peng, H.; Lan, F.; Peng, S.; Liu, C.; Guo, J. Zinc oxide nanoparticles induce mitochondrial biogenesis impairment and cardiac dysfunction in human ipsc-derived cardiomyocytes. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 2669–2683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yousef, M.I.; Mutar, T.F.; Kamel, M.A.E.N. Hepato-renal toxicity of oral sub-chronic exposure to aluminum oxide and/or zinc oxide nanoparticles in rats. *Toxicol. Rep.* **2019**, *6*, 336–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liu, Y.J.; McIntyre, R.L.; Janssens, G.E.; Houtkooper, R.H. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mech. Ageing Dev.* **2020**, *186*, 111212. [[CrossRef](#)]
25. Li, J.; Zhang, B.; Chang, X.; Gan, J.; Li, W.; Niu, S.; Kong, L.; Wu, T.; Zhang, T.; Tang, M.; et al. Silver nanoparticles modulate mitochondrial dynamics and biogenesis in HepG2 cells. *Environ. Pollut.* **2020**, *256*, 113430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aung, L.H.H.; Jumbo, J.C.C.; Wang, Y.; Li, P. Therapeutic potential and recent advances on targeting mitochondrial dynamics in cardiac hypertrophy: A concise review. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2021**, *25*, 416–443. [[CrossRef](#)]
27. Babele, P.K.; Thakre, P.K.; Kumawat, R.; Tomar, R.S. Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* **2018**, *213*, 65–75. [[CrossRef](#)]
28. Kumar Babele, P. Zinc oxide nanoparticles impose metabolic toxicity by de-regulating proteome and metabolome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol. Rep.* **2019**, *6*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bird, A.J.; Wilson, S. Zinc homeostasis in the secretory pathway in yeast. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 145–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Chevallet, M.; Gallet, B.; Fuchs, A.; Jouneau, P.H.; Um, K.; Mintz, E.; Michaud-Soret, I. Metal homeostasis disruption and mitochondrial dysfunction in hepatocytes exposed to sub-toxic doses of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale* **2016**, *8*, 18495–18506. [[CrossRef](#)]
31. Yu, K.N.; Yoon, T.J.; Minai-Tehrani, A.; Kim, J.E.; Park, S.J.; Jeong, M.S.; Ha, S.W.; Lee, J.K.; Kim, J.S.; Cho, M.H. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicol. Vitro.* **2013**, *27*, 1187–1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Khan, M.F.; Siddiqui, S.; Zia, Q.; Ahmad, E.; Jafri, A.; Arshad, M.; Jamal, A.; Alam, M.M.; Banawas, S.; Alshehri, B.A.; et al. Characterization and in vitro cytotoxic assessment of zinc oxide nano-particles in human epidermoid carcinoma cells. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 105636. [[CrossRef](#)]
33. Liang, S.; Sun, K.; Wang, Y.; Dong, S.; Wang, C.; Liu, L.X.; Wu, Y.H. Role of Cyt-C/caspases-9,3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *258*, 40–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, L.; Guo, D.; Wang, Z.; Yin, X.; Wei, H.; Hu, W.; Chen, R.; Chen, C. Zinc oxide nanoparticles induce human tenon fibroblast apoptosis through reactive oxygen species and caspase signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**, *683*, 108324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Khan, M.; Naqvi, A.H.; Ahmad, M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Rep.* **2015**, *2*, 765–774. [[CrossRef](#)]
36. Czyżowska, A.; Dyba, B.; Rudolphi-Szydło, E.; Barbasz, A. Structural and biochemical modifications of model and native membranes of human immune cells in response to the action of zinc oxide nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* **2021**, *41*, 458–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Czyżowska, A.; Barbasz, A. Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles to innate and adaptive human immune cells. *J. Appl. Toxicol.* **2021**, *41*, 1425–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ahlam, A.A.; Shaniba, V.S.; Jayasree, P.R.; Manish Kumar, P.R. *Spondias pinnata* (L.f.) Kurz Leaf Extract Derived Zinc Oxide Nanoparticles Induce Dual Modes of Apoptotic-Necrotic Death in HCT 116 and K562 Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, *199*, 1778–1801. [[CrossRef](#)]
39. Wang, S.W.; Lee, C.H.; Lin, M.S.; Chi, C.W.; Chen, Y.J.; Wang, G.S.; Liao, K.W.; Chiu, L.P.; Wu, S.H.; Huang, D.M.; et al. ZnO nanoparticles induced caspase-dependent apoptosis in gingival squamous cell carcinoma through mitochondrial dysfunction and p70s6K signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1612. [[CrossRef](#)]
