



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

UNIVERSIDAD DE LEÓN

# FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL ZINC

## BIOLOGICAL FUNCTIONS OF ZINC

ADÁN LESTEGÁS SOTO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

JULIO DE 2021



# ÍNDICE

1. Objetivos.....	- 1 -
2. Introducción.....	- 1 -
2.1. Propiedades del zinc.....	- 1 -
2.2. Zinc y plantas.....	- 2 -
2.3. Animales.....	- 4 -
3. Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs).....	- 9 -
4. Síntesis de las ZnO-NPs.....	- 10 -
4.1. Métodos físicos.....	- 11 -
4.1.1. Evaporación térmica.....	- 11 -
4.2. Métodos químicos.....	- 12 -
4.2.1. Precipitación química.....	- 12 -
4.2.2. Sol-Gel síntesis.....	- 12 -
4.2.3. Transporte de vapor.....	- 13 -
4.3. Métodos biológicos.....	- 14 -
5. Usos de las ZnO-NPs.....	- 15 -
5.1. Agentes anti microbianos.....	- 16 -
5.2. Terapia anti cáncer.....	- 17 -
5.2.1. Inducción de apoptosis.....	- 18 -
5.2.2. Autofagia.....	- 19 -
5.2.3. Envío dirigido de fármacos.....	- 21 -
5.3. Otras.....	- 23 -
6. Conclusiones.....	- 24 -
7. Referencias.....	- 25 -



## RESUMEN

El zinc es el segundo elemento traza más abundante en los animales y uno de los micronutrientes más importantes en plantas. Su homeostasis, funciones y los efectos que tienen las deficiencias y excesos de este metal en el organismo son analizados en este trabajo para comprender su importancia en estos seres vivos. Por otra parte, el trabajo se centra fundamentalmente en el estudio de las nanopartículas de óxido de zinc. Estos novedosos compuestos formados por zinc y oxígeno atraen cada vez más atención dentro de la comunidad científica debido a sus interesantes propiedades y a las potenciales funciones que poseen. Se explica en qué consisten estas partículas, cuáles son las formas de síntesis más comunes y sus funciones más importantes, siempre desde el punto de vista biológico. Para terminar, se exponen una serie de conclusiones que permiten establecer en qué punto se encuentra la investigación de estas nanopartículas, de qué forma se puede avanzar en este campo y finalmente se destaca la importancia de estos compuestos, sobre todo en los campos de la investigación biomédica y clínica.

**Palabras clave:** Biomedicina, cáncer, nanopartículas, óxido de zinc, sistemas biológicos, zinc.

## ABSTRACT

Zinc is the second most abundant trace element in animals and one of the most important micronutrients in plants. Its homeostasis, functions and the effects that deficiencies and excesses can produce in the organism are analyzed in this work to understand its importance in these living organisms. On the other hand, the work focuses fundamentally on the study of the zinc oxide nanoparticles. These novel zinc and oxygen compounds are attracting more and more attention within the scientific community due to their interesting properties and the potential functions they possess. It explains what these particles consist of, what are the most common forms of synthesis and their more important functions, always from a biological point of view. To sum up, a series of conclusions are presented that allow us to establish at what point the research of these nanoparticles is, in what ways we can advance in this field and finally the importance of these compounds is highlighted, especially in the fields of biomedical and clinical research.

**Keywords:** Biological systems, biomedicine, cancer, nanoparticles, zinc, zinc oxide.



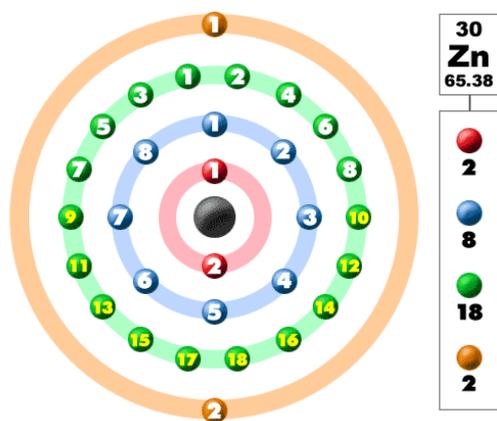
## 1. Objetivos.

En este trabajo se pretende realizar un estudio del zinc basado en sus funciones en los sistemas biológicos para conocer su relevancia. Además, se profundizará de forma específica en un novedoso modo de utilización de este metal, las nanopartículas de óxido de zinc: qué son, cómo se pueden sintetizar y de qué formas pueden ser utilizadas en un ámbito biomédico y de investigación.

## 2. Introducción.

### 2.1. Propiedades del zinc.

El zinc es un metal de transición que se encuentra en el grupo 12, periodo 4 de la tabla periódica, tiene número atómico 30 y su símbolo es Zn. Tiene cinco isótopos estables:  $^{64}\text{Zn}$  (48.63%),  $^{66}\text{Zn}$  (27.90%),  $^{67}\text{Zn}$  (4.90%),  $^{68}\text{Zn}$  (18.75%) y  $^{70}\text{Zn}$  (0.62%), dando una masa molecular media es de 65.38 u.m.a. En las plantas, se pueden encontrar en mayor proporción isótopos pesados en las raíces e isótopos ligeros en los brotes (Weiss *et al.*, 2005). Tiene otros isótopos que son inestables, unos 30, entre las masas atómicas de 54 y 83. El más estable dentro de este grupo es el  $^{65}\text{Zn}$ , con un tiempo de vida medio de 244.26 días. El zinc en disolución existe con un estado de oxidación de +2 y es estable frente a oxidaciones y reducciones debido a que tiene una configuración electrónica de  $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3d^{10}$  (**figura 1**) en este estado, con todos los orbitales completos. Tiene un radio iónico que varía entre 0.68 y 0.83 Å en función de cómo esté coordinado y tiene una ratio de radio-carga muy baja, lo que le permite comportarse como ácido de Lewis y formar enlaces covalentes fuertes con átomos de azufre, nitrógeno y oxígeno. El zinc es un metal de color blanco azulado con un punto de fusión de 692.68 K (420 °C) y punto de ebullición de 1180 K (907°C), por lo que se mantiene en estado sólido en condiciones normales (Barak y Helmke, 1993). Tiene roles muy importantes en el campo de la biología y, en este caso, se profundizará en sus funciones en plantas y en animales.

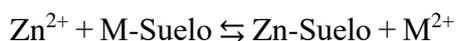


**Figura 1.** Diagrama de Bohr para el átomo de zinc. Se observan las capas completas hasta la capa d y más externamente una última capa con 2 electrones de valencia. Cuando el zinc pierde o comparte esos dos electrones adquiere una disposición estable, por eso aparece en forma de  $\text{Zn}^{+2}$  de manera natural. Fuente: <https://zincnews.weebly.com/diagrams.html>



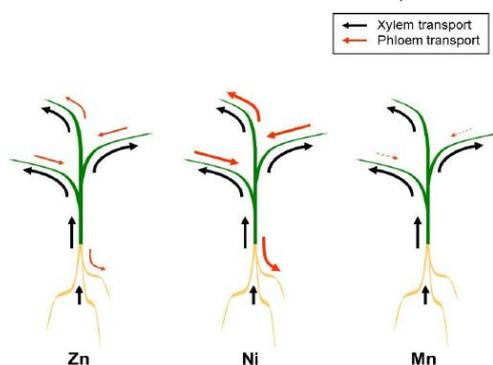
## 2.2. Zinc y plantas.

El zinc en las plantas es uno de los micronutrientes más importantes. Se encuentra en el suelo de cinco formas diferentes: diluido en agua, intercambiable, absorbido, quelado o en complejos de zinc y en función de la forma en la que se encuentre el metal en el suelo, será más fácil o más difícil de absorber por las plantas. Este metal puede ser transportado en forma de ion  $Zn^{2+}$  o unido a ácidos orgánicos, aunque también se cree que se puede tomar en forma de catión monovalente  $ZnOH^+$ . Por ejemplo, la absorción del zinc en forma intercambiable puede describirse sencillamente de la siguiente forma:



Donde M es cualquier otro catión divalente (Tsonev y Lidon, 2012).

El zinc se acumula en la zona de las raíces y vía simplasto y apoplasto entra al xilema, a través del cual se transporta hacia los brotes, donde se lleva hacia los órganos en desarrollo. Incluso, en caso de ser necesario, existe un movimiento vía floema desde las hojas más desarrolladas hacia los tejidos que lo necesiten. Este se cree que es el sistema principal, pero también se pueden observar concentraciones altas de este metal en el floema de las raíces, lo que parece indicar que el zinc puede ser absorbido y transportado mediante ambos xilema y floema según las necesidades del momento (Noulas *et al.*, 2018).

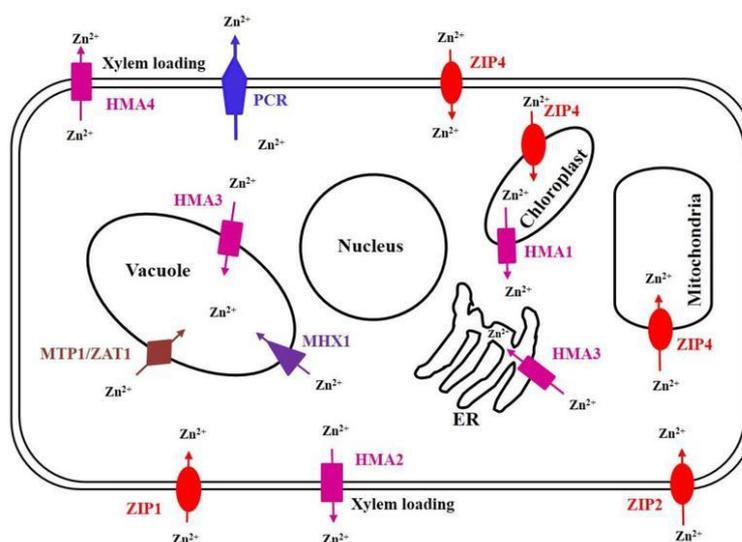


**Figura 2.** Diagrama de transporte vía xilema (flechas negras) y floema (flechas rojas) para tres micronutrientes importantes en las plantas, entre ellos, el zinc (Page y Feller, 2015).

En cuanto a los mecanismos moleculares de estos eventos, se han logrado muchos avances, sobre todo en los últimos 15 años. Gracias a la aplicación de diferentes técnicas de genética molecular, se han ido descubriendo un amplio número de genes implicados en el transporte de metales en plantas. En el caso del zinc, las primeras secuencias relacionadas con su transporte se identificaron en *Arabidopsis thaliana*. Estos genes, forman la familia ZIP1-4 (del inglés *zinc regulated ZRT/IRT-like transporter proteins*) y se descubrió que su expresión se veía influenciada al alza o a la baja en función del uso de fertilizantes con zinc en el suelo en el que se cultivaban las plantas. Estos transportadores se pueden denominar con una referencia a la especie de planta a la que pertenecen delante, como los MtZIP para los transportadores de



*Medicago truncatula* o los OsZIP de *Oryza sativa* (Tsonev y Lidon, 2012). También se descubrió un gen de un transportador que se denominó ZAT, de la familia de los CDF (del inglés *cation difusión facilitator*). No se conoce al cien por cien su función, pero la hipótesis más aceptada es la de que tiene que ver con el secuestro vacuolar de zinc y por tanto interviene en la regulación de la homeostasis y la tolerancia al zinc (Hall y Williams, 2003). Otro tipo de transportadores son los CAX (*cation exchanger*), PCR (*plant cadmium resistance*) y los HMA (*heavy metal ATPase*). Muchos de estos transportadores, además del zinc, están involucrados en el transporte de otros metales como el hierro, cadmio, cobre, cobalto o manganeso.



