



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,**  
**ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO DE FÍSICA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE**  
**ZINC SINTETIZADAS POR QUÍMICA VERDE, EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO**  
**DE PARTÍCULA**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**M. en C. RAFAEL ÁLVAREZ CHIMAL**

**TUTOR:**  
**Dr. JESÚS ÁNGEL ARENAS ALATORRE**  
**INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**  
**Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM**

**Dr. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## **SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:**

- ❖ Laboratorio 113 Síntesis de Nanomateriales Magnéticos. Departamento Materia Condensada. Instituto de Física. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. Ciudad de México. México.
  
- ❖ Laboratorio de Biointerfases. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. Ciudad de México. México.

---

**Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre**

Tutor

---

**M. en C. Rafael Álvarez Chimal**

Sustentante



## AGRADECIMIENTOS

- ∞ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número de CVU: 579637 para realizar los estudios de doctorado.
- ∞ A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que ha sido mi *Alma Máter* desde la preparatoria hasta el nivel de posgrado, donde he crecido y desarrollado como persona y profesional.
- ∞ Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA) con el proyecto IN112422 por su apoyo financiero.
- ∞ Al Programa de Maestría Y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud (PMDCMOS), sede Facultad de Odontología de la UNAM, por brindarme la plataforma para crecer profesionalmente.
- ∞ Al Instituto de Física de la UNAM por ofrecerme el lugar perfecto, con los servicios adecuados para realizar el proyecto de investigación. En especial a los compañeros del Laboratorio 113 Síntesis de Nanomateriales Magnéticos.
- ∞ Al Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre por su excelente tutoría, su siempre disposición para asesorarme, orientarme y ayudarme en mi formación profesional, muchas gracias por incluirme en su grupo de investigación.
- ∞ A los miembros del comité tutor, Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y Dr. Víctor Irahuen García Pérez, por sus comentarios, sugerencias y asesorías para mejorar y culminar este trabajo.



- ∞ A los integrantes del Laboratorio Central de Microscopia del Instituto de Física de la UNAM, en particular al Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa, al Arq. Diego Quiterio Vargas, al Fís. Roberto Hernández Reyes y al M. en C. Manuel Aguilar Franco, por sus asistencias técnicas en las observaciones a los microscopios electrónicos de barrido y de transmisión.
  
- ∞ Al Laboratorio de Biointerfases de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, por ofrecerme los recursos y espacio para la realización de las pruebas antibacterianas.
  
- ∞ A la Dra. Rosario Tavera Hernández por su invaluable ayuda y compañía, el proyectó creció mucho gracias al análisis de acoplamiento molecular, siempre te estaré agradecido.
  
- ∞ A la I.Q.M. Eréndira Martínez Acevedo por su orientación en la realización de los análisis termogravimétricos.
  
- ∞ Al Sr. Antonio Morales Espino por su ayuda en la obtención de los resultados de difracción de rayos X.
  
- ∞ A Lorena Reyes, Mikado Nidome, Kevin López y Óscar Ortega por acompañarme en esta aventura, y por sus valiosos comentarios y sugerencias.
  
- ∞ Un agradecimiento especial a mis padres Isabel Chimal y Leonardo Álvarez, mi hermano Leonardo Álvarez, y a Rosario Tavera, que me impulsaron y motivaron a conseguir esta meta, a ustedes les dedico este trabajo.



*Once there was a child's dream*

*(Una vez hubo un sueño de niño)*

*One night the clock struck twelve*

*(Una noche el reloj marcó las doce)*

*The window open wide*

*(La ventana abierta de par en par)*

*Once there was a child's heart*

*(Una vez hubo un corazón de niño)*

*The age I learned to fly*

*(La edad en que aprendí a volar)*

*And took a step outside*

*(Y di un paso afuera)*

*Tuomas Holopainen, Nightwish, Once, Dark Chest of Wonders, 2004*





# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>12</b>
1.1 Infecciones generadas por bacterias	<b>12</b>
1.1.1 Bacterias asociadas a enfermedades orales	<b>15</b>
1.2 Nanopartículas (NPs)	<b>20</b>
1.3 Actividad antibacteriana de las NPs	<b>24</b>
1.3.1 Mecanismo de acción antibacteriano de las NPs	<b>26</b>
1.4 Química verde	<b>29</b>
1.4.1 Mecanismo de síntesis de NPs por química verde	<b>31</b>
1.5 Óxido de zinc (ZnO)	<b>35</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivos particulares	<b>37</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>38</b>
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>39</b>
5.1 Materiales	<b>39</b>
5.2 Síntesis por química verde de las ZnO-NPs	<b>39</b>
5.3 Caracterización	<b>40</b>
5.4 Evaluación antibacteriana	<b>42</b>
5.4.1 Prueba de difusión en disco	<b>43</b>
5.4.2 Concentración mínima bactericida (MBC)	<b>44</b>
5.5 Acoplamiento molecular	<b>45</b>



<b>6. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
6.1 Síntesis por química verde de las ZnO-NPs	47
6.2 Difracción de rayos X (XRD)	47
6.3 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM)	49
6.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	52
6.5 Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS)	55
6.6 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	57
6.7 Termogravimetría (TG)	58
6.8 Resumen de los tamaños obtenidos de las ZnO-NPs	59
6.9 Prueba de difusión en disco	60
6.10 Concentración mínima bactericida	64
6.11 Acoplamiento molecular	67
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>70</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>86</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>88</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>89</b>
<b>11. APÉNDICES</b>	<b>108</b>
Apéndice A. Publicaciones derivadas del proyecto de investigación	108
Apéndice B. Difracción de rayos X	109
Apéndice C. Microscopía electrónica de barrido	111
Apéndice D. Microscopía electrónica de transmisión	117
Apéndice E. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	120
Apéndice F. Termogravimetría	123
Apéndice G. Prueba de difusión en disco	125
Apéndice H. Concentración mínima bactericida	126
Apéndice I. Acoplamiento molecular	127



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Especies bacterianas de interés médico. <b>a)</b> <i>Escherichia coli</i> . <b>b)</b> <i>Staphylococcus aureus</i> . <b>c)</b> <i>Staphylococcus epidermidis</i> . <b>d)</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b>	Especies bacterianas de interés odontológico. <b>a)</b> <i>Streptococcus mutans</i> . <b>b)</b> <i>Streptococcus sanguinis</i> . <b>c)</b> <i>Prevotella intermedia</i> . <b>d)</b> <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b>	Diagrama de Socransky que representa la interacción entre los complejos microbianos.	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b>	Escala nanométrica (1-100 nm)	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b>	Algunos campos de aplicación de las NPs	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b>	Propiedades y características de las NPs	<b>24</b>
<b>Figura 7.</b>	Mecanismo de acción antibacteriano de las NPs	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b>	Enfoques generales para la síntesis de NPs	<b>32</b>
<b>Figura 9.</b>	Mecanismo de síntesis de NPs por química verde	<b>35</b>
<b>Figura 10.</b>	Procedimiento para la síntesis por química verde de las ZnO-NPs de diferente tamaño de partícula.	<b>40</b>
<b>Figura 11.</b>	Distribución de los discos de 6 mm de diámetro.	<b>44</b>
<b>Figura 12.</b>	Sólidos obtenidos de las distintas síntesis.	<b>47</b>
<b>Figura 13.</b>	Patrones de XRD de las distintas ZnO-NPs, se observan los planos cristalinos correspondientes al ZnO en todas las síntesis.	<b>48</b>
<b>Figura 14.</b>	Imágenes por FESEM de las distintas ZnO-NPs sintetizadas. <b>a)</b> Las formas cuasiesféricas de las ZnO-NP 200 °C. <b>b)</b> Las formas cuasiesféricas de las ZnO-NPs 400 °C. <b>c)</b> Las formas cuasiesféricas (flechas rojas) y prismas hexagonales (flechas amarillas) de las ZnO-NPs 600 °C. <b>d)</b> Las formas de los prismas hexagonales (flechas amarillas) y cuasiesféricas (flechas rojas) de las ZnO-NPs 800 °C.	<b>51</b>
<b>Figura 15.</b>	Imágenes obtenidas por TEM de las ZnO-NPs sintetizadas a 200 y 400 °C. <b>a)</b> Se observan las formas cuasiesféricas de las ZnO-NPs 200 °C, encerradas en círculos rojo se enmarcan algunas de ellas. <b>b)</b> Análisis de las ZnO-NPs 200 °C por HRTEM con resolución atómica en dirección [010], se inserta el correspondiente análisis de la FFT con las distancias interplanares calculadas. <b>c)</b> Se presentan encerradas en círculos rojos algunas de las ZnO-NPs 400 °C de forma cuasiesférica. <b>d)</b> El análisis de las ZnO-NPs 400 °C por HRTEM en dirección [010], se inserta el	<b>53</b>



- correspondiente análisis de la FFT con las distancias interplanares calculadas.
- Figura 16.** Imágenes obtenidas por TEM de las ZnO-NPs sintetizadas a 600 y 800 °C. **a)** Se observan las formas cuasiesféricas (círculos rojos) y los prismas hexagonales (cuadrados azules) de las ZnO-NPs 600 °C. **b)** El análisis de las ZnO-NPs 600 °C cuasiesféricas con resolución atómica en dirección [010], se inserta el correspondiente análisis por FFT con las distancias interplanares correspondientes. **c)** La imagen muestra las ZnO-NPs 800 °C de forma cuasiesférica (círculos rojos) y prismas hexagonales (cuadrados azules). **d)** Nanopartícula con resolución atómica en dirección [010] con su respectivo análisis por FFT de las ZnO-NPs 800 °C de forma cuasiesférica, se insertan las distancias interplanares calculadas. **e)** El análisis de las ZnO-NPs 600 °C con forma de prisma hexagonal en dirección [010], se inserta el correspondiente análisis de la FFT con las distancias interplanares calculadas. **f)** El análisis de las ZnO-NPs 800 °C con forma de prisma hexagonal en dirección [010], se inserta su análisis por FFT con las correspondientes distancias interplanares calculadas. **54**
- Figura 17.** Resultados por EDS de las ZnO-NPs sintetizadas a diferentes temperaturas donde se observan las señales del Zn, O y de otros elementos. **56**
- Figura 18.** Espectros de FTIR de las ZnO-NPs sintetizadas, se indican las vibraciones obtenidas en cada espectro. **57**
- Figura 19.** Termogramas de las ZnO-NPs sintetizadas a diferentes temperaturas. **59**
- Figura 20.** Tamaño promedio de las ZnO-NPs a las distintas temperaturas de síntesis. **60**
- Figura 21.** Resultados de las medidas promedio y desviación estándar de los halos de inhibición generados por las ZnO-NPs en las especies bacterianas utilizadas. Se incluyen los 6 mm de diámetro del disco. c (cuasiesféricas), ph (prismas hexagonales). **61**
- Figura 22.** Gráfica que representa las diferencias entre las concentraciones mínimas bactericidas en µg/mL de las ZnO-NPs de diferentes tamaños de partícula sobre las cepas bacterianas evaluadas. c (cuasiesféricas), ph (prismas hexagonales). **66**



<b>Figura 23.</b>	Modos de unión de las ZnO-NPs con proteínas bacterianas. <b>69</b> <b>a)</b> Simulación de los modos de unión de las ZnO-NPs a la proteína TagF de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , el acercamiento muestra los puentes de hidrógeno que hacen las ZnO-NPs con la arginina 548 e histidina 584. <b>b)</b> Simulación de los modos de unión de las ZnO-NPs a la proteína AcrAB-TolC de <i>Escherichia coli</i> , el acercamiento muestra los puentes de hidrógeno que hacen las ZnO-NPs con la glutamina 71 y treonina 177.
<b>Figura 24.</b>	Mecanismo propuesto de síntesis por química verde de las ZnO-NPs usando el extracto de <i>Dysphania ambrosioides</i> . <b>72</b>
<b>Figura 25.</b>	Diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas. <b>78</b>
<b>Figura 26.</b>	Mecanismos antibacterianos de las ZnO-NPs <b>81</b>
<b>Figura B.1.</b>	Interacción de un cristal con los rayos X <b>110</b>
<b>Figura C.1.</b>	Principales señales que tienen lugar en un sólido cuando es bombardeado por un haz de electrones. <b>111</b>
<b>Figura C.2.</b>	Volumen de excitación primaria <b>112</b>
<b>Figura C.3.</b>	Componentes de un microscopio electrónico de barrido <b>116</b>
<b>Figura D.1.</b>	Componentes de un microscopio electrónico de transmisión <b>118</b>
<b>Figura E.1.</b>	Modos de vibración de las moléculas al absorber la radiación IR. <b>120</b>
<b>Figura E.2.</b>	Fundamento del equipo de IR <b>122</b>
<b>Figura F.1.</b>	Componentes de un termoanalizador <b>124</b>
<b>Figura G.1.</b>	Procedimiento para la prueba de difusión en disco por el método de Kirby-Bauer <b>125</b>
<b>Figura H.1.</b>	Procedimiento para determinar la concentración mínima bactericida <b>126</b>
<b>Figura I.1.</b>	Fundamento del análisis de acoplamiento molecular <b>128</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Especies bacterianas utilizadas	<b>42</b>
<b>Tabla 2.</b>	Tamaños promedio de cristal ( $\pm$ desviación estándar) calculados con la ecuación de Debye-Sherrer	<b>49</b>
<b>Tabla 3.</b>	Porcentajes atómicos (% at) del Zn y O	<b>56</b>
<b>Tabla 4.</b>	Imágenes de las pruebas de difusión en disco evaluando las distintas ZnO-NPs sobre las especies bacterianas utilizadas	<b>62</b>
<b>Tabla 5.</b>	Concentraciones mínimas bactericidas en $\mu\text{g/mL}$ de las distintas ZnO-NPs sobre las especies bacterianas utilizadas	<b>65</b>
<b>Tabla 6.</b>	Resultados del acoplamiento molecular de las ZnO-NPs con las proteínas TagF de <i>Staphylococcus epidermidis</i> y AcrAB-TolC de <i>Escherichia coli</i>	<b>68</b>



## ABREVIATURAS

**Å:** ángstrom

**μM:** micromolar

**A.U.:** unidades arbitrarias

**FESEM:** microscopía electrónica de barrido por emisión de campo

**FTIR:** espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

**HRTEM:** microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

**Kcal:** kilocalorías

**Ki:** constante de inhibición

**MBC:** concentración mínima bactericida

**mL:** mililitros

**nm:** nanómetros

**PDB:** base de datos de proteínas

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SEM:** microscopía electrónica de barrido

**TG:** termogravimetría

**TSB:** caldo soya tripticasa

**ZnO:** óxido de zinc

**μg:** microgramos

**ANOVA:** análisis de varianza

**EDS:** espectroscopía por dispersión de energía de rayos X

**FFT:** transformada rápida de Fourier

**h:** horas

**KBr:** bromuro de potasio

**KeV:** kiloelectronvoltios

**M:** molar

**min:** minutos

**mm:** milímetros

**NPs:** nanopartículas

**PDF:** archivo de difracción de polvos

**rpm:** revoluciones por minuto

**TEM:** microscopía electrónica de transmisión

**TSA:** agar soya tripticasa

**XRD:** difracción de rayos X

**ZnO-NPs:** nanopartículas de óxido de zinc



## RESUMEN

Las infecciones asociadas a las bacterias han aumentado en los últimos años, esto debido mayormente al uso excesivo de antibióticos y a la resistencia que desarrollan los microorganismos a estos compuestos, de ahí que se busquen alternativas a los tratamientos médicos convencionales. Las nanopartículas (NPs), como las de plata, óxido de zinc (ZnO), etc., han demostrado ser una buena alternativa debido a su alta capacidad antibacteriana asociado a su tamaño nanométrico. Dentro de las metodologías para sintetizarlas se encuentra la química verde, donde el uso de especies vegetales es uno de los recursos más utilizados.

En este trabajo se usó el extracto de la especie vegetal *Dysphania ambrosioides* (epazote) para sintetizar las NPs de ZnO (ZnO-NPs) de diferentes tamaños, variando la temperatura de síntesis, se evaluaron sobre cepas bacterianas de interés médico y odontológicos, y se determinó la influencia del tamaño de partícula sobre su inhibición.

Las temperaturas de síntesis utilizadas fueron: 200, 400, 600 y 800 °C, con las que se obtuvieron ZnO-NPs de diferentes tamaños, en promedio de 7 a 130 nm, además de formas distintas dependiendo de la temperatura usada en la síntesis. Observándose la característica de que el incremento de la temperatura favoreció el aumento del tamaño de las NPs.

La caracterización de las ZnO-NPs por difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de transmisión convencional (TEM) y de alta resolución (HRTEM) confirmó la presencia de la fase cristalina hexagonal del ZnO. Por



microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM) se observaron las formas obtenidas, en todas las síntesis (200, 400, 600 y 800 °C) se obtuvieron formas cuasiesféricas y sólo a 600 y 800 °C resultaron también formas de prismas hexagonales. Por espectroscopía infrarroja (FTIR) se identificó la señal correspondiente a la vibración del enlace Zn-O y por termogravimetría (TG) se evaluó su estabilidad, siendo las ZnO-NPs a 600 °C las más estables.

Las pruebas antibacterianas demostraron la influencia del tamaño de partícula en la inhibición bacteriana, las NPs de menor tamaño lograron una mayor inhibición, apreciable con las cepas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, aunque todas las cepas evaluadas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*) fueron sensibles a las ZnO-NPs.

El estudio de acoplamiento molecular evidenció una interacción favorable entre las ZnO-NPs con las proteínas bacterianas TagF de *Staphylococcus epidermidis* y AcrAB-TolC de *Escherichia coli*, lo que llevó a proponerlas como posibles blancos de las NPs, y así tener una mayor entendimiento de su mecanismo antibacteriano.



## ABSTRACT

Bacteria-associated infections have increased in recent years, due to the excessive use of antibiotics and the resistance developed by the microorganisms to these compounds, leading to the search for new medical treatments. Nanoparticles (NPs), such as silver, zinc oxide (ZnO), etc., have proven to be a good option due to their high antibacterial capacity associated with their nanometric size. Among the methodologies to synthesize them is green synthesis, where the use of plant species is one of the most used resources.

In this work, the extract of the plant species *Dysphania ambrosioides* (wormseed) was used to synthesize different sized ZnO-NPs, besides varying the synthesis temperature, testing them on bacterial strains of medical and dental interest, and determining the influence of particle size on their inhibition.

The different synthesis temperatures used were: 200, 400, 600, and 800 °C, which allowed synthesizing different sized ZnO-NPs, on average from 7 to 130 nm, and different shapes depending on the temperature used in the synthesis. Furthermore, it was observed that as the temperature increased, the size of the NPs was larger.

The characterization of the ZnO-NPs by X-ray diffraction (XRD), conventional transmission electron microscopy (TEM), and high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) confirmed the presence of the ZnO hexagonal crystalline structure. The resulting shapes were observed by field emission scanning electron microscopy (FESEM); in all syntheses (200, 400, 600,



and 800 °C), quasi-spherical were obtained, at 600 and 800 °C hexagonal prism shapes also appeared. By the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), the vibration corresponding to the Zn-O bond was identified, and by thermogravimetry (TG), the stability was evaluated, being the ZnO-NPs 600 °C the most stable.

The antibacterial evaluation demonstrated the influence of particle size on bacterial inhibition; the smaller the ZnO-NPs size, the higher the inhibition. This was observed mainly with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains, although all the evaluated strains (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia*) were sensitive to ZnO-NPs.

Furthermore, the molecular docking study showed a favorable interaction between ZnO-NPs with bacterial proteins TagF from *Staphylococcus epidermidis* and AcrAB-TolC from *Escherichia coli*, which led to proposing them as possible targets of NPs, allowing a better understanding of their antibacterial mechanisms.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Infecciones generadas por bacterias

Las infecciones bacterianas tienen un gran impacto en la salud pública. Las enfermedades pueden producirse en cualquier lugar del cuerpo y ser causadas por el propio microorganismo o por la respuesta del cuerpo a su presencia [1].

Las bacterias se transmiten al ser humano a través del aire, agua, alimentos o vectores vivos. Una vez que una persona está infectada, puede o no observarse una enfermedad clínicamente aparente y dependerá de los factores del huésped para determinar si la enfermedad se desarrollará tras la transmisión de un agente bacteriano [1]. Entre las bacterias que desarrollan infecciones en el cuerpo humano se encuentran *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras.

*Escherichia coli* (Figura 1a) es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de un tamaño de 3  $\mu\text{m}$ , comúnmente móvil por flagelos [2]. Es un miembro importante de la microflora intestinal normal de los seres humanos, y otros mamíferos, pero también es la causante más común de infecciones agudas del tracto urinario, así como de sepsis en el mismo tracto. Está asociada a la meningitis, sepsis neonatal, y a la generación de abscesos en varios órganos y tejidos. Puede provocar enteritis aguda, es la causa general de la "diarrea del viajero", una enfermedad parecida a la disentería que afecta a los seres humanos, y de la colitis hemorrágica, a menudo denominada "diarrea con sangre" [3].



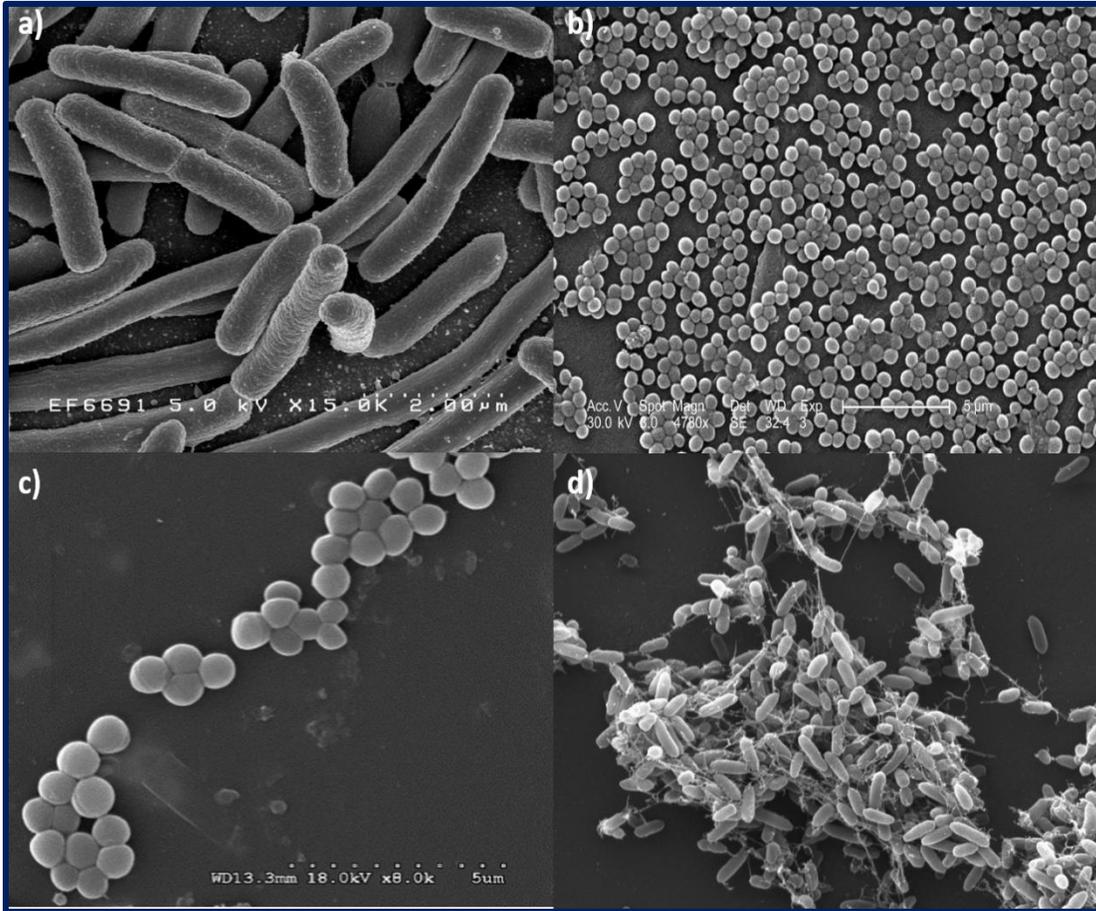
*Staphylococcus aureus* (Figura 1b) es una bacteria Gram positiva de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de tamaño, presenta morfología de cocos agrupados en racimos, es inmóvil, anaerobia facultativa, se encuentra en la piel y mucosas de individuos sanos [4,5]. También es un importante patógeno bacteriano humano que provoca una gran variedad de manifestaciones clínicas como endocarditis, infecciones en la piel, tejidos blandos, pulmones, etc. Según las cepas implicadas y el lugar de la infección, estas bacterias pueden causar padecimientos invasivos y/o enfermedades mediadas por toxinas. Los contagios son frecuentes tanto en entornos adquiridos en la comunidad como en los hospitales y su tratamiento sigue siendo un reto debido a la aparición de cepas multirresistentes como la *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) [6].

*Staphylococcus epidermidis* (Figura 1c) es una bacteria Gram positiva de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de tamaño, morfología de cocos agrupados en racimos, inmóvil y su metabolismo es anaerobio facultativo [7]. Está presente en la piel y mucosas, especialmente en sitios húmedos como axilas, ingle, conjuntivas, etc. Es conocida como la principal causante de las infecciones de dispositivos médicos implantados, como los catéteres intravenosos periféricos o centrales. La queratitis ocular y la endoftalmitis por lentes de contacto contaminadas, así como por sondas urinarias infectadas, la bacteriemia, la mediastinitis y otras enfermedades están asociadas a esta bacteria. Se considera hoy en día un importante patógeno oportunista. Actualmente se le asocia como la causante más frecuente de infecciones nosocomiales. La existencia de una alta frecuencia de *Staphylococcus epidermidis* en la microflora de la piel humana, la amplia colonización de las células epiteliales y



varios factores de virulencia, como su capacidad para formar biopelícula, son las principales razones de estos contagios [8,9].

*Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1d) es un bacilo recto o ligeramente curvado de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , Gram negativo, aerobio y móvil por flagelo polar [10]. Puede causar múltiples infecciones que varían de locales a sistémicas y de benignas a potencialmente mortales. En las últimas décadas, esta bacteria se ha convertido en uno de los agentes causantes más frecuentes de enfermedades nosocomiales como la neumonía, además está involucrada en afecciones del trato urinario y del torrente sanguíneo. Los problemas crónicos de las vías respiratorias por *Pseudomonas aeruginosa* son de las principales causas de morbilidad en personas con fibrosis quística o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Esto está relacionado con su capacidad para desarrollar rápidamente resistencia a múltiples clases de antibióticos [11].



**Figura 1.** Especies bacterianas de interés médico. **a)** *Escherichia coli*. **b)** *Staphylococcus aureus*. **c)** *Staphylococcus epidermidis*. **d)** *Pseudomonas aeruginosa*. [tomadas de la red]

### 1.1.1 Bacterias asociadas a enfermedades orales

La cavidad bucal está compuesta de diversas estructuras anatómicas, cada una de ellas colonizada por una gran cantidad de bacterias, la biopelícula bacteriana proverbial. Algunas de estas bacterias han sido implicadas en enfermedades bucales como la caries y la periodontitis, que están entre las infecciones bacterianas más comunes en la población a nivel mundial [12].



Existe una gran diversidad de hábitats dentro de la cavidad bucal, esto depende de las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas [13]. Es ampliamente aceptado que algunos microorganismos bucales causan enfermedades principalmente por una forma sinérgica o cooperativa, y que las infecciones bucales son de naturaleza polimicrobiana [14].

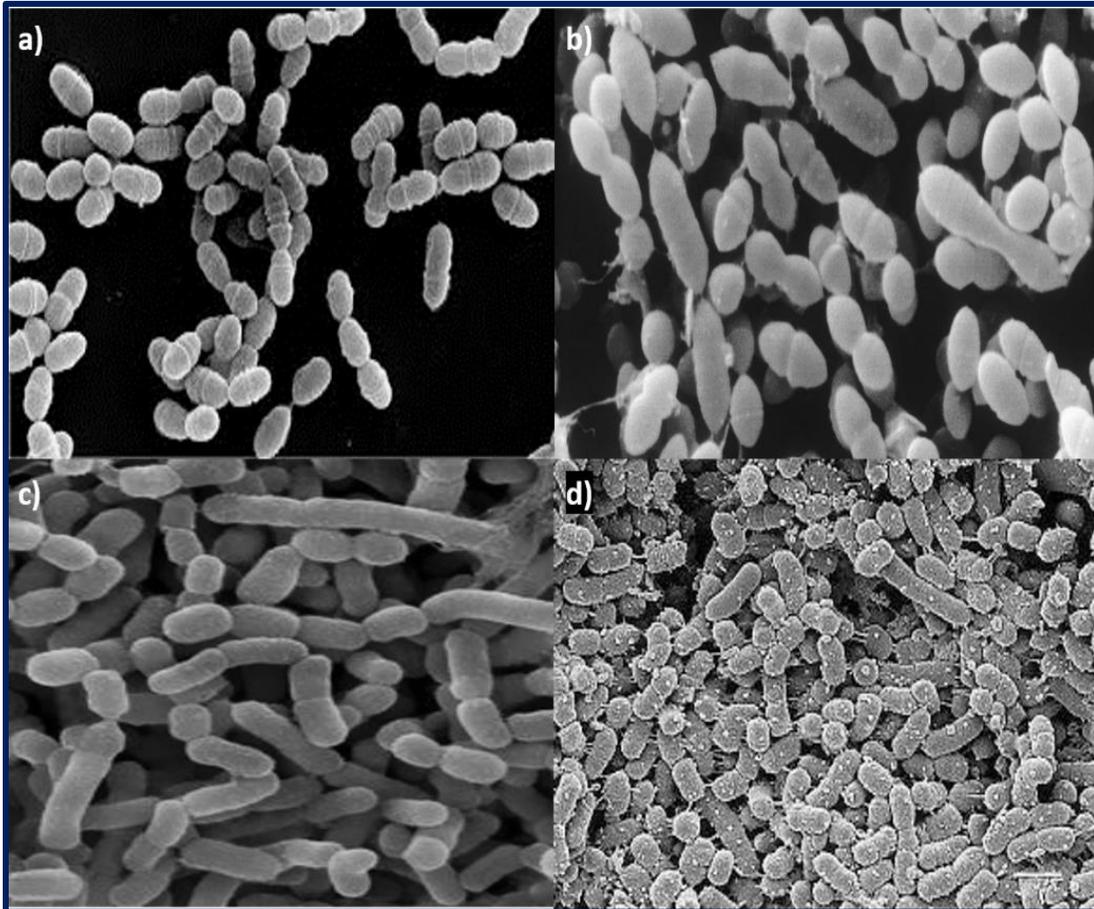
*Streptococcus mutans* (Figura 2a) está asociada al desarrollo de la caries, que es el daño al esmalte del diente y puede provocar la pérdida del mismo [14]. Es una bacteria Gram positiva en forma de cocos de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de tamaño, su metabolismo es anaerobio facultativo y forma parte de la placa dental [15]. Su capacidad para metabolizar rápidamente una gran variedad de azúcares y generar ácidos orgánicos provoca la disminución del pH en el ambiente bucal, con la consecuente desmineralización del esmalte dental. La destrucción progresiva del esmalte hasta la formación de una cavidad, lleva a la invasión de la pulpa dental y de ahí a la circulación, por lo que también participa en la generación de endocarditis [14,16].

*Streptococcus sanguinis* (Figura 2b) es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, de 0.6 a 2  $\mu\text{m}$  de tamaño, en forma de cocos. Su presencia en la boca es usual en condiciones normales de salud debido a su capacidad para adherirse a la saliva, por su interacción con proteínas de la superficie dental. Aunque también es una de las principales causantes de endocarditis infecciosa en válvulas cardíacas, lo que puede ser mortal [17].



*Prevotella intermedia* (Figura 2c) es un bacilo de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño, Gram negativo, anaerobio. Se le ha asociado con el desarrollo de muchas formas de enfermedad periodontal humana, incluida la periodontitis crónica y la de aparición temprana, participa de manera importante en el deterioro periodontal de los diabéticos, así como en la generación de la gingivitis ulcerosa necrosante aguda [18]. Está involucrada en el desarrollo de abscesos periamigdalinos y orales, e infecciones pulmonares. Tiene una alta capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos [19].