40. Wang, J.; Gao, S.; Wang, S.; Xu, Z.; Wei, L. Zinc oxide nanoparticles induce toxicity in CAL 27 oral cancer cell lines by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 3441–3450. [[CrossRef](#)]
41. Li, J.; Song, Y.; Vogt, R.D.; Liu, Y.; Luo, J.; Li, T. Bioavailability and cytotoxicity of Cerium- (IV), Copper- (II), and Zinc oxide nanoparticles to human intestinal and liver cells through food. *Sci. Total Environ.* **2020**, *702*, 134700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ananthalakshmi, R.; Rathinam, S.R.X.R.; Sadiq, A.M. Apoptotic Signalling of Huh7 Cancer Cells by Biofabricated Zinc Oxide Nanoparticles. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2021**, *31*, 1764–1773. [[CrossRef](#)]
43. Wahab, R.; Siddiqui, M.A.; Saquib, Q.; Dwivedi, S.; Ahmad, J.; Musarrat, J.; Al-Khedhairi, A.A.; Shin, H.S. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *117*, 267–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Arasu, M.V.; Madankumar, A.; Theerthagiri, J.; Salla, S.; Prabu, S.; Kim, H.S.; Al-Dhabi, N.A.; Arokiyaraj, S.; Duraipandiyan, V. Synthesis and characterization of ZnO nanoflakes anchored carbon nanoplates for antioxidant and anticancer activity in MCF7 cell lines. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 536–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Akhtar, M.J.; Alhadlaq, H.A.; Alshamsan, A.; Majeed Khan, M.A.; Ahamed, M. Aluminum doping tunes band gap energy level as well as oxidative stress-mediated cytotoxicity of ZnO nanoparticles in MCF-7 cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Farasat, M.; Niazvand, F.; Khorsandi, L. Zinc oxide nanoparticles induce necroptosis and inhibit autophagy in MCF-7 human breast cancer cells. *Biologia* **2020**, *75*, 161–174. [[CrossRef](#)]
47. Li, Z.; Guo, D.; Yin, X.; Ding, S.; Shen, M.; Zhang, R.; Wang, Y.; Xu, R. 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. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *122*, 109712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gowdhami, B.; Jaabir, M.; Archunan, G.; Suganthi, N. Anticancer potential of zinc oxide nanoparticles against cervical carcinoma cells synthesized via biogenic route using aqueous extract of *Gracilaria edulis*. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103*, 109840. [[CrossRef](#)]
49. Chen, H.; Luo, L.; Fan, S.; Xiong, Y.; Ling, Y.; Peng, S. Zinc oxide nanoparticles synthesized from *Aspergillus terreus* induces oxidative stress-mediated apoptosis through modulating apoptotic proteins in human cervical cancer HeLa cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **2021**, *73*, 221–232. [[CrossRef](#)]
50. Dulta, K.; Koşarsoy Ağçeli, G.; Chauhan, P.; Jasrotia, R.; Chauhan, P.K. A Novel Approach of Synthesis Zinc Oxide Nanoparticles by *Bergenia ciliata* Rhizome Extract: Antibacterial and Anticancer Potential. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2021**, *31*, 180–190. [[CrossRef](#)]
51. Bai, D.P.; Zhang, X.F.; Zhang, G.L.; Huang, Y.F.; Gurunathan, S. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 6521–6535. [[CrossRef](#)]
52. Tang, Q.; Xia, H.; Liang, W.; Huo, X.; Wei, X. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Morus nigra* and its anticancer activity of AGS gastric cancer cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *202*, 111698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Cheng, J.; Wang, X.; Qiu, L.; Li, Y.; Marraiki, N.; Elgorban, A.M.; Xue, L. Green synthesized zinc oxide nanoparticles regulates the apoptotic expression in bone cancer cells MG-63 cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *202*, 111644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Patrón-Romero, L.; Luque, P.A.; Soto-Robles, C.A.; Nava, O.; Vilchis-Nestor, A.R.; Barajas-Carrillo, V.W.; Martínez-Ramírez, C.E.; Chávez Méndez, J.R.; Alvelais Palacios, J.A.; Leal Ávila, M.; et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles by green synthesis method. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *60*, 101925. [[CrossRef](#)]

55. Aude-Garcia, C.; Dalzon, B.; Ravanat, J.L.; Collin-Faure, V.; Diemer, H.; Strub, J.M.; Cianferani, S.; Van Dorsselaer, A.; Carrière, M.; Rabilloud, T. A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages. *J. Proteomics* **2016**, *134*, 174–185. [[CrossRef](#)]