**Figura 3.** Localización de varios transportadores de zinc diferentes en una célula vegetal. Todos estos transportadores están involucrados de forma importante en procesos de transporte, detoxificación y homeostasis de zinc. Se pueden distinguir los transportadores ZIP1, 2 y 4 y los HMA2 regulando la entrada y salida de zinc a través de la membrana plasmática y los transportadores CAX (MHX1), ZAT, HMA2 y 4 y ZIP4 regulando el transporte de zinc en las membranas de los diferentes orgánulos. En cuanto a la familia PCR, sobre todo es utilizado para la detoxificación de la célula. HMA1 tiene la misma función, pero en el cloroplasto (Ajeesh *et al.*, 2017).

Es un micronutriente esencial en el crecimiento de las plantas, necesario en pequeñas cantidades, pero crítico en numerosas funciones fisiológicas a nivel de membrana plasmática, fotosíntesis, regulación de expresión génica o metabolismo de lípidos y ácidos nucleicos, entre otras. Esto es así debido sobre todo a sus importantes roles en dominios catalíticos de diversas enzimas, donde suele actuar como cofactor (Noulas *et al.*, 2018). Se ha visto en algunos estudios que, en el desarrollo de diferentes tipos de cultivos, como en el arroz y las habas, el zinc es un factor muy importante, pudiendo producirse tanto faltas como excesos de este metal y provocando diferentes rendimientos en la obtención de materia seca (Baligar *et al.*, 2001). En el caso del arroz, de entre todos los micronutrientes, la deficiencia de zinc junto con la de molibdeno son las que más reducen el rendimiento en peso seco (Fageria y Baligar, 1997). La

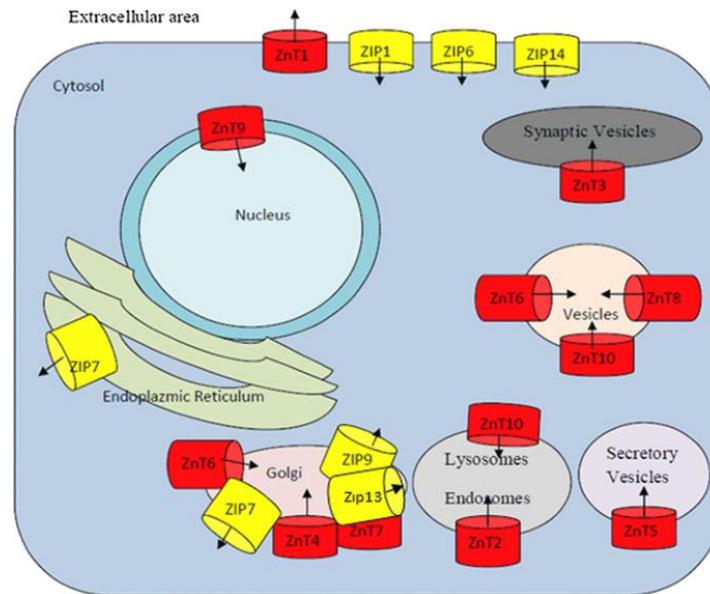


deficiencia de zinc afecta significativamente al sistema de raíces, reduciendo su desarrollo y por tanto afectando la absorción de agua y de nutrientes del suelo. También causa importantes deficiencias en el sistema de reproducción, causando una disminución significativa del tamaño, forma y viabilidad del polen y en el tamaño y capacidad de producción de polen de las anteras (Pandey *et al.*, 2006).

En general el problema suele ser la deficiencia de este metal en los suelos, por lo que puede resultar muy interesante suplementarlo utilizando fertilizantes. En pocos casos el zinc causa toxicidad, pero puede ocurrir. El principal efecto de la toxicidad por zinc es, al igual que la deficiencia, un retraso en el crecimiento del cultivo acompañado de una consecuente pérdida de rendimiento en materia seca, enrollamiento de las hojas jóvenes y generalmente causa clorosis (Rout y Das, 2009). En la mayoría de casos que ocurre toxicidad por este metal, está causada por contaminación ambiental derivada de actividades industriales y agrarias como por ejemplo emisiones de fundiciones e incineradoras, dispersión de desechos de minas, uso excesivo de fertilizantes y pesticidas con zinc en sus componentes o utilización de lodos de depuradoras, estiércol o desechos industriales contaminados con Zn como fertilizantes (Tsonev y Lidon, 2012).

### **2.3. Animales.**

En animales, el zinc es uno de los elementos traza más importantes. De hecho, sin contar el hierro unido a hemoglobina, es el metal de transición más abundante en mamíferos (Vašák y Hasler, 2000). El cuerpo humano tiene entre 2 y 3 gramos de zinc en total. Alrededor del 90% de este se encuentra en el músculo y el hueso y el resto se reparte en los demás tejidos, habiendo mayores concentraciones en tejidos específicos como la próstata, riñones, hígado, piel, pulmones o cerebro (Wastney *et al.*, 1986; Llobet *et al.*, 1988). A nivel celular el zinc se encuentra en un 30-40% en el núcleo, un 50% en el citoplasma y el resto está asociado a membranas. Las cantidades de zinc a nivel celular se regulan mediante procesos muy finos para mantener la homeostasis. El mecanismo principal es mediante el uso de proteínas transportadoras de zinc (Vallee y Falchuk, 1993). Estas proteínas se engloban en dos grandes familias: las ZIPs (zinc importer proteins) con 14 miembros conocidos y ZnTs (zinc transporters) con 10 miembros conocidos. Se encuentran en las membranas plasmática y de los diferentes orgánulos y actúan de forma contraria, las primeras introducen iones de zinc en el citosol, mientras que las segundas los retiran de este hacia el espacio extracelular o hacia dentro de los orgánulos (Baltaci y Yuce, 2018).



**Figura 4.** Localización de varios transportadores de zinc diferentes en una célula animal. Estos diferentes transportadores participan en los procesos de transporte, detoxificación y homeostasis de zinc. Por un lado, están los transportadores de tipo ZnT, que regulan la salida del zinc del interior del citoplasma hacia el exterior de la célula o hacia el interior de los orgánulos. Por otro lado, están los transportadores ZIP regulando el transporte de zinc hacia del citoplasma desde el medio extracelular y desde el interior de orgánulos (Baltaci y Yuce, 2018).

Además, hay un tercer tipo de proteínas que regulan la concentración de zinc en la célula: las metalotioneínas o MTs junto con su apoproteína la tioneína. Estas proteínas son capaces de formar complejos con iones metálicos. En concreto, cada metalotioneína es capaz de unirse a 7 iones de zinc. De esta forma, funcionan como amortiguadoras de la concentración del ion, contribuyendo a paliar excesos que pudieran provocar efectos tóxicos indeseados (Krężel y Maret, 2007).

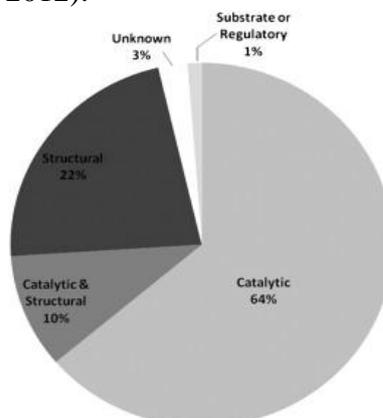
La concentración de iones zinc en las células necesita de una regulación fina por la importancia que este tiene, ya que desempeña funciones catalíticas, además de funciones estructurales y de regulación de factores de transcripción que resultan ser esenciales para el correcto desarrollo del organismo.

El zinc es cofactor de más de 300 enzimas (Rink y Gabriel, 2000) que cubren los 6 tipos diferentes, haciéndolo un elemento fundamental en procesos de crecimiento, desarrollo del sistema nervioso, formación de hueso o curación de heridas, entre otros (Mocchegiani *et al.*, 2000). Aproximadamente el 10% de las reacciones químicas que son catalizadas por enzimas requieren zinc en al menos uno de los mecanismos implicados en la catálisis. Tal y como se representa en la **figura 5**, de todas las enzimas que necesitan de zinc para funcionar, en un 64% de los casos el zinc es un átomo esencial en el sitio catalítico, en un 22% el zinc se une a la enzima como elemento estructural, en un 10% de los casos el zinc pertenece al sitio activo y



además se une en un lugar diferente de la enzima como componente estructural y, en el resto de los casos, puede actuar como regulador de la actividad de la proteína o ser el propio sustrato de esta en el 1% de los casos o, en el 3% restante, tiene roles todavía desconocidos en el funcionamiento de la enzima (Andreini y Bertini, 2012).

**Figura 5.** Roles del átomo de zinc en el proceso de catálisis enzimática. Los porcentajes se refieren a las enzimas asociadas a un número EC y cuya estructura es conocida (Andreini y Bertini, 2012).



Tiene importantes funciones estructurales como, por ejemplo, a la hora de garantizar la estabilidad de las proteínas con dedos de zinc (Zfp, del inglés *zinc finger proteins*). Estas proteínas pueden ser de varios tipos diferentes, pero todas tienen en común que el zinc es su componente central y más importante a la hora de mantener su estructura y función.

Las proteínas con dedos de zinc conforman la superfamilia de proteínas de unión a ácidos nucleicos más grande que se conoce y son las encargadas de regular numerosos procesos del metabolismo celular mediante la unión a los dominios de unión de zinc. Esto es posible precisamente gracias a los dominios de dedos de zinc o los dominios RING que poseen (Joazeiro y Weissman, 2000; Chasapis y Spyroulias, 2009). Por lo tanto, el zinc también tiene importantes funciones en la regulación de factores de transcripción.

Por estas tres grandes funciones, el zinc es esencial para la regulación del ciclo celular, diferenciación, homeostasis, desarrollo y mantenimiento de tejidos, producción de hormonas y el desarrollo y actividad del sistema nervioso, además de participar en procesos de apoptosis, estrés oxidativo y envejecimiento (Chasapis *et al.*, 2012).

La toxicidad derivada de altas cantidades de zinc en el organismo no es demasiado importante, ya que suele ser algo poco común y más adelante se ahondará en el tema. La cuestión que genera más problemas habitualmente es la falta de este elemento en el organismo.