*Porphyromonas gingivalis* (Figura 2d) es considerada como una de las bacterias odontopatógenas periodontales más relevantes, está implicada en procesos infecciosos como la periodontitis crónica y agresiva debido a su capacidad para adherirse a estas superficies y evadir el sistema inmune del huésped [20]. Es un cocobacilo Gram negativo, no móvil, anaerobio estricto, de 1 a 3.5  $\mu\text{m}$  de tamaño [21]. Se le ha identificado en infecciones pulmonares como la neumonía, en padecimientos cardiacos y recientemente se ha investigado su participación en el desarrollo del Alzheimer [21,22].

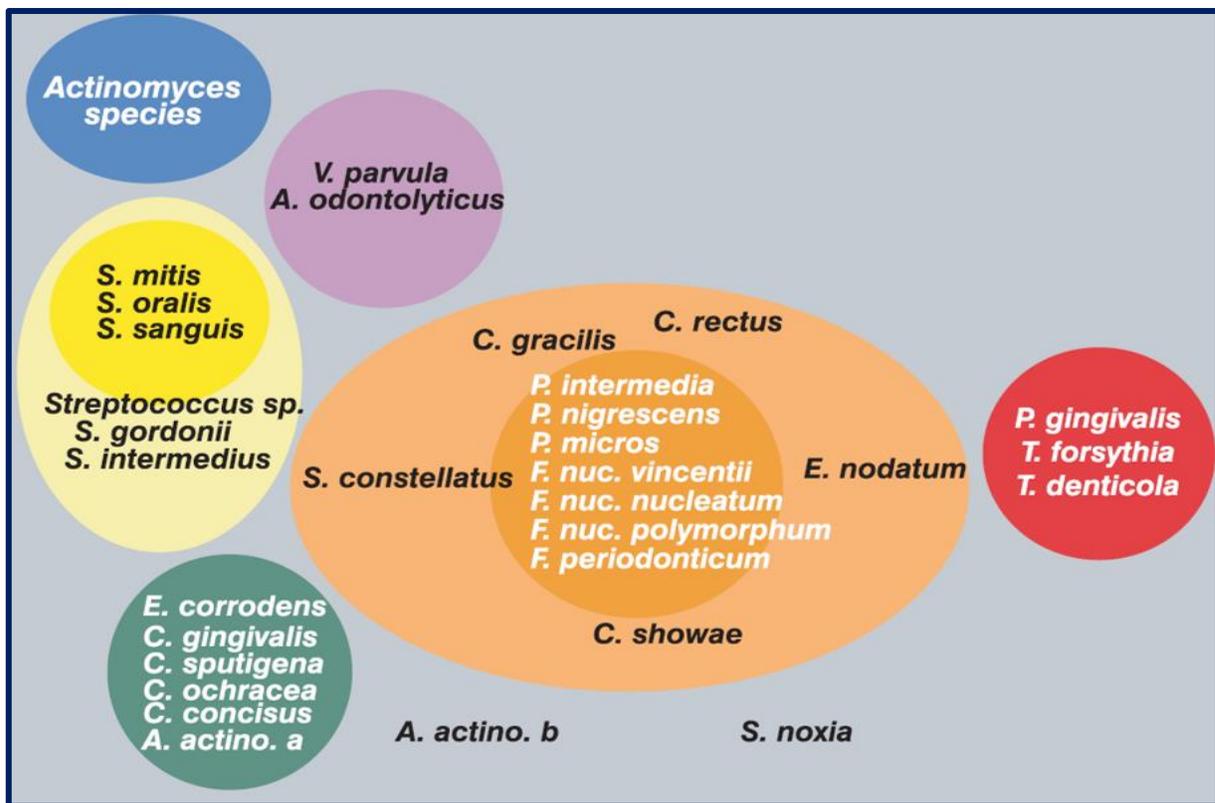


**Figura 2.** Especies bacterianas de interés odontológico. **a)** *Streptococcus mutans*. **b)** *Streptococcus sanguinis*. **c)** *Prevotella intermedia*. **d)** *Porphyromonas gingivalis*. [tomadas de la red]

*Streptococcus sanguinis*, *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, en conjunto con otras especies bacterianas, forman parte de los complejos en los que Sigmund Socransky, microbiólogo y periodoncista canadiense, las agrupó por su participación en el desarrollo de la enfermedad periodontal, un padecimiento que lleva a la destrucción de las encías y del hueso que sujeta los dientes. *Streptococcus sanguinis* se encuentra en el complejo amarillo, participa en las primeras etapas de la enfermedad, colonizando y preparando la superficie



dentaria para la llegada de los siguientes complejos. *Prevotella intermedia* pertenece al complejo anaranjado, que agrupa una gran cantidad de bacterias, e interactúan con las cepas colonizadoras iniciales para agravar el daño y sirven de puente con los colonizadores tardíos, que conforman el complejo rojo, donde se ubica *Porphyromonas gingivalis* junto con otras dos bacterias, que desarrollan la patología y una respuesta inflamatoria [23,24] (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de Socransky que representa la interacción entre los complejos microbianos. [23,24]

La proliferación bacteriana consecuencia de una dieta rica en azúcares, como la sacarosa, aunado a una deficiente higiene bucal, favorece el desarrollo de



patologías o procesos infecciosos como caries, gingivitis y periodontitis. Existen muchas estrategias para reducir la acumulación de placa, desde la restricción del consumo de azúcar, hasta la vacunación contra bacterias odontopatógenas específicas como *Streptococcus mutans* o el uso de agentes antimicrobianos como antibióticos, antisépticos o recientemente el uso de NPs en enjuagues bucales o pastas dentífricas en conjunto con técnicas adecuadas de cepillado [25,26].

## **1.2 Nanopartículas (NPs)**

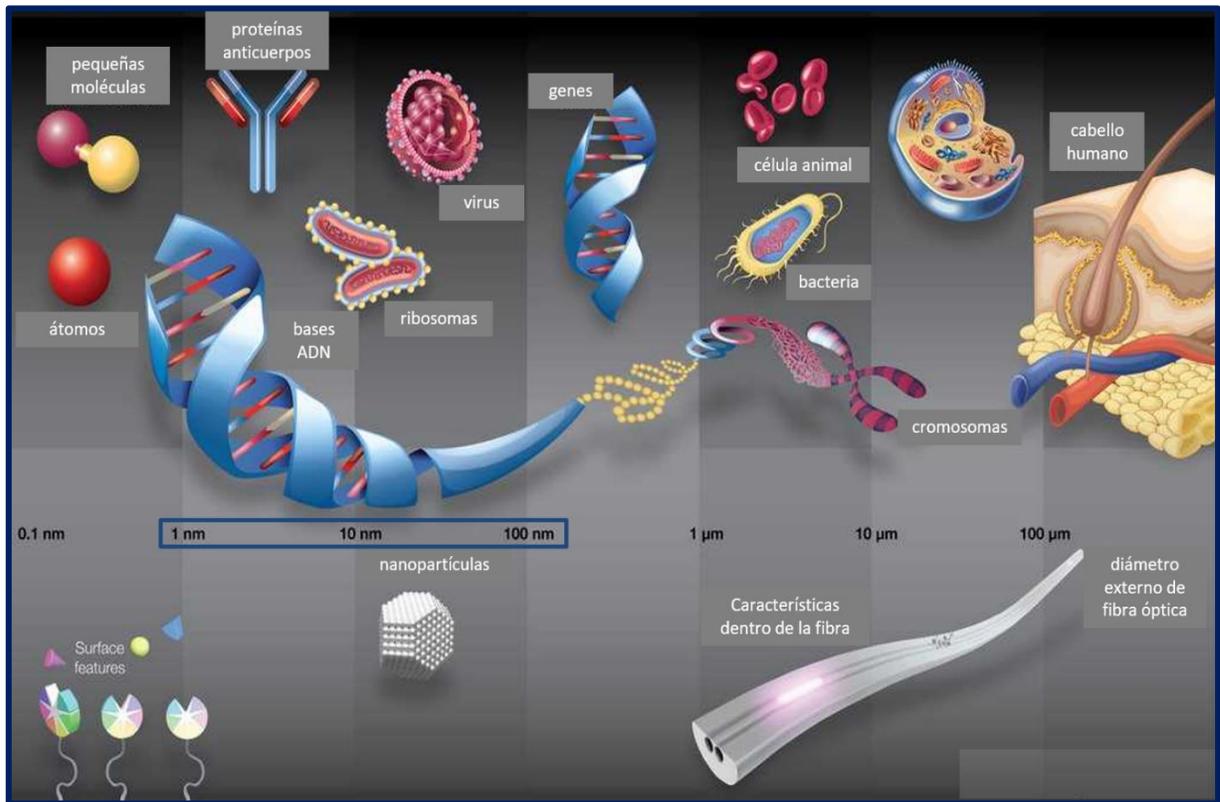
Las NPs se incluyen dentro de los materiales con unidades estructurales básicas como granos, fibras, partículas u otros componentes con al menos en una dimensión se encuentra en el intervalo de 1-100 nm, inclusive un intervalo mayor. Su importancia radica en que, en el mundo nanométrico, los materiales pueden adquirir o realzar propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica [27].

Las NPs pueden ser ensambladas de tal manera que además de la reducción del tamaño, también se favorezca una mayor superficie de contacto, dando lugar a propiedades fisicoquímicas superiores (mecánicas, eléctricas, magnéticas, ópticas, catalítica, etc.), permitiendo el desarrollo de aplicaciones en campos tan diversos como la medicina, electrónica, informática, etc. [28].

Las NPs pertenecen a la nanociencia que se encarga del estudio de los fenómenos y el manejo de materiales a escala nanométrica [29] (Figura 4) e involucra a la nanotecnología que se enfoca en el diseño, la caracterización y la

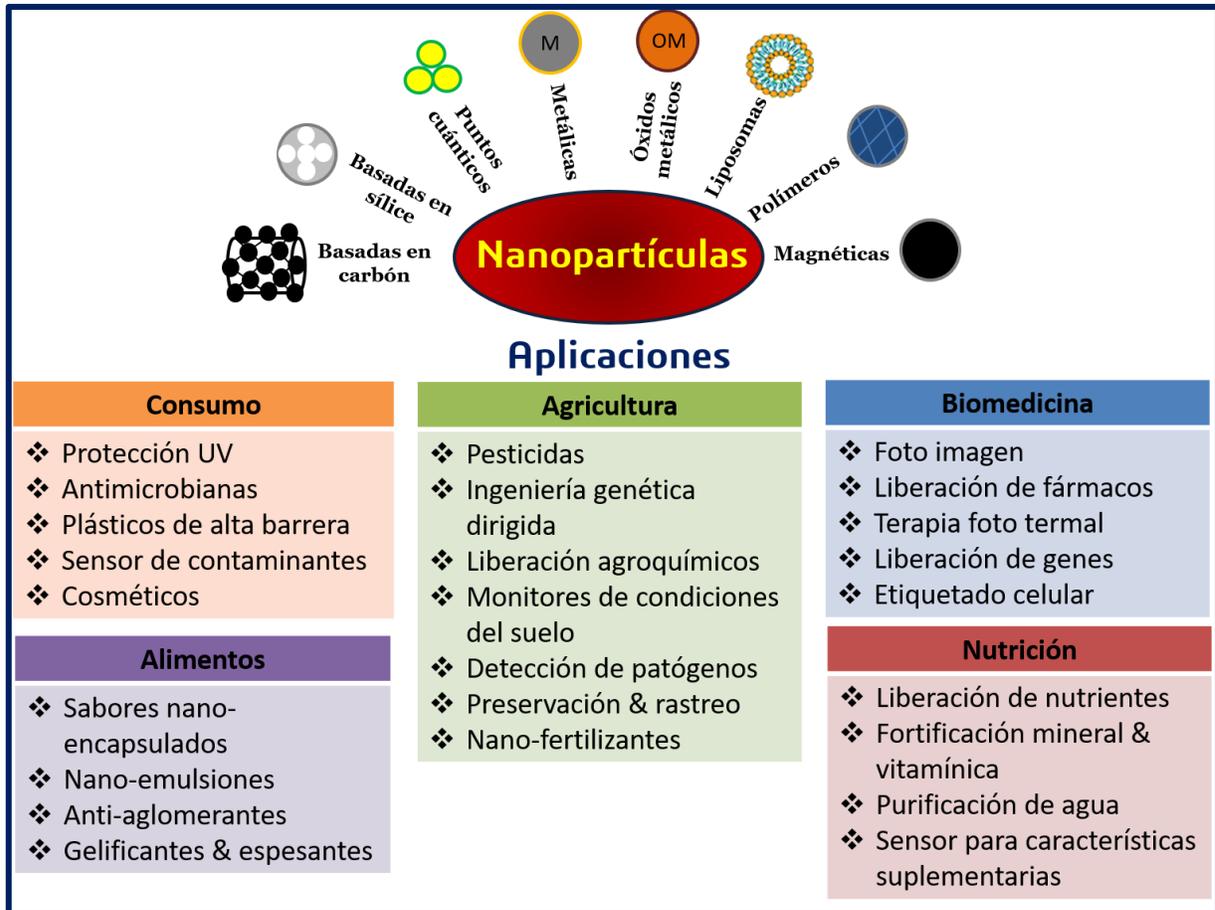


aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a esta escala.



**Figura 4.** Escala nanométrica (1-100 nm) [tomada de [www.nanova.org](http://www.nanova.org)]

Actualmente las NPs son objeto de intensa investigación científica, debido a su amplia variedad de aplicaciones potenciales (Figura 5), en campos como el médico, alimenticio, óptico, electrónico, químico, agricultura, etc. [30].



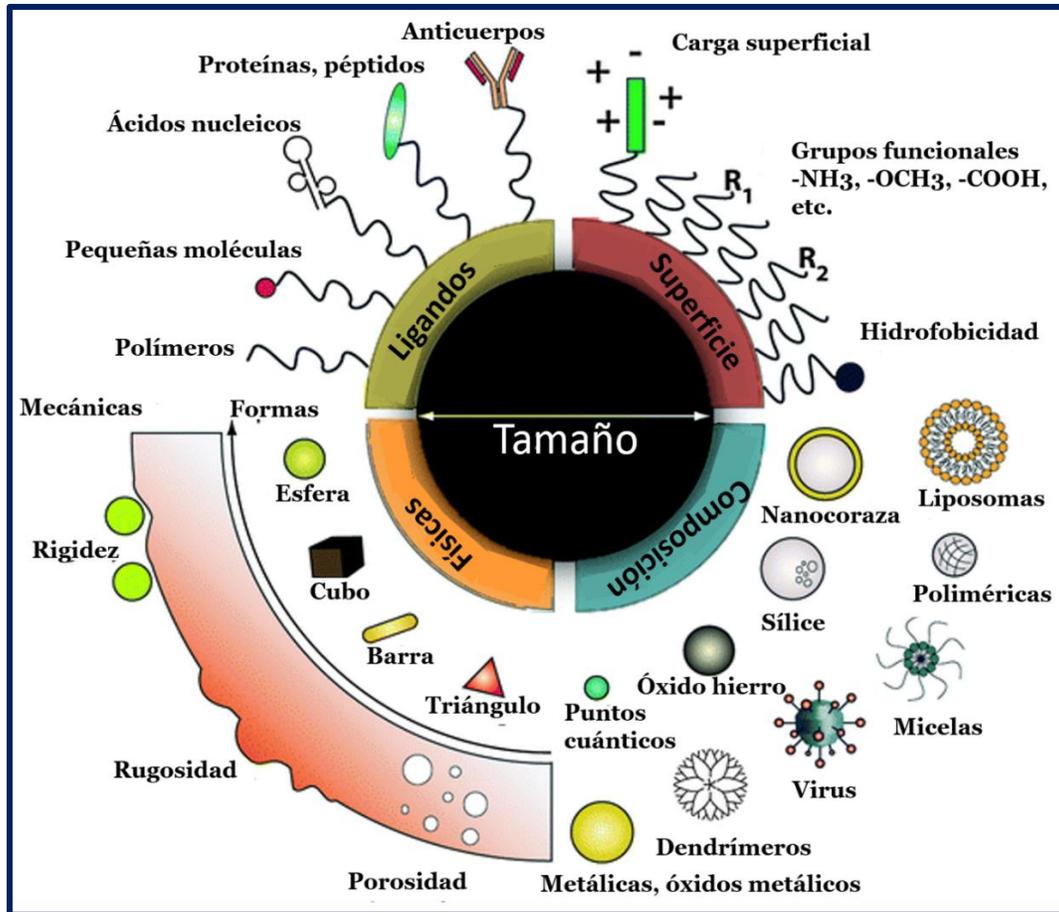
**Figura 5.** Algunos campos de aplicación de las NPs [30]

El interés que presentan las NPs se basa en que la reducción de tamaño lleva a nuevas propiedades no presentes normalmente en sus homólogos macroscópicos, además de que otras características como lo son sus formas, sus propiedades de superficie y físicas, su composición química, si están recubiertas [31] (Figura 6), las hacen muy versátiles para ser usadas en diferentes áreas debido a que:

- ❖ Al reducir el tamaño se permite sintetizar estructuras con mayor relación superficie/volumen, es decir, hay mayor cantidad de átomos o moléculas superficiales por unidad de volumen.



- ❖ Aparecen propiedades únicas de los sistemas de tamaño reducido, el efecto del tamaño cuántico, ya que están constituidos por un pequeño número de átomos o moléculas. Los efectos cuánticos dominan el comportamiento de la materia a escala nanométrica influyendo en sus propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas.
  
- ❖ La forma en la que se distribuyen las moléculas da lugar a diferencias importantes en cuanto a las propiedades mecánicas.
  
- ❖ Las NPs presentan mayor área superficial en comparación con su homólogo macroscópico en volumen, por lo que se considera que al disminuir el tamaño se obtiene un nuevo material. Esto hace, que el material sea más reactivo.



**Figura 6.** Propiedades y características de las NPs [31]

### 1.3 Actividad antibacteriana de las NPs

En los últimos años, el número de infecciones asociadas con bacterias resistentes a los antibióticos han aumentado. Los antibióticos actúan inhibiendo las síntesis de pared celular, proteínas y ácidos nucleicos, o alterando funciones de la membrana celular y el metabolismo bacteriano. Las bacterias son capaces de desarrollar rápidamente mecanismos de resistencia a través de múltiples vías que incluyen la alteración o inactivación del antibiótico, la modificación de la diana o una vía metabólica para evitar su efecto dañino, solo por mencionar algunos [32].



Las NPs se basan en mecanismos antibacterianos completamente diferentes a los de los antibióticos tradicionales, proporcionando una alternativa convincente. Para todas las variedades de NPs, el mecanismo antibacteriano no se comprende del todo. La superficie específica de las NPs aumenta a medida que disminuye el tamaño de partícula, lo que permite una mayor interacción del material con el entorno. La composición química, la concentración, el tamaño y la forma de las NPs son algunas de las variables más relevantes que influyen en la actividad antibacteriana [32,33].

La capacidad antibacteriana de las NPs se centra en que debido a su tamaño nanométrico presentan una mayor relación volumen/superficie, lo que les proporciona una interacción considerablemente más grande con las estructuras microbianas y así ejercer su actividad antibacteriana, además de que llevan a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son moléculas altamente oxidantes, y liberación de iones lo que afecta a proteínas y al ADN de las bacterias, aunado a que éstas no han desarrollado mecanismos de resistencia muy eficientes contra las NPs [33,34].

Las NPs metálicas y de óxidos metálicos son de las más estudiadas por su estabilidad y bioseguridad, las NPs de plata (Ag-NPs), óxido de zinc (ZnO-NPs), óxido de cobre (CuO-NPs) entre otras, han atraído una atención especial porque se les han comprobado una alta efectividad antibacteriana [35].

Las Ag-NPs son las más estudiadas y de las que se tiene mayor conocimiento de su mecanismo de acción antibacteriano, tienen la desventaja de no ser tan biocompatibles, afectando a células normales del organismo si se busca su aplicación en seres humanos [36].



Otras NPs con actividad antibacteriana son las CuO-NPs, estas ejercen su actividad por la liberación de  $\text{Cu}^{2+}$ , además poseen una baja solubilidad en agua, lo que permite una liberación sostenida de iones  $\text{Cu}^{2+}$  para uso a largo plazo, estas también presentan el inconveniente de que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  afectan a las células sanas del cuerpo [37].

Las ZnO-NPs tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana hacia diferentes bacterias, hongos y virus debido a su mayor área superficial, mayor capacidad de absorción, cristalinidad y transmisión, estas tienen la ventaja de ser más biocompatibles [38].

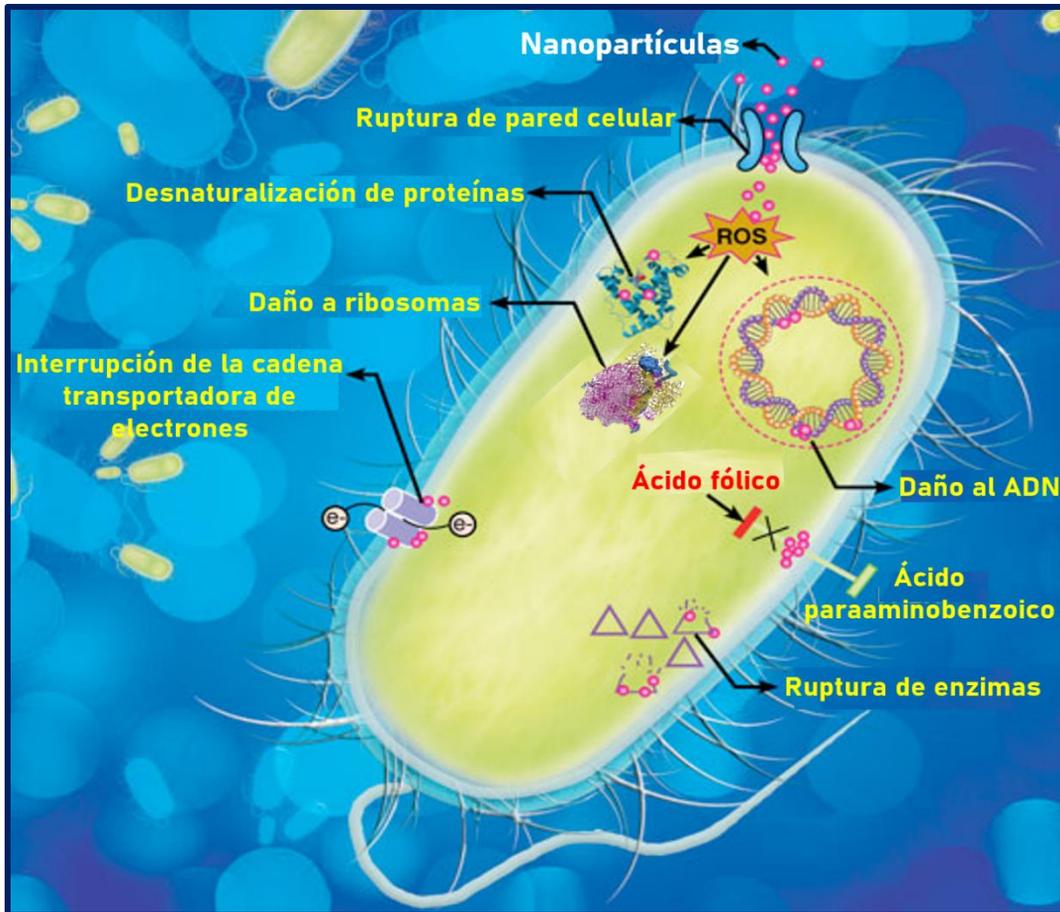
### **1.3.1 Mecanismo de acción antibacteriano de las NPs**

El mecanismo antibacteriano de las NPs no está completamente desarrollado, pero se han descrito varios procesos (Figura 7); uno de ellos indica que las NPs interactúan con la pared celular bacteriana causando perturbaciones en las funciones de la membrana celular como la destrucción de su integridad, el desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico inhibiendo la respiración celular, provocando finalmente su muerte. La carga global de la membrana y pared de las células bacterianas es negativa debido al exceso de grupos carboxílicos que están disociados, las NPs tienen generalmente una carga positiva, como resultado, las cargas opuestas entre las NPs y estas estructuras generan una fuerte atracción electrostática, produciendo un daño debido a su acumulación [34].



Otro de los mecanismos es mediante la generación de ROS, que incluyen al radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), como resultado de la activación de las NPs por la luz visible y ultravioleta. Las NPs activadas reaccionan con las moléculas de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) donde están suspendidas, separándolas en  $\cdot\text{OH}$  y protones ( $\text{H}^+$ ). Las moléculas de  $\text{O}_2$  disueltas en el medio se transforman en  $\cdot\text{O}_2^-$ , que a su vez reacciona con los  $\text{H}^+$  para generar  $\text{HO}_2\cdot$ . Posteriormente, esta especie interactúa con electrones produciendo aniones de peróxido de hidrógeno ( $\text{HO}_2^-$ ), el  $\text{HO}_2^-$  reacciona con los  $\text{H}^+$  para producir moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{O}_2^-$  están negativamente cargados por lo que no pueden penetrar a la célula bacteriana hasta que no se debilita su integridad, permaneciendo en contacto directo con la superficie externa de la bacteria causando daño. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  si puede penetra y ejercer su acción tanto adentro como afuera del microorganismo [34,38].

Las NPs que ingresan a la bacteria interaccionan con las proteínas, enzimas y el ADN, lo que tienen efecto significativo en la inhibición de su metabolismo y la ruptura del sistema enzimático, este daño se ve incrementado cuando las NPs liberan iones de manera sostenida [39].



**Figura 7.** Mecanismo de acción antibacteriano de las NPs [tomada de [www.nanowerk.com/spotlight/spotid=32188.php](http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=32188.php)]

La acción antibacteriana dependerá de factores como el tamaño y la forma de las NPs, su composición química, el recubrimiento, su carga superficial potencial y la concentración, las que están en el intervalo de tamaño de 1-10 nm han mostrado tener la mayor actividad antibacteriana [40].

Las propiedades antibacterianas de las NPs se han utilizado, por ejemplo, para revestir superficies que evitan la adhesión microbiana y así reducir la formación de biopelícula [41] además se han desarrollado nanocompuestos y agentes de unión



a dentina que contienen NPs con una potente actividad antibacteriana en su aplicación odontológica [42].

#### **1.4 Química verde**

La química verde tiene como propósito el promover las tecnologías químicas innovadoras que reduzcan o eliminen el uso y la generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y empleo de productos químicos. Consiste en reducir al mínimo o de ser posible eliminar por completo la contaminación producida en procesos de elaboración, evitando al máximo el consumo y desperdicio de materias primas no renovables, así como el empleo de materiales peligrosos o contaminantes en la fabricación de productos. Paul J. Anastas, considerado el padre de la química verde, la define como *“una filosofía de trabajo que implica la utilización de herramientas y caminos alternativos que prevengan la contaminación”*, refiriéndose tanto al diseño de la estrategia sintética como al tratamiento de los posibles productos secundarios que se devengan de dicha ruta [43-45].

Los doce principios básicos de la química verde son [44]:

- 1.** Es mejor evitar los residuos que tratarlos o limpiarlos una vez formados.
- 2.** La ruta sintética debe ser diseñada con el objetivo de maximizar la incorporación de la materia prima usada en el producto final.



- 3.** La metodología sintética debe procurar generar el número mínimo de sustancias tóxicas para el ser humano y el ambiente.
  
- 4.** Los productos químicos diseñados deben ser eficaces e inocuos.
  
- 5.** El uso de sustancias auxiliares (disolventes) seguras o evitarlas en lo posible.
  
- 6.** Los requerimientos energéticos de la ruta sintética también deben ser tomados en cuenta y minimizados. Las reacciones deben llevarse a cabo a temperatura ambiente y presión atmosférica normal cuando sea factible.
  
- 7.** Las materias primas deben ser renovables cuando sea técnica y económicamente favorable.
  
- 8.** La reducción de subproductos.
  
- 9.** El uso de catalizadores en las reacciones.
  
- 10.** Los productos químicos deben ser diseñados de modo que al final de su vida útil se descompongan en compuestos inocuos.
  
- 11.** La metodología analítica debe ser usada para poder controlar los procesos, evitando la formación de sustancias peligrosas.



- 12.** Las sustancias y su estado físico deben ser elegidas con cuidado de modo que se eviten potenciales situaciones de riesgo como explosiones o fuegos.

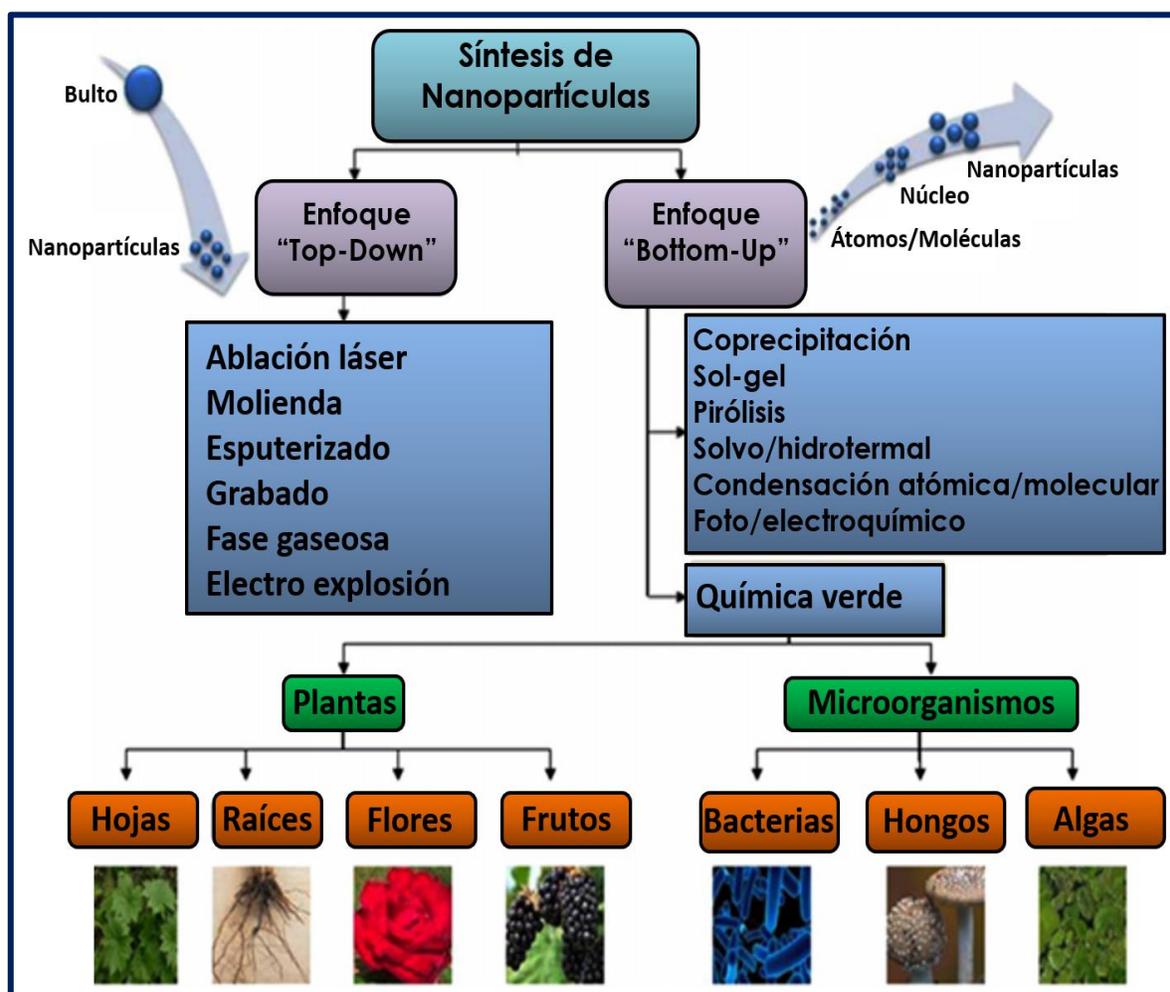
#### **1.4.1 Mecanismo de síntesis de NPs por química verde**

Para generar NPs se distinguen dos enfoques [46] (Figura 8):

- ❖ “*Top-Down*” o de arriba-abajo: enfoque que desarrolla las NPs mediante técnicas físicas como la molienda o la abrasión de un material.
  