56. Yan, Y.; Wang, G.; Luo, X.; Zhang, P.; Peng, S.; Cheng, X.; Wang, M.; Yang, X. Endoplasmic reticulum stress-related calcium imbalance plays an important role on Zinc oxide nanoparticles-induced failure of neural tube closure during embryogenesis. *Environ. Int.* **2021**, *152*, 106495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Li, F.; Song, L.; Yang, X.; Huang, Z.; Mou, X.; Syed, A.; Bahkali, A.H.; Zheng, L. Anticancer and genotoxicity effect of (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) Peel ZnONPs on neuroblastoma (SH-SY5Y) cells through the modulation of autophagy mechanism. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *203*, 111748. [[CrossRef](#)]
58. Han, Z.; Yan, Q.; Ge, W.; Liu, Z.G.; Gurunathan, S.; De Felici, M.; Shen, W.; Zhang, X.F. Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5187–5203. [[CrossRef](#)]
59. Saber, M.; Hayaei-Tehrani, R.S.; Mokhtari, S.; Hoorzad, P.; Esfandiari, F. In vitro cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in mouse ovarian germ cells. *Toxicol. Vitro.* **2021**, *70*, 105032. [[CrossRef](#)]
60. Sruthi, S.; Nury, T.; Millot, N.; Lizard, G. Evidence of a non-apoptotic mode of cell death in microglial BV-2 cells exposed to different concentrations of zinc oxide nanoparticles. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 12500–12520. [[CrossRef](#)]
61. Singh, R.; Letai, A.; Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 175–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ladokhin, A.S. Regulation of Apoptosis by the Bcl-2 Family of Proteins: Field on a Brink. *Cells* **2020**, *9*, 2121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Morrish, E.; Brumatti, G.; Silke, J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells* **2020**, *9*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Carneiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 395–417. [[CrossRef](#)]
65. Wanner, E.; Thoppil, H.; Riabowol, K. Senescence and Apoptosis: Architects of Mammalian Development. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Rajashekara, S.; Shrivastava, A.; Sumhitha, S.; Kumari, S. Biomedical Applications of Biogenic Zinc Oxide Nanoparticles Manufactured from Leaf Extracts of *Calotropis gigantea* (L.) Dryand. *Bionanoscience* **2020**, *10*, 654–671. [[CrossRef](#)]
67. Shobha, N.; Nanda, N.; Giresha, A.S.; Manjappa, P.; Sophiya, P.; Dharmappa, K.K.; Nagabhusana, B.M. Synthesis and characterization of Zinc oxide nanoparticles utilizing seed source of *Ricinus communis* and study of its antioxidant, antifungal and anticancer activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *97*, 842–850. [[CrossRef](#)]
68. Moratin, H.; Scherzad, A.; Gehrke, T.; Ickrath, P.; Radeloff, K.; Kleinsasser, N.; Hackenberg, S. Toxicological characterization of ZnO nanoparticles in malignant and non-malignant cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **2018**, *59*, 247–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Julien, O.; Wells, J.A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1380–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Boice, A.; Bouchier-Hayes, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, *1867*, 118688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Nakajima, Y.I.; Kuranaga, E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1422–1430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. McComb, S.; Chan, P.K.; Guinot, A.; Hartmannsdottir, H.; Jenni, S.; Dobay, M.P.; Bourquin, J.P.; Bornhauser, B.C. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, 1–12. [[CrossRef](#)]
73. Kopeina, G.S.; Prokhorova, E.A.; Lavrik, I.N.; Zhivotovsky, B. Alterations in the nucleocytoplasmic transport in apoptosis: Caspases lead the way. *Cell Prolif.* **2018**, *51*, e12467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Shalini, S.; Dorstyn, L.; Dawar, S.; Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 526–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Giordo, R.; Nasrallah, G.K.; Al-Jamal, O.; Paliogiannis, P.; Pintus, G. Resveratrol inhibits oxidative stress and prevents mitochondrial damage induced by zinc oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wang, J.; Wang, L. Aged Zinc Oxide Nanoparticles Did Not Induce Cytotoxicity Through Apoptosis Signaling Pathway as Fresh NPs. *Res. Sq.* **2020**. [[CrossRef](#)]
77. Van Opdenbosch, N.; Lamkanfi, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity* **2019**, *50*, 1352–1364. [[CrossRef](#)]
78. Suski, J.; Lebiecinska, M.; Bonora, M.; Pinton, P.; Duszynski, J.; Wieckowski, M.R. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2018; Volume 1782, pp. 357–381.