Hay dos principales causas de una posible deficiencia de zinc. Por un lado, las deficiencias pueden ser derivadas de disfunciones metabólicas o genéticas como síndromes de mala absorción, enfermedad de Crohn, enfermedades renales crónicas o tratamiento con fármacos que contengan sustancias que impidan la correcta absorción del zinc, como la penicilamina o la

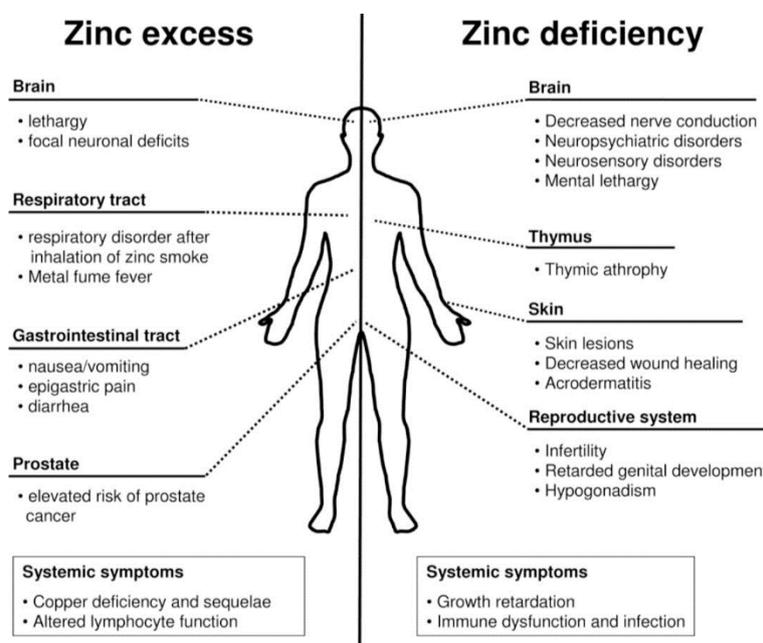


histidina. Por otro lado, la deficiencia puede ser también a causa de la nutrición, que de hecho suele ser lo más común (Salgueiro *et al.*, 2000) Hay estudios tan antiguos como de 1961 relacionando deficiencias de zinc en la población estudiada con síntomas como hipogonadismo, retrasos en el crecimiento, desórdenes en la piel y letargo y cansancio mental (Prasad *et al.*, 1961). Otros estudios posteriores señalan de nuevo que la deficiencia de zinc, sobre todo derivada de las dietas que se siguen en las diferentes partes del mundo, provocan síntomas como retardo en el crecimiento, complicaciones en el embarazo, atrofia del timo, depresión del sistema inmunológico, dermatitis o discapacidades relacionadas con procesos neurofisiológicos, entre otros (Sandstead, 1991). También puede existir una deficiencia de zinc debida a ingestas de alcohol excesivas o a causa de una enfermedad presente en el paciente que afecte a la absorción del metal.

En cuanto a la toxicidad por la exposición excesiva a este metal, puede provocar efectos en varios órganos según la vía de exposición, además de los efectos de intoxicación sistémica. Si la exposición es por inhalación, puede provocar un síndrome denominado fiebre de los humos metálicos (FHM) o fiebre del soldador. Esta es causada por inhalación de óxido de zinc, muy presente en humos generados en actividades como la fundición o la soldadura, de ahí su nombre común. Algunos síntomas son tos, dolor de pecho, dificultad para respirar y sabor metálico y suele durar unas 48h, pero puede tardar 4 días en remitir (Brown, 1988). La exposición dérmica, por otro lado, no suele ser peligrosa, pudiendo causar como mucho una irritación local (Lansdown, 1991). De hecho, se relaciona la acumulación de zinc en las heridas abiertas con una mejora de los procesos de cicatrización, mejorando la re epitelización y protegiendo el tejido de infecciones, por lo que podría utilizarse para tratamientos médicos en estos casos (Lansdown *et al.*, 2007). Para el caso de la exposición oral, llegar a una dosis tan alta como para general efectos tóxicos es complicado, pero puede ocurrir. La dosis letal media está calculada sobre los 27g/día (Syracuse Research Corporation, 2005), basada en estudios en ratas y ratones y sobrepasar esta dosis causa efectos como dolor abdominal, náuseas, vómitos, pancreatitis y puede causar fallo renal (Fox, 1989). También puede tener otros efectos como un efecto de aumento del riesgo de cáncer de próstata, en caso de suplementarse altas dosis durante un tiempo prolongado, aunque este efecto podría ser no tanto a causa del zinc como tal, sino más bien derivado de la inmunosupresión que puede causar en altas dosis (Leitzmann *et al.*, 2003). En cuando a los efectos sistémicos y hablando de la inmunosupresión, este es un efecto secundario de un exceso de zinc bastante importante. Una cantidad adecuada de zinc en el organismo es esencial para el correcto funcionamiento de los linfocitos y de alguna hormona



como la timulina, necesaria para la función del sistema inmune. Sin embargo, un exceso de zinc puede afectar a la función de los linfocitos T e incluso inhibirla y también es importante para la unión de algunos superantígenos bacterianos a la cadena  $\beta$  de la molécula del MHC de clase II., provocando entonces una disminución de la intensidad de la respuesta inmune (Campo *et al.*, 2001). Por último, la deficiencia de cobre derivada de zinc también es un efecto sistémico negativo de un exceso de zinc en el organismo. La toma de altas dosis de zinc puede causar una relación de absorción competitiva entre el zinc y el cobre en enterocitos mediada por las MT. La expresión de estas enzimas se ve aumentada por dietas con alto contenido en zinc y se unen con más afinidad al cobre que al zinc, por lo que se genera un gran número de complejos MT-cobre que son excretados de la célula. Algunos de los síntomas más típicos de este síndrome son anemia, leucopenia o un aumento del ratio entre el colesterol de baja densidad y colesterol de alta densidad (LDL:HDL) (Plum *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Comparación de los efectos de la intoxicación por zinc con los efectos de la deficiencia de este. Tanto una intoxicación por exposición desmesurada o por ingesta excesiva (mitad izquierda de la imagen), como una insuficiencia causada por malnutrición o una condición médica (mitad derecha de la imagen), tienen efectos nocivos en diferentes sistemas del organismo. Los efectos que no se pueden clasificar dentro de un órgano o sistema definido se han recopilado como síntomas sistémicos en la parte inferior (Plum *et al.*, 2010).

Como ya hemos visto hasta este punto, el zinc es un elemento muy versátil, vital para prácticamente todos los procesos fisiológicos tanto de plantas como de animales y también puede ser utilizado como agente terapéutico en el tratamiento de diversas condiciones. Uno de los usos del zinc que está cobrando bastante importancia en los últimos años gracias a los avances que se han logrado en la materia, es el uso en forma de nanopartículas de óxido de zinc.



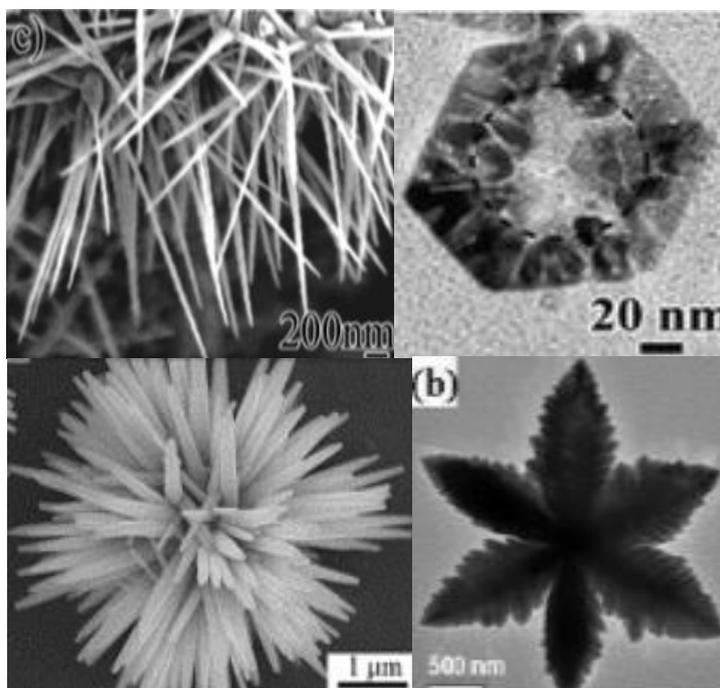
### 3. Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs).

La nanotecnología es un foco de investigación muy importante en la ciencia de los materiales. Se considera nanotecnología a la síntesis, caracterización y exploración de materiales en la escala nanométrica (1-100 nm). Opera en el primer nivel de organización de los átomos y moléculas de los organismos vivos. A estas escalas es donde las propiedades y funciones de los sistemas vivos son definidas (Yadav, 2013). Algunas nanopartículas (NPs) metálicas, como las de óxido de zinc (ZnO), óxido de titanio o plata son las que mejor caracterizadas están en función de su tamaño, composición, cristalización y morfología. Las NPs son capaces de interactuar de una forma única con las biomoléculas de las células y de esta forma se facilita la transferencia física de las NPs al interior de las células y estructuras celulares, gracias a las características químicas, mecánicas, eléctricas o estructurales entre otras, que presentan estas partículas. Además, las NPs tienen normalmente un porcentaje muy alto de sus átomos en la superficie, lo que las hace poseer una reactividad alta en esta zona, facilitando que sean cargadas con agentes terapéuticos u otras moléculas que serán dirigidas a las células diana (Rasmussen *et al.*, 2010).

El óxido de zinc se describe como un material inorgánico, semiconductor del grupo II-VI, con propiedades químicas, eléctricas y ópticas únicas, que permiten su uso en diversos campos como el de la electrónica, tecnología láser, generación de energía, industria cerámica o biomedicina, entre otros. Este compuesto en forma de polvo se utiliza mucho como aditivo en numerosos materiales y productos incluyendo cerámicas, cristal, plástico, pigmentos, comidas (como suplementación de zinc), baterías etc. (Parihar *et al.*, 2018). Puede formar varios tipos de estructuras nanométricas que lo clasifican dentro de una categoría de nuevos materiales con numerosas potenciales aplicaciones en el campo de la nanotecnología (Kolodziejczak-Radzimska y Jesionowski, 2014). Dependiendo del método de síntesis, se pueden formar estructuras en 1 dimensión, 2 dimensiones o 3 dimensiones. Algunos ejemplos de estructuras de 1 dimensión son los nanocables o las nanovarillas (Banerjee *et al.*, 2003); en el caso de las estructuras en 2 dimensiones, tenemos las nanoláminas o los nanopellets (Chiu *et al.*, 2010) y en el caso de las de 3 dimensiones nos podemos encontrar estructuras en forma de erizo (Xie *et*



*al.*, 2005) o de copo de nieve (Polshettiwar *et al.*, 2009). El óxido de zinc proporciona una de las mayores variedades de estructuras en sus partículas de todos los materiales conocidos.



**Figura 7.** Ejemplos de posibles estructuras del óxido de zinc. De izquierda a derecha y de arriba abajo: Estructura en 1 dimensión en forma de nano-varilla, estructura en dos dimensiones en forma de nano-pellet, formación en 3 dimensiones en forma de erizo, formación en 3 dimensiones en forma de copo de nieve. Figura creada a partir de imágenes extraídas de los trabajos de Banerjee *et al.*, Xie *et al.*, Polshettiwar, Baruwati y Varma y Chiu *et al.* (Banerjee *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2005; Polshettiwar *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2010).

Las nanopartículas de óxido de zinc, que son unas de las nanopartículas de metales más importantes, se utilizaron primero en la industria del caucho, porque son capaces de proporcionar un aumento a la resistencia al desgaste del compuesto de caucho y, por consiguiente, aumentan su vida útil (Sahoo *et al.*, 2007). También se han utilizado en la industria textil, del cuidado personal, medicina, electrónica, en electrodomésticos, en la producción de cemento o en la industria química, entre otras. Como se puede observar, estos compuestos se pueden utilizar en numerosas industrias diferentes, gracias a sus propiedades físicas y químicas.