- ❖ “*Bottom-Up*” o de abajo-arriba: enfoque en el que las NPs se producen a partir de “nanobloques” de átomos o moléculas dando lugar a agrupaciones más complejas. En este enfoque se distinguen tres alternativas:
  - *Síntesis química*. Método para producir moléculas o partículas mediante la reacción entre las sustancias usadas como materia prima.
  
  - *Autoensamble*. Técnica en la que los átomos o moléculas se ordenan a sí mismas mediante interacciones físicas y/o químicas.
  
  - *Ensamble posicional*. Los átomos, moléculas o sus agregados son manipulados deliberadamente y posicionados uno por uno. Este método es extremadamente laborioso y no es conveniente como proceso industrial.



De las metodologías que están teniendo relevancia en la obtención de NPs, dentro del enfoque “*bottom-up*”, se encuentra la síntesis por química verde (Figura 6). El uso de especies vegetales es uno de los recursos más utilizados para llevar a cabo este procedimiento. Varios metabolitos de las plantas, incluyendo terpenoides, polifenoles, azúcares, alcaloides y proteínas, juegan un papel importante en la síntesis de NPs actuando de manera conjunta [46-48].



**Figura 8.** Enfoques generales para la síntesis de NPs [32]



En particular, la fuente del extracto vegetal es un factor importante que influye en su morfología y tamaño, debido a que las diferentes concentraciones de los metabolitos en los extractos de las plantas dan lugar a las diferencias en las NPs sintetizadas, además de que dependen de otros factores como la concentración del ion metálico, pH, tiempo y temperatura de reacción [47,48].

La salida de un protón del grupo hidroxilo de los terpenoides da como resultado la formación de estructuras resonantes capaces de una mayor oxidación. Este proceso va acompañado de la reducción activa de iones metálicos, seguida de la formación de NPs [47].

Los flavonoides son un gran grupo de compuestos polifenólicos que pueden quelar y reducir activamente los iones metálicos en NPs al contener varios grupos funcionales capaces de la formación de estas estructuras. Las transformaciones estructurales de los flavonoides igualmente generan protones que reducen los iones metálicos para formar NPs por lo que están involucrados en la nucleación, etapa inicial de su formación y una mayor agregación [47].

Los azúcares presentes en los extractos de plantas también pueden inducir la formación de NPs. Los monosacáridos tales como la glucosa pueden actuar como agentes reductores, el grupo aldehído del azúcar se oxida en un grupo carboxilo a través de la adición de grupos hidroxilo que a su vez conduce a la reducción de iones metálicos y a la síntesis de las NPs [47].

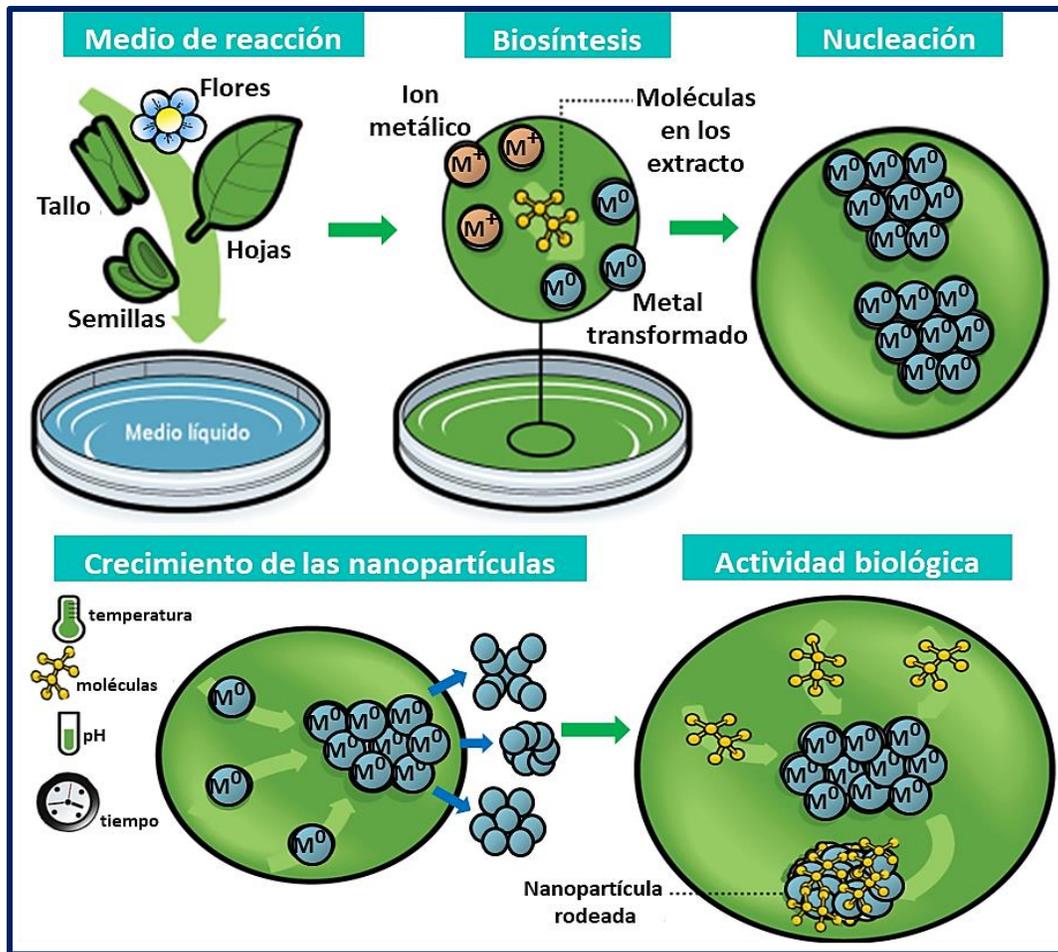
Las proteínas facilitan la formación de NPs a partir de iones metálicos debido a su alta actividad reductora y potencial para atraer iones metálicos a las regiones de



una molécula responsable de la reducción, pero su actividad quelante no es excesiva. Los aminoácidos de una proteína pueden influir en gran medida al tamaño, la morfología y la cantidad de NPs que se generan por lo que desempeñan un papel muy importante en la determinación de su forma y rendimiento [47].

En general, el mecanismo de síntesis incluye las siguientes fases [47] (Figura 9):

- 1.** Fase inicial: obtención del medio de reacción, que es el extracto, generalmente acuoso, de una o varias partes de la planta y adición de los iones metálicos.
- 2.** Fase de activación: en la cual ocurren la reducción de iones metálicos y nucleación.
- 3.** Fase de crecimiento: donde las pequeñas NPs adyacentes se fusionan espontáneamente en partículas de mayor tamaño formando agregados, esta fase se ve influenciada por factores como temperatura, concentración y tipo de metabolitos, pH, tiempo de la reacción, etc.
- 4.** Fase de terminación: donde se determina la forma final de las NPs y los compuestos en el extracto ayudan a estabilizarlas quedándose adheridas a ellas y ayudan a potenciar sus propiedades biológicas.



**Figura 9.** Mecanismo de síntesis de NPs por química verde [47]

### 1.5 Óxido de zinc (ZnO)

El ZnO es químicamente inerte, poco soluble en agua, además de que posee alta resistencia mecánica y baja toxicidad. Es útil como matriz para transportar y estabilizar fármacos, posee propiedades terapéuticas sobre las irritaciones y heridas superficiales por su efecto astringente y antibacterial. Para las lesiones y quemaduras en piel se aplica en polvo y en cremas sobre la parte afectada, quedando una fina capa protectora. En el proceso de cicatrización el Zn forma parte de las metaloproteinasas implicadas en la reparación celular en el sitio de la lesión por



degradación de colágeno y facilitan la migración de queratinocitos. La administración de ZnO tanto oral como tópica a personas con niveles bajos de este compuesto en sangre y tejidos, mejora los procesos de regeneración celular y aceleran la reparación de heridas en la piel [49].

Posee alta absorción óptica a los rayos ultravioleta A (315-400 nm) y regiones del ultravioleta B (280-315 nm) lo que es beneficioso en la respuesta antibacteriana y como protector solar en cosméticos [49].

En cuanto a su actividad antibacteriana, el ZnO en su tamaño nanométrico o ZnO-NPs de entre 25-40 nm han mostrado efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* y *Citrobacter freundii* [50], ZnO-NPs de entre 15-37 nm han inhibido el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Shigella flexneri* [51], ZnO-NPs de aproximadamente 30 nm han mostrado efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* [52], ZnO-NPs de 57 nm han inhibido el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* [53].



## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al interés médico que tienen las ZnO-NPs por sus propiedades antibacterianas, se continúa la búsqueda de procesos eficientes de síntesis con el menor impacto posible al ambiente, siendo la química verde una alternativa a los métodos clásicos de síntesis que permiten solventar estos problemas. De ahí el interés en profundizar en las características que presentan las ZnO-NPs sintetizadas por química verde, así como adquirir un mayor entendimiento de la influencia del tamaño de partícula sobre sus propiedades antibacterianas.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar ZnO-NPs de diferentes tamaños por el método de química verde y evaluar sus propiedades antibacterianas en función del tamaño de partícula.

### 3.1 Objetivos particulares

- ❖ Sintetizar las ZnO-NPs empleando el método de química verde, utilizando el extracto acuoso de la especie vegetal *Dysphania ambrosioides* como medio de síntesis, variando la temperatura a la que se realiza la reacción.
- ❖ Caracterizar las ZnO-NPs sintetizadas a través de difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS), microscopía electrónica de transmisión convencional (TEM) y de alta resolución



(HRTEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y termogravimetría (TG).

- ❖ Evaluar las propiedades antibacterianas de las ZnO-NPs sintetizadas de diferente tamaño de partícula por el método de difusión en disco y determinación de la concentración mínima bactericida.
- ❖ Determinar los modos de unión entre las ZnO-NPs y proteínas bacterianas, como posibles blancos, mediante un estudio de acoplamiento molecular.

#### **4. HIPÓTESIS**

Al variar las condiciones de síntesis por química verde de las ZnO-NPs, se obtendrán NPs de diferentes tamaños de partícula lo que influirá en sus propiedades antibacterianas.



## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 Materiales

Los materiales usados para la síntesis de las ZnO-NPs y su caracterización fueron hojas secas de la especie vegetal *Dysphania ambrosioides* obtenidas comercialmente, nitrato de zinc hexahidratado al 99.0 % ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) comprado de Meyer y rejillas de cobre de 300 mesh cubiertas de carbón. Para las pruebas antibacterianas se usaron agar soya tripticasa (TSA) y caldo soya tripticasa (TSB) comprados de BD Bioxon, sangre de cordero desfibrinada y agua desionizada.

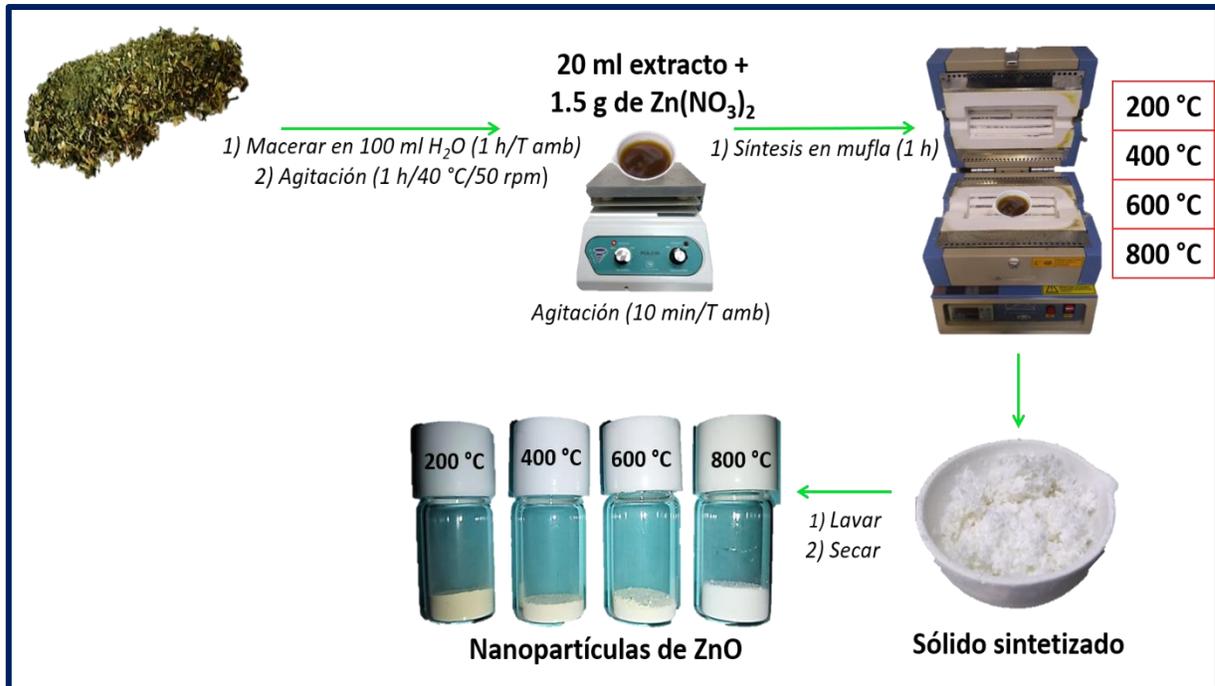
### 5.2 Síntesis por química verde de las ZnO-NPs

Para la síntesis se utilizó la especie vegetal *Dysphania ambrosioides* y se siguió el siguiente procedimiento [54,55] (Figura 10). La planta se lavó con agua y se dejó secar, una vez seca se molió. Se tomaron 10 g del material seco molido y se colocaron en 100 mL de agua desionizada, se dejó macerar por 1 h a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, la mezcla se colocó en agitación por 2 h a 40 °C y 50 rpm. Terminado el proceso, el extracto acuoso se separó del material vegetal por filtración.

La reacción se realizó a cuatro temperaturas: 200, 400, 600 y 800 °C. Para ello, se mezclaron 20 mL de extracto obtenido anteriormente con 1.5 g de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , se dejaron en agitación durante 10 min a temperatura ambiente, después de la agitación, la mezcla se colocó en una mufla durante 1 h a la temperatura a la que se realizó la reacción, después del tiempo, se sacó de la mufla y se dejó enfriar



a temperatura ambiente. El sólido resultante de cada reacción se lavó por triplicado con agua desionizada y se dejó secar por 24 h.



**Figura 10.** Procedimiento para la síntesis por química verde de las ZnO-NPs de diferente tamaño de partícula.

### 5.3 Caracterización

Los sólidos resultantes de las reacciones a diferentes temperaturas fueron caracterizados por XRD, FESEM, EDS, TEM, HRTEM, FTIR y TG para determinar los tamaños de partícula obtenidos, formas resultantes, estructura cristalina, confirmar la síntesis y su estabilidad

La caracterización por XRD se realizó utilizando un difractómetro de rayos X Bruker AXS D8 Advance operado a un voltaje de 40 kV, una corriente de 30 mA con



radiación Cu K $\alpha$  (1.541 Å), entre los ángulos 2 $\theta$  de 4°-110° para analizar la estructura cristalina. Los resultados fueron analizados usando el Powder Diffraction File (PDF) #891397 para el ZnO.

El tamaño promedio de cristal fue calculado con la fórmula de Debye–Scherrer.

$$D=K \lambda/B\cos\theta$$

Dónde: D- tamaño promedio de cristal; K- factor de forma usualmente tomado como 0.9;  $\lambda$ - la longitud de onda de la radiación de los rayos X ( $\lambda = 1.541$  Å) para  $\lambda_{K\alpha}Cu$ ;  $\theta$ - ángulo de difracción de Bragg; B- el ancho de la línea a la mitad de la altura máxima expresado en radianes.

Para el análisis por FESEM, la muestra se montó en un portamuestras de aluminio con cinta de carbono conductora. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo JEOL, modelo JSM7800F con resolución de 0.7 nm, equipado con una microsonda OXFORD para análisis por EDS.

En el estudio por TEM se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM 2010 FEG, con resolución de 0.19 nm, equipado con una microsonda modelo Voyager marca NORAN para análisis por EDS. Las mediciones de la distancia interplanares se registraron en imágenes de HRTEM utilizando la transformada rápida de Fourier (FFT) en el software Digital Micrograph de GATAN.

En el experimento de FTIR se usó un espectrofotómetro FTIR Bruker Tensor 27 en la región de número de onda de 4000-500  $cm^{-1}$ , el análisis se realizó colocando las muestras en pastillas de bromuro de potasio (KBr).



En la caracterización por TG se usó un termoanalizador marca TA Instruments modelo SDT Q600 bajo una atmósfera de aire usando una rampa de temperatura de 10 a 800 °C con un incremento de 10 °C/min.

## 5.4 Evaluación antibacteriana

Para determinar la influencia del tamaño de partícula de las ZnO-NPs sobre sus propiedades antibacterianas, se realizaron las pruebas de difusión en disco y determinación de la concentración mínima bactericida. Se evaluaron varias cepas de interés médico y odontológico, que para fines de estos ensayos se clasificaron en aerobias y anaerobias (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especies bacterianas utilizadas

<b>Tipo</b>	<b>Gram positivas</b>	<b>Gram negativas</b>
Aerobias	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 33780)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 14990)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 43536)
Anaerobias	<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)	<i>Prevotella intermedia</i> (ATCC 25611)
	<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25275)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277)

ATCC: colección americana de cultivos tipo



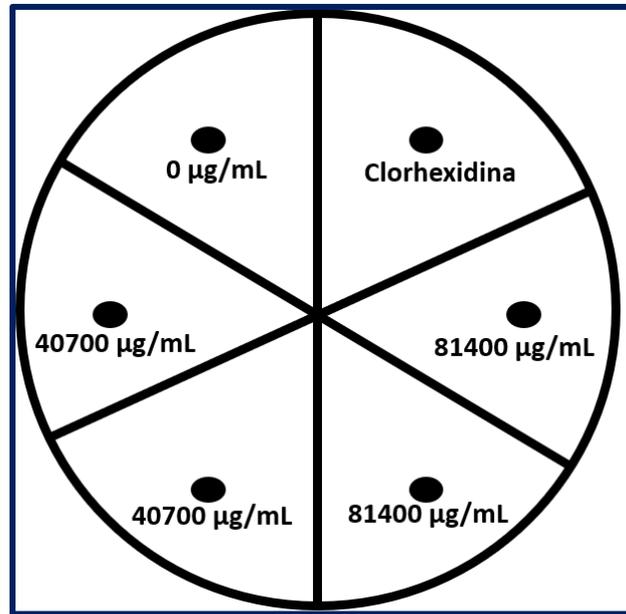
### **5.4.1 Prueba de difusión en disco**

Se utilizó el método de Kirby-Bauer [56,57] para evaluar las ZnO-NPs de diferentes tamaños a las concentraciones de 81400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1 M) y 40700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0.5 M).

En condiciones de esterilidad, se prepararon las suspensiones de las ZnO-NPs a las concentraciones a evaluar usando agua desionizada y se mantuvieron en agitación en todo momento.

Se ajustó cada bacteria a una densidad óptica de 1 y se cultivaron en placas con los medios de cultivo: TSA para las bacterias aerobias y TSA con 5 % de sangre de cordero desfibrinada para las bacterias anaerobias. Se colocaron los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro sobre los medios de cultivo previamente sembrados con las bacterias (Figura 11).

Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de las suspensiones de las ZnO-NPs (agitación constante) y se distribuyeron sobre el disco de papel filtro, por duplicado. Como control positivo se usaron 5  $\mu\text{L}$  de clorhexidina (2100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y como control negativo 5  $\mu\text{L}$  de TSB estéril (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubaron a 35 °C durante 18 a 24 h para las bacterias aerobias y durante 48 a 72 h a la misma temperatura y en condiciones de anaerobiosis para las bacterias anaerobias. Después de los periodos de incubación se midieron los halos de inhibición generados.



**Figura 11.** Distribución de los discos de 6 mm de diámetro.

#### **5.4.2 Concentración mínima bactericida (MBC)**

La determinación de la MBC se realizó por el método de microdilución en caldo de cultivo en placas de 96 pocillos [57].

Se prepararon las suspensiones de las ZnO-NPs haciendo diluciones seriadas, partiendo de la concentración 81400 µg/mL (1 M) hasta la concentración 5088 µg/mL (0.063 M), se colocaron 100 µL de cada suspensión en los pocillos, por duplicado. Como control positivo se utilizaron 100 µL de clorhexidina (2100 µg/mL) y 100 µL de TSB estéril como control negativo (0 µg/mL). Cada pocillo con ZnO-NPs y controles se inoculó asepticamente con 10 µL de suspensión bacteriana a una concentración de  $10^7$  bacterias/mL. Las placas con pocillos se incubaron bajo agitación a 180 rpm durante 24 h a 35 °C para bacterias aerobias y 72 h para bacterias anaerobias a la misma temperatura y bajo condiciones de anaerobiosis.



Después de los tiempos de incubación, se transfirió el contenido de los pocillos a placas con TSA o TSA con 5 % de sangre de cordero desfibrinada según el tipo de bacteria y se incubaron en las mismas condiciones especificadas anteriormente, pasado el tiempo, visualmente se observó a que concentraciones hubo o no crecimiento bacteriano.

La MBC se define como la concentración más baja de ZnO-NPs capaz de eliminar el 99.9 % del inóculo bacteriano después del periodo de incubación (no se observa crecimiento bacteriano).

El análisis estadístico fue mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con prueba post hoc de Tukey, se consideraron diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0.05$ .

## **5.5 Acoplamiento molecular**

La estimación del modo de unión entre las ZnO-NPs y la enzima TagF, encargada de la síntesis de los polímeros de ácidos teicoicos en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* [58], y de la proteína AcrAB-TolC, que es una bomba de expulsión que transporta vectorialmente diversos compuestos con poca similitud química en *Escherichia coli* [59], se realizó mediante un análisis de acoplamiento molecular usando el software AutoDock 4.2. Para el procesamiento de las ZnO-NPs se usaron los softwares Avogadro y MGL Tools 1.5.6, las proteínas seleccionadas fueron trabajadas con los software MGL Tools 1.5.6 y UCSF Chimera 1.15. Las imágenes fueron generadas en el software Pymol en ambos casos.



Las ZnO-NPs fueron generadas en el software de Avogadro asignando un tamaño de  $5 \times 5 \times 5 \text{ \AA}$ , se agregaron cargas de Marsilli-Gasteiger a las ZnO-NPs en el software MGL Tools 1.5.6. Las estructuras cristalizadas de las proteínas utilizadas fueron tomadas de la base de datos de proteínas (PDB); polimerasa TagF (PDB ID: 3L7I) y de la bomba AcrAB-TolC (PDB ID: 5NG5).

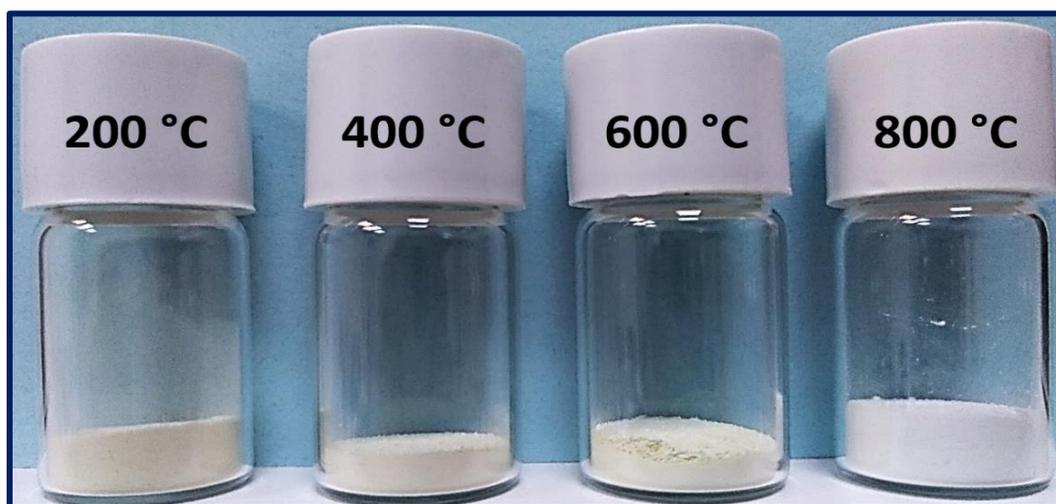
Para el análisis con la polimerasa TagF se seleccionó la cadena A, los residuos de disolventes fueron removidos en el software UCSF Chimera 1.15, hidrógenos polares y cargas de Kollman fueron agregados en MGL Tools 1.5.6, el tamaño de cuadrícula fue de  $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$  con un espacio de  $0.375 \text{ \AA}$  y centro en x: -146.318, y: 85.698 y z: 13.278 cubriendo todos los aminoácidos del sitio catalítico de la enzima, se asignaron los parámetros predeterminado de AutoDock 4.2 y se seleccionaron los algoritmos genéticos Lamarckianos. Para el ensayo con la bomba AcrAB-TolC se consideraron las cadenas A, B, D, E, G y H de la proteína, los residuos de disolventes fueron igualmente removidos en el software UCSF Chimera 1.15, se agregaron hidrógenos polares y cargas de Kollman en MGL Tools 1.5.6, el tamaño de cuadrícula fue de  $120 \times 104 \times 88 \text{ \AA}$  con un espacio de  $0.375 \text{ \AA}$  y centro en x: 200.504, y: 200.518 y z: 198.92, se asignaron los parámetros predeterminados de AutoDock 4.2 y se seleccionaron los algoritmos genéticos Lamarckianos.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Síntesis por química verde de las ZnO-NPs

Los sólidos obtenidos a las diferentes temperaturas de síntesis, a 200 °C (ZnO-NPs 200 °C), 400 °C (ZnO-NPs 400 °C), 600 °C (ZnO-NPs 600 °C) y 800 °C (ZnO-NPs 800 °C), fueron de color blanco de diferentes tonalidades (Figura 12).



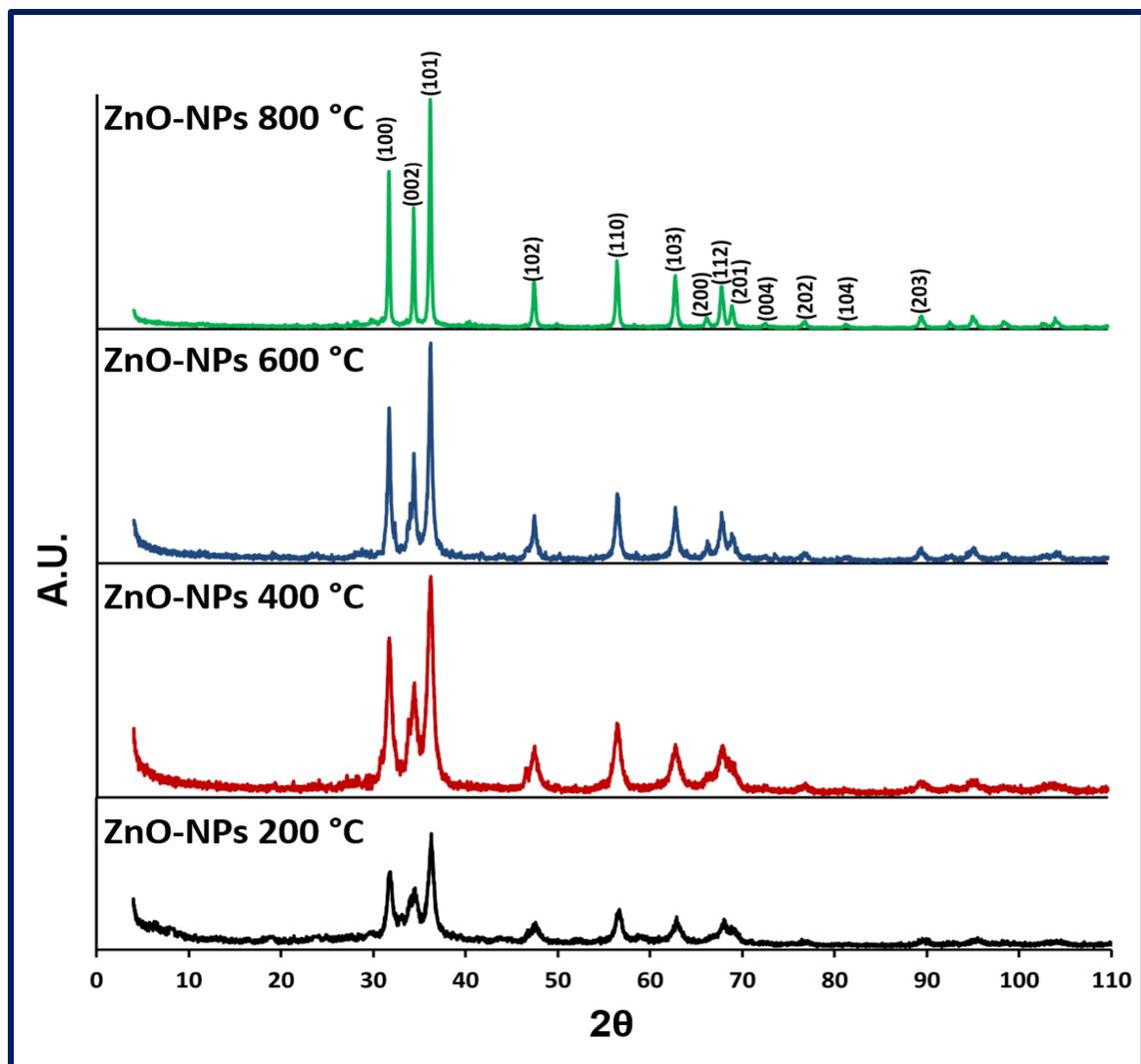
**Figura 12.** Sólidos obtenidos de las distintas síntesis.

### 6.2 Difracción de rayos X (XRD)

La caracterización por XRD de los distintos sólidos (Figura 13) mostró las reflexiones de Bragg indicadas para el ZnO en la tabla del PDF #891397, los valores  $2\theta$  fueron de 31.74°, 34.38°, 36.21°, 47.49°, 56.54°, 62.78°, 66.30°, 67.87°, 69.00°, 72.47°, 76.87°, 81.28°, y 89.50°, que corresponden a las reflexiones del ZnO con índices (1 0 0), (0 0 2), (1 0 1), (1 0 2), (1 1 0), (1 0 3), (2 0 0), (1 1 2), (2 0 1), (0 0 4), (2 0 2), (1 0



4) y (2 0 3) respectivamente en todas las síntesis realizadas, está tabla también indica que la estructura cristalina del ZnO es hexagonal.



**Figura 13.** Patrones de XRD de las distintas ZnO-NPs, se observan los planos cristalinos correspondientes al ZnO en todas las síntesis.



El tamaño promedio de cristal determinado por la ecuación de Debye-Scherrer (Tabla 2) permitió observar que el tamaño promedio del cristal aumentó conforme la temperatura de síntesis se incrementó.