#### 4. Síntesis de las ZnO-NPs.

La función de las nanopartículas depende de diversos factores, incluyendo las propiedades de la superficie, la distribución de su masa, el tamaño, la forma o su reactividad. Por lo tanto, el desarrollo de nanopartículas utilizando métodos que proporcionen un producto uniforme en tamaño, morfología y función, es esencial para su posterior uso en el ámbito de interés (Jiang



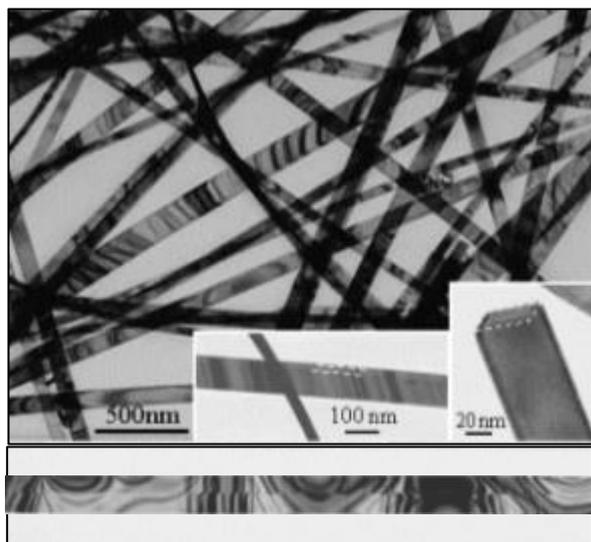
*et al.*, 2018). Además, es interesante desarrollar métodos que sean sencillos, baratos y eficientes, que permitan obtener nanopartículas que cumplan con los requerimientos cuantitativos y cualitativos necesarios (Parihar *et al.*, 2018).

La síntesis de nanopartículas de óxido de zinc se puede realizar utilizando varios métodos, que pueden ser separados en tres grandes categorías: métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos. Luego, dentro de cada una de estas categorías, se pueden clasificar en otras tres: métodos de fase sólida, de fase líquida y de fase gaseosa/vapor. Hay una gran cantidad de métodos diferentes para la síntesis de estas partículas y se han recogido más adelante en la **figura 10**. A continuación se explicarán más en profundidad los mayormente utilizados.

#### 4.1. Métodos físicos.

##### 4.1.1. Evaporación térmica.

El método de evaporación térmica es el método físico de síntesis más utilizado. Se toma un material de partida en forma de polvo y se vaporiza a elevadas temperaturas. Después, el gas resultante de este proceso se condensa bajo unas condiciones de temperatura, presión y composición de la atmósfera, que serán las que en última instancia definan las características del producto obtenido. Con este método se pueden obtener diferentes tamaños y formas como varillas, cinturones, peines, anillos y tubos, todos a escala nanométrica. Este método tiene como ventajas que es sencillo, barato y no necesita de catalizadores (Dai *et al.*, 2003).



**Figura 8.** En la parte superior, imagen tomada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de un conjunto de nano-cinturones de óxido de estaño. Las imágenes ampliadas permiten observar al detalle la geometría de las estructuras. En la parte inferior, imagen tomada por TEM de un nano-cinturón de óxido de zinc con un defecto de apilamiento en la parte central. La estructura es la misma que en las imágenes obtenidas del óxido de estaño. Imágenes extraídas del trabajo de Dai *et al.* (Dai *et al.*, 2003).



## 4.2. Métodos químicos.

### 4.2.1. Precipitación química.

Este es el método más popular de síntesis de ZnO-NPs. Hay varias formas de realizar la precipitación, pero normalmente se necesitan dos agentes reactivos: por un lado, un precursor de zinc de alta pureza, como por ejemplo en acetato de zinc ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ). También se pueden usar nitrato de zinc o sulfato de zinc. Por otro lado, se necesita un agente precipitante, como el hidróxido de sodio (NaOH) o el hidróxido de amonio. Generalmente, el proceso consiste en añadir gota a gota el precipitante a una solución en la que se encuentra el precursor de zinc e ir midiendo el pH. Cuando este llega en torno a 10, las soluciones se mezclan homogéneamente y se obtiene como producto intermedio hidróxido de zinc ( $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ), de coloración blanca. Este compuesto es el que se convierte en ZnO mediante un proceso de secado y calcinado a altas temperaturas. El producto es un polvo formado por estructuras del orden de nanómetros y sus características dependen de parámetros como el pH, la temperatura o el tiempo de la precipitación. De esta forma Bisht *et al.* consiguieron sintetizar las nanopartículas con una media de diámetro de 18.67 nm. (Bisht *et al.*, 2016). En este tipo de síntesis, cada vez se están utilizando más los surfactantes para controlar la nucleación y el crecimiento de las partículas. Un ejemplo de surfactante es el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que fue utilizado por Wang *et al.* para obtener un polvo final formado por partículas de 50 nm de diámetro (Wang *et al.*, 2002). Este método es sencillo y fácil de controlar, además de escalable a la industria. El punto negativo es que se forman agregados con relativa frecuencia, provocando una pérdida de la calidad del polvo obtenido (Jiang *et al.*, 2018).

### 4.2.2. Sol-Gel síntesis

El primer método que se planteó con este método de síntesis se hizo en 1991 por Spanhel y Anderson (Spanhel y Anderson, 1991). El proceso consta de tres etapas:

#### 1. Preparación del precursor de zinc.

Se utiliza como precursor el acetato de zinc, que se disuelve en etanol y se coloca en un destilador. Se calienta hasta ebullición y se agita con un agitador magnético para obtener finalmente un condensado y una solución higroscópica (en la que ocurriría precipitación con la adición de pequeñas cantidades de agua) con óxido de zinc y derivados de ácido acético, que se utilizará para la reacción.



## 2. Preparación de los clústeres de óxido de zinc.

La solución higroscópica preparada en el paso anterior se diluye de nuevo en etanol y se le añade polvo de hidróxido de litio (LiOH), que queda suspendido. Con el uso de un baño de ultrasonidos se homogeneiza la mezcla rompiendo el polvo poco soluble y se acelera la liberación de iones de OH, resultando en una reacción espontánea de formación de núcleos de ZnO estables.

## 3. Crecimiento de los cristales.

El crecimiento de los cristales es espontáneo a temperatura ambiente. La reacción es la siguiente:



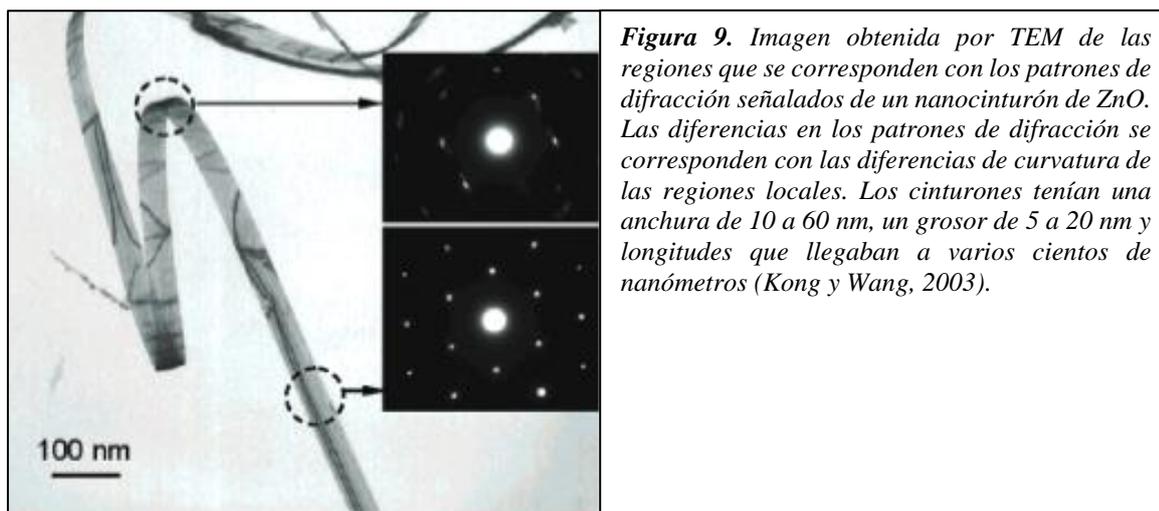
Este método tiene como ventaja su simplicidad y rapidez, además de que es escalable a nivel industrial y se realiza en condiciones suaves. Se forman nano cristales de ZnO de un tamaño de partícula de unos 45 nm, homogéneos en cuanto a su morfología. Hay más formas de realizar este método, con diferentes reactivos y distintas condiciones y tiempos, pero todos tienen en común el esquema general. Se prepara una solución coloidal (sol) que se convierte en gel y material sólido. Se producen reacciones de hidrólisis, condensación y polimerización. Al igual que en el método de precipitación química, se pueden utilizar aditivos como surfactantes para mejorar el rendimiento de las reacciones (Król *et al.*, 2017).

### 4.2.3. Transporte de vapor.

Un método muy común de síntesis química es el que utiliza un proceso de transporte de vapor. Hay dos tipos: El método sin catalizador vapor-sólido (VS) y el método asistido por catalizador vapor-líquido-sólido (VLS), dependiendo de cómo es el proceso de formación de las nanopartículas de ZnO. El más interesante es el método libre de catalizador VS, que es capaz de generar una amplia gama de estructuras nanométricas en forma de cinturones, de varillas, de cable...(Parihar *et al.*, 2018).



Kong y Wang sintetizaron utilizando este método nanoestructuras complejas de ZnO en forma de nanohélices y nanocinturones. En este proceso, se tomaron polvos de ZnO de alta pureza y se colocaron en un horno en el que se indujo el vacío y se calentaron a 1350°C. Después de unos minutos, se inyectó Argón a razón de 25 cm<sup>3</sup> por minuto durante 30 minutos y las estructuras nanométricas formadas se recogieron y se analizaron con técnicas de TEM (Kong y Wang, 2003).



En este procedimiento, el Zn y el oxígeno se mezclan en los vapores generados y reaccionan formando las estructuras que se pueden ver en la **figura 9**. El problema principal del método descrito es la necesidad de alcanzar tales temperaturas tan elevadas. Otro punto negativo es que con este método se tiene menos control sobre la homogeneidad en la geometría de las partículas formadas, su alineamiento y su localización (Król *et al.*, 2017).