**Tabla 2.** Tamaños promedio de cristal ( $\pm$  desviación estándar) calculados con la ecuación de Debye-Scherrer

ZnO-NPs	Tamaño promedio de cristal (nm)
ZnO-NPs 200 °C	6.74 ( $\pm$ 3.17)
ZnO-NPs 400 °C	10.10 ( $\pm$ 2.68)
ZnO-NPs 600 °C	16.37 ( $\pm$ 3.53)
ZnO-NPs 800 °C	29.53 ( $\pm$ 5.90)

### 6.3 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM)

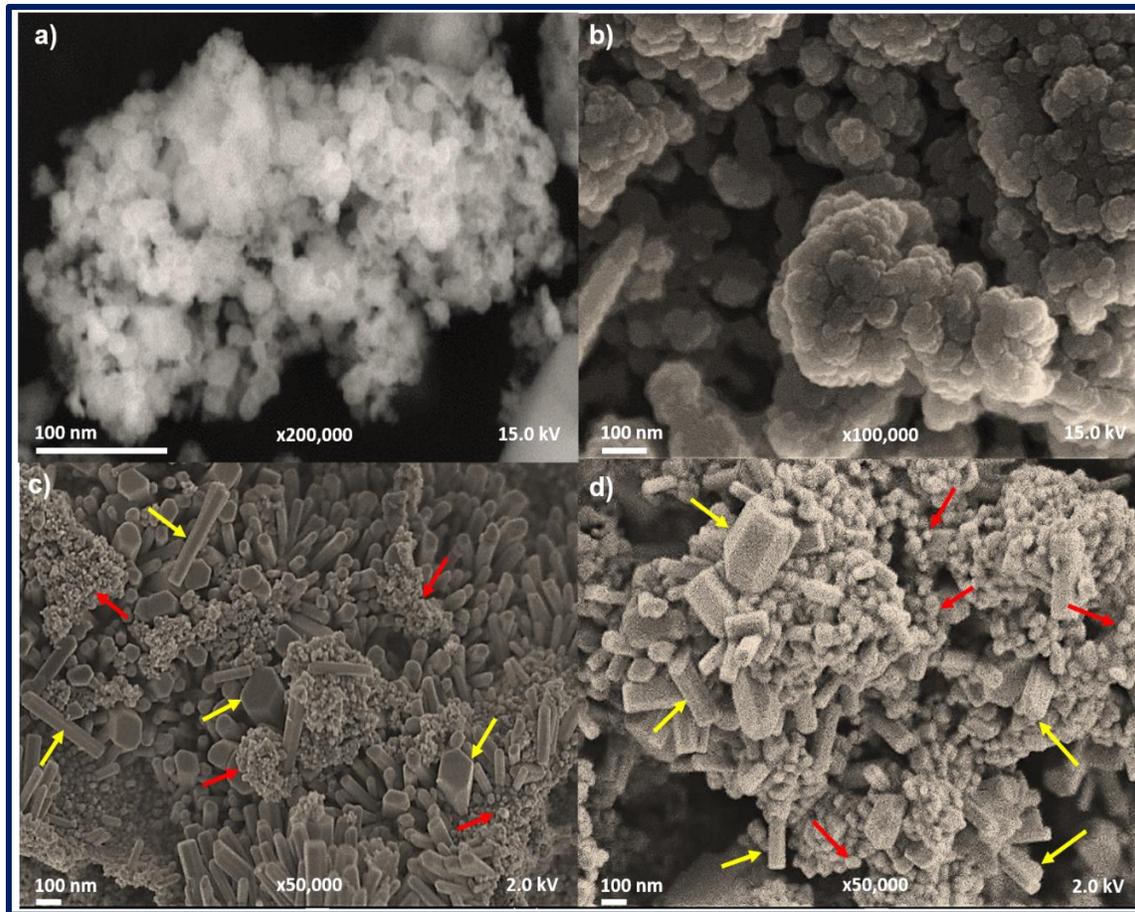
Por FESEM se observó que las ZnO-NPs 200 °C fueron de forma cuasiesférica (Figura 14a), el intervalo del tamaño de partícula fue de 4 a 10 nm con promedio de 7 nm.



Las ZnO-NPs 400 °C (Figura 14b) fueron de forma cuasiesférica, el tamaño de partícula fue de 4 a 24 nm con promedio de 14 nm.

Las ZnO-NPs 600 °C (Figura 14c) presentaron dos formas, cuasiesféricas y prismas hexagonales, el intervalo del tamaño de las partículas cuasiesféricas fue de 12 a 45 nm con promedio de 22 nm y los prismas hexagonales fueron de 20 a 100 nm con promedio de 70 nm.

En las ZnO-NPs 800 °C (Figura 14d) resultaron dos formas, igual que en las ZnO-NPs 600 °C, formas cuasiesféricas y prismas hexagonales, el intervalo del tamaño de las partículas cuasiesféricas fue de 50 a 200 nm con promedio de 130 nm, los prismas hexagonales fueron de intervalo de 30 a 140 nm con promedio de 90 nm.



**Figura 14.** Imágenes por FESEM de las distintas ZnO-NPs sintetizadas. **a)** Las formas cuasiesféricas de las ZnO-NP 200 °C. **b)** Las formas cuasiesféricas de las ZnO-NPs 400 °C. **c)** Las formas cuasiesféricas (flechas rojas) y prismas hexagonales (flechas amarillas) de las ZnO-NPs 600 °C. **d)** Las formas de los prismas hexagonales (flechas amarillas) y cuasiesféricas (flechas rojas) de las ZnO-NPs 800 °C.



## 6.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Por TEM (Figuras 15 y 16) se analizó la cristalinidad de las NPs y se determinó que los planos cristalinos y distancias interplanares en todas las ZnO-NPs correspondían al ZnO usando como referencia la tabla del PDF #891397.

En las ZnO-NPs 200 °C (Figura 15a) se observaron las formas cuasiesféricas y algunas irregulares, en el análisis de la imagen por HRTEM de estas NPs (Figura 15b), la FFT confirmó la presencia de los planos cristalinos correspondientes al ZnO además de las distancias entre estos planos.

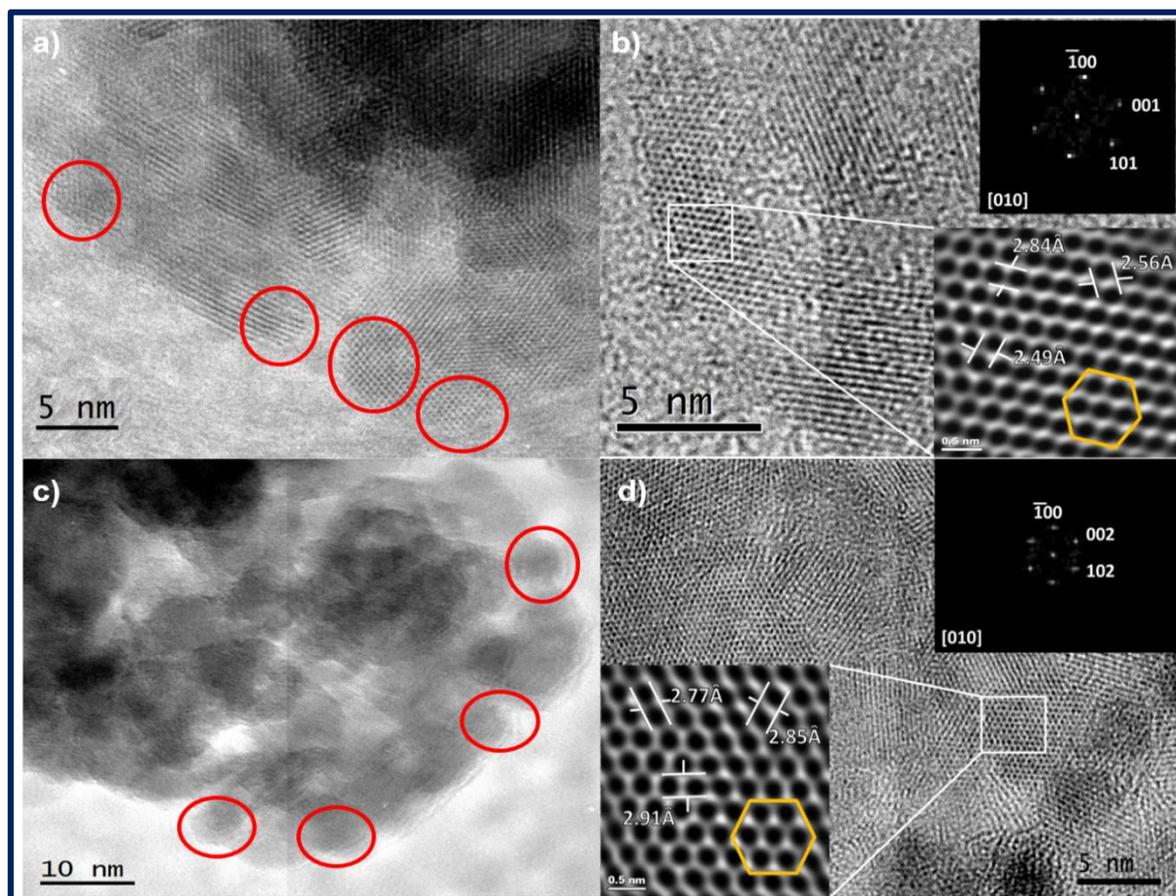
En las ZnO-NPs 400 °C (Figura 15c) se observaron también las formas cuasiesféricas de estas NPs, que son de tamaño mayor, se confirmó la presencia de los planos cristalinos y la distancias interplanares correspondientes al ZnO en el análisis de la imagen por HRTEM (Figura 15d).

Las ZnO-NPs 600 °C presentaron dos formas; cuasiesféricas y formas alargadas correspondientes a los prismas hexagonales (Figura 16a), en el análisis que se hizo por FFT de ambas formas obtenidas (Figuras 16b y 16e) se determinó la presencia de planos cristalinos y sus distancias interplanares correspondientes al ZnO.

Se realizó el mismo tratamiento con las ZnO-NPs 800 °C y se observaron las formas cuasiesféricas, así como los prismas hexagonales (Figura 16c), el análisis por FFT (Figuras 16d y 16f) de ambas formas obtenidas a esta temperatura, confirmó la presencia del ZnO al determinarse los planos cristalinos y distancias interplanares correspondientes a este compuesto.



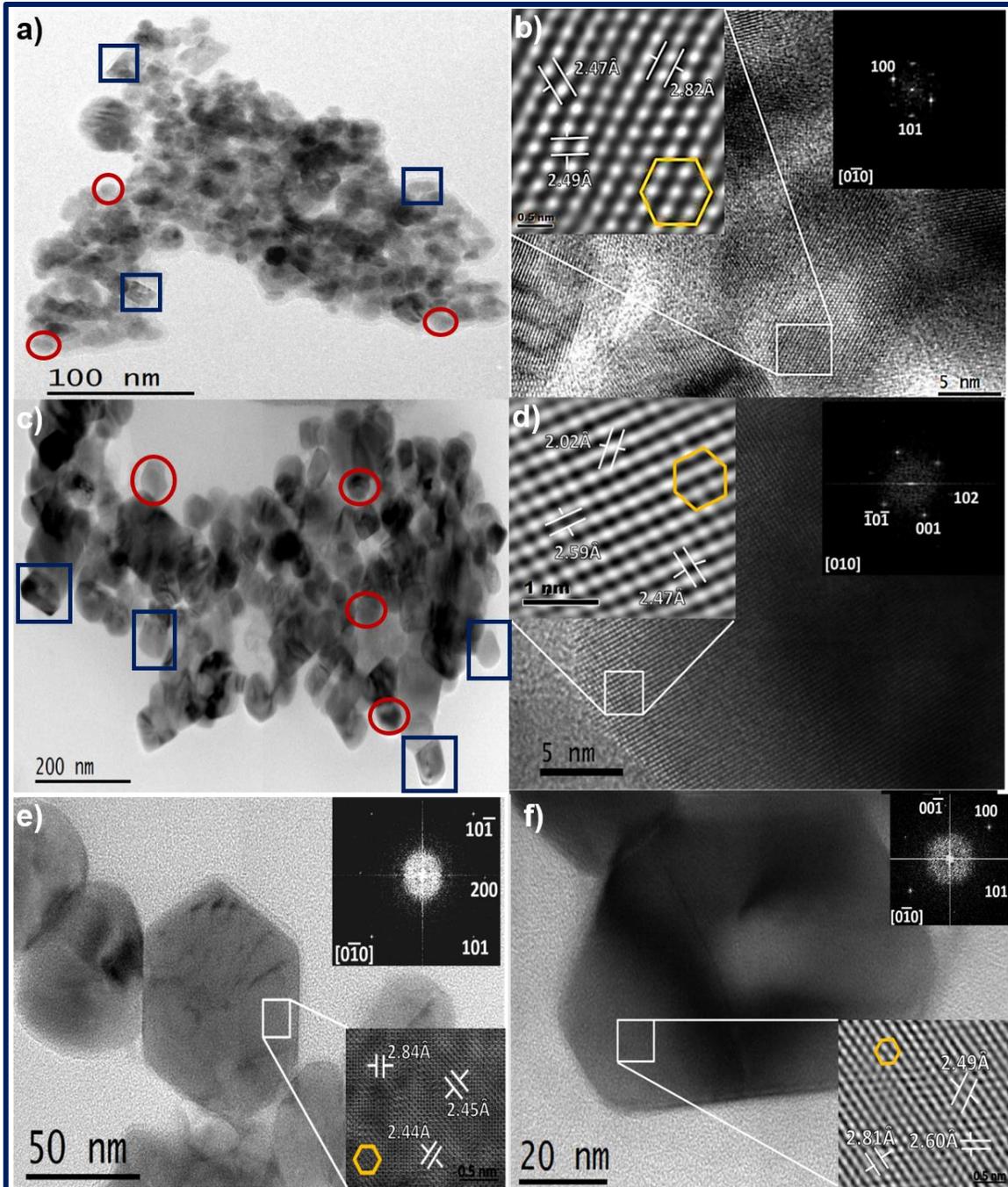
Estos análisis apoyaron a la confirmación de la síntesis del ZnO y se pudo apreciar la estructura cristalina hexagonal de este compuesto lo cual confirmó el análisis realizado por XRD.



**Figura 15.** Imágenes obtenidas por TEM de las ZnO-NPs sintetizadas a 200 y 400 °C. **a)** Se observan las formas cuasiesféricas de las ZnO-NPs 200 °C, encerradas en círculos rojo se enmarcan algunas de ellas. **b)** Análisis de las ZnO-NPs 200 °C por HRTEM con resolución atómica en dirección [010], se inserta el correspondiente análisis de la FFT con las distancias interplanares calculadas. **c)** Se presentan encerradas en círculos rojos algunas de las ZnO-NPs 400 °C de forma cuasiesférica.



d) El análisis de las ZnO-NPs 400 °C por HRTEM en dirección [010], se inserta el correspondiente análisis de la FFT con las distancias interplanares calculadas.



**Figura 16.** Imágenes obtenidas por TEM de las ZnO-NPs sintetizadas a 600 y 800 °C. **a)** Se observan las formas cuasiesféricas (círculos rojos) y los prismas



hexagonales (cuadrados azules) de las ZnO-NPs 600 °C. **b)** El análisis de las ZnO-NPs 600 °C cuasiesféricas con resolución atómica en dirección [010], se inserta el correspondiente análisis por FFT con las distancias interplanares correspondientes. **c)** La imagen muestra las ZnO-NPs 800 °C de forma cuasiesférica (círculos rojos) y prismas hexagonales (cuadrados azules). **d)** Nanopartícula con resolución atómica en dirección [010] con su respectivo análisis por FFT de las ZnO-NPs 800 °C de forma cuasiesférica, se insertan las distancias interplanares calculadas. **e)** El análisis de las ZnO-NPs 600 °C con forma de prisma hexagonal en dirección [010], se inserta el correspondiente análisis de la FFT con las distancias interplanares calculadas. **f)** El análisis de las ZnO-NPs 800 °C con forma de prisma hexagonal en dirección [010], se inserta su análisis por FFT con las correspondientes distancias interplanares calculadas.

## 6.5 Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS)

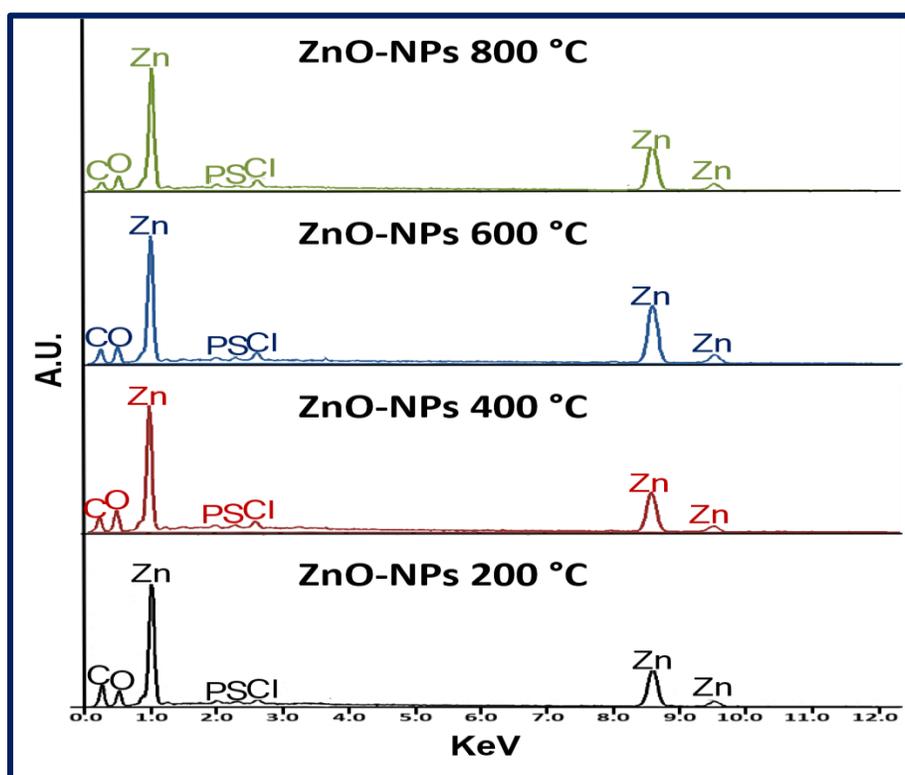
El análisis por EDS de las ZnO-NPs mostró que los porcentajes atómicos del Zn y O en todos los casos fueron cercanos al 50 % (Tabla 3), lo que permitió establecer una proporción 1:1 de ambos elementos y apoyó la confirmación de la síntesis de ZnO a las distintas temperaturas.

Se observaron otros elementos (Figura 17) como lo son el C (0.09 %), P (0.04 %), S (0.02 %) y Cl (0.02 %) que seguramente provinieron de la especie vegetal utilizada, pero sus porcentajes atómicos no modificaron la proporción 1:1 del Zn y O.



**Tabla 3.** Porcentajes atómicos (% at) del Zn y O

ZnO-NPs	Zn (% at)	O (% at)
ZnO-NPs 200 °C	49.58	50.42
ZnO-NPs 400 °C	50.76	49.24
ZnO-NPs 600 °C	52.68	47.32
ZnO-NPs 800 °C	53.40	46.60

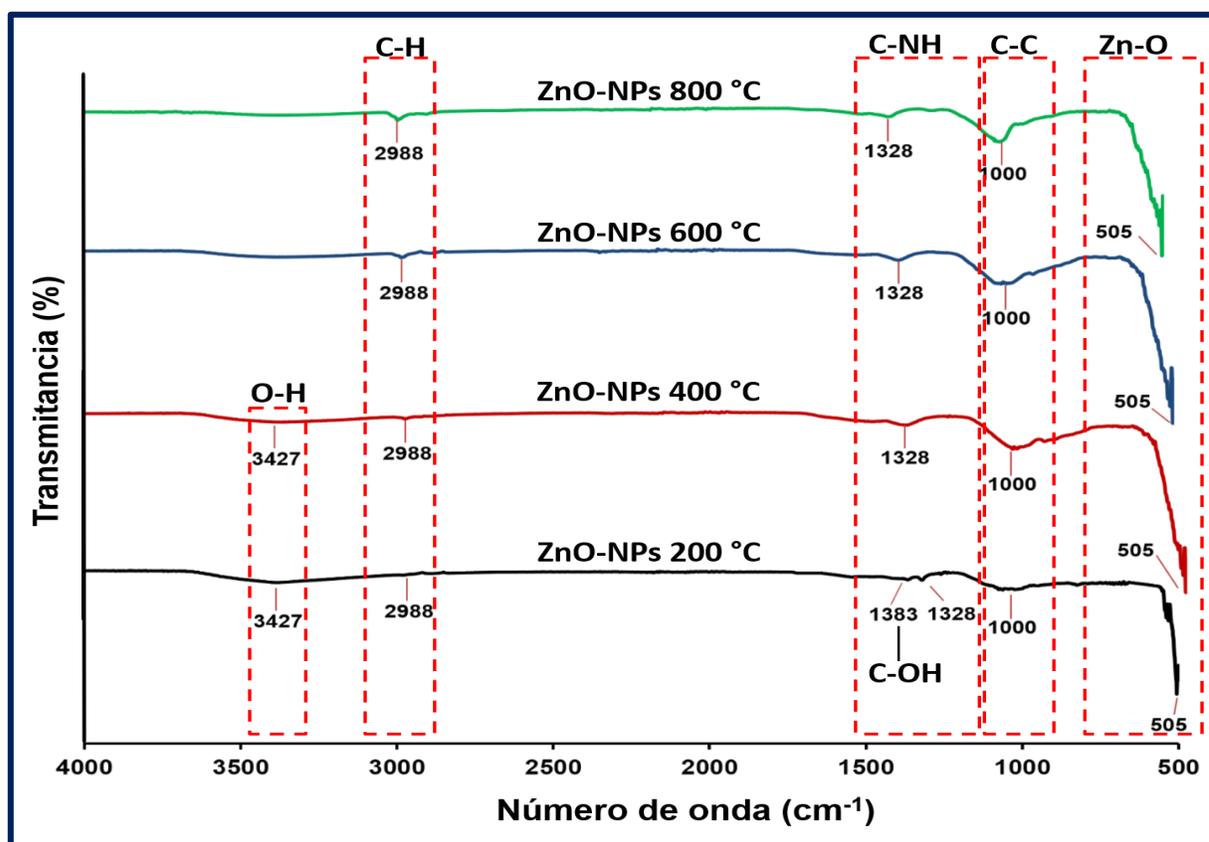


**Figura 17.** Resultados por EDS de las ZnO-NPs sintetizadas a diferentes temperaturas donde se observan las señales del Zn, O y de otros elementos.



## 6.6 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las ZnO-NPs sintetizadas a las distintas temperaturas mostraron (Figura 18) la señal a  $505\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a las vibraciones del estiramiento del enlace Zn-O en todos los casos. Las otras señales pertenecen a los grupos funcionales de los compuestos orgánicos provenientes del extracto vegetal; la señal a  $1000\text{ cm}^{-1}$  es debida a las vibraciones del estiramiento C-C, a  $1383$  y  $1328\text{ cm}^{-1}$  se le atribuye al enlace C-OH y C-NH respectivamente, a  $2988\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace C-H y la señal a  $3427\text{ cm}^{-1}$ , que aparece sólo en las ZnO-NPs  $200\text{ °C}$  y ZnO-NPs  $400\text{ °C}$ , se le asigna al estiramiento del enlace O-H [60-64].



**Figura 18.** Espectros de FTIR de las ZnO-NPs sintetizadas, se indican las vibraciones obtenidas en cada espectro.



## 6.7 Termogravimetría (TG)

Por TG se analizó el comportamiento de las ZnO-NPs sintetizadas al incremento de temperatura para evaluar su estabilidad a esta condición (Figura 19).

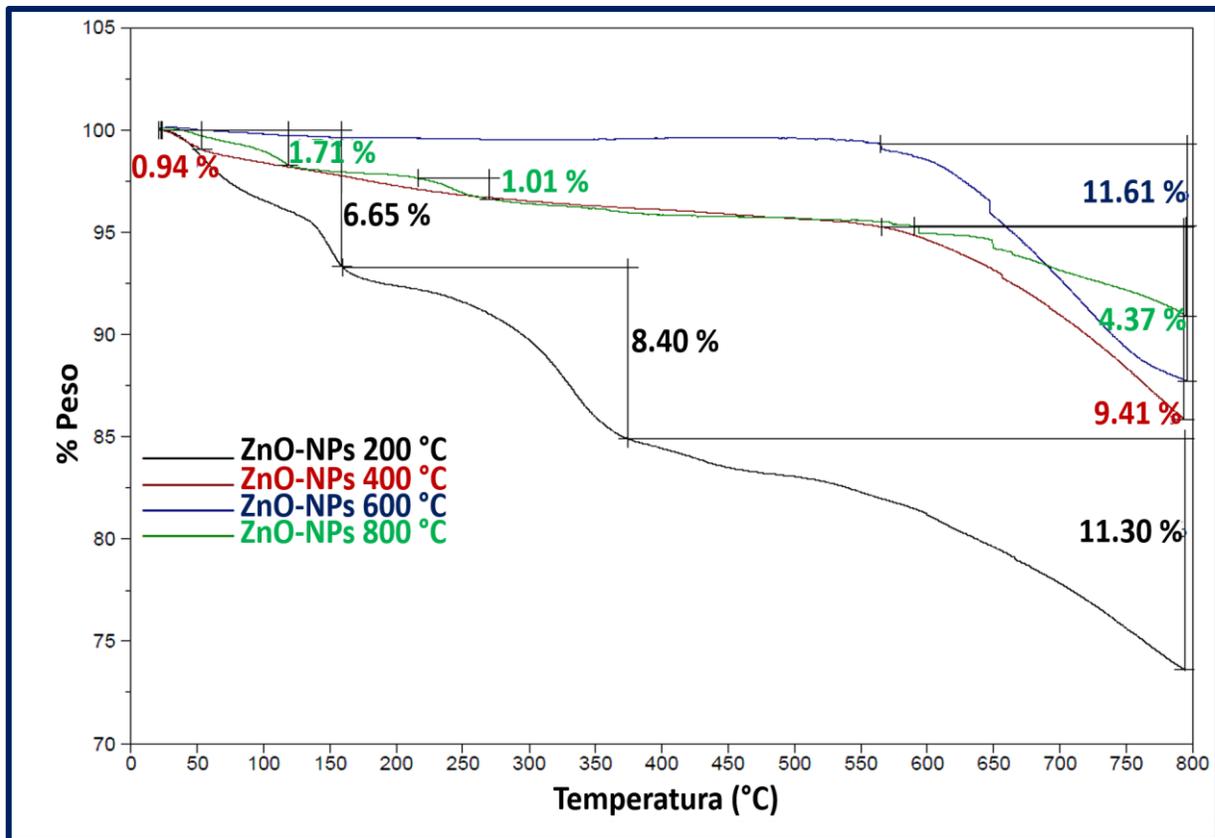
En las ZnO-NPs 200 °C se observaron 3 pérdidas de peso, una del 6.65 % a 100 °C, la otra de 8.40 % a partir de los 150 °C y finalmente una pérdida del 11.30 % alrededor de los 400 °C, después del proceso se perdió el 25 % del peso inicial de estas NPs.

Las ZnO-NPs 400 °C fueron más estables que las de 200 °C, se observó una pérdida del 0.94 % a los 100 °C después se mantuvieron estables hasta los 550 °C donde hubo una pérdida del 9.41 % de su peso, al final del proceso se perdió poco más del 10 % del peso inicial.

Las ZnO-NPs 600 °C fueron las más estables, no hubo pérdida de peso hasta aproximadamente los 550 °C donde se perdió el 11.61 %.

Las ZnO-NPs 800 °C tuvieron un comportamiento similar a las ZnO-NPs 400 °C, a los 100 °C hubo una pérdida del 1.71 % de su peso inicial, aproximadamente a los 250 °C hubo otra del 1.01 % y una del 9.41 % a los 550 °C, al final del tratamiento hubo una pérdida total aproximadamente del 12 %.

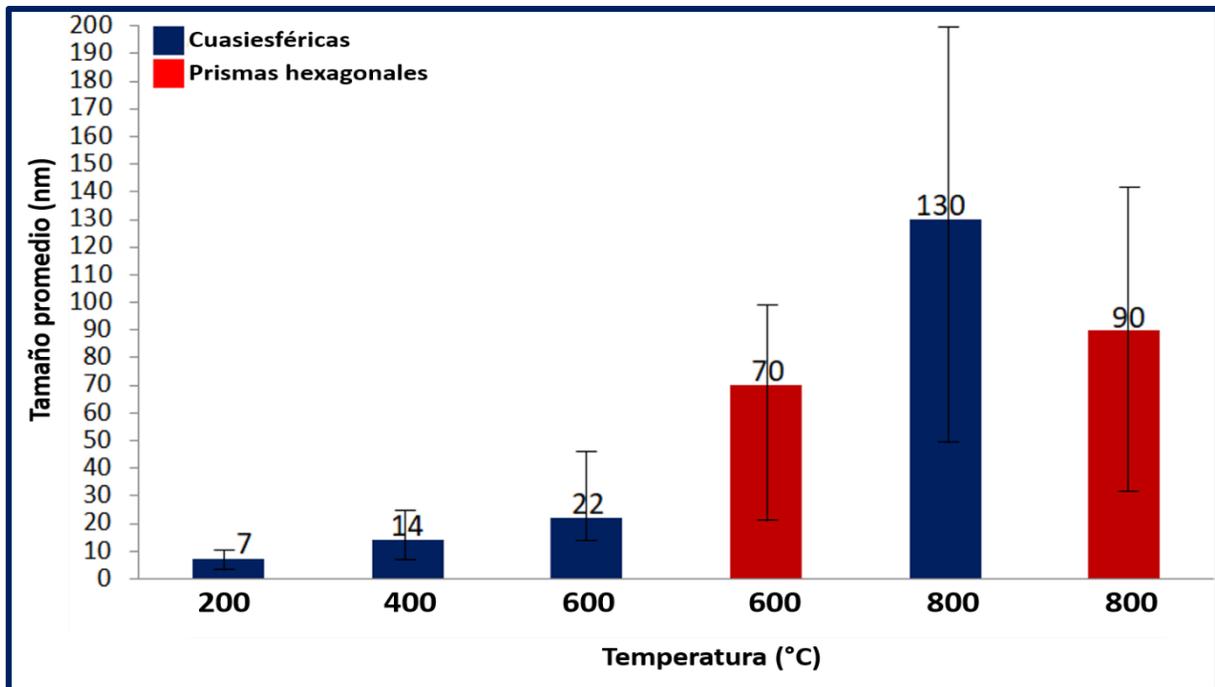
En la sección de discusión se explica y analiza a que se deben cada una de las pérdidas de peso presentadas por las ZnO-NPs.



**Figura 19.** Termogramas de las ZnO-NPs sintetizadas a diferentes temperaturas.

## 6.8 Resumen de los tamaños obtenidos de las ZnO-NPs

Al comprobarse la síntesis de las ZnO-NPs y al determinar los tamaños obtenidos, se observó el comportamiento que, al incrementar la temperatura de síntesis, el tamaño de las NPs fue mayor, además de que a partir de los 600 °C apareció una nueva forma, los prismas hexagonales conservando la tendencia de a mayor temperatura, mayor tamaño (Figura 20).