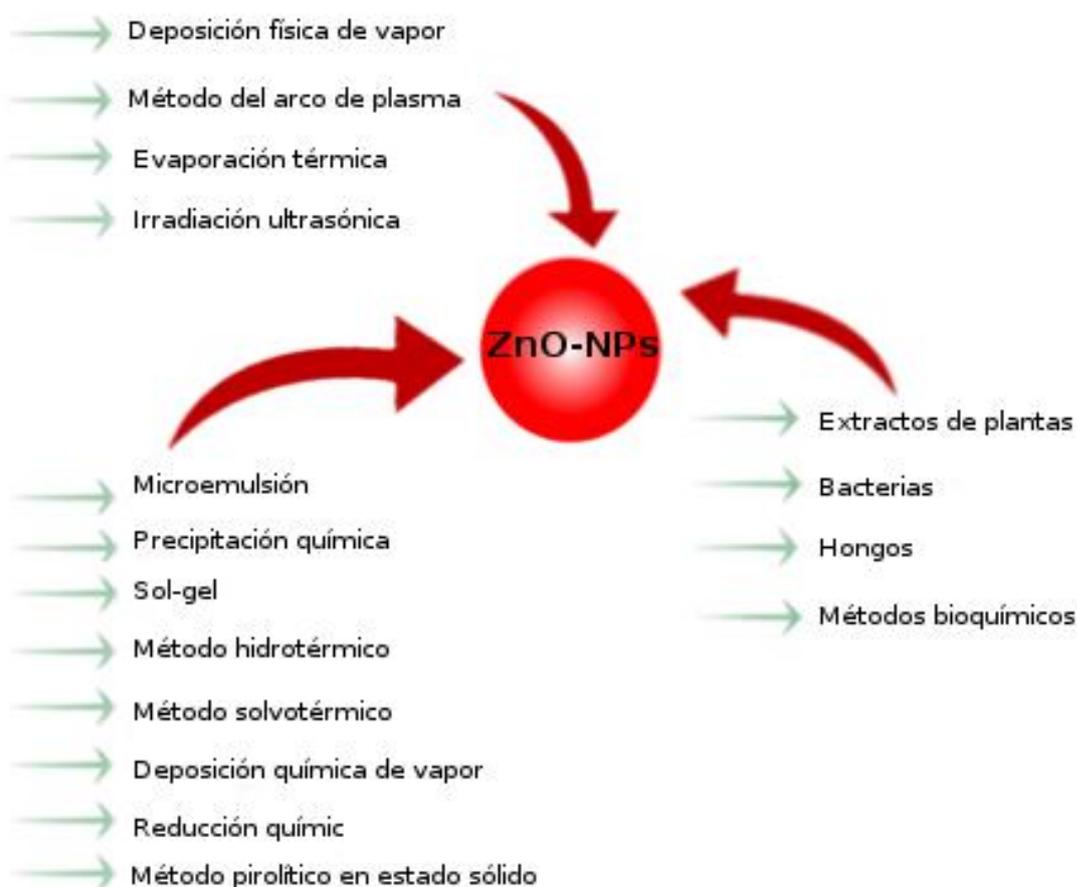
### 4.3. Métodos biológicos.

Los métodos físicos y químicos de síntesis de ZnO-NPs son muy utilizados y están muy estudiados y desarrollados. Pero en la actualidad, el desarrollo de un nuevo método utilizando seres vivos, mediante la llamada química verde, atrae mucho la atención, sobre todo gracias a que son respetuosos con el medio ambiente. Además, estos métodos también permiten controlar con bastante exactitud el tamaño y forma de las partículas (Król *et al.*, 2017). En los métodos biológicos se necesita tener en cuenta varios parámetros como la selección de un organismo adecuando en cuanto a sus actividades enzimáticas y rutas metabólicas y las condiciones de crecimiento de la biomasa y de actividad de las enzimas que permitan obtener mayores rendimientos en la producción (temperatura, pH, agitación, sustratos...). En base a estos parámetros las características finales de las nanopartículas sintetizadas podrán variar. Se pueden



utilizar varios organismos diferentes para la síntesis como bacterias, hongos o plantas (Ahmad *et al.*, 2003; Prasad y K. Jha, 2009; Iravani, 2011), cada uno con sus peculiaridades distintivas.

Estos son algunos de los métodos más utilizados para la síntesis de ZnO-NPs, pero como ya se ha mencionado anteriormente, hay un gran número de métodos distintos. En la siguiente imagen se recogen la mayoría de estos.



**Figura 10.** Esquema representativo de los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de zinc. En la parte superior izquierda los métodos físicos, en la parte inferior izquierda los métodos químicos y en la parte derecha media los métodos biológicos. Imagen de elaboración propia.

## 5. Usos de las ZnO-NPs.

Las nanopartículas de ZnO, atraen cada vez más interés en diferentes campos donde podrían ser utilizadas, sobre todo gracias a sus características en cuanto al precio, poca toxicidad en organismos vivos y sus propiedades. Uno de los campos en los que más importancia están cobrando es el de la biomedicina. Dentro de esta, pueden ser utilizadas como agentes antibacterianos, agentes anticancerosos, antidiabéticos, para transporte de fármacos a sus dianas



o para análisis de bioimágenes. En general, las nanopartículas de ZnO de tamaños menores de 100 nm son consideradas compatibles con su uso en seres vivos, lo que promueve que surjan todas estas y aplicaciones biomédicas y abre nuevos frentes de investigación en este campo (Jiang *et al.*, 2018).

### 5.1. Agentes anti microbianos

Las ZnO-NPs pueden utilizarse como agentes antibacterianos por sus propiedades superiores, como su alta área específica y su capacidad de bloquear numerosos agentes patógenos. Se cree que el mecanismo por el que producen esta actividad antibacteriana es la toxicidad que causan por su habilidad de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células. Las ZnO-NPs se acumulan en la membrana y en el citoplasma y liberan iones de zinc, que pueden causar daños en la membrana, daños en las proteínas, en el ADN, en las mitocondrias y finalmente la muerte de la célula (Jiang *et al.*, 2018). Se han probado numerosos métodos para evaluar la actividad antibacteriana de las ZnO-NPs. El más utilizado es el de cultivo de células diluidas junto con las nanopartículas en placas de agar, seguido del conteo de colonias. Los microorganismos más utilizados para estudiar las propiedades antibacterianas de las nanopartículas son el gram negativo *Escherichia coli* y el gram positivo *Staphylococcus aureus*. Hay estudios realizados en otros microorganismos de especies importantes como *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Kasraei *et al.*, 2014), *Bacillus* y *Listeria* (Mirhosseini y Barzegari Firouzabadi, 2015), *Pseudomonas* (Sangani *et al.*, 2015) o *Salmonella* (Akbar *et al.*, 2019), pero los dos anteriores son los que mayor respaldo científico tienen. Estudiando la actividad antibacteriana de las ZnO-NPs se ha llegado a varias conclusiones.

Dependiendo del microorganismo estudiado, la eficacia es diferente. Raghupati *et al.* llegaron a esta conclusión en 2001 cuando estudiaban las propiedades antibacterianas de las ZnO-NPs en *S. aureus*. Calcularon que la concentración mínima inhibitoria (CMI) se encontraba entre 4 y 7 mM dependiendo de la cepa específica con la que se realizase el experimento (Raghupati *et al.*, 2011). Por otro lado, dependiendo también del género de bacteria que se esté estudiando, las nanopartículas tendrán una mayor eficiencia antibacteriana o menor. Por ejemplo, hay varios estudios que indican que las ZnO-NPs tienen mayor actividad antibacteriana frente a gram positivos que frente a gram negativos, pero la explicación de por qué esto ocurre así no parece estar del todo clara. Lo más probable es, tal y como explican Hoseinzadeh *et al.*, que debido a la estructura rígida y gruesa de la pared celular de los gram positivos las nanopartículas encuentran más dificultades para llegar a la membrana y penetrar dentro de la célula, provocando una eficiencia antibacteriana menor (Hoseinzadeh *et al.*, 2014). En algunos casos,



también se cree que puede ser debido a una diferencia entre las concentraciones internas de antioxidantes de cada especie, como en el caso de *E. coli* y *S. aureus*, donde Applerot *et al.* achacan la menor eficiencia antibacteriana de las nanopartículas contra *S. aureus* a que esta especie tiene grandes cantidades de pigmento carotenóide en su citoplasma, lo que la dota de una gran resistencia frente al estrés oxidativo, que es la principal vía de toxicidad causada por las ZnO-NPs, por inducción de la producción de ROS (Applerot *et al.*, 2009).

La actividad antibacteriana de las ZnO-NPs depende también de su tamaño y concentración. Después de hacer pruebas en *E. coli* con nanopartículas de varios tamaños (12 nm, 45 nm y 2  $\mu$ m), las nanopartículas de 12 nm resultaron ser más eficientes que el resto en cuanto a su capacidad antibacteriana y viendo los resultados de las otras dos, se concluyó que hay una relación inversa entre el tamaño de la nanopartícula y su eficiencia antibacteriana. En este mismo estudio también se probaron diferentes concentraciones de cada tamaño de nanopartícula y también se observó una clara relación directamente proporcional entre la concentración y la eficiencia (Padmavathy y Vijayaraghavan, 2008).

Por último, la actividad antibacteriana de las ZnO-NPs depende también de su forma. Stankovic *et al.* investigaron la influencia de la morfología y del tamaño de las nanopartículas de ZnO en sus propiedades antibacterianas. Utilizando *S. aureus* y *E. coli*, llegaron a la conclusión de que en ambas especies se observaba una diferencia significativa de la eficiencia antibacteriana de las nanopartículas en función de su forma, siendo las más eficientes las nanoesferas, seguidas de las elipsoides y por último las nanopartículas en forma de prisma. También se concluye en el mismo estudio que en función del tamaño hay diferencias, como ya se ha explicado anteriormente (Stanković *et al.*, 2013).

## **5.2. Terapia anti cáncer**

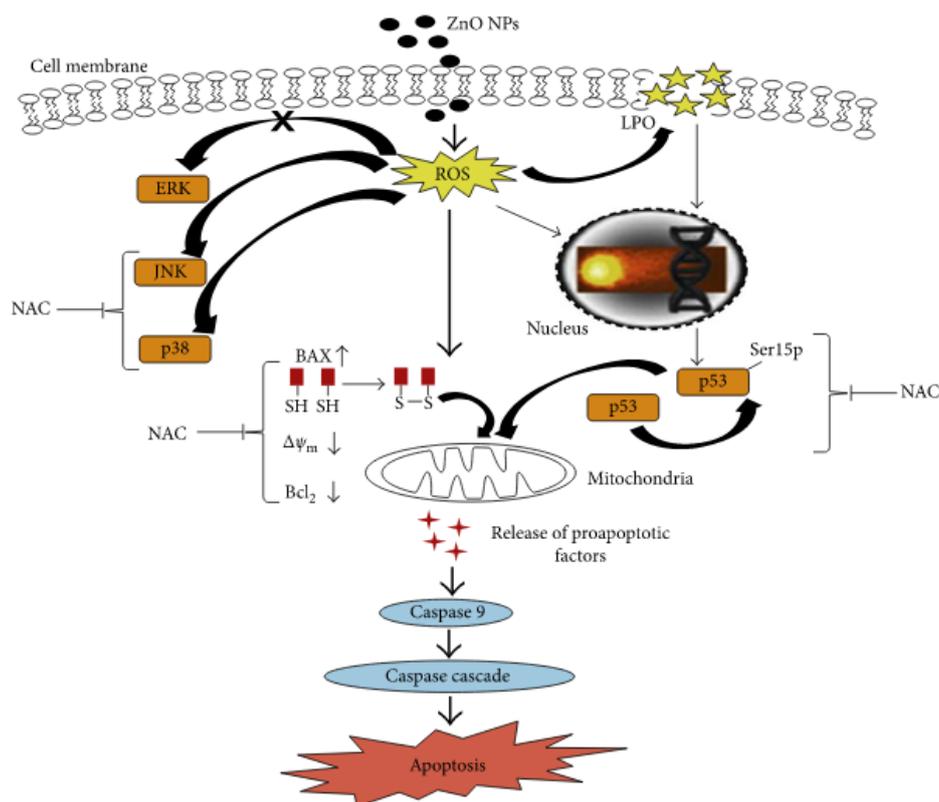
Cáncer es un término que se utiliza para referirse a un amplio número de enfermedades que tienen en común una desregulación del crecimiento y proliferación de las células. Normalmente se trata utilizando terapias de radiología, quimioterapia y cirugías en caso de ser posible, pero estas formas de enfrentarlo suelen tener una amplia gama de efectos secundarios negativos para el paciente. La terapia más utilizada, la quimioterapia, utiliza fármacos citotóxicos que afectan negativamente a células sanas y células cancerosas al mismo tiempo. Los tejidos más afectados son la médula ósea, las mucosas gastrointestinales, los folículos pilares y las gónadas, que son los tejidos donde se produce una proliferación alta de células de forma natural. Por lo tanto, los efectos secundarios más inmediatos son la mielosupresión, náuseas, vómitos, pérdida de pelo y



reducción de la fertilidad. También es importante tener en cuenta que los agentes citotóxicos suelen ser muy teratogénicos (Corrie, 2008). Además, los agentes citotóxicos generan resistencia poco a poco, por lo que cada vez es necesario utilizar dosis más altas para conseguir el mismo efecto, empeorando el perfil de efectos secundarios (Sharma *et al.*, 2016). Recientemente, la nanomedicina basada en nanomateriales ha demostrado un gran potencial para paliar estos efectos. El zinc es un nutriente esencial en adultos y el óxido de zinc está considerado como una sustancia segura *in vivo*. Teniendo en cuenta estas ventajas, las ZnO-NPs pueden utilizarse como plataformas biocompatibles y biodegradables para el tratamiento del cáncer (Jiang *et al.*, 2018). En esta materia, se pueden utilizar desde varios frentes. Estos son algunos de los más importantes:

### **5.2.1. Inducción de apoptosis.**

En un estudio realizado en 2012 con células humanas de cáncer de hígado HepG2, se utilizaron las ZnO-NPs para ver qué efecto tenían y explorar la posibilidad de utilizarlas como terapia. En el estudio se observó que las células HepG2 que se exponían a las ZnO-NPs mostraban mayores daños y un descenso significativo de la viabilidad celular, efectos que fueron asociados a un aumento de la apoptosis generado por un aumento de la liberación de ROS en las mitocondrias. Esto provoca una lisis de la membrana de las mitocondrias y un aumento de la ratio Bax/Bcl2, lo que provoca la liberación de diferentes factores que promueven la apoptosis por la vía de las caspasas como el citocromo c. También se observó que causaban daños oxidativos en el ADN, pero estos podían ser evitados utilizando N-acetilcisteína (NAC) y también se producía una clara activación de las vías JNK y p38 y una inducción de la fosforilación de p53, pero la apoptosis se consideró independiente de estas vías. (Sharma *et al.*, 2012). Lo mismo observaron Chandrasekaran y Pandurangan cuando investigaron las ZnO-NPs y su citotoxicidad contra células C2C12 de mioblastoma y células 3T3-L1 de adipocitos. Se producía una inhibición del ciclo celular e inducción de la apoptosis mediada por las ROS, la vía p53, la ratio Bax/Bcl2 y la vía de la caspasa 3 en las células C2C12, comparado con las células 3T3-L1 (Chandrasekaran y Pandurangan, 2016). Con estos resultados se puede plantear la idea de que las ZnO-NPs pueden tener la capacidad de inducir vías de apoptosis en células cancerosas mientras que resultarían poco o nada tóxicas en células sanas, por lo que podrían identificarse como candidatos prometedores para la terapia del cáncer.



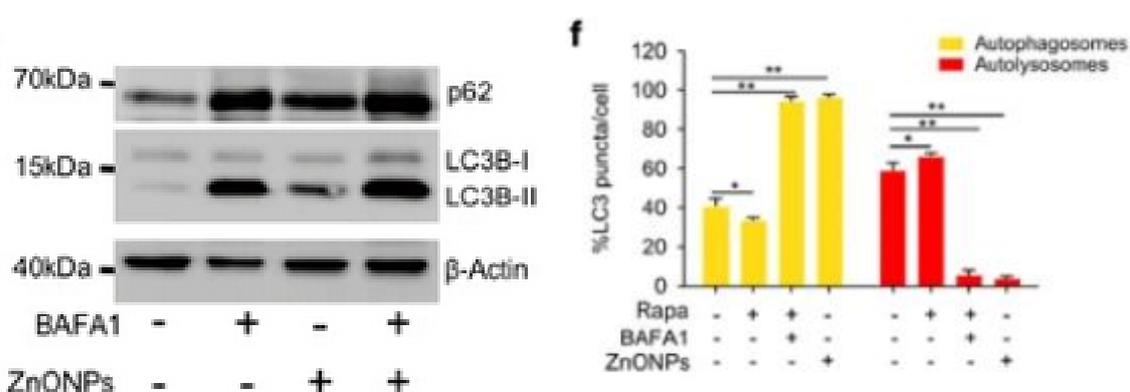
**Figura 11.** Mecanismos de inducción de apoptosis en las células humanas provocados por la exposición a ZnO-NPs (Sharma *et al.*, 2012).

### 5.2.2. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado que sirve para aumentar el índice de supervivencia de las células cuando estas son sometidas a situaciones adversas como daños en orgánulos, ROS, agentes anticancerosos, agregados de proteínas o falta de nutrientes. Este proceso natural consiste en el secuestro de parte del citoplasma de una célula en una membrana que se fusiona con un lisosoma para su degradación. Posteriormente, los productos generados se liberan al citosol mediante permeasas y pueden ser reciclados (Rubinsztein *et al.*, 2011). Un daño celular excesivo puede desembocar en la muerte de las células por apoptosis posterior a los eventos de autofagia, que no serían suficientes para paliar el estrés al que está sometida la célula. Esto puede ocurrir derivado de la exposición de las células a nanopartículas como las de ZnO. Esto mismo estudiaron Yu *et al.* en su trabajo, las ZnO-NPs pueden provocar una acumulación de ROS en células humanas de piel sana, derivando en un aumento de los procesos de autofagia y provocando consigo un aumento de la muerte por apoptosis, principalmente causada por los daños generados a las mitocondrias por las ROS (Yu *et al.*, 2013). El mecanismo más exacto lo analizaron Zhang *et al.* en 2017. Tomaron células de epitelio



pulmonar humano A549 y las sometieron a las ZnO-NPs. Primero, demostraron que estas inducían autofagia, pero, además, observaron que las ZnO-NPs podían llegar a los lisosomas y liberar iones de zinc dentro de estos. Esta liberación masiva de iones de zinc produce daños a los lisosomas, que no son capaces de funcionar correctamente y se impide el proceso de autofagia que se había inducido, produciéndose una acumulación en la célula de los denominados autofagosomas. A la vez, y como ya se había descrito anteriormente, las ZnO-NPs causan un aumento de la producción de ROS, que dañan las mitocondrias y es lo que causa la inducción de la autofagia. Con la producción de ROS dañando las mitocondrias y el proceso de autofagia siendo impedido por las ZnO-NPs, las ROS se acumulan hasta que la célula termina muriendo por apoptosis (Zhang *et al.*, 2017).



**Figura 12.** A la izquierda, western blot para analizar la expresión de LC3 y p62 en las células A549 tratadas con BAFA1 (100nM), ZnO-NPs (30 µg/ml) y BAFA1 junto con ZnO-NPs, tras 24h de tratamiento. A la derecha el número autofagosomas y autolisosomas contados en las imágenes del experimento y pasados a porcentaje. Los valores representados son la media de los obtenidos en 3 experimentos independientes ± error estándar, \*P<0.05 y \*\*P<0.01. Figura creada a partir de imágenes extraídas del trabajo de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2017).

La bafilomicina A1 (BAFA1), es un inhibidor específico de ATPasas vacuolares de tipo H<sup>+</sup>, que impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Cuando la función del lisosoma se ve inhibida, la cantidad de LC3B-II depende estrictamente de la producción del mismo y esto refleja si la autofagia es inducida. P62 es un sustrato específico que interviene en los procesos de autofagia. Los efectos que tiene el tratamiento de las células con este compuesto son comparables a los del tratamiento con ZnO-NPs en cuanto a los niveles de LC3B-II/LC3B-I y p62, que son marcadores de autofagia. Por lo tanto, se puede deducir que las ZnO-NPs causan una inducción de la autofagia. Por otro lado, se hizo otro experimento con la rapamicina (Rapa), que es un inductor de la autofagia. Se trataron células transgénicas con rapa, rapa + BAFA1 y ZnO-NPs y se realizó un conteo de los autofagosomas y autolisosomas. Con el tratamiento con rapa se observa un aumento de los autolisosomas, lo que indica que se promueve el flujo



autofágico. Cuando se trata con rapa y BAFA1 al mismo tiempo, se produce un aumento muy significativo de autofagosomas y una gran disminución de los autolisosomas, lo que indica que se está produciendo un aumento de la síntesis de autofagosomas y, por tanto, induciendo la autofagia, pero al mismo tiempo se produce un bloqueo del flujo autofágico al inhibirse la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y formar los autolisosomas. Este mismo efecto es el que tienen las ZnO-NPs (**figura 12**). Por lo que según sugieren los datos, parece que estas partículas promueven la autofagia y al mismo tiempo impiden que el proceso se lleve a cabo.

En definitiva, un exceso de daño celular debido a ROS, por ejemplo, puede conducir a una inducción del proceso de autofagia y si este no funciona correctamente y/o no es suficiente para asegurar la supervivencia de la célula dañada, el proceso culmina en la muerte celular por apoptosis de la célula cancerosa. Por tanto, la autofagia no solo puede promover la supervivencia, sino que también es capaz de encender mecanismos en las células tumorales que son letales para estas y por tanto, si se diseña un sistema para que las ZnO-NPs se dirijan a estas células podrían ser una interesante terapia potencial para esta enfermedad (Zhang *et al.*, 2017).

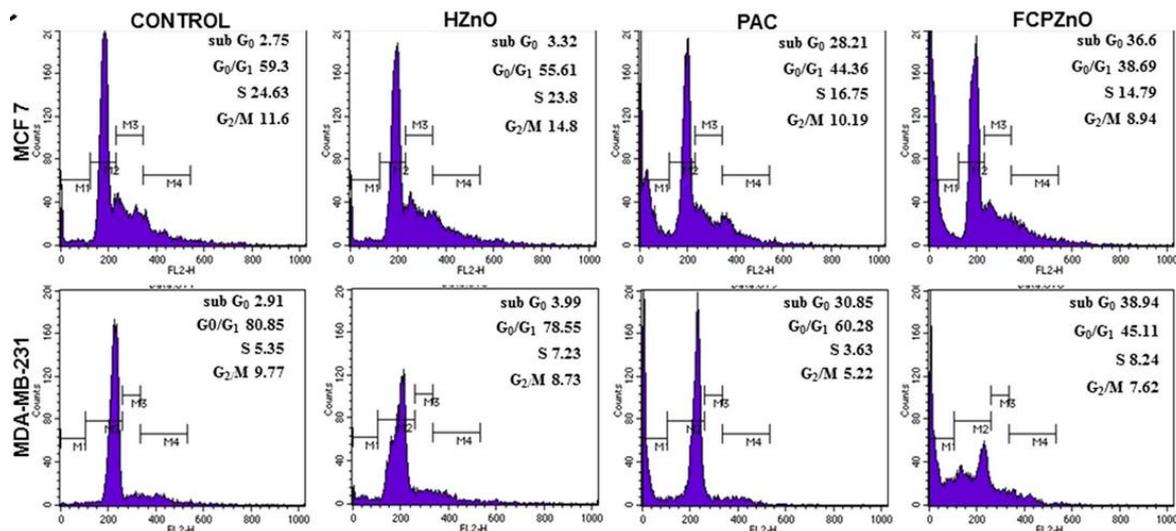
### **5.2.3. Envío dirigido de fármacos.**

El uso de las nanopartículas para el envío de fármacos provee de oportunidades que pueden resultar muy interesantes para mejorar la seguridad y la eficiencia de los tratamientos contra el cáncer. Si se consigue apuntar a lugares específicos para llevar los fármacos que componen el tratamiento mediante el uso de nanopartículas, se podrían reducir considerablemente las cantidades de fármacos que se tienen que utilizar, produciendo un efecto de mejora en la eficacia del tratamiento y además de reducción de efectos secundarios no deseados. Por tanto, las ZnO-NPs cada vez están despertando más interés en el tratamiento del cáncer por envío de fármacos, ya que diferentes medicamentos como la doxorubicina, paclitaxel o curcumina pueden cargarse en las ZnO-NPs, individualmente o combinados, para mejorar su solubilidad, incrementar su toxicidad y dirigirse a las células tumorales. (Rasmussen *et al.*, 2010).