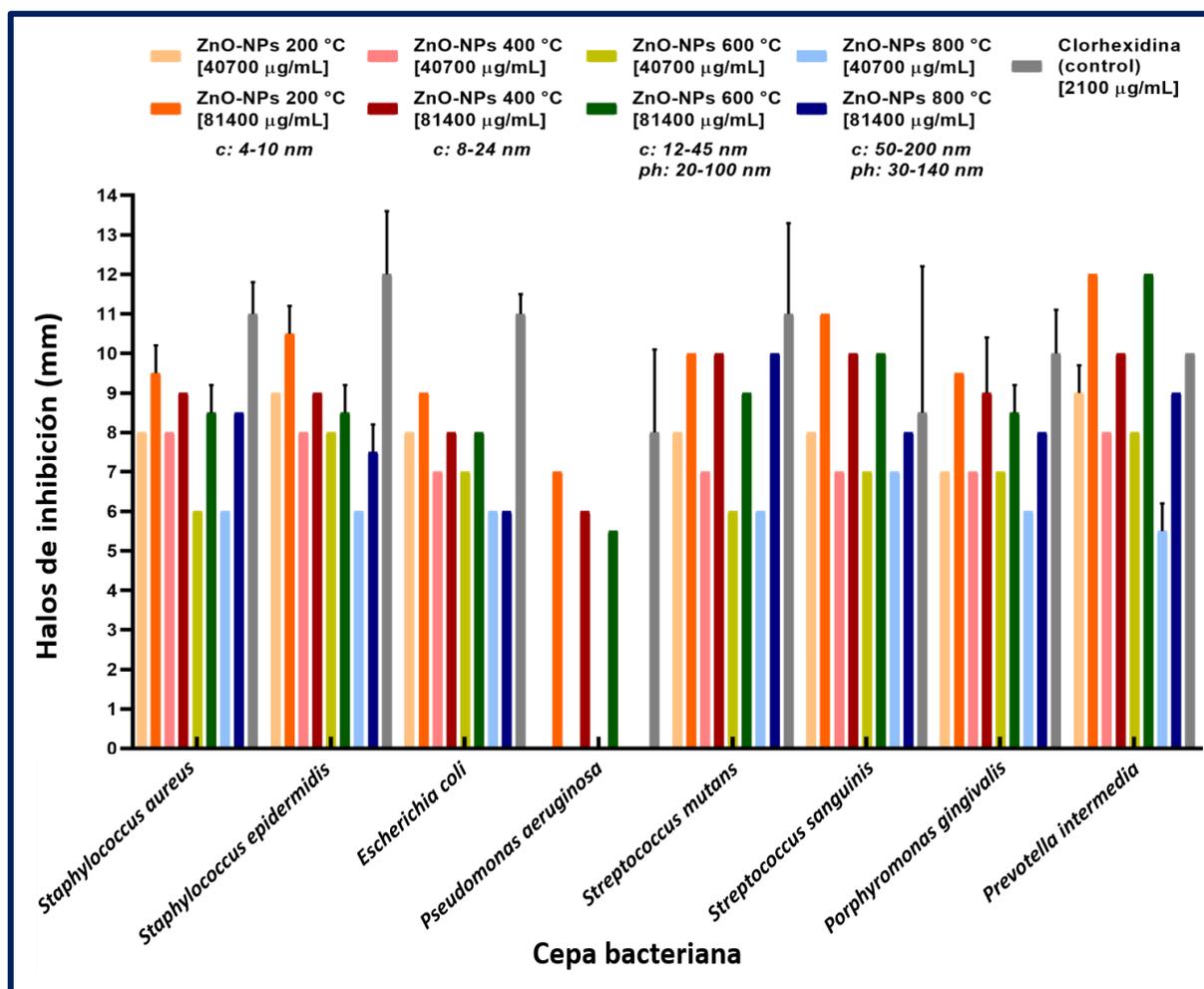
**Figura 20.** Tamaño promedio de las ZnO-NPs a las distintas temperaturas de síntesis.

## 6.9 Prueba de difusión en disco

Mediante esta prueba se evaluaron las ZnO-NPs de diferente tamaño a dos concentraciones, 40700 y 81400  $\mu\text{g/mL}$ , este ensayo mostró que hubo inhibición de todas de las cepas bacterianas evaluadas tanto Gram positivas como Gram negativas (Figura 21 y Tabla 4), se observó que el diámetro del halo generado fue de mayor diámetro conforme el tamaño de las NPs disminuía, al igual que a mayor concentración, mayor inhibición. La bacteria más resistente fue *Pseudomonas aeruginosa*, se logró su inhibición solo a la concentración más alta y con las ZnO-NPs de menor tamaño, las cepas *Streptococcus sanguinis* y *Prevotella intermedia*



fueron las más sensibles al obtenerse los halos de inhibición de mayor diámetro con ambas concentraciones y con todas las ZnO-NPs inclusive mayores a los obtenidos con la clorhexidina. Los halos de inhibición generados por las ZnO-NPs fueron en la mayoría de los casos de menor diámetro que los producidos por el control clorhexidina.

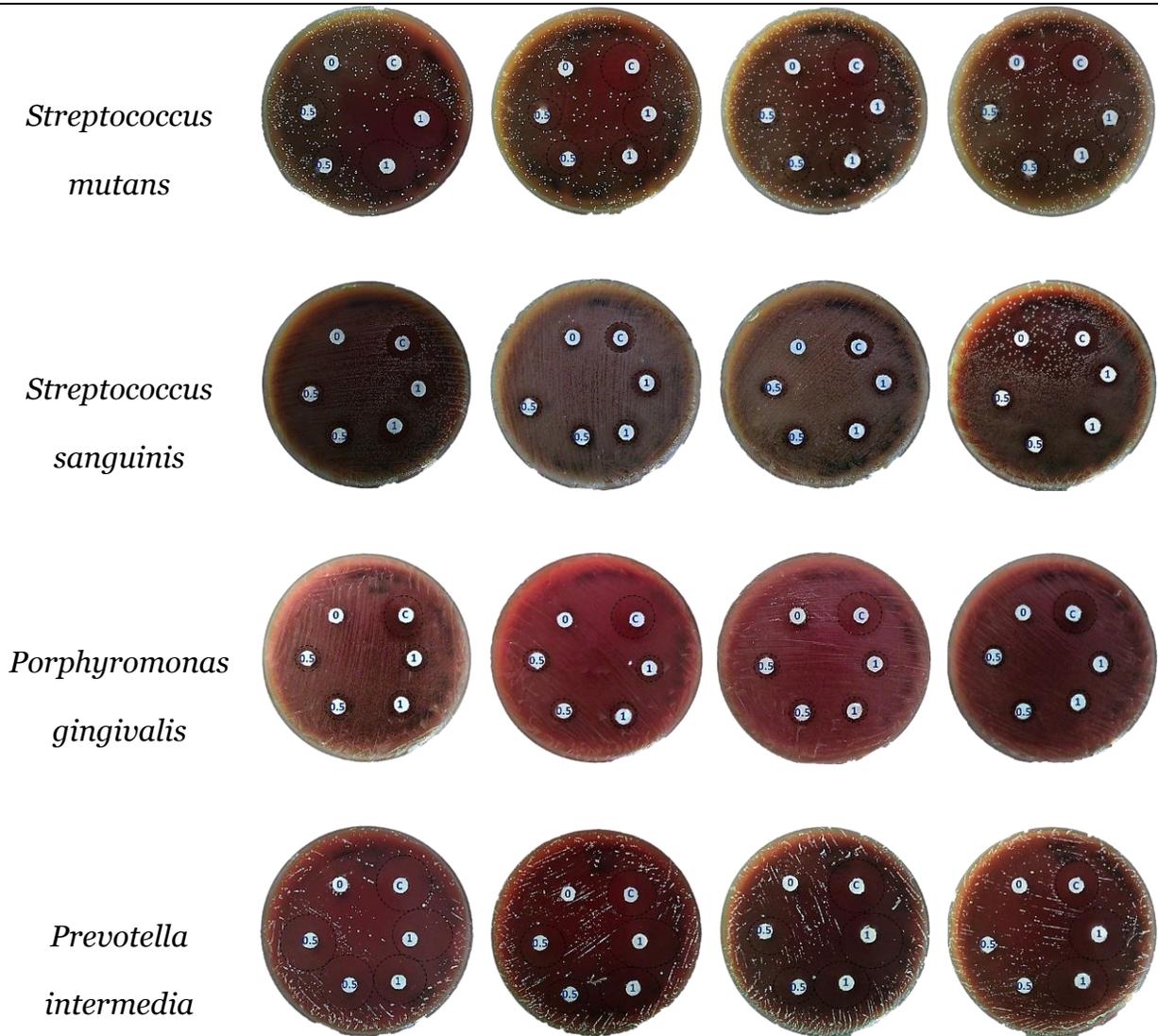


**Figura 21.** Resultados de las medidas promedio y desviación estándar de los halos de inhibición generados por las ZnO-NPs en las especies bacterianas utilizadas. Se incluyen los 6 mm de diámetro del disco. c (cuasiesféricas), ph (prismas hexagonales).



**Tabla 4.** Imágenes de las pruebas de difusión en disco evaluando las distintas ZnO-NPs sobre las especies bacterianas utilizadas

Cepa bacteriana	ZnO-NPs 200 °C*	ZnO-NPs 400 °C**	ZnO-NPs 600 °C***,◇	ZnO-NPs 800 °C****,◇◇
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				



C (clorhexidina), 0 (0  $\mu\text{g/mL}$ ), 1 (81400  $\mu\text{g/mL}$ ) y 0.5 (40700  $\mu\text{g/mL}$ ).

Cuasiesféricas: 4-10 nm (●); cuasiesféricas: 8-24 nm (●●); cuasiesféricas: 12-45 nm (●●●); cuasiesféricas: 50-200 nm (●●●●); prismas hexagonales: 20-100 nm (◇); prismas hexagonales: 30-140 nm (◇◇).



## 6.10 Concentración mínima bactericida

Con esta prueba se demostró que el tamaño de partícula si influyó en el valor de la MBC (Tabla 5 y Figura 22), a menor tamaño, la MBC fue más baja, esto se observó en las cepas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

*Staphylococcus epidermidis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* fueron las más sensible a las ZnO-NPs, no hubo influencia en el tamaño de partícula, todas la ZnO-NPs eliminaron estas cepas a la concentración más baja evaluada.

*Streptococcus sanguinis* también fue sensible a las ZnO-NPs, no se observó influencia del tamaño de partícula con las ZnO-NPs de menor tamaño, con las de mayor tamaño (50-200 nm) se observó un incremento en la MBC.

Con *Streptococcus mutans* también se observó influencia del tamaño de partícula, con las ZnO-NPs más pequeñas (4-10 nm y 8-24 nm) se obtuvo la MBC a la concentración más baja evaluada, con las ZnO-NPs de mayor tamaño se incrementó la MBC.

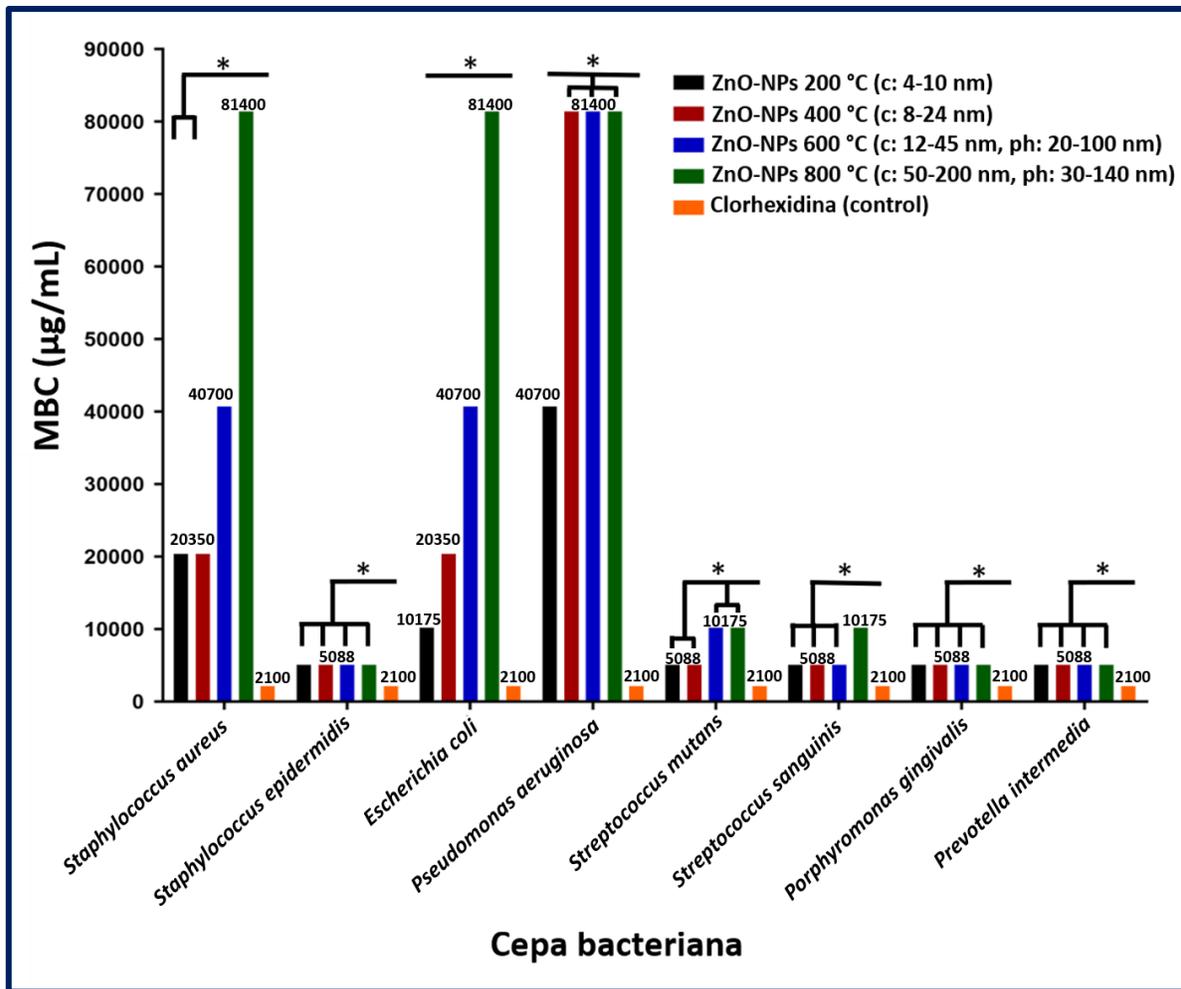
*Pseudomonas aeruginosa* fue la más resistente a las ZnO-NPs, la MBC fue la más alta, sólo las ZnO-NPs de menor tamaño (4-10 nm) lograron eliminarla a una menor MBC.

En todos los casos, la MBC obtenida con las ZnO-NPs fue mayor que la de la clorhexidina usada como control. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en la prueba de difusión en disco.



**Tabla 5.** Concentraciones mínimas bactericidas en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de las distintas ZnO-NPs sobre las especies bacterianas utilizadas

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>ZnO-NPs 200 °C</b>	<b>ZnO-NPs 400 °C</b>	<b>ZnO-NPs 600 °C</b>	<b>ZnO-NPs 800 °C</b>	<b>Clorhexidina (control)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	20350	20350	40700	81400	2100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5080	5080	5080	5080	2100
<i>Escherichia coli</i>	10175	20350	40700	81400	2100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40700	81400	81400	81400	2100
<i>Streptococcus mutans</i>	5080	5080	10175	10175	2100
<i>Streptococcus sanguinis</i>	5080	5080	5080	10175	2100
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5080	5080	5080	5080	2100
<i>Prevotella intermedia</i>	5080	5080	5080	5080	2100



**Figura 22.** Gráfica que representa las diferencias entre las concentraciones mínimas bactericidas en µg/mL de las ZnO-NPs de diferentes tamaños de partícula sobre las cepas bacterianas evaluadas. c (cuasiesféricas), ph (prismas hexagonales). Significancia  $P \leq 0.001$  (\*).



## 6.11 Acoplamiento molecular

De acuerdo a los resultados de las pruebas antibacterianas, las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* fueron sensibles a las ZnO-NPs, por lo que se realizó el análisis de acoplamiento molecular para observar el posible modo de unión de las ZnO-NPs a la polimerasa TagF de *Staphylococcus epidermidis* y la bomba AcrAB–TolC de *Escherichia coli*, consideradas posibles dianas antibacterianas.

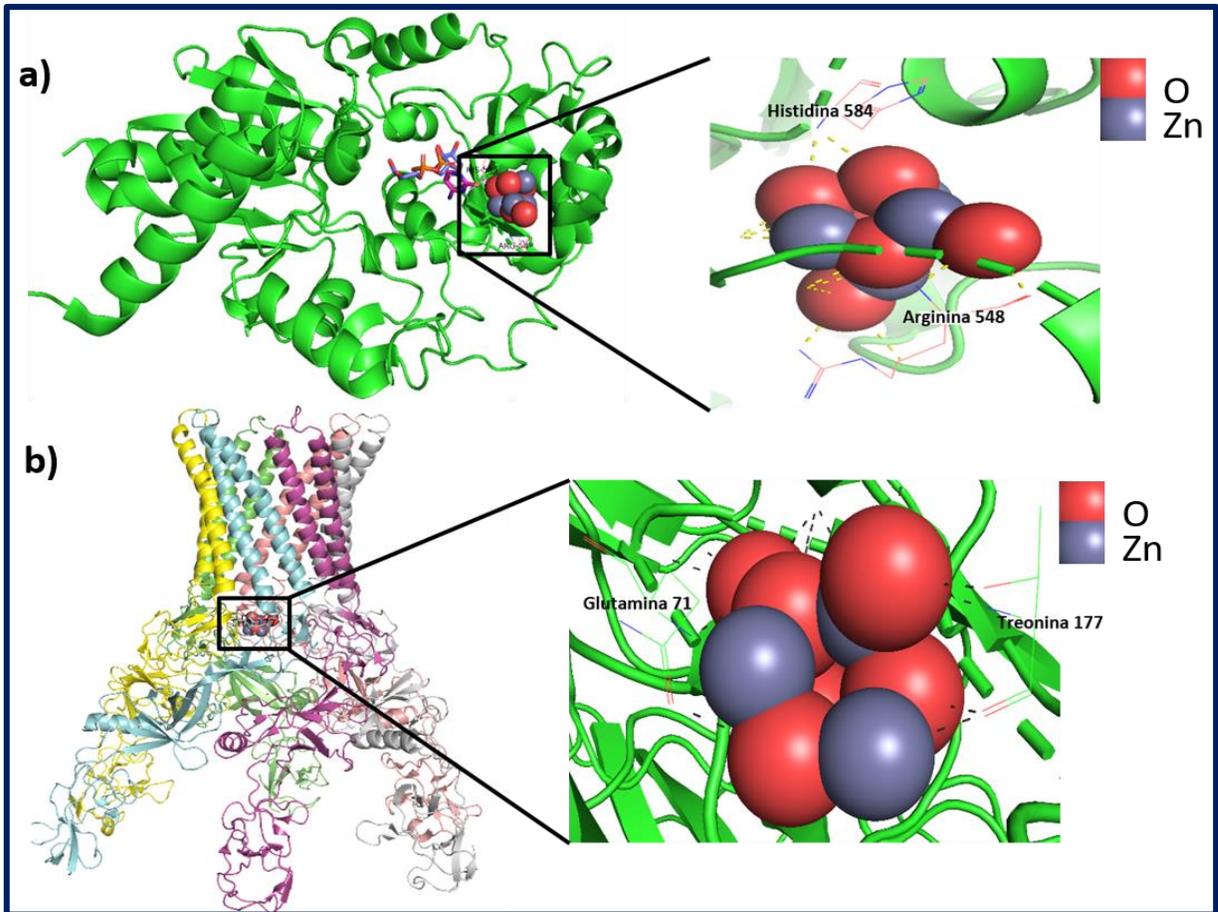
Con la polimerasa TagF se obtuvo el valor de energía libre de unión de -7.54 Kcal/mol, una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 2.99  $\mu\text{M}$  además de que las ZnO-NPs formaron puentes de hidrógeno con los aminoácidos arginina 548 e histidina 584 (Tabla 6 y Figura 23a) siendo este último aminoácido parte del dominio catalítico de esta enzima [58].

Con la bomba AcrAB–TolC la energía libre de unión fue de -7.36 Kcal/mol, la  $K_i$  fue de 4.02  $\mu\text{M}$  y las NPs formaron puentes de hidrógeno con los aminoácidos glutamina 71 y treonina 177 de la porción AcrA, encargada de interactuar con el espacio periplásmico de esta bacteria [59] (Tabla 6 y Figura 23b).



**Tabla 6.** Resultados del acoplamiento molecular de las ZnO-NPs con las proteínas TagF de *Staphylococcus epidermidis* y AcrAB–TolC de *Escherichia coli*

<b>Proteína</b>	<b>Energía libre de unión (Kcal/mol)</b>	<b>Constante de inhibición (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Puentes de hidrógeno</b>
TagF	-7.54	2.99	arginina 548 e histidina 584
AcrAB–TolC	-7.36	4.02	glutamina 71 y treonina 177



**Figura 23.** Modos de unión de las ZnO-NPs con proteínas bacterianas. **a)** Simulación de los modos de unión de las ZnO-NPs a la proteína TagF de *Staphylococcus epidermidis*, el acercamiento muestra los puentes de hidrógeno que hacen las ZnO-NPs con la arginina 548 e histidina 584. **b)** Simulación de los modos de unión de las ZnO-NPs a la proteína AcrAB-TolC de *Escherichia coli*, el acercamiento muestra los puentes de hidrógeno que hacen las ZnO-NPs con la glutamina 71 y treonina 177.



## 7. DISCUSIÓN

El ZnO es uno de los minerales más versátiles que se encuentran en la corteza terrestre [65]. Es un compuesto inorgánico, polar, no tóxico, cristalino y seguro. Tiene propiedades antiinflamatorias y de cicatrización de heridas sobre todo en su tamaño nanométrico [66,67].

Las ZnO-NPs se encuentran en productos de cuidado personal, pinturas, catalizadores, además de que son utilizadas con propósitos médicos [68,69] siendo sus propiedades antibacterianas de las más estudiadas [70-72].

Una de las metodologías que están cobrando relevancia para sintetizar las ZnO-NPs es por procesos de química verde, donde generalmente se utilizan extractos de plantas como medio reductor [73]. En este trabajo se usó el extracto de la especie *Dysphania ambrosioides*, conocida coloquialmente como epazote, que es empleada en la medicina tradicional en infusiones o decocciones de las hojas y raíces, así como su aceite esencial para su uso como antihelmíntico, antiparasitario, etc. Entre los componentes se han identificado productos de naturaleza monoterpénica (C<sub>10</sub>) y sesquiterpénica (C<sub>15</sub>), principalmente ascaridol, así como limoneno, transpinocarveol, aritasona, β- pineno, mirceno, alcanfor y α-terpineol además de compuestos fenólicos como flavonas y flavonoles, la mayoría de ellos derivados de quercetina y kaempferol [74,75].

El mecanismo de síntesis de las ZnO-NPs (Figura 24) utilizando el extracto de *Dysphania ambrosioides* se ha asociado a la acción de los polifenoles que actúan como agentes de ligadura. El ion zinc (Zn<sup>2+</sup>) forma compuestos de coordinación, en



la mayor parte de ellos la unidad estructural fundamental es el  $Zn^{2+}$  central rodeado por cuatro grupos coordinados dispuestos espacialmente en las esquinas de un tetraedro regular. Los grupos hidroxilo (-OH) aromáticos presentes en los polifenoles se unen con el  $Zn^{2+}$  y forman un complejo coordinado llamado elegato de zinc que es estable. Este sistema sufre descomposición directa por encima de las 200 °C lo que conduce a la liberación de las NPs del sistema complejo [76].

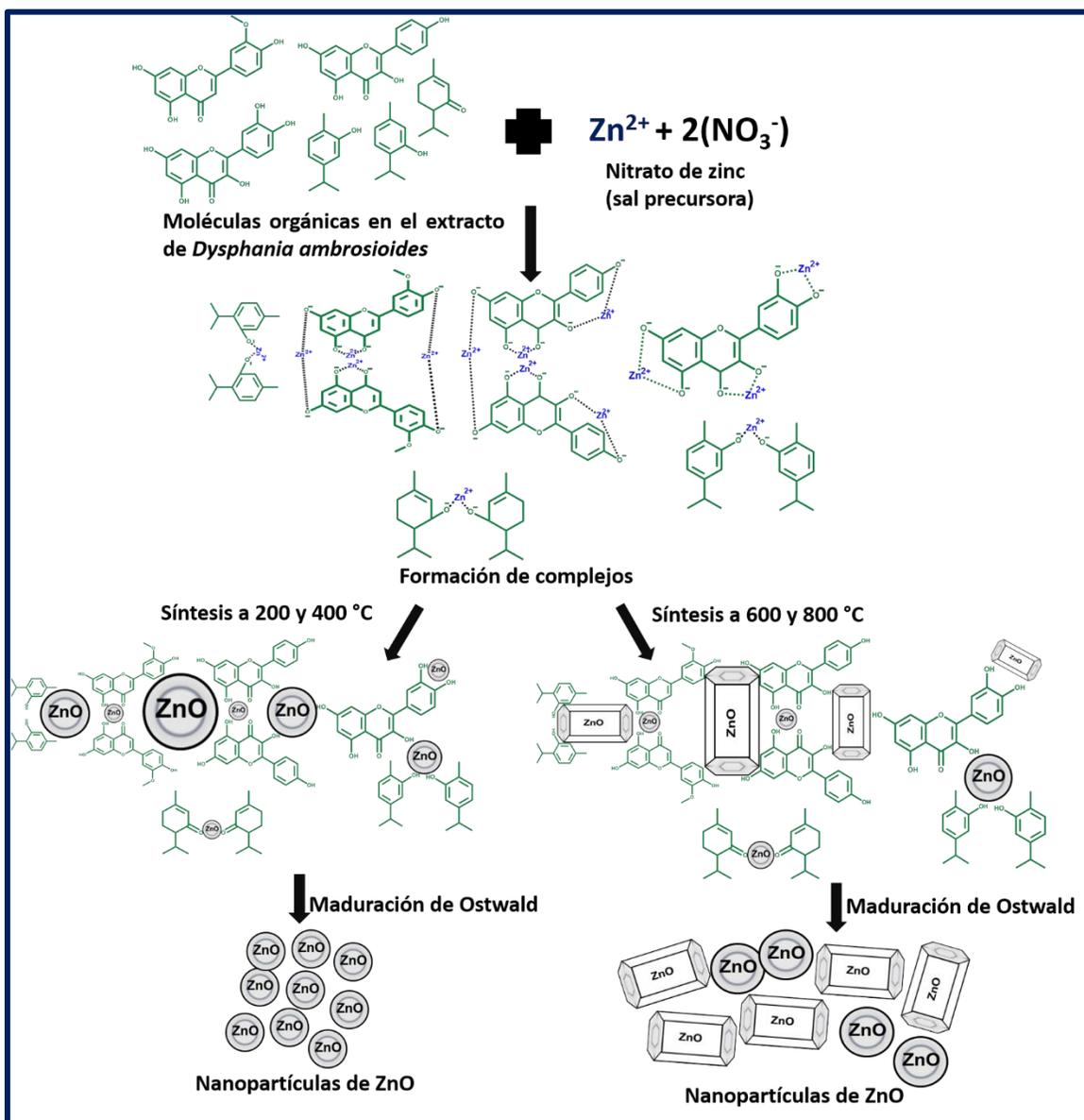
Los flavonoides, terpenoides, taninos, azúcares reductores etc., presentes en esta especie vegetal, tienen la característica de poseer -OH que, al perder electrones, rodean al  $Zn^{2+}$ , formando el complejo, después de este proceso, los iones  $OH^-$  se oxidan a grupos carbonilo, los grupos carbonilo están involucrados en la estabilización de las NPs, la síntesis se favorece si las moléculas que participan tienen al menos dos -OH en posición orto y para [74-76].

Los aminoácidos tienen influencia en determinar el tamaño, la morfología y la cantidad de NPs que se generan [47], dependiendo del tipo de aminoácidos presentes en el extracto y de su concentración, junto con las condiciones de reacción dan lugar a NPs con diferentes morfologías [76], como se observó en este trabajo donde se sintetizaron formas cuasiesféricas y prismas hexagonales (Figura 24).

El proceso de química verde permitió la síntesis de NPs con el uso de sustancias no tóxicas tanto para el humano como al ambiente, en comparación con otras metodologías de síntesis, por ejemplo, precipitación, emulsión, sol-gel, entre



otras, dónde se llegan a utilizar sustancias peligrosas como el hidróxido de amonio o el surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio [65].



**Figura 24.** Mecanismo propuesto de síntesis por química verde de las ZnO-NPs usando el extracto de *Dysphania ambrosioides*.



La estructura cristalina hexagonal correspondiente al ZnO se confirmó con el estudio por XRD, las posiciones de las reflexiones indexadas coincidieron con la fase del ZnO en las NPs obtenidas en las cuatro condiciones de síntesis, las intensidades fueron distintas, lo cual está relacionado al tamaño del cristal, el tamaño promedio de cristal se calculó con la ecuación de Debye-Scherrer y se comprobó que a mayor temperatura se incrementó de tamaño los cristales. Estos resultados fueron apoyados por el análisis de las imágenes de HRTEM, dónde se determinó la presencia de los planos cristalinos correspondientes al ZnO en los cuatro tamaños de NPs usando como referencia la tabla PDF #891397 correspondiente a este compuesto.

A través de las imágenes de FESEM y TEM se observó que se obtuvieron ZnO-NPs de diferentes tamaños y formas dependiendo de la temperatura de síntesis. A 200 y 400 °C se obtuvieron NPs de 7 y 14 nm en promedio respectivamente, ambas de forma cuasiesférica, a 600 y 800 °C se obtuvieron NPs de 22 y 130 nm en promedio respectivamente en el caso de las formas cuasiesféricas y los prismas hexagonales fueron en promedio de 70 y 90 nm en ambas temperaturas. Estos resultados coincidieron con las síntesis de ZnO-NPs usando otras especies vegetales, por ejemplo, con *Pandanus odorifer* se sintetizaron ZnO-NPs esféricas de aproximadamente 90 nm a 400 y 600 °C [77]. Con la especie *Medicago sativa* sintetizaron ZnO-NPs cuasiesféricas de 10 nm usando una temperaturas de 110 °C [78]. ZnO-NPs de 25-90 nm de forma esférica se sintetizaron con las especie *Trianthema portulacastrum* [79]. Con la especie *Solanum torvum* resultaron ZnO-NPs de 30-40 nm de forma esférica a un temperatura de 60 °C [80]. *Trifolium*



*pratense* permitió sintetizar ZnO-NPs cuasiesféricas de 100-190 nm usando una temperatura de 400 °C [81]. Con la especie *Brassica oleracea* sintetizaron ZnO-NPs de 14-17 nm a 450 °C [82]. ZnO-NPs de 20-40 nm se sintetizaron con la especie *Berberis aristata* [83]. Con la especie *Limonia acidissima* se sintetizaron ZnO-NPs de 12-45 nm de forma esférica usando una temperatura de 80 °C [84]. Con *Aloe vera* e *Hibiscus sabdariffa* se sintetizaron ZnO-NPs de 9-18 nm en formas de prismas hexagonales [85], muy semejaste a las obtenidas en este trabajo. Y con *Punica granatum* se sinetizaron ZnO-NPs de 32.98 nm y 81.84 nm usando temperaturas de 600 y 700 °C respectivamente [86], sus formas fueron cuasiesféricas y hexagonales, este resultado coincidió con los obtenido en este estudio, al aumentar la temperatura de síntesis se incrementó el tamaño de las NPs y surgieron nuevas formas. La especie vegetal y la temperatura de síntesis tienen influencia importante en el tamaño y las formas de las NPs que se obtienen.

El crecimiento de la estructura con forma de prisma hexagonal y cuasiesférica de las ZnO-NPs se debe a la presencia de los iones zincato  $(\text{Zn}(\text{OH})_4)^{2-}$  procedentes de la interacción del  $\text{Zn}^{2+}$  con los iones  $\text{OH}^-$  en el extracto de la planta. Cuando la disolución que contiene los iones zincato se calienta, se convierte lentamente en ZnO. Este fenómeno se produce porque la estructura cristalina del ZnO es construida gradualmente por los iones  $\text{OH}^-$ , y actúa como un cristal polar. Cuando las partículas se saturan, el núcleo de ZnO crece, dando lugar a NPs de forma esférica o cuasiesférica. El tratamiento térmico proporciona suficiente energía calorífica para la nucleación de los átomos, mejora la movilidad de la superficie y permite que estas estructuras se coloquen en la superficie de los cristales hexagonales previamente



formados, lo que conduce a la formación de la estructura en forma de prisma hexagonal. Los compuestos orgánicos participan en los centros de nucleación, estabilizándolos, influyendo también en las formas resultantes y definiendo el tamaño nanométrico [87,84].

Los resultados de EDS apoyaron la confirmación de la síntesis del ZnO, por los análisis de XRD y HRTEM, al estar los porcentajes atómicos del Zn y el O en proporción 1:1. Se observó una tendencia que, a mayor temperatura de síntesis, el porcentaje atómico del Zn aumentó y el del O disminuyó, esto es debido a que, a altas temperaturas, varios compuestos orgánicos se degradan, estos compuestos tienen O en su estructura por lo que al degradarse ya no participan en la reacción, el Zn se va a unir a las moléculas orgánicas restantes y de ahí que se encuentre en mayor proporción [89]. El aumento de la temperatura provoca la liberación del O superficial, lo que también genera una disminución de su porcentaje atómico [90].