Puvvada *et al.* probaron este método para cargar paclitaxel (PAC), un miembro de la familia de los taxanos que se dirige específicamente a la disociación de microtúbulos, en nanopartículas de ZnO, para estudiar su eficacia contra el cáncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo*. Para dirigir las nanopartículas a las células tumorales utilizaron un conjugado con ácido fólico. En el estudio concluyen que los complejos de las nanopartículas se acumulaban en las células de cáncer de mama (células MCF-7 y MDA-MB-231) gracias a los receptores de folato que son sobreexpresados en estas células. De esta forma, la toxicidad que tienen las nanopartículas se



dirige a estas células y se puede reducir la proliferación de los tumores, también en ratones vivos (Puvvada *et al.*, 2015).



**Figura 13.** Apoptosis provocada por los transportadores nanométricos, PAC, HZnO y FCPZnO en células MCF-7 y MDA-MB-231 mediante estudio de distribución de fase. Los resultados son representativos de tres experimentos independiente. (Puvvada *et al.*, 2015).

En la **figura 13** se pueden ver los resultados del análisis del efecto del PAC, las nanopartículas de ZnO con folato y nanoportadores sin fármaco sobre la distribución del contenido de ADN de MCF-7 y MDA-MB-231, para conocer en qué momento del ciclo celular se encuentran y la apoptosis que está ocurriendo. Tanto las nanopartículas como el PAC inducen un aumento de la apoptosis que se observa en una acumulación de células al inicio del eje horizontal, además de una reducción de la proliferación. La reducción de la proliferación derivada de las nanopartículas de ZnO con folato fue mayor en las células MCF-7 que en las MDA-MB-231, pero en ambos casos hubo un 10% más de apoptosis en el tratamiento con ZnO-NPs que en el tratamiento con PAC solo. Los nanoportadores de HZnO, sin fármacos cargados, no mostraron efectos significativos en las células en comparación con el control. Estos resultados parecen indicar que las ZnO-NPs con folato cargadas con el fármaco son capaces de atacar directamente a las células tumorales, probablemente gracias al transportador de folato que estas sobreexpresan, y por lo tanto estas partículas son más eficientes que el PAC solo para esta misión.

Experimentos parecidos hicieron Hariharan *et al.*, probando la capacidad que tienen las ZnO-NPs de transportar diferentes fármacos de forma específica a las células tumorales. En este caso se utilizaron las nanopartículas para llevar doxorubicina (DOX) a células de cáncer cervical HeLa humanas y se encontraron con que no solo así se aumentaba la acumulación intracelular



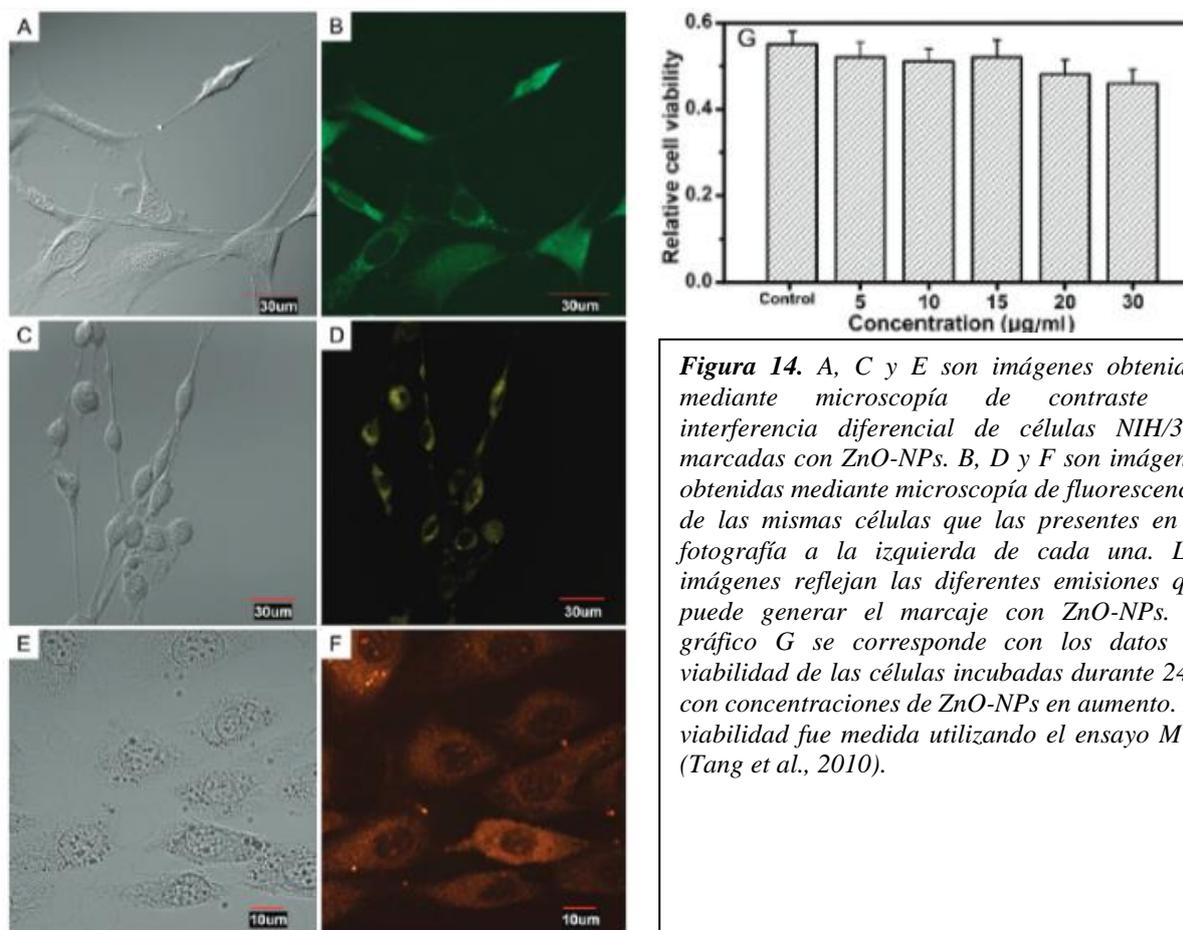
de DOX, sino que también se midió una inhibición de la proliferación de las células HeLa que era dosis dependiente (Hariharan *et al.*, 2012).

### 5.3. Otras.

Las funciones descritas en este trabajo son las más relevantes a nivel biomédico, pero las ZnO-NPs tienen muchas funciones más. Por ejemplo, se pueden utilizar para tratar la diabetes. En 2015, Nazarizadeh y Asri-Rezaie realizaron un estudio utilizando estas nanopartículas para tratar ratas con diabetes y se encontraron con que estas eran capaces de reducir muy significativamente los niveles de glucosa en sangre y de incrementar los niveles de insulina, además de servir al mismo tiempo como suplementación de zinc para elevar sus niveles en suero. El problema que observaron fue que a altas concentraciones provocaban estrés oxidativo a los eritrocitos, disminuyendo la capacidad antioxidante del suero (Nazarizadeh y Asri-Rezaie, 2016).

Otra función que pueden tener las nanopartículas de ZnO es la de antiinflamatorios. Nagajyothi *et al.* describieron un método de síntesis de ZnO-NPs sencillo, barato y ecológico y estas se probaron para estudiar sus propiedades antiinflamatorias con macrófagos estimulados con LPS. Las ZnO-NPs produjeron una supresión de la producción de NO y de diferentes compuestos pro inflamatorios como TNF-alfa, IL-6, IL-1beta o COX-2 (Nagajyothi *et al.*, 2015).

Por último, una función interesante es la de bioimagen. Tang *et al.* sintetizaron ZnO-NPs y estudiaron su emisión de luz en diferentes condiciones de pH. Estas emitieron luz azul, verde, amarilla o roja dependiendo del pH de la solución en la que se encontrasen y los investigadores determinaron que esta diferencia se debía a la disponibilidad de moléculas de oxígeno en la superficie de las nanopartículas. A pH alto, el zinc domina en la superficie y la longitud de onda emitida es mayor (el color se mueve hacia el rojo). A pH bajo domina el oxígeno en la superficie y la longitud de onda emitida baja (el color se mueve al azul) (Tang *et al.*, 2010).



## 6. Conclusiones

El zinc es un ión metálico casi omnipresente, no solo es un elemento vital en varios procesos fisiológicos sino también un fármaco en la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades. El reconocimiento de la importancia de este elemento ha llevado mucho tiempo y no es hasta hace pocos años que se ha conseguido. Es muy importante tener en cuenta que casi la mitad de la población mundial está en riesgo de tener una ingesta inadecuada de este metal, por lo que es importante que para controlar las deficiencias que esto genera la sanidad pública formule planes para combatir esta situación. No obstante, la falta de biomarcadores estandarizados para estudiar los niveles de zinc ha impedido realizar estudios concluyentes sobre la importancia real de la deficiencia de zinc en la población. Aun así, se está estudiando cada vez más su utilización como agente terapéutico y han surgido formas de utilizarlo que cada vez cobran más importancia como las nanopartículas de óxido de zinc.

Las ZnO-NPs han mostrado aplicaciones biomédicas prometedoras basadas en su actividad anticancerosa, antibacteriana, antidiabética, antiinflamatoria, de administración de fármacos y de bioimagen. Debido a la toxicidad inherente de las ZnO-NPs, poseen fuertes efectos de



inhibición contra las células cancerosas y las bacterias, al inducir la generación de ROS intracelulares y activar la vía de señalización apoptótica, lo que convierte a las ZnO-NPs en un candidato potencial como agentes anticancerígenos y antibacterianos. Además, también se sabe que las ZnO-NPs promueven la biodisponibilidad de fármacos terapéuticos o biomoléculas cuando funcionan como portadores de estas para lograr una eficacia terapéutica mejorada. Por otro lado, con la capacidad de disminuir la glucosa en sangre y aumentar los niveles de insulina, las ZnO-NPs han demostrado el potencial prometedor para tratar la diabetes y atenuar sus complicaciones y también pueden actuar como antiinflamatorios, produciendo descensos en la síntesis de factores proinflamatorios o como marcadores para realizar ensayos de bioimágenes.