La influencia de la temperatura en el tamaño de las partículas se explica por el fenómeno denominado “maduración de Ostwald”, en donde las partículas más pequeñas se redisuelven debido a su alta solubilidad y a la energía superficial dentro de la disolución, a mayores temperatura hay más colisiones de estas partículas redisueltas, lo que permite que las partículas más grandes crezcan aún más y reprecipiten en partículas de mayor tamaño, es decir, consiste en el crecimiento de NPs grandes a expensas de las más pequeñas a través de la transferencia de materia de las partículas pequeñas a las más grandes impulsadas por la estabilidad dependiente del tamaño de partícula [91,92]. Este comportamiento se confirmó al analizar las imágenes obtenidas y al determinar el tamaño de las ZnO-NPs en cada



condición de síntesis, y se observó que el tamaño de las NPs aumentó al incrementar la temperatura.

La caracterización por FTIR de las ZnO-NPs sintetizadas por química verde a diferentes temperaturas mostraron la señal de la vibración correspondiente al enlace entre el Zn y el O en todas la síntesis, lo que apoyó a la confirmación en la obtención del ZnO, además de que aparecieron otras señales atribuidas a los compuestos orgánicos que participaron en la reacción [60-64].

Para conocer la estabilidad de las ZnO-NPs, se analizaron los termogramas obtenidos en cada caso. En todas las ZnO-NPs, las pérdidas de peso cercanas a los 100 °C correspondieron a la evaporación del agua superficial. En las ZnO-NPs 200 °C, la pérdida de peso a los 150 °C se le atribuyó a la descomposición del Zn(OH)<sub>2</sub>, el cual se forma al diluir el Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en el extracto y que faltó por convertirse en ZnO, este compuesto se descompone por encima de las 125 °C [93]. La pérdida del 11.30 % alrededor de los 400 °C se le atribuyó a la descomposición de los nitratos del Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> utilizado como precursor para la síntesis y de la materia orgánica restante [94,95].

Las pérdidas del 9.41 % en las ZnO-NPs 400 °C, del 11.61 % en las ZnO-NPs 600 °C y del 9.41 % en las ZnO-NPs 800 °C todas a 550 °C correspondieron a la descomposición de materia orgánica remanente [94,96]. En las ZnO-NPs 800 °C, la pérdida de peso del 1.01 % a 250 °C se le atribuyó a la descomposición del Zn(OH)<sub>2</sub> que faltó por convertirse en ZnO, cuyo temperatura de descomposición abarca hasta los 250 °C [94].



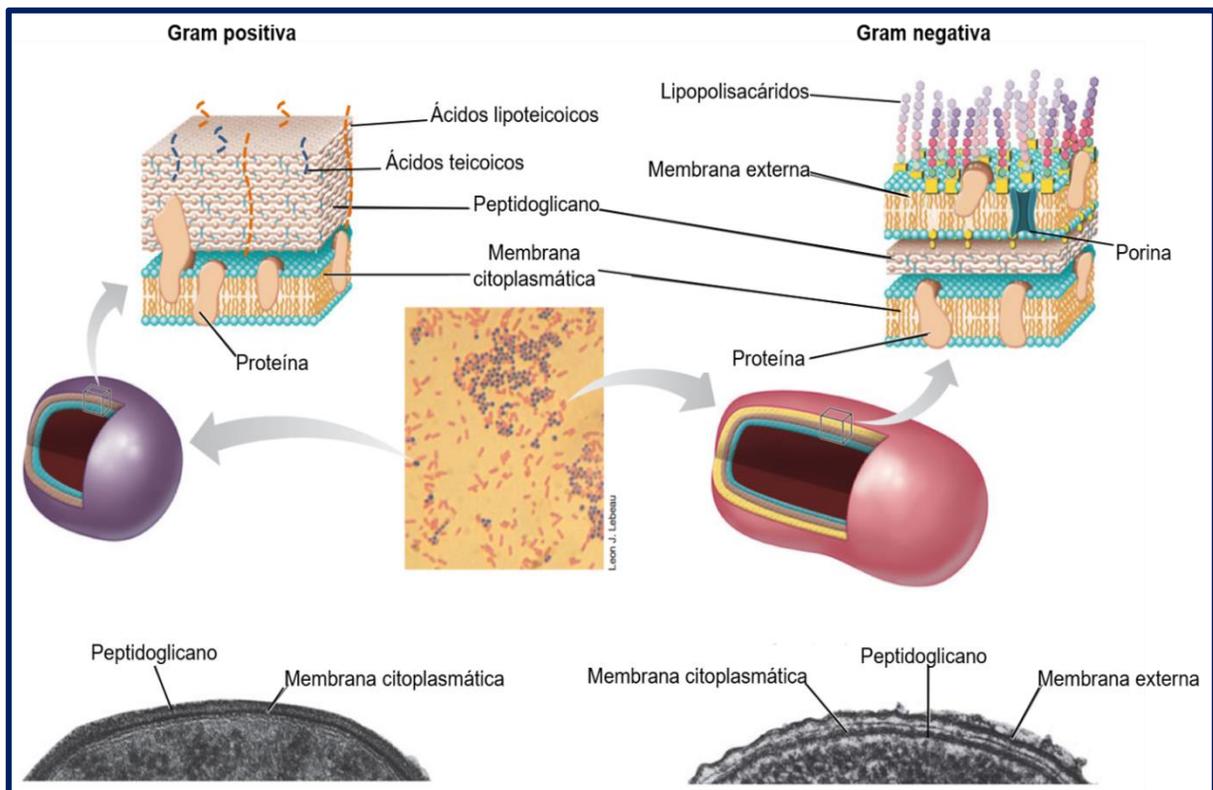
El aumento de la temperatura de síntesis favorece una mayor estabilidad de las ZnO-NPs debido a la presencia de vacantes de oxígeno en la estructura cristalina del ZnO. A medida que aumenta la temperatura de síntesis, aparecen un mayor número de vacancias de oxígeno, alcanzando un máximo cuando la síntesis se realiza a 600 °C. Cuando la síntesis se realiza por encima de los 600 °C, las ZnO-NPs comienzan a presentar un menor número de vacancias de oxígeno, lo que las hace más sensibles al aumento de la temperatura [96]. Por ello, las ZnO-NPs 800 °C tuvieron una mayor pérdida de peso que las ZnO-NPs 600 °C.

En cuanto a las pruebas antibacterianas, se observó que todas las cepas bacterianas evaluadas fueron sensibles a las NPs y que el tamaño de partícula influyó en la inhibición o eliminación de la cepa bacteriana.

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas son estructuralmente diferentes, la pared celular de las bacterias Gram positivas es una capa gruesa de 20 a 50 nm compuesta por peptidoglicano y los ácidos teicoicos que son exclusivos de la pared celular de estas bacterias. Por el contrario, las bacterias Gram negativas son más complejas, su pared celular comprende una fina capa de peptidoglicano, aproximadamente de 8 nm de grosor, ubicada en medio de las membranas que constituyen este tipo de bacterias, una membrana externa y una interna. La membrana externa de las bacterias Gram negativas contienen a los lipopolisacáridos y proteínas, como porinas y bombas, por donde se lleva a cabo el transporte de nutrientes y iones que son esenciales para la integridad estructural y la viabilidad de las bacterias [97] (Figura 25).



Estas diferencias estructurales pueden influir en la resistencia de las bacterias Gram positivas y Gram negativas a las NPs. Por ejemplo, la pared celular en las bacterias Gram positivas actúa como capa protectora, debido a su mayor grosor, haciéndolas más resistentes a las NPs que las bacterias Gram negativas que carecen de esta capa gruesa de peptidoglicano, y por la permeabilidad de su membrana externa, facilita el ingreso de las NPs o sus iones liberados. Aunque las bacterias Gram negativas tienen la ventaja que, en el espacio periplásmico, entre su pared celular y la membrana interna, pueden quedarse retenidas las NPs antes de que lleguen al citoplasma, para después ser eliminadas de la bacteria con ayuda de las bombas de expulsión [98].



**Figura 25.** Diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas [97].



En este estudio, las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fueron las más sensibles a las ZnO-NPs, siendo *Staphylococcus epidermidis* unas de las más sensibles, estos resultados coinciden con la inhibición que logran NPs de 50 nm de tamaño evaluadas a las mismas concentraciones sobre estas cepas bacterianas [99], las bacterias Gram positivas suelen ser las más sensibles a las ZnO-NPs donde se han observado halos de inhibición de 17-23 mm de diámetro con NPs que van desde los 10 a los 90 nm, formas esféricas y alargadas, y la MBC también es más bajas [100,101], conservando las característica de que a menor tamaño, la inhibición es mayor y son dependientes de la concentración [102].

Las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son más resistentes a las ZnO-NPs, conservando la condición que a menores tamaños de NPs, hay mayor inhibición de estas bacterias, por ejemplo, NPs de 14 a 25 nm y forma cuasiesféricas logran inhibirlas [103], la MBC fue mayor que contra bacterias Gram positivas y también son dependientes del tamaño [104,105], siendo *Pseudomonas aeruginosa* de las más resistentes a las NPs [102] coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo.

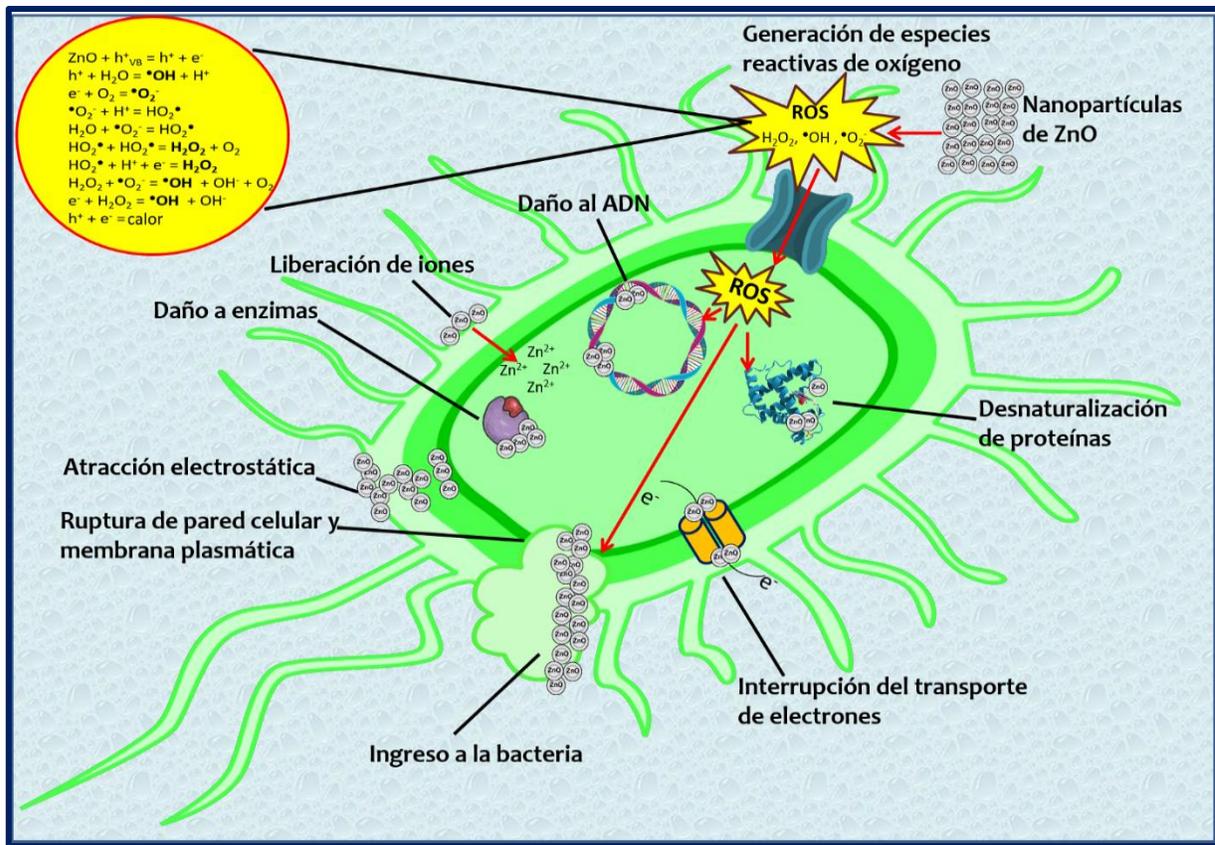
La inhibición por parte de las ZnO-NPs de diferentes tamaños sobre las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, permitió observar que fueron las cepas más sensibles a los diferentes tamaños de las NPs, ya que se generaron los halos de inhibición de mayor diámetro y una menor MBC, aunque con algunas cepas hubo poca influencia del tamaño de partícula sobre su inhibición.



Los resultados son similares a los obtenidos con ZnO-NPs de 10-50 nm generando halos de inhibición de 12 a los 17 mm de diámetro [106,107], la MBC obtenida en este trabajo contra esta especie fue mayor a las determinadas en otras investigaciones, donde encontraron que la destrucción del inóculo bacteriano puede ser a concentraciones que van desde los 0.3 µg/mL con NPs de 30 nm [108] hasta de 2500 µg/mL con NPs de 10-50 nm [109] o inclusive potenciar su efecto inhibitorio al colocarlas en enjuagues bucales donde ZnO-NPs de 20 nm a una concentración de 25 µg/mL lograron inhibirlas [110].

Como se mencionó anteriormente, estas bacterias están involucradas en varios padecimientos dentales como la caries dental, donde *Streptococcus mutans* es la bacteria más asociada a esta condición [111]. *Streptococcus sanguinis*, *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* están involucradas en el desarrollo de la enfermedad periodontal y otros padecimientos [112,113]. Por lo que las ZnO-NPs pueden ser una alternativa para el tratamiento de estas afecciones.

Los mecanismos antibacterianos por parte de las ZnO-NPs que se han estudiado se encuentran la alteración de las funciones de proteínas y enzimas por unión directa con estas estructuras, la generación de ROS, el daño a la membrana celular por interacción electrostática, el daño al ADN y liberación de iones Zn<sup>2+</sup>, que en combinación ayudan a potenciar esta acción [114] (Figura 26).



**Figura 26.** Mecanismos antibacterianos de las ZnO-NPs

La alteración en las funciones de las proteínas y enzimas es debida a la interacción directa de las ZnO-NPs con estas moléculas como se demostró con el análisis de acoplamiento molecular. Este daño se incrementa cuando hay una reacción entre los grupos -SH de los aminoácidos con los  $Zn^{2+}$  liberados por las ZnO-NPs. Los iones oxidan la cadena de aminoácidos lo que conduce a la degradación de las proteínas y a la pérdida de la actividad enzimática dando como resultado un bloqueo en las funciones metabólicas y de crecimiento de las bacterias [115,116].



El análisis de acoplamiento molecular puede utilizarse para modelar la interacción entre una pequeña molécula y una proteína a nivel atómico, lo que permite caracterizar el comportamiento de las pequeñas moléculas en el sitio de unión de las proteínas diana, así como dilucidar procesos bioquímicos fundamentales [117,118].

Con este estudio se observó que las ZnO-NPs se pueden unir a proteínas bacterianas, potenciando su acción antibacteriana. Las energías de unión fueron negativas y similares con ambas proteínas, lo que indica un sistema estable y por lo tanto una mayor probabilidad de que así se dé la interacción. La  $K_i$  indica la concentración necesaria de inhibidor para que la mitad de los sitios enzimáticos estén ocupados [119,120], en ambos casos se requiere una concentración baja de NPs para conseguir la inhibición de las funciones de estas proteínas.

La polimerasa TagF se encarga de catalizar una sustitución nucleofílica para unir unidades de glicerol-fosfato en la síntesis de los ácidos teicoicos en la pared celular de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, y otras bacterias Gram positivas [121]. La deficiencia en los ácidos teicoicos compromete la virulencia, formación de biopelícula y a la misma protección de la bacteria [58,122], resultando en un mayor efecto antibacteriano de las NPs contra este tipo de bacterias, además de que pueden interactuar con aminoácidos presentes en el sitio catalítico de esta enzima.

La bomba de expulsión AcrAB–TolC es una proteína que atraviesa la membrana interna y externa de las bacterias Gram negativas, esta bomba transporta vectorialmente diversos compuestos con poca similitud química, confiriéndole a



*Escherichia coli* resistencia a un amplio espectro de antibióticos [59]. Estos transportadores actúan de forma sinérgica con la membrana externa expulsando fármacos o compuestos tóxicos de la membrana interna y el periplasma hacia el medio externo [123]. La inactivación de esta proteína anula por completo la salida de diversos compuestos y conduce al aumento de la susceptibilidad a varios agentes antimicrobianos como las NPs, el sitio de unión de las NPs fue similar al presentado por potenciales inhibidores orgánicos [121].

Aunque este estudio se realiza con una nanopartícula, se puede inferir el modo de unión de una gran cantidad de ZnO-NPs con proteínas bacterianas mostrando su potencial inhibitorio contra diversas especies bacterianas promoviendo la disminución en su viabilidad.

Otro mecanismo antibacteriano importante de la ZnO-NPs es la generación de ROS, estas especies se originan en la superficie de las NPs como resultado del cambio en las propiedades electrónicas, a menor tamaño de partícula hay mayor interacción con el oxígeno molecular o el agua del medio y los sitios activos donantes y aceptores de electrones, lo que genera una cascada de reacciones y por consiguiente aumento en la concentración de estas especies [124,125]. Uno de los blancos de la ROS es la cadena transportadora de electrones, lo que lleva a una disminución de la producción de adenosín trifosfato (ATP), compuesto importante en la respiración y metabolismo bacteriano, al atacar enzimas involucradas en el metabolismo provocan daños en otros procesos como la síntesis de proteínas, lípidos, pared celular, etc. [126]. Otra consecuencia es la peroxidación de lípidos que conduce a un daño en la integridad de la membrana y cambios conformacionales en las proteínas de



membrana. Este desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes causa estrés oxidativo dentro de la bacteria provocando la muerte celular [127].

El daño al ADN es mediante la intercalación de las ZnO-NPs en esta estructura y los  $Zn^{2+}$  reaccionan con el grupo fosfato de los nucleótidos lo que lleva a la muerte celular [128].

La interacción electrostática que conduce al daño de la membrana celular es debida a las diferencias de cargas entre la membrana con carga negativa y las ZnO-NPs generalmente con carga positiva, lo que posibilita que se acumulen en esta estructura. Las NPs dependiendo de su tamaño van a tener una mayor superficie permitiendo un incremento en la interacción con la membrana, provocando su alteración y posterior permeabilidad dejando ingresar a las NPs [67]. Las bacterias Gram negativas son más susceptibles al daño en la membrana porque contienen lipopolisacáridos en la membrana externa, lo que aumenta la carga negativa, en comparación con las bacterias Gram positivas que no tienen esta estructura [129].

Los mecanismos de resistencia de las bacterias a las ZnO-NPs de diferentes tamaños, sobre todo observado con *Pseudomonas aeruginosa*, es debido a la producción de matriz extracelular responsable de aglomerar y desactivar las NPs, la formación de biopelícula, la regulación de la carga eléctrica de su superficie o la sobre expresión de genes relacionados con el control del estrés oxidativo y de bombas de expulsión activa lo que posibilita a la bacteria disminuir el daño generado [130]. Estos mecanismos aún están en estudio, pero como se observó en este trabajo, la capacidad antibacteriana de las ZnO-NPs es diferente para cada bacteria y el tamaño de partícula es una propiedad importante.



Finalmente, el uso de agentes antibacterianos de tamaño nanométrico ofrece una nueva alternativa a los tratamientos convencionales usados en el control de diversos padecimientos infecciosos, al evitar el crecimiento de estas especies bacterianas y a la formación de biopelícula [131,132].

Las ZnO-NPs debido a su tamaño, capacidad biocida, antiadherente, de liberación y sus combinaciones con adhesivos, polímeros, resinas o recubrimiento de superficies [132,133] permiten ampliar la variedad de posibles aplicaciones como su uso clínico en el tratamiento de diferentes enfermedades asociadas a las bacterias.



## 8. CONCLUSIONES

- ❖ El proceso de síntesis por química verde utilizando el extracto de *Dysphania ambrosioides* permitió sintetizar ZnO-NPs.
- ❖ Con las diferentes temperaturas de síntesis (200, 400, 600 y 800 °C) se sintetizaron ZnO-NPs de distintos tamaños y formas, observando la característica que el incremento de la temperatura favoreció al aumento del tamaño de las NPs.
- ❖ La caracterización de las distintas ZnO-NPs por XRD confirmó la presencia de la fase cristalina hexagonal del ZnO.
- ❖ Por FESEM se observaron las formas cuasiesféricas y prismas hexagonales.
- ❖ Por TEM y HRTEM se identificaron los planos cristalinos y distancias interplanares que correspondieron al ZnO.
- ❖ Con EDS se confirmó la síntesis del ZnO al estar las señales de Zn y O. Los porcentajes atómicos dieron una proporción 1:1 de ambos elementos.
- ❖ Los espectros de FTIR mostraron la señal correspondiente a la vibración del enlace entre el Zn y O en todas las síntesis, lo que apoyó la confirmación de la misma.
- ❖ Las ZnO-NPs sintetizadas a 600 °C fueron las más estables al incremento de la temperatura, seguidas por las ZnO-NPs a 400 y 800 °C con una estabilidad similar y finalmente las ZnO-NPs a 200 °C que fueron las menos estables.



- ❖ Se demostró la influencia del tamaño de partícula en la inhibición bacteriana, los halos de inhibición generados por las ZnO-NPs de diferentes tamaños y a distintas concentraciones mostró que se inhibió el crecimiento de todas las cepas evaluadas, los halos de mayor diámetro fueron generados por las ZnO-NPs más pequeñas y fueron dependientes de la concentración, a mayor concentración, mayor inhibición.
- ❖ El tamaño de partícula también influyó en el valor de la MBC, se presentó una tendencia que, a menor tamaño, la MBC fue más baja, y ésta fue mayor a medida que el tamaño de las NPs aumentó, observándose principalmente con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- ❖ *Staphylococcus epidermidis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* fueron las especies más sensible a las ZnO-NPs. *Pseudomonas aeruginosa* la más resistente.
- ❖ Con el estudio de acoplamiento molecular se determinó que las ZnO-NPs pueden interactuar con proteínas bacterianas, al ser probables dianas de las NPs, potenciando su acción antibacteriana, lo que explicaría uno de los mecanismos de inhibición.
- ❖ Se confirmó la hipótesis, las distintas temperaturas de síntesis permitieron sintetizar ZnO-NPs de diferentes tamaños, demostrando que a menor tamaño de partícula hubo una mayor inhibición bacteriana.



## 9. PERSPECTIVAS

- ❖ Obtener imágenes por TEM que muestren el daño a las bacterias por parte de las ZnO-NPs.
- ❖ Intentar la síntesis con diferentes especies vegetales y variando otras condiciones de reacción.
- ❖ Caracterizar otras propiedades físicas de las ZnO-NPs, como cualidades ópticas, magnéticas, catalíticas, mecánicas, etc.
- ❖ Realizar ensayos que permitan profundizar y entender más el mecanismo antibacteriano por parte de las ZnO-NPs.
- ❖ Evaluar las ZnO-NPs en otras actividades biológicas (citotoxicidad, antioxidante, antiinflamatoria, etc.).
- ❖ Evaluar las ZnO-NPs para una posible aplicación clínica.
- ❖ Realizar pruebas de incorporación de las ZnO-NPs a un producto para su uso industrial, médico, etc.



## 10. REFERENCIAS

1. Doron, S., Gorbach, S., 2008. Bacterial Infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health* 273–282. doi:10.1016/b978-012373960-5.00596-7
2. Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 822–880. doi:10.1128/cmr.00022-13
3. Percival, S.L., Williams, D.W., 2014. *Escherichia coli*. *Microbiology of Waterborne Diseases* 89–117. doi:10.1016/b978-0-12-415846-7.00006-8
4. Harris, L.G., Foster, S.J., Richards, R.G., 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials* 4, 39–60. doi:10.22203/ecm.v004a04
5. Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 339, 520–532. doi:10.1056/nejm199808203390806
6. Taylor, T.A., Unakal, C.G., 2021. *Staphylococcus Aureus*. StatPearls, Treasure Island.
7. Dong, Y., Speer, C.P., Glaser, K., 2018. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence* 9, 621–633. doi:10.1080/21505594.2017.1419117
8. Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the accidental pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7, 555–567. doi:10.1038/nrmicro2182
9. Lee, J.Y., Monk, I.R., Gonçalves da Silva, A., Seemann, T., Chua, K.Y., Kearns, A., Hill, R., Woodford, N., Bartels, M.D., Strommenger, B., Laurent, F., Dodémont, M., Deplano, A., Patel, R., Larsen, A.R., Korman, T.M.,



- Stinear, T.P., Howden, B.P., 2018. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. *Nature Microbiology* 3, 1175–1185. doi:10.1038/s41564-018-0230-7
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S., 2015. *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology* 753–767. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00041-x
10. Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S., 2015. *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology* 753–767. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00041-x
  11. Klockgether, J., Tümmler, B., 2017. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research* 6, 1261. doi:10.12688/f1000research.10506.1
  12. Takahashi, N., 2015. Oral Microbiome Metabolism. *Journal of Dental Research* 94, 1628–1637. doi:10.1177/0022034515606045
  13. Zaura, E., Keijsers, B.J., Huse, S.M., Crielaard, W., 2009. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiology* 9, 259. doi:10.1186/1471-2180-9-259
  14. He, J., Li, Y., Cao, Y., Xue, J., Zhou, X., 2014. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiologica* 60, 69–80. doi:10.1007/s12223-014-0342-2
  15. Lemos, J.A., Palmer, S.R., Zeng, L., Wen, Z.T., Kajfasz, J.K., Freires, I.A., Abranches, J., Brady, L.J., 2019. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum* 7. doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018
  16. Schelenz, S., Page, A.J., Emmerson, A.M., 2005. *Streptococcus mutans* endocarditis: Beware of the 'diphtheroid.' *Journal of the Royal Society of Medicine* 98, 420–421. doi:10.1177/014107680509800911
  17. Zhu, B., Macleod, L.C., Kitten, T., Xu, P., 2018. *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiology* 13, 915–932. doi:10.2217/fmb-2018-0043



18. Dayakar, M.M., Bhat, S., Lakshmi, K.N., 2021. *Prevotella intermedia* - an overview and its role in periodontitis. *Journal of Advanced Clinical and Research Insights* 8, 79–82. doi:10.15713/ins.jcri.336
19. Beem, J.E., Nesbitt, W.E., Leung, K.-P., 1998. Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiology and Immunology* 13, 97–105. doi:10.1111/j.1399-302x.1998.tb00719.x
20. Hajishengallis, G., Lamont, R.J., 2014. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *European Journal of Immunology* 44, 328–338. doi:10.1002/eji.201344202
21. Olsen, I., Yilmaz, Ö., 2016. Modulation of inflammasome activity by *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis and associated systemic diseases. *Journal of Oral Microbiology* 8, 30385. doi:10.3402/jom.v8.30385
22. Dominy, S.S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L.J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M.I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G.D., Reynolds, E.C., Faull, R.L., Curtis, M.A., Dragunow, M., Potempa, J., 2019. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances* 5. doi:10.1126/sciadv.aau3333
23. Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C., Kent, R.L., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25, 134–144. doi:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x
24. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* 38, 135–187. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x
25. Marsh, P., Martin, M., 1999. *Oral microbiology*. Wright, Oxford.
26. Wilson, M., 2009. *Bacteriology of Humans: an Ecological Perspective*.



- 27.** Quintili, M., 2019. Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. Cuadernos del Centro de Estudios de Diseño y Comunicación. doi:10.18682/cdc.v42i42.1430
- 28.** Zhang, L., Webster, T.J., 2009. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 4, 66–80. doi:10.1016/j.nantod.2008.10.014
- 29.** Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, 2004. The Royal Society, London.
- 30.** Chaudhry, N., Dwivedi, S., Chaudhry, V., Singh, A., Saquib, Q., Azam, A., Musarrat, J., 2018. Bio-inspired nanomaterials in agriculture and food: Current status, foreseen applications and challenges. *Microbial Pathogenesis* 123, 196–200. doi:10.1016/j.micpath.2018.07
- 31.** Chou, L.Y.T., Ming, K., Chan, W.C.W., 2011. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 40, 233–245.
- 32.** Webster, T.J., Seil, I., 2012. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine* 2767. doi:10.2147/ijn.s24805
- 33.** Carrouel, F., Viennot, S., Ottolenghi, L., Gaillard, C., Bourgeois, D., 2020. Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care Cosmetics: A Review of the Current Situation. *Nanomaterials* 10, 140. doi:10.3390/nano10010140
- 34.** Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N.H.M., Ann, L.C., Bakhori, S.K.M., Hasan, H., Mohamad, D., 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters* 7, 219–242. doi:10.1007/s40820-015-0040-x
- 35.** Betancur Henao, C.P., Hernández Montes, V., Buitrago Sierra, R., 2016. Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 4 35, 287–402.



- 36.** Salem, W., Leitner, D.R., Zingl, F.G., Schratte, G., Prassl, R., Goessler, W., Reidl, J., Schild, S., 2015. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 305, 85–95. doi:10.1016/j.ijmm.2014.11.005
- 37.** Ren, G., Hu, D., Cheng, E.W., Vargas-Reus, M.A., Reip, P., Allaker, R.P., 2009. Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33, 587–590. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004
- 38.** Espitia, P., Otoni, C., Soares, N., 2016. Zinc Oxide Nanoparticles for Food Packaging Applications. *Antimicrobial Food Packaging* 425–431. doi:10.1016/b978-0-12-800723-5.00034-6
- 39.** Chiriac, V., Stratulat, D.N., Calin, G., Nichitus, S., Burlui, V., Stădoleanu, C., Popa, M., Popa, I.M., 2016. Antimicrobial property of zinc-based nanoparticles. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 133, 012055. doi:10.1088/1757-899x/133/1/012055
- 40.** Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P.K.-H., Chiu, J.-F., Che, C.-M., 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12, 527–534. doi:10.1007/s00775-007-0208-z
- 41.** Borzabadi-Farahani, A., Borzabadi, E., Lynch, E., 2013. Nanoparticles in orthodontics, a review of antimicrobial and anti-caries applications. *Acta Odontologica Scandinavica* 72, 413–417. doi:10.3109/00016357.2013.859728
- 42.** Wang, X., Wang, B., Wang, Y., 2015. Antibacterial orthodontic cement to combat biofilm and white spot lesions. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 148, 974–981. doi:10.1016/j.ajodo.2015.06.017



43. Anastas, P.T., Warner, J.C., 2014. Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press, Oxford.
44. Salinas Estevané, J.P., Sánchez Cervantes, E.M., 2012. La química verde en la síntesis de nanoestructuras. Ingenierías 15, 7–16.
45. Hebbalalu, D., Lalley, J., Nadagouda, M.N., Varma, R.S., 2013. Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 1, 703–712. doi:10.1021/sc4000362
46. Singh, J., Dutta, T., Kim, K.-H., Rawat, M., Samddar, P., Kumar, P., 2018. ‘green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. Journal of Nanobiotechnology 16. doi:10.1186/s12951-018-0408-4
47. Makarov, V.V., Love, A.J., Sinitsyna, O.V., Makarova, S.S., Yaminsky, I.V., Taliany, M.E., Kalinina, N.O., 2014. “Green” Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. Acta Naturae 6, 35–44. doi:10.32607/20758251-2014-6-1-35-44
48. Agarwal, H., Kumar, S.V., Rajeshkumar, S., 2017. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach. Resource-Efficient Technologies 3, 406–413. doi:10.1016/j.reffit.2017.03.002
49. Treviño, S., Águila-Rosas, J., González-Coronel, M.A., Carmona-Gutiérrez, G., Rubio-Rosas, E., López-López, G., Moreno-Rodríguez, J.A., Díaz, A., 2014. Estudios preliminares de caracterización y acción cicatrizante de nanomatrices de ZnO con extracto de *Plantago major* en la piel de rata. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 45.
50. Gunalan, S., Sivaraj, R., Rajendran, V., 2012. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. Progress in Natural Science: Materials International 22, 693–700. doi:10.1016/j.pnsc.2012.11.015



51. Ashajyothi, C., Harish, K.H., Dubey, N., Chandrakanth, R.K., 2016. Antibiofilm activity of biogenic copper and zinc oxide nanoparticles-antimicrobials collegiate against multiple drug resistant bacteria: a nanoscale approach. *Journal of Nanostructure in Chemistry* 6, 329–341. doi:10.1007/s40097-016-0205-2
52. Yusof, H.M., Rahman, N.A.A., Mohamad, R., Zaidan, U.H., Samsudin, A.A., 2021. Antibacterial Potential of Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles against Poultry-Associated Foodborne Pathogens: An *In Vitro* Study. *Animals* 11, 2093. doi:10.3390/ani11072093
53. Jayaseelan, C., Rahuman, A.A., Kirthi, A.V., Marimuthu, S., Santhoshkumar, T., Bagavan, A., Gaurav, K., Karthik, L., Rao, K.B., 2012. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 90, 78–84. doi:10.1016/j.saa.2012.01.006
54. Álvarez-Chimal, R., García-Pérez, V.I., Álvarez-Pérez, M.A., Arenas-Alatorre, J.Á., 2021. Green synthesis of ZnO nanoparticles using a *Dysphania ambrosioides* extract. Structural characterization and antibacterial properties. *Materials Science and Engineering: C* 118, 111540. doi:10.1016/j.msec.2020.111540
55. Geetha, M., Nagabhushana, H., Shivananjaiah, H., 2016. Green mediated synthesis and characterization of ZnO nanoparticles using *Euphorbia Jatropa* latex as reducing agent. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* 1, 301–310. doi:10.1016/j.jsamd.2016.06.015
56. Tiwari, V., Mishra, N., Gadani, K., Solanki, P.S., Shah, N.A., Tiwari, M., 2018. Mechanism of Anti-bacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticle Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01218



57. Meraat, R., Ziabari, A.A., Issazadeh, K., Shadan, N., Jalali, K.M., 2016. Synthesis and Characterization of the Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles against *Salmonella typhi*. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)* 29, 601–608. doi:10.1007/s40195-016-0439-5
58. Lovering, A.L., Lin, L.Y.-C., Sewell, E.W., Spreter, T., Brown, E.D., Strynadka, N.C.J., 2010. Structure of the bacterial teichoic acid polymerase TagF provides insights into membrane association and catalysis. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 582–589. doi:10.1038/nsmb.1819
59. Du, D., Wang, Z., James, N.R., Voss, J.E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., Venter, H., Chiu, W., Luisi, B.F., 2014. Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. *Nature* 509, 512–515. doi:10.1038/nature13205
60. Liu, Z., Chen, F., Lu, Z., 2019. Biofabrication of zinc oxide nanoparticles, characterization and cytotoxicity against pediatric leukemia cell lines. *Green Processing and Synthesis* 9, 56–62. doi:10.1515/gps-2020-0007
61. Santhoshkumar, J., Kumar, S.V., Rajeshkumar, S., 2017. Synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant leaf extract against urinary tract infection pathogen. *Resource-Efficient Technologies* 3, 459–465. doi:10.1016/j.reffit.2017.05.001
62. Anvekar, T., Rajendra, V., Kadam, H., 2017. Green Synthesis of ZnO Nano Particles, its Characterization and Application. *Material Science Research India* 14, 153–157. doi:10.13005/msri/140211
63. Khan, S.H., R, S., Pathak, B., Fulekar, M., 2015. Photocatalytic degradation of organophosphate pesticides (Chlorpyrifos) using synthesized zinc oxide nanoparticle by membrane filtration reactor under UV irradiation. *Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology* 1, 23–27. doi:10.15761/fnn.1000105
64. Umar, H., Kavaz, D., Rizaner, N., 2018. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Albizia lebbek* stem bark, and evaluation of its antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities on human breast cancer



- cell lines. *International Journal of Nanomedicine* Volume 14, 87–100. doi:10.2147/ijn.s186888
65. Kołodziejczak-Radzimska, A., Jesionowski, T., 2014. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. *Materials* 7, 2833–2881. doi:10.3390/ma7042833
  66. Limo, M.J., Sola-Rabada, A., Boix, E., Thota, V., Westcott, Z.C., Puddu, V., Perry, C.C., 2018. Interactions between Metal Oxides and Biomolecules: from Fundamental Understanding to Applications. *Chemical Reviews* 118, 11118–11193. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00660
  67. Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., Buszewski, B., 2017. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science* 249, 37–52. doi:10.1016/j.cis.2017.07.033
  68. Fasiku, V.O., Owonubi, S.J., Malima, N.M., Hassan, D., Revaprasadu, N., 2020. Metal Oxide Nanoparticles: A Welcome Development for Targeting Bacteria. *Antibiotic Materials in Healthcare* 261–286. doi:10.1016/b978-0-12-820054-4.00015-x
  69. Martínez-Carmona, M., Gun'Ko, Y., Vallet-Regí, M., 2018. ZnO Nanostructures for Drug Delivery and Theranostic Applications. *Nanomaterials* 8, 268. doi:10.3390/nano8040268
  70. Mishra, P.K., Mishra, H., Ekielski, A., Talegaonkar, S., Vaidya, B., 2017. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today* 22, 1825–1834. doi:10.1016/j.drudis.2017.08.006
  71. Abebe, B., Zereffa, E.A., Tadesse, A., Murthy, H.C.A., 2020. A Review on Enhancing the Antibacterial Activity of ZnO: Mechanisms and Microscopic Investigation. *Nanoscale Research Letters* 15. doi:10.1186/s11671-020-03418-6



72. Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., Nalwa, H.S., 2017. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceramics International* 43, 3940–3961. doi:10.1016/j.ceramint.2016.12.062
73. Chan, Y.Y., Pang, Y.L., Lim, S., Chong, W.C., 2021. Facile green synthesis of ZnO nanoparticles using natural-based materials: Properties, mechanism, surface modification and application. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 105417. doi:10.1016/j.jece.2021.105417
74. Carrillo-López, L.M., Soto-Hernández, R.M., Zavaleta-Mancera, H.A., Vilchis-Néstor, A.R., 2016. Study of the Performance of the Organic Extracts of *Chenopodium ambrosioides* for Ag Nanoparticle Synthesis. *Journal of Nanomaterials* 2016, 1–13. doi:10.1155/2016/4714162
75. Gómez-Castellanos, J.R., 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 7, 3–9.
76. Nava, O., Luque, P., Gómez-Gutiérrez, C., Vilchis-Nestor, A., Castro-Beltrán, A., Mota-González, M., Olivas, A., 2017. Influence of *Camellia sinensis* extract on Zinc Oxide nanoparticle green synthesis. *Journal of Molecular Structure* 1134, 121–125. doi:10.1016/j.molstruc.2016.12.069
77. Hussain, A., Oves, M., Alajmi, M.F., Hussain, I., Amir, S., Ahmed, J., Rehman, M.T., El-Seedi, H.R., Ali, I., 2019. Biogenesis of ZnO nanoparticles using *Pandanus odorifer* leaf extract: anticancer and antimicrobial activities. *RSC Advances* 9, 15357–15369. doi:10.1039/c9ra01659g
78. Król, A., Railean-Plugaru, V., Pomastowski, P., Buszewski, B., 2019. 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. *Phytochemistry Letters* 31, 170–180. doi:10.1016/j.phytol.2019.04.009



- 79.** Khan, Z.U.H., Sadiq, H.M., Shah, N.S., Khan, A.U., Muhammad, N., Hassan, S.U., Tahir, K., Safi, S.Z., Khan, F.U., Imran, M., Ahmad, N., Ullah, F., Ahmad, A., Sayed, M., Khalid, M.S., Qaisrani, S.A., Ali, M., Zakir, A., 2019. Greener synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Trianthema portulacastrum* extract and evaluation of its photocatalytic and biological applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 192, 147–157. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.01.013
- 80.** Ezealisiji, K.M., Siwe-Noundou, X., Maduelosi, B., Nwachukwu, N., Krause, R.W.M., 2019. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Solanum torvum* (L) leaf extract and evaluation of the toxicological profile of the ZnO nanoparticles–hydrogel composite in Wistar albino rats. *International Nano Letters* 9, 99–107. doi:10.1007/s40089-018-0263-1
- 81.** Dobrucka, R., Długaszewska, J., 2016. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23, 517–523. doi:10.1016/j.sjbs.2015.05.016
- 82.** Osuntokun, J., Onwudiwe, D.C., Ebenso, E.E., 2019. Green synthesis of ZnO nanoparticles using aqueous *Brassica oleracea* L. var. italica and the photocatalytic activity. *Green Chemistry Letters and Reviews* 12, 444–457. doi:10.1080/17518253.2019.1687761
- 83.** Chandra, H., Patel, D., Kumari, P., Jangwan, J., Yadav, S., 2019. Phyto-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles of *Berberis aristata*: Characterization, antioxidant activity and antibacterial activity with special reference to urinary tract pathogens. *Materials Science and Engineering: C* 102, 212–220. doi:10.1016/j.msec.2019.04.035
- 84.** Patil, B.N., Taranath, T.C., 2016. *Limonia acidissima* L. leaf mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles: A potent tool against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology* 5, 197–204. doi:10.1016/j.ijmyco.2016.03.004



- 85.** Mahendiran, D., Subash, G., Selvan, D.A., Rehana, D., Kumar, R.S., Rahiman, A.K., 2017. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Plant Extracts of *Aloe vera* and *Hibiscus sabdariffa*: Phytochemical, Antibacterial, Antioxidant and Anti-proliferative Studies. *BioNanoScience* 7, 530–545. doi:10.1007/s12668-017-0418-y
- 86.** Sukri, S.N.A.M., Shameli, K., Wong, M.M.-T., Teow, S.-Y., Chew, J., Ismail, N.A., 2019. Cytotoxicity and antibacterial activities of plant-mediated synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles using *Punica granatum* (pomegranate) fruit peels extract. *Journal of Molecular Structure* 1189, 57–65. doi:10.1016/j.molstruc.2019.04.026
- 87.** Hassan Basri, H., Talib, R.A., Sukor, R., Othman, S.H., Ariffin, H., 2020. Effect of synthesis temperature on the size of ZnO nanoparticles derived from pineapple peel extract and antibacterial activity of ZnO–starch nanocomposite films. *Nanomaterials* 10, 1061. doi:10.3390/nano10061061
- 88.** Kumar, H., Rani, R., 2013. Structural and optical characterization of ZnO nanoparticles synthesized by microemulsion route. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* 19, 26–36. doi:10.18052/www.scipress.com/ilcpa.19.26
- 89.** Krężel, A., Maret, W., 2016. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 611, 3–19. doi:10.1016/j.abb.2016.04.010
- 90.** Wang, J., Chen, R., Xiang, L., Komarneni, S., 2018. Synthesis, properties and applications of ZnO nanomaterials with oxygen vacancies: A Review. *Ceramics International* 44, 7357–7377. doi:10.1016/j.ceramint.2018.02.013
- 91.** T K Thanh, N., Maclean, N., Mahiddine, S., 2014. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews* 114, 7610–7630. doi:10.1021/cr400544s



92. Gomme, C., 2019. Ostwald ripening of confined nanoparticles: Chemomechanical coupling in nanopores. *Nanoscale* 11, 7386–7393. doi:10.1039/c9nr01349k
93. Wang, M., Zhou, Y., Zhang, Y., Hahn, S.H., Kim, E.J., 2011. From Zn(OH)<sub>2</sub> to ZnO: A study on the mechanism of phase transformation. *CrystEngComm* 13, 6024. doi:10.1039/c1ce05502j
94. Fatimah, I., Pradita, R.Y., Nurfalinda, A., 2016. Plant Extract Mediated of ZnO Nanoparticles by Using Ethanol Extract of *Mimosa Pudica* Leaves and Coffee Powder. *Procedia Engineering* 148, 43–48. doi:10.1016/j.proeng.2016.06.483
95. Pinjari, D., Pandit, A.B., Mhaske, S., 2016. Ultrasound assisted green synthesis of zinc oxide nanorods at room temperature. *Indian Journal of Chemical Technology* 23, 221–226.
96. He, H., Cao, J., Fei, X., Duan, N., 2019. High-temperature annealing of ZnO nanoparticles increases the dissolution magnitude and rate in water by altering o vacancy distribution. *Environment International* 130, 104930. doi:10.1016/j.envint.2019.104930
97. Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Aberasturi, D.J.D., Larramendi, I.R.D., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M., 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* 30, 499–511. doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.004
98. Slavin, Y.N., Asnis, J., Häfeli, U.O., Bach, H., 2017. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology* 15. doi:10.1186/s12951-017-0308-z
99. Tayel, A.A., El-Tras, W.F., Moussa, S., El-Baz, A.F., Mahrous, H., Salem, M.F., Brimer, L., 2011. Antibacterial Action Of Zinc Oxide Nanoparticles Against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Safety* 31, 211–218. doi:10.1111/j.1745-4565.2010.00287.x



- 100.** Stan, M., Popa, A., Toloman, D., Silipas, T.-D., Vodnar, D.C., 2016. Antibacterial and Antioxidant Activities of ZnO Nanoparticles Synthesized Using Extracts of *Allium sativum*, *Rosmarinus officinalis* and *Ocimum basilicum*. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)* 29, 228–236. doi:10.1007/s40195-016-0380-7
- 101.** Gaddala, B., Nataru, S., 2014. Biological Synthesis of Zinc oxide Nanoparticles from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Leaf extract and validation for antibacterial activity. *International Journal of Drug Development & Research* 6, 208–214.
- 102.** Elumalai, K., Velmurugan, S., 2015. Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). *Applied Surface Science* 345, 329–336. doi:10.1016/j.apsusc.2015.03.176
- 103.** Azam, A., Ahmed, Oves, Khan, Habib, Memic, A., 2012. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine* 6003. doi:10.2147/ijn.s35347
- 104.** Iqbal, J., Abbasi, B.A., Mahmood, T., Kanwal, S., Ahmad, R., Ashraf, M., 2019. Plant-extract mediated green approach for the synthesis of ZnONPs: Characterization and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant potentials. *Journal of Molecular Structure* 1189, 315–327. doi:10.1016/j.molstruc.2019.04.060
- 105.** Mirza, A.U., Kareem, A., Nami, S.A., Bhat, S.A., Mohammad, A., Nishat, N., 2019. *Malus pumila* and *Juglen regia* plant species mediated zinc oxide nanoparticles: Synthesis, spectral characterization, antioxidant and antibacterial studies. *Microbial Pathogenesis* 129, 233–241. doi:10.1016/j.micpath.2019.02.020
- 106.** Vargas-Reus, M.A., Memarzadeh, K., Huang, J., Ren, G.G., Allaker, R.P., 2012. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-



- implantitis pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents* 40, 135–139. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.04.012
- 107.** Wang, J., Du, L., Fu, Y., Jiang, P., Wang, X., 2019. ZnO nanoparticles inhibit the activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinomyces naeshundii* and promote the mineralization of the cementum. *BMC Oral Health* 19. doi:10.1186/s12903-019-0780-y
- 108.** Modaresi, F., 2017. The Use of Synergistically Antiplaque Nanoparticles In Treating Dental Caries. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy* 6. doi:10.15406/jdhodt.2017.06.00214
- 109.** Khan, S.T., Al-Khedhairi, A.A., Musarrat, J., Ahamed, M., 2016. Application of nanoparticles in oral hygiene. *Biomaterials and Tissue Engineering Bulletin* 3, 35–49. doi:10.33263/bteb314.035049
- 110.** Ahrari, F., Eslami, N., Rajabi, O., Ghazvini, K., Barati, S., 2015. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sangius* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dental Research Journal* 12, 44. doi:10.4103/1735-3327.150330
- 111.** Zhang, S., 2014. Dental Caries and Vaccination Strategy against the Major Cariogenic Pathogen, *Streptococcus mutans*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 14, 960–966. doi:10.2174/1389201014666131226144339
- 112.** Sampaio-Mai, B., Monteiro-Silva, F., 2014. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dental Research Journal* 11, 291–301.
- 113.** Lamont, R.J., Hajishengallis, G., Koo, H., Jenkinson, H.F., 2019. *Oral microbiology and immunology*. ASM Press, Washington, DC.
- 114.** Raghunath, A., Perumal, E., 2017. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49, 137–152. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011



- 115.** Lynch, I., Dawson, K.A., 2020. Protein–Nanoparticle Interactions. *Nano-Enabled Medical Applications* 231–250. doi:10.1201/9780429399039-8
- 116.** Aggarwal, P., Hall, J.B., Mcleland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., Mcneil, S.E., 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 428–437. doi:10.1016/j.addr.2009.03.009
- 117.** Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design* 2011; 7: 146–157. doi: 10.2174/157340911795677602
- 118.** McConkey BJ, Sobolev V, Edelman M. The performance of current methods in ligand–protein docking. *Current Science* 2002; 83: 845–856.
- 119.** Yuriev, E., Holien, J., Ramsland, P.A., 2015. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012–2013 in review. *Journal of Molecular Recognition* 28, 581–604. doi:10.1002/jmr.2471
- 120.** Ferreira, L., Santos, R.D., Oliva, G., Andricopulo, A., 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* 20, 13384–13421. doi:10.3390/molecules200713384
- 121.** Abdali, N., Parks, J.M., Haynes, K.M., Chaney, J.L., Green, A.T., Wolloscheck, D., Walker, J.K., Rybenkov, V.V., Baudry, J., Smith, J.C., Zgurskaya, H.I., 2016. Reviving Antibiotics: Efflux Pump Inhibitors That Interact with AcrA, a Membrane Fusion Protein of the AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump. *ACS Infectious Diseases* 3, 89–98. doi:10.1021/acsinfecdis.6b00167
- 122.** Weidenmaier, C., Peschel, A., 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* 6, 276–287. doi:10.1038/nrmicro1861
- 123.** Eiff, C.V., Heilmann, C., Peters, G., 1999. New Aspects in the Molecular Basis of Polymer-Associated Infections due to *Staphylococci*. *European*



Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 18, 843–846.  
doi:10.1007/s100960050417

- 124.** Ali, J., Irshad, R., Li, B., Tahir, K., Ahmad, A., Shakeel, M., Khan, N.U., Khan, Z.U.H., 2018. Synthesis and characterization of phytochemical fabricated zinc oxide nanoparticles with enhanced antibacterial and catalytic applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 183, 349–356. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.05.006
- 125.** Sivakumar, P., Lee, M., Kim, Y.-S., Shim, M.S., 2018. Photo-triggered antibacterial and anticancer activities of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B* 6, 4852–4871. doi:10.1039/c8tb00948a
- 126.** Jiang, S., Lin, K., Cai, M., 2020. ZnO Nanomaterials: Current Advancements in Antibacterial Mechanisms and Applications. *Frontiers in Chemistry* 8. doi:10.3389/fchem.2020.00580
- 127.** Dutta, R., Nenavathu, B.P., Gangishetty, M.K., Reddy, A., 2012. Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94, 143–150. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.046
- 128.** Nair, S., Sasidharan, A., Rani, V.V.D., Menon, D., Nair, S., Manzoor, K., Raina, S., 2008. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20, 235–241. doi:10.1007/s10856-008-3548-5
- 129.** Beveridge, T.J., 1999. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology* 181, 4725–4733. doi:10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999
- 130.** Niño-Martínez, N., Orozco, M.F.S., Martínez-Castañón, G.-A., Méndez, F.T., Ruiz, F., 2019. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal



and Metal Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2808. doi:10.3390/ijms20112808

- 131.** Li, H., Chen, Q., Zhao, J., Urmila, K., 2015. Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultrasmall metal nanoparticles. *Scientific Reports* 5. doi:10.1038/srep11033
- 132.** Allaker, R.P., 2011. The Use of Antimicrobial Nanoparticles to Control Oral Infections. *Nano-Antimicrobials* 395–425. doi:10.1007/978-3-642-24428-5\_14
- 133.** Allaker, R., 2010. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *Journal of Dental Research* 89, 1175–1186. doi:10.1177/002203451037779
- 134.** Skoog, D.A., Leary, J.J., 1999. *Análisis instrumental*. MacGraw-Hill, Madrid.
- 135.** Sorrivas de Lozano, V., Morales, A., Yañez, M.J., 2014. *Principios y práctica de la Microscopía Electrónica*.
- 136.** Felpeto Josefina Méndez, Villanueva Esperanza Cerdán, María Rodríguez Torres Ana, 1994. *Técnicas de microscopía, micromanipulación y análisis de imagen*. Universidade da Coruña. Servizo de Publicacións, La Coruña.
- 137.** Inkson, B.J., 2016. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* 17–43. doi:10.1016/b978-0-08-100040-3.00002-x
- 138.** Reimer, L., Kohl, H., 2010. *Transmission electron microscopy: physics of image formation*. Springer, New York, NY.
- 139.** Reimer, L., 1984. *Transmission electron microscopy*. Springer-Verlag, Berlin.



- 140.** Spence, J.C.H., 1988. Experimental high-resolution electron microscopy. New York: Oxford U. Press.
- 141.** Osborne, B.G., Fearn, T., 1988. Near infrared spectroscopy in food analysis. Longman Scientific et Technical, Burnt Mill, Harlow.
- 142.** Aparicio R., Harwood, J.L., 2013. Handbook of olive oil: analysis and properties. Springer, New York.
- 143.** Sun, D.W., 2009. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Academic Press/Elsevier, Amsterdam.
- 144.** Rodríguez, E., Villegas, E., 1969. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y Materiales* 2, 25–32. doi:10.15517/mym.v2i1.13470
- 145.** Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493–496. doi:10.1093/ajcp/45.4\_ts.493
- 146.** García, L.S., Isenberg, H.D., 2010. Clinical microbiology procedures handbook. ASM Press, Washington, DC.
- 147.** Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J., 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 935–949. doi:10.1038/nrd1549
- 148.** Feig, M., Onufriev, A., Lee, M.S., Im, W., Case, D.A., Brooks, C.L., 2003. Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures. *Journal of Computational Chemistry* 25, 265–284. doi:10.1002/jcc.10378



## 11. APÉNDICES

### Apéndice A. Publicaciones derivadas del proyecto de investigación

❖ **Título:** Green synthesis of ZnO nanoparticles using a *Dysphania ambrosioides* extract. Structural characterization and antibacterial properties.

**Autores:** Rafael Álvarez-Chimal, Víctor Irahuen García-Pérez, Marco Antonio Álvarez-Pérez, Jesús Ángel Arenas-Alatorre.

**Revista:** Materials Science & Engineering C (factor de impacto 2020: 7.328).

**Año:** 2021

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111540>

❖ **Título:** Influence of the particle size on the antibacterial activity of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Dysphania ambrosioides* extract, supported by molecular docking analysis.

**Autores:** Rafael Álvarez-Chimal, Víctor I. García-Pérez, Marco Antonio Álvarez-Pérez, Rosario Tavera-Hernández, Lorena Reyes-Carmona, Miryam Martínez-Hernández, Jesús Ángel Arenas-Alatorre.

**Revista:** Arabian Journal of Chemistry (factor de impacto 2020: 5.165).

**Año:** 2022

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103804>



## Apéndice B. Difracción de rayos X

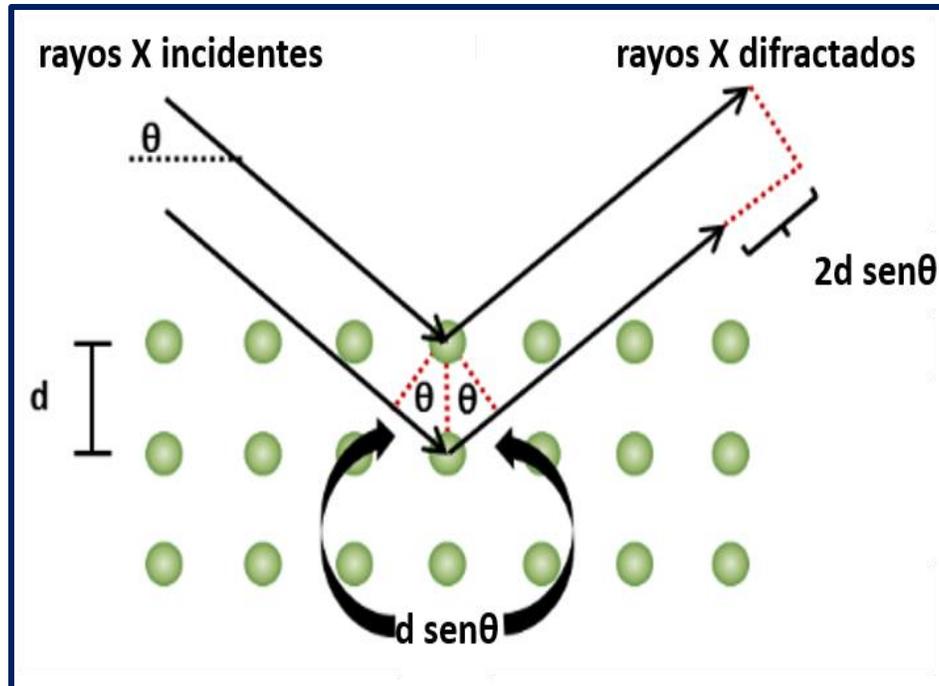
El fundamento de las técnicas de difracción de rayos X se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de rayos X, esta estructura cristalina consiste en la repetición periódica de los átomos o moléculas en las tres direcciones del espacio [134].

Sobre esta estructura tridimensional se pueden trazar planos infinitos paralelos que pasarán por una serie de puntos. Si se toma uno de estos planos, a una cierta distancia existirá otro plano donde la distribución de puntos que corta será la misma, a la distancia entre estos dos planos se llama distancia interplanar “d”, por lo tanto, se tendrán planos infinitos paralelos a distancias múltiplos de “d”. Si por dos de estos planos de la estructura se hace incidir un haz de rayos X, se da el siguiente fenómeno: Si el frente de ondas que se difracta por el primer plano lo hace con un ángulo  $\theta$ , el frente de ondas del segundo plano también se va difractar con un ángulo  $\theta$ , con esta nueva trayectoria que se describe si los dos frentes no están en fase ocurre una interferencia destructiva y se anula uno al otro, pero si los dos salen en fase, hay una interferencia constructiva y el haz difractado no se anula y es detectable, esto ocurre cuando la diferencia de recorrido entre los dos frentes es un múltiplo de la longitud de onda  $\lambda$  esto se expresa con la Ley de Bragg mediante la ecuación:  $2d\sin\theta = n\lambda$  [134] (Figura B.1).

Como cada familia de planos tiene una distancia d, se detectan estos planos a diferentes ángulos, y los resultados serán diferentes según la estructura de lo que se está midiendo, por lo que se caracteriza las fases que componen la muestra en base a las diferentes señales de detección que son las reflexiones de los planos de cada



fase, para una rápida identificación se tienen tabulados los valores de las diferentes fases en fichas y se comparan con los resultados obtenidos [134].



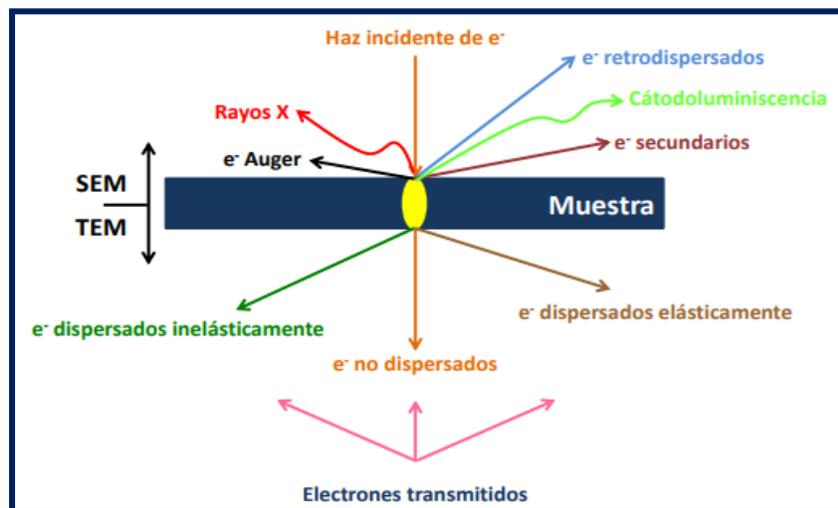
**Figura B.1.** Interacción de un cristal con los rayos X [134]



## Apéndice C. Microscopía electrónica de barrido

El principio del sistema de microscopía electrónica de barrido (SEM) consiste en que si se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones finamente enfocado, al interactuar con la muestra, emite señales que pueden registrarse con ayuda de detectores y una pantalla de alta resolución [135].

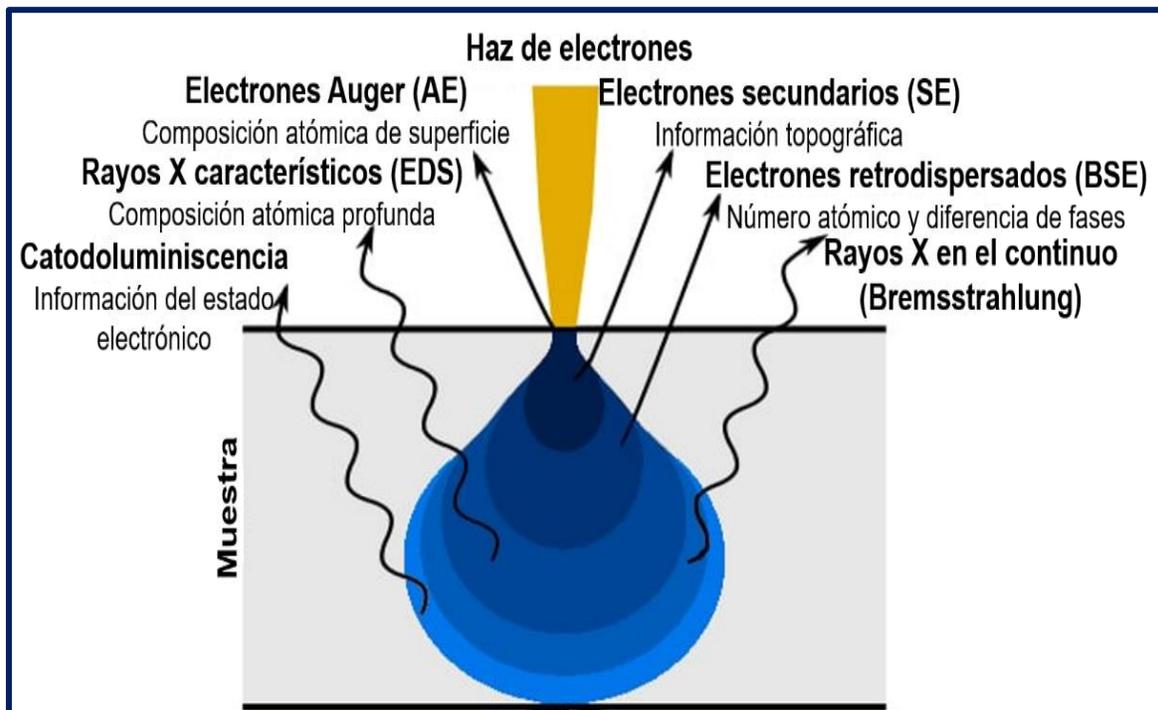
Un electrón interactúa con la materia de diversas formas. Los electrones incidentes, chocan con la superficie de la muestra e interactúan elástica e inelásticamente con los átomos que la componen. Como consecuencia de esto, se producen rayos X característicos, luz visible, electrones Auger, electrones retrodispersados, electrones secundarios, catodoluminiscencia y si la muestra es delgada, electrones difractados, electrones transmitidos y electrones no dispersados (Figura C.1). Cada uno de estos fenómenos es portador de una información característica de la muestra y es captado por detectores específicos [135,136].



**Figura C.1.** Principales señales que tienen lugar en un sólido cuando es bombardeado por un haz de electrones [135].



Cuando un haz de electrones choca contra una muestra, los electrones incidentes penetran en el material una distancia que es directamente dependiente de la energía del haz e inversamente dependiente del número atómico de los átomos que componen la muestra. La región en la cual los electrones penetran la muestra se conoce como volumen de excitación primaria [135] (Figura C.2).



**Figura C.2.** Volumen de excitación primaria [135]

La profundidad de penetración y el volumen de excitación aumentan con el incremento de la energía del haz incidente y decrece con el incremento del número atómico. Una muestra compuesta por átomos de alto número atómico tendrá más partículas disponibles para detener la penetración del haz, que un material compuesto de elementos de bajo número atómico. Con el incremento de la energía del haz los electrones pueden penetrar más profundamente en la muestra, por lo



tanto, el volumen de excitación aumenta su diámetro y profundidad. Esto provocará una pérdida del detalle de la estructura superficial en la imagen debido al incremento de la generación de señales adicionales [136,137].

Electrones secundarios (SE): son emitidos desde la muestra como consecuencia de las ionizaciones surgidas de las interacciones inelásticas. Poseen baja energía (<50 eV). Brindan una imagen de la morfología superficial de la muestra.

Electrones retrodispersados (BSE): Poseen alta energía (>50 eV), algunos electrones primarios son reflejados o retrodispersados tras interactuar con los átomos de la muestra. La intensidad de emisión de estos electrones está directamente relacionada con el número atómico medio de los átomos de la muestra ( $Z$  promedio), así los átomos más pesados producen mayor cantidad de electrones retrodispersados, permitiendo la obtención de imágenes de composición química y topografía de la superficie.

Rayos X característicos (EDS): Este tipo de señal se produce cuando un electrón de un orbital interno de un átomo es desalojado por un electrón del haz incidente. La vacancia es llenada con un electrón de un orbital más externo. En este salto el exceso de energía es liberado en forma de radiación electromagnética (rayos X). Se sabe que cada orbital tiene una cantidad discreta de energía que es característica para cada elemento. Por lo tanto, la diferencia de energía entre orbitales es también una cantidad discreta y característica de un átomo en particular. La EDS brinda información sobre la composición elemental de la muestra, a partir del carbono y con una sensibilidad de hasta 1000 ppm.



**Electrones Auger:** Cuando un electrón de una capa externa llena una vacancia de una capa más interna, el exceso de energía puede inducir la eyección de un electrón de un orbital externo; convirtiendo esta energía en energía cinética. Este electrón es llamado electrón Auger. La energía de este electrón es aproximadamente igual a la diferencia de energía entre los orbitales involucrados en la transición. La emisión Auger es más alta en elementos de bajo número atómico debido a que los electrones están débilmente ligados al núcleo.

**Catodoluminiscencia:** Es la emisión de fotones en longitudes de onda en las regiones de ultravioleta, visible o infrarrojo, para disipar el exceso de energía que se genera en la transición electrónica entre orbitales. Esta técnica permite realizar estudios de concentración de impurezas en un material.

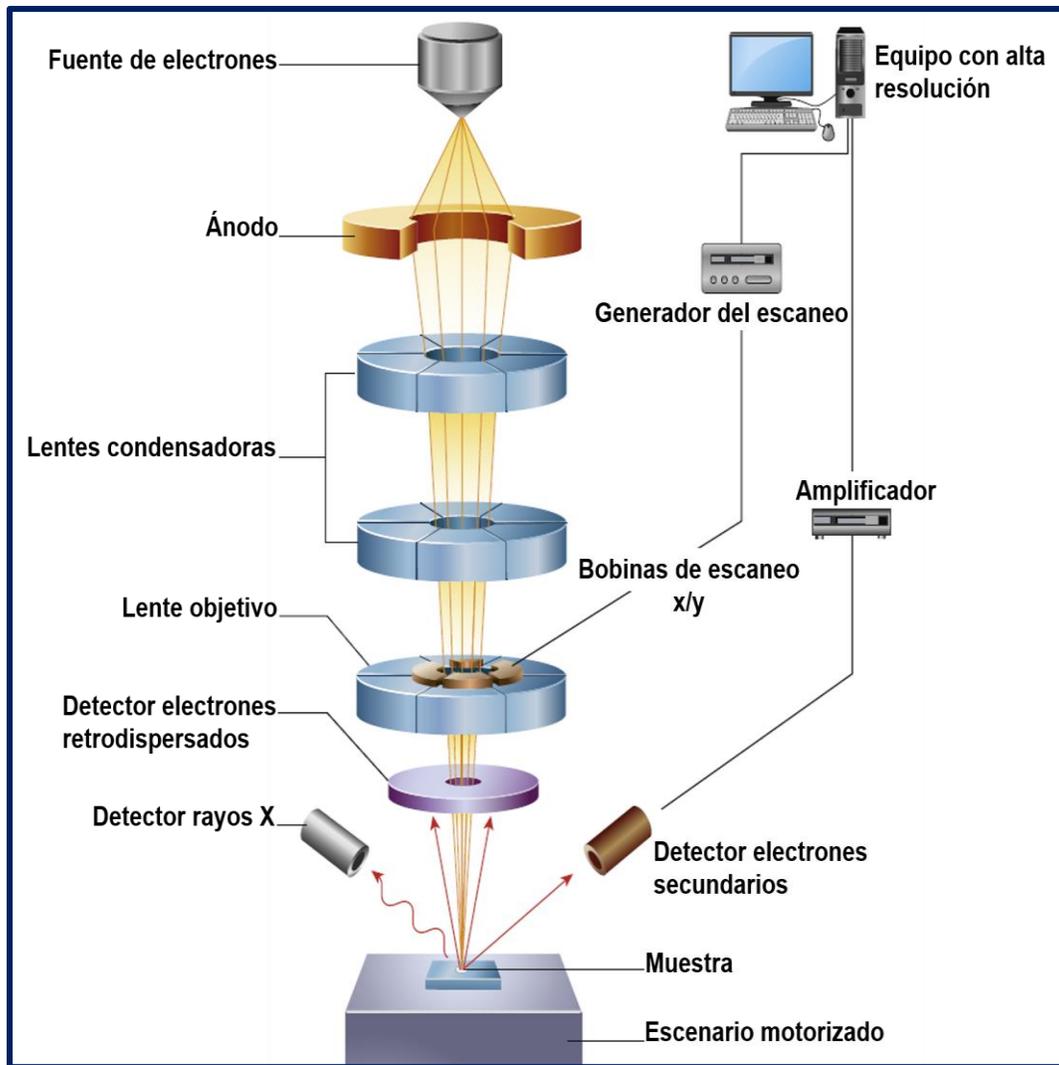
**Bremsstrahlung:** Esto ocurre cuando un electrón incidente interactúa inelásticamente con el núcleo atómico, como consecuencia de esto se desacelera y provoca la emisión de rayos X, que no son característicos de ningún elemento. También se denomina radiación blanca o rayos X en el continuo.

En el microscopio electrónico de barrido (Figura C.3), el haz electrónico, atraviesa la columna y llega a la muestra. Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz, de manera que barra la muestra punto a punto. De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores específicos para cada una de ellas. El detector capta una señal y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla [137].



El microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FESEM), es un instrumento que al igual que el SEM es capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un intervalo de energía mucho mayor. El funcionamiento es igual al de un SEM convencional; se barre un haz de electrones sobre la superficie de la muestra mientras que en un monitor se visualiza la información en función de los detectores disponibles [137].

La mayor diferencia entre un FESEM y un SEM reside en el sistema generación de electrones. El FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales, (0.02 - 5 kV); esto ayuda a minimizar el efecto de carga en muestras no conductores y a evitar daños en muestras sensibles al haz electrónico. Otra característica muy destacable de los FESEM es la utilización de detectores dentro de la lente. Estos detectores están optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración, por lo que son fundamentales para obtener el máximo rendimiento al equipo [137].



**Figura C.3.** Componentes de un microscopio electrónico de barrido [137]

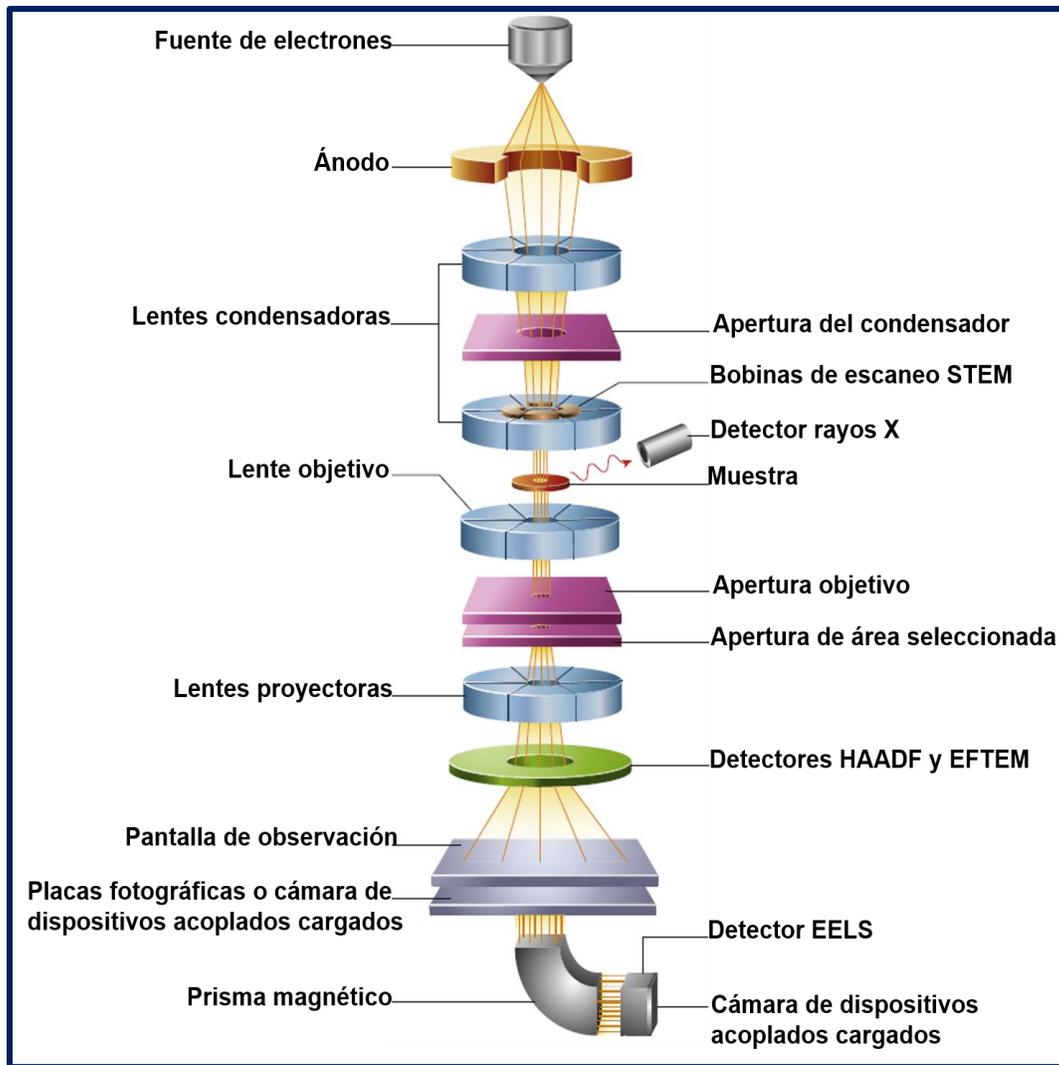


## **Apéndice D. Microscopía electrónica de transmisión**

En la microscopía electrónica de transmisión (TEM) una fracción de los electrones atraviesan sin desviar el haz de electrones, con ellos se forman las imágenes de campo claro. Si la muestra es cristalina, otra fracción de los electrones son difractados al pasar a través de la muestra generando un patrón de difracción, que es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones [137,138] (Figura D.1).

Hay que tener en cuenta el espesor de la muestra y de las condiciones de focalización. Muestras muy delgadas son los ideales (espesor  $<100$  nm) [137].

La dispersión de los electrones puede ser elástica o inelástica. En el caso de la dispersión elástica, los electrones interactúan con el potencial electrostático del núcleo atómico. Este potencial desvía los electrones incidentes sin ninguna pérdida de energía apreciable, por tanto, es posible, con la detección de estos electrones, obtener imágenes por contraste, imágenes de difracción de electrones e imágenes de alta resolución (HRTEM). Por otra parte, en el caso de la dispersión inelástica, los electrones pueden transferir energía a diferentes grados de libertad del átomo. Esta transferencia puede causar excitación o ionización de los electrones, vibraciones en la red cristalina y la posibilidad de calentamiento de la muestra, obteniendo así imágenes por microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM), imágenes por filtrado de energía (EFTEM), imágenes de campo oscuro a ángulo grande (HAADF) y espectroscopía por pérdida de energía de electrones (EELS) [138].



**Figura D.1.** Componentes de un microscopio electrónico de transmisión [137]

Las imágenes de TEM están afectadas por el efecto óptico del microscopio. Las lentes que se utilizan en un TEM son lentes electromagnéticas, las cuales sufren defectos como la coma, el astigmatismo, las aberraciones cromáticas y esféricas. La lente objetivo es la más importante, ya que esta determina la resolución del microscopio [137,139].



La técnica de HRTEM permite obtener imágenes de la estructura cristalográfica de una muestra a escala atómica. Para utilizar esta resolución directamente con el TEM deben utilizarse correctores para la aberración esférica y cromática para alcanzar resoluciones de hasta  $0.5 \text{ \AA}$  ( $0.05 \text{ nm}$ ). A esta pequeña escala se pueden obtener imágenes de átomos individuales y defectos cristalinos [140].

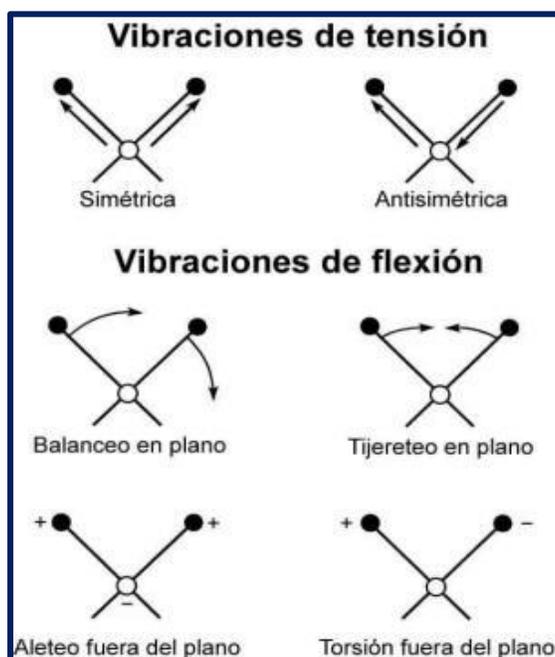
Esta técnica utiliza el contraste de la interferencia en el plano de la muestra de las ondas de electrones con sí mismas para generar las imágenes, pero es importante que la muestra sea lo suficientemente delgada para que los electrones que la atraviesan sean atraídos por los potenciales positivos de los núcleos atómicos, y los canales a lo largo de las columnas de átomos de la red cristalográfica, y al mismo tiempo, la interacción entre la onda de electrones en las diferentes columnas de átomos conduce a la difracción de Bragg, con el propósito de que las variaciones de amplitud solo afecten ligeramente a la imagen y así observar los átomos [140].



## Apéndice E. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Esta espectroscopía se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja (IR) por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante radiación IR [141].

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión (Figura E.1.). Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces [142].



**Figura E.1.** Modos de vibración de las moléculas al absorber la radiación IR [141].



En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como  $O_2$  y  $Br_2$ ) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al IR. De esta forma, analizando cuales son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del IR, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia [142].

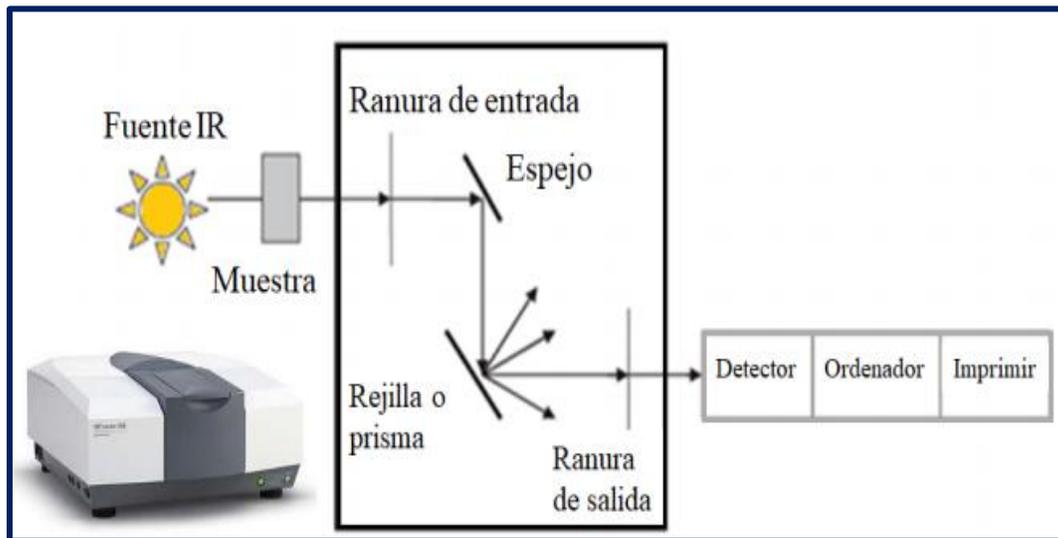
La espectroscopía de absorción IR es el método utilizado para determinar las estructuras de moléculas con características de absorción de la radiación IR según su vibración molecular. La región IR va de  $12800$  a  $10$   $cm^{-1}$  y se puede dividir en la región de IR cercano (NIR) ( $12800$ - $4000$   $cm^{-1}$ ), IR medio ( $4000$ - $400$   $cm^{-1}$ ) e IR lejano o FAR-IR ( $50$ - $400$   $cm^{-1}$ ). El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de esta molécula [142].

El análisis por FTIR funciona de la siguiente manera [143] (Figura E.2):

- ❖ La luz emitida por una fuente que produce todo el espectro completo de longitudes de onda, se hace pasar por un dispositivo llamado interferómetro.
- ❖ El interferómetro modifica la luz de una manera particular que permite el consiguiente procesamiento de datos.
- ❖ El haz de luz atraviesa la muestra y esta absorbe parte de la energía.
- ❖ Al otro lado, un detector recibe el haz de luz que deja pasar la muestra y lo envía a una computadora.



- ❖ La computadora procesa toda la información, infiere cuál es la absorción correspondiente a cada longitud de onda y genera un espectro utilizando la técnica de la transformada de Fourier.



**Figura E.2.** Fundamento del equipo de IR [143]



## Apéndice F. Termogravimetría

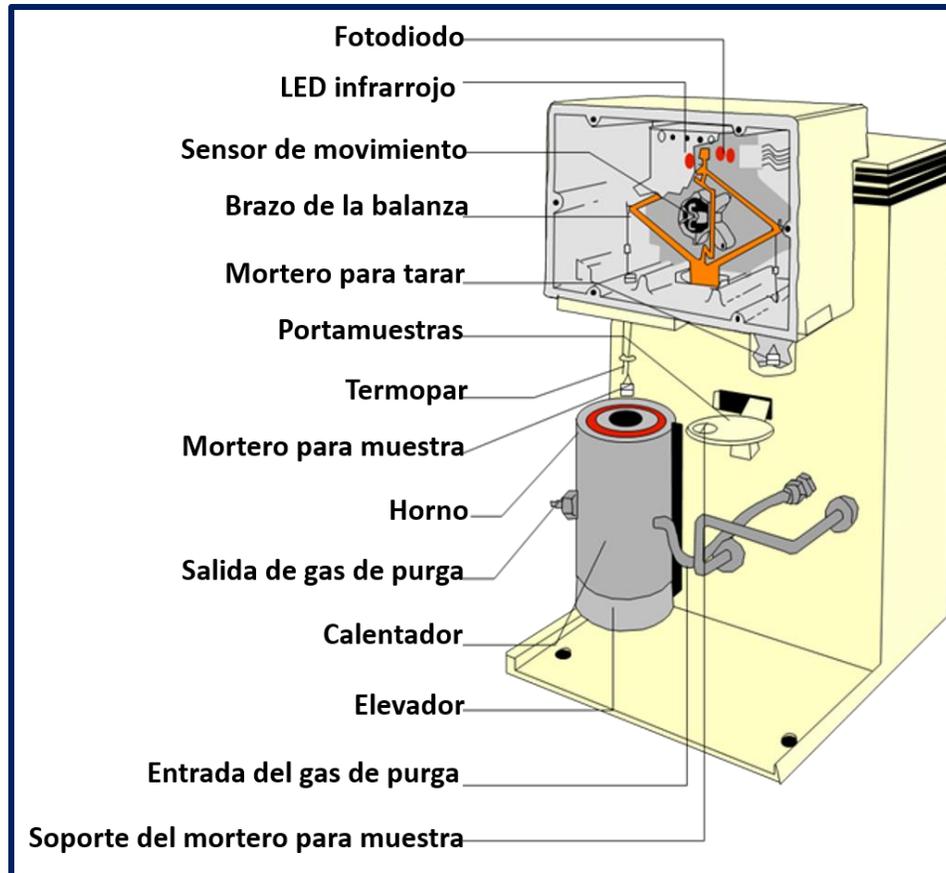
Los efectos del calor sobre los materiales pueden ser varios y producir cambios en muchas de sus propiedades. En la termogravimetría se mide el cambio (ganancia o pérdida) de peso y la tasa a la que este cambia como función de la temperatura, tiempo y atmósfera. Estas medidas son mayormente usadas para determinar la composición de materiales o predecir su estabilidad termal [144].

El aparato para realizar este ensayo se llama termoanalizador (Figura F.1), en el cual se establece un equilibrio físico mediante un mortero hecho de un material resistente al calor (platino o alúmina). El mortero contiene la muestra que va a estar sujeta al incremento de temperatura. Durante todo el procedimiento de calentamiento, la atmósfera del horno se mantiene por el influjo de una mezcla gaseosa inerte u oxidativa. El gas sale del horno a través de un orificio de salida. Antes de que comience el análisis, el equilibrio físico se establece en una posición nula. Cualquier disminución en la masa de la muestra inicial “ $m_1$ ” conduce a una alteración en el nivel nulo del equilibrio físico. Esto inicia un mecanismo de corriente eléctrica a través de fotodiodos, lo que hace que la balanza vuelva a su posición nula. La cantidad de corriente eléctrica utilizada para restablecer el equilibrio a su nivel inicial depende del grado de reducción de masa, que ahora es “ $m_2$ ”, por lo tanto, el cambio en la masa ( $m_1 - m_2$ ) se puede cuantificar [144].

Los datos del cambio en la masa se pueden enviar al software de la computadora. Esto permite realizar un gráfico de la disminución de la masa de la muestra en función del aumento de la temperatura (termograma). El gráfico puede representar si la muestra sufrió cambios en la masa, la disminución constante de la



masa seguida de una meseta (contenido de humedad), la descomposición de masa en una o varias etapas y el aumento de la masa (reacción oxidativa) [144].



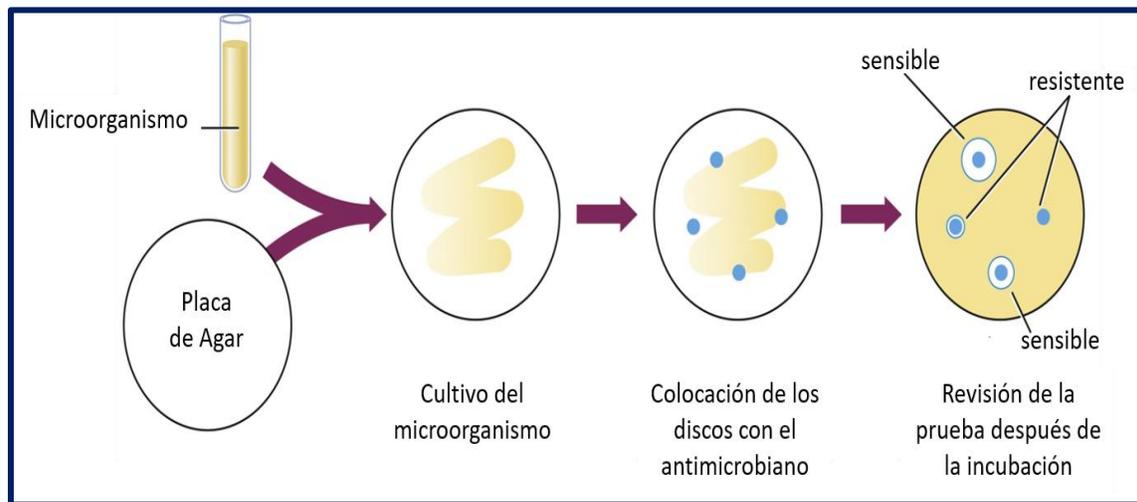
**Figura F.1.** Componentes de un termoanalizador [144]



## Apéndice G. Prueba de difusión en disco

En la prueba de difusión en disco se usa el método de Kirby-Bauer. El microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, después, sobre ésta se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano a evaluar. Las placas se incuban bajo las condiciones específicas de crecimiento de los microorganismos. Durante la incubación, el antimicrobiano difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antimicrobiano en el medio es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio [145] (Figura G.1).

El diámetro del halo de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible o resistente.



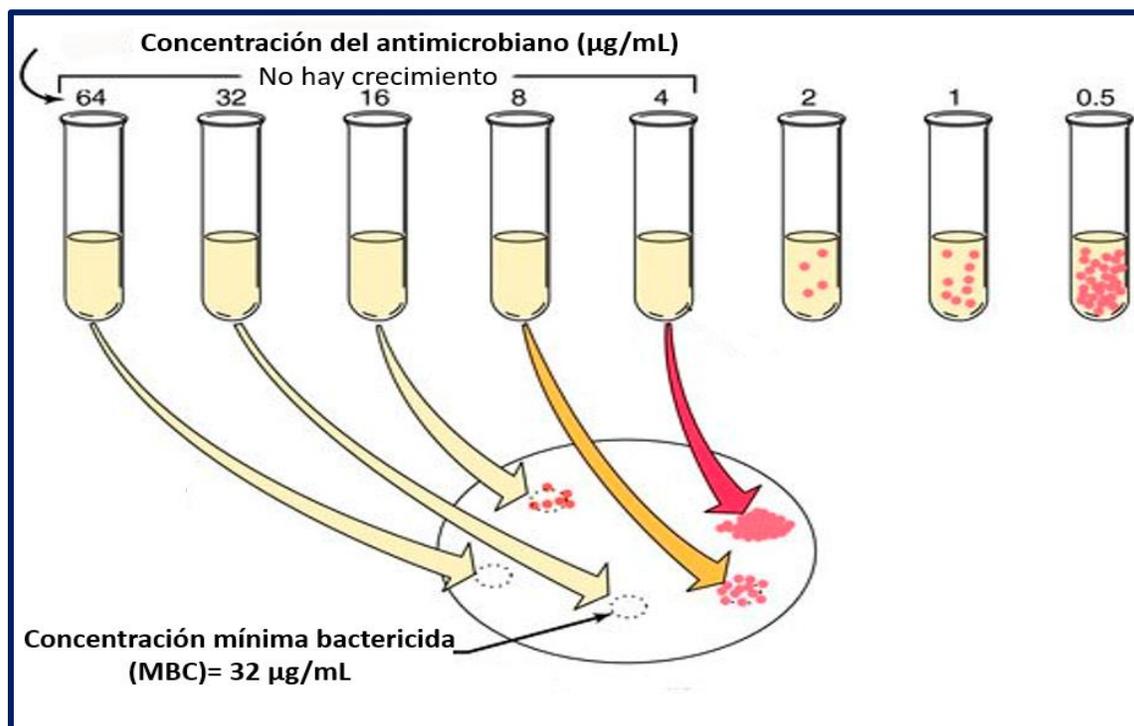
**Figura G.1.** Procedimiento para la prueba de difusión en disco por el método de Kirby-Bauer [146]



## Apéndice H. Concentración mínima bactericida

La concentración mínima bactericida o MBC por sus siglas en inglés, se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99.9 % de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas) [146].

El método consiste en hacer diluciones seriadas del antimicrobiano, después a los tubos se les inocula el microorganismo y se deja incubar un tiempo determinado, pasado el tiempo, el contenido de los tubos se siembra en placas de agar, la concentración a la cual ya no hay crecimiento bacteriano se le denomina concentración mínima bactericida [146] (Figura H.1).



**Figura H.1.** Procedimiento para determinar la concentración mínima bactericida [146]



## Apéndice I. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es usado para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña, que serán candidatos a fármacos, con la proteína que será donde ejercerán su acción, con lo que se podrá predecir la afinidad y la actividad de la molécula pequeña (Figura I.1). Y es por eso que este método tiene un rol muy importante en el diseño racional de fármacos. Dada la importancia biológica y farmacéutica, se han hecho grandes esfuerzos buscando mejorar el método usado para predecir el acoplamiento molecular [147].

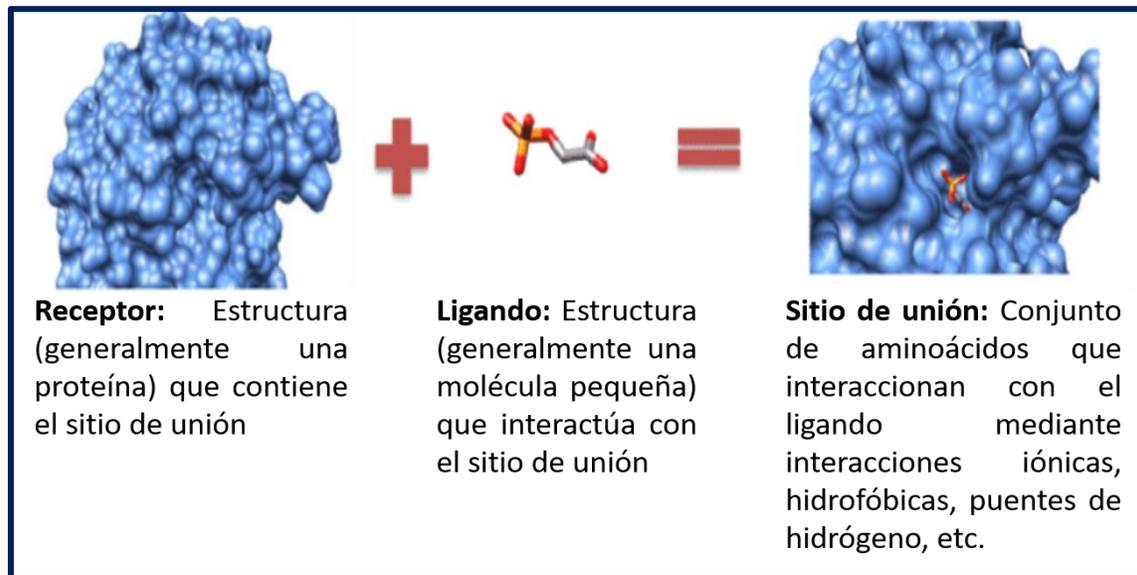
El enfoque de esto es simular computacionalmente el proceso de reconocimiento celular. El objetivo es alcanzar una conformación óptima tanto para la proteína, como para su ligando, haciendo que la orientación entre estos minimice la energía libre [147].

Para hacer un análisis del acoplamiento, primero se necesita la estructura de la proteína. La estructura de esta proteína y la base de datos de ligandos potenciales sirven como los valores a ingresar en el programa que calcula el acoplamiento. El éxito del programa depende de dos factores: el algoritmo de búsqueda y la función de puntuación [148].

- ❖ La búsqueda del algoritmo consiste en la búsqueda espacial de todas las conformaciones y orientaciones posibles que puede haber en el conjunto proteína-ligando.
- ❖ La función de puntuación toma una pose como dato a introducir y entrega un número indicando si la interacción puede ser favorable. La mayoría de las



funciones de puntuación están basadas en la mecánica de la física molecular por campos de fuerza que estiman la energía de la pose; baja (negativa) energía indica un sistema estable y por tanto con una posibilidad mayor a que así se dé la interacción.



**Figura I.1.** Fundamento del análisis de acoplamiento molecular [148]