Las ZnO-NPs están listadas como sustancia segura por la FDA. Sin embargo, algunos aspectos críticos de las ZnO-NPs aún necesitan ser explorados más a fondo, que incluyen lo siguiente:

(1) Falta de análisis comparativos de sus ventajas biológicas con otras nanopartículas metálicas.

(2) Las limitaciones de la toxicidad de las ZnO-NPs hacia los sistemas biológicos siguen siendo un problema y este es un tema especialmente controvertido en las investigaciones recientes.

(3) Falta de investigación aleatorizada basada en evidencia que explore específicamente los roles terapéuticos en la mejora de las actividades anticancerígenas, antibacterianas, antiinflamatorias y antidiabéticas.

(4) Falta de información sobre el estudio correspondiente en animales sobre su actividad anticancerígena, antibacteriana, actividades antiinflamatorias y antidiabéticas a nivel molecular.

Los estudios que puedan venir centrados en los problemas mencionados anteriormente podrían ayudar a dilucidar y comprender aún más el uso potencial de las nanopartículas de ZnO en los campos terapéuticos y de diagnóstico biomédico. Los nanomateriales pueden promover drásticamente el desarrollo de la medicina y es de esperar que las nanopartículas de ZnO hagan contribuciones muy interesantes en estos campos en los años siguientes.

## 7. Referencias.

Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R. y Sastry, M. (2003) "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier, 28(4), pp. 313–318.

Ajeesh, T. P., Ceasar, S. A., Maha Rajan, T., M, R., Duraipandiyan, V., Al-Dhabi, N. y Ignacimuthu, S. (2017) "Improving the zinc-use efficiency in plants: A review", *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 49, pp. 211–230.

Akbar, A., Sadiq, M. B., Ali, I., Muhammad, N., Rehman, Z., Khan, M. N., Muhammad, J., Khan, S. A., Rehman,



F. U. y Anal, A. K. (2019) "Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 17, pp. 36–42.

Andreini, C. y Bertini, I. (2012) "A bioinformatics view of zinc enzymes", *Journal of Inorganic Biochemistry*. Elsevier, 111, pp. 150–156.

Applerot, G., Perkas, N., Amirian, G., Girshevitz, O. y Gedanken, A. (2009) "Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties", *Applied Surface Science*. Elsevier, 256(3 SUPPL.), pp. S3–S8.

Baligar, V. C., Fageria, N. K. y He, Z. L. (2001) "Nutrient use efficiency in plants", *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. Taylor & Francis Group, 32(7–8), pp. 921–950.

Baltaci, A. K. y Yuce, K. (2018) "Zinc Transporter Proteins", *Neurochemical Research*. Springer New York LLC, pp. 517–530.

Banerjee, D., Lao, J. Y., Wang, D. Z., Huang, J. Y., Ren, Z. F., Steeves, D., Kimball, B. y Sennett, M. (2003) "Large-quantity free-standing ZnO nanowires", *Applied Physics Letters*, 83(10), pp. 2061–2063.

Barak, P. y Helmke, P. A. (1993) "The Chemistry of Zinc", in Robson, A. D. (ed.) *Zinc in Soils and Plants: Proceedings of the International Symposium on 'Zinc in Soils and Plants' held at The University of Western Australia, 27--28 September, 1993*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–13.

Bisht, G., Rayamajhi, S., Kc, B., Paudel, S. N., Karna, D. y Shrestha, B. G. (2016) "Synthesis, Characterization, and Study of In Vitro Cytotoxicity of ZnO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Composite Nanoparticles in Human Breast Cancer Cell Line (MDA-MB-231) and Mouse Fibroblast (NIH 3T3)", *Nanoscale Research Letters*. Springer New York LLC, 11(1), pp. 1–11.

Brown, J. J. L. (1988) "Zinc fume fever", *British Journal of Radiology*. The British Institute of Radiology, 61(724), pp. 327–329.

Campo, C. A., Wellinghausen, N., Faber, C., Fischer, A. y Rink, L. (2001) "Zinc inhibits the mixed lymphocyte culture", *Biological Trace Element Research*. Springer, 79(1), pp. 15–22.

Chandrasekaran, M. y Pandurangan, M. (2016) "In Vitro Selective Anti-Proliferative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles Against Co-Cultured C2C12 Myoblastoma Cancer and 3T3-L1 Normal Cells", *Biological Trace Element Research*. Humana Press Inc., 172(1), pp. 148–154.

Chasapis, C. y Spyroulias, G. (2009) "RING Finger E3 Ubiquitin Ligases: Structure and Drug Discovery", *Current Pharmaceutical Design*. Bentham Science Publishers Ltd., 15(31), pp. 3716–3731.

Chasapis, C. T., Spiliopoulou, C. A., Loutsidou, A. C. y Stefanidou, M. E. (2012) "Zinc and human health: An update", *Archives of Toxicology*. Springer, pp. 521–534.

Chiu, W. S., Khiew, P. S., Cloke, M., Isa, D., Tan, T. K., Radiman, S., Abd-Shukor, R., Hamid, M. A. A., Huang, N. M., Lim, H. N. y Chia, C. H. (2010) "Photocatalytic study of two-dimensional ZnO nanopellets in the decomposition of methylene blue", *Chemical Engineering Journal*. Elsevier, 158(2), pp. 345–352.

Corrie, P. G. (2008) "Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects", *Medicine*. Elsevier, pp. 24–28.

Dai, Z. R., Pan, Z. W. y Wang, Z. L. (2003) "Novel nanostructures of functional oxides synthesized by thermal evaporation", *Advanced Functional Materials*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 9–24.

*Diagrams - Zinc*. Disponible en: <https://zincnews.weebly.com/diagrams.html> (Accedido: 26 de junio de 2021).

Fageria, N. K. y Baligar, V. C. (1997) "Response of common bean, upland rice, corn, wheat, and soybean to soil fertility of an Oxisol", *Journal of Plant Nutrition*. Taylor and Francis Inc., 20(10), pp. 1279–1289.

Fox, M. R. S. (1989) "Zinc Excess", in. Springer, London, pp. 365–370.

Hall, J. L. y Williams, L. E. (2003) "Transition metal transporters in plants", *Journal of Experimental Botany*. Oxford Academic, pp. 2601–2613.

Hariharan, R., Senthilkumar, S., Suganthi, A. y Rajarajan, M. (2012) "Synthesis and characterization of doxorubicin modified ZnO/PEG nanomaterials and its photodynamic action", *Journal of Photochemistry and*



*Photobiology B: Biology*. Elsevier, 116, pp. 56–65..

Hoseinzadeh, E., Alikhani, M. Y., Samarghandi, M. R. y Shirzad-Siboni, M. (2014) "Antimicrobial potential of synthesized zinc oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria", *Desalination and Water Treatment*. Taylor and Francis Inc., 52(25–27), pp. 4969–4976.

Iravani, S. (2011) "Green synthesis of metal nanoparticles using plants", *Green Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 13(10), pp. 2638–2650.

Jiang, J., Pi, J. y Cai, J. (2018) "The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications", *Bioinorganic Chemistry and Applications*. F. P. Fanizzi. Hindawi, 2018. doi:10.1155/2018/1062562.

Joazeiro, C. A. P. y Weissman, A. M. (2000) "RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity", *Cell*. Elsevier B.V., pp. 549–552.

Kasraei, S., Sami, L., Hendi, S., AliKhani, M.-Y., Rezaei-Soufi, L. y Khamverdi, Z. (2014) "Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*", *Restorative Dentistry & Endodontics*. The Korean Academy of Conservative Dentistry, 39(2), p. 109.

Kolodziejczak-Radzimska, A. y Jesionowski, T. (2014) "Zinc oxide—from synthesis to application: A review", *Materials*. MDPI AG, pp. 2833–2881.

Kong, X. Y. y Wang, Z. L. (2003) "Spontaneous Polarization-Induced Nanohelices, Nanosprings, and Nanorings of Piezoelectric Nanobelts", *Nano Letters*. American Chemical Society, 3(12), pp. 1625–1631.

Krężel, A. y Maret, W. (2007) "Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein", *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 129(35), pp. 10911–10921.

Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V. y Buszewski, B. (2017) "Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism", *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V., pp. 37–52.

Lansdown, A. B. G. (1991) "Interspecies variations in response to topical application of selected zinc compounds", *Food and Chemical Toxicology*. Pergamon, 29(1), pp. 57–64.

Lansdown, A. B. G., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E. y Ågren, M. S. (2007) "Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects", *Wound Repair and Regeneration*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 2–16.

Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., Wu, K., Colditz, G. A., Willett, W. C. y Giovannucci, E. L. (2003) "Zinc supplement use and risk of prostate cancer", *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press, 95(13), pp. 1004–1007.

Llobet, J. M., Domingo, J. L., Colomina, M. T., Mayayo, E. y Corbella, J. (1988) "Subchronic Oral Toxicity of Zinc in Rats", *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 41, pp. 36–43.

Mirhosseini, M. y Barzegari Firouzabadi, F. (2015) "Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in Milk by Zinc Oxide Nanoparticles.", *Iranian journal of pathology*. Iranian Society of Pathology, 10(2), pp. 97–104.

Mocchegiani, E., Muzzioli, M. y Giacconi, R. (2000) "Zinc and immunoresistance to infection in aging: New biological tools", *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 205–208.

Nagajyothi, P. C., Cha, S. J., Yang, I. J., Sreekanth, T. V. M., Kim, K. J. y Shin, H. M. (2015) "Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier, 146, pp. 10–17.

Nazarizadeh, A. y Asri-Rezaie, S. (2016) "Comparative Study of Antidiabetic Activity and Oxidative Stress Induced by Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate in Diabetic Rats", *AAPS PharmSciTech*. Springer New York LLC, 17(4), pp. 834–843.

Noulas, C., Tziouvalekas, M. y Karyotis, T. (2018) "Zinc in soils, water and food crops", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Elsevier GmbH, pp. 252–260.

Padmavathy, N. y Vijayaraghavan, R. (2008) "Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles - An antimicrobial



study", *Science and Technology of Advanced Materials*. IOP Publishing, 9(3), p. 035004.

Page, V. y Feller, U. (2015) "Heavy metals in crop plants: Transport and redistribution processes on the whole plant level", *Agronomy*. MDPI AG, pp. 447–463.

Pandey, N., Pathak, G. C. y Sharma, C. P. (2006) "Zinc is critically required for pollen function and fertilisation in lentil", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Elsevier GmbH, 20(2), pp. 89–96.

Parihar, V., Raja, M. y Paulose, R. (2018) "A brief review of structural, electrical and electrochemical properties of zinc oxide nanoparticles", *Reviews on Advanced Materials Science*. Institute of Problems of Mechanical Engineering, pp. 119–130.

Plum, L. M., Rink, L. y Hajo, H. (2010) "The essential toxin: Impact of zinc on human health", *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Molecular Diversity Preservation International, pp. 1342–1365.

Polshettiwar, V., Baruwati, B. y Varma, R. S. (2009) "Self-assembly of metal oxides into three-dimensional nanostructures: Synthesis and application in catalysis", *ACS Nano*. American Chemical Society, 3(3), pp. 728–736.

Prasad, A. S., Halsted, J. A. y Nadimi, M. (1961) "Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia", *The American Journal of Medicine*. Elsevier, 31(4), pp. 532–546.

Prasad, K. y K. Jha, A. (2009) "ZnO Nanoparticles: Synthesis and Adsorption Study", *Natural Science*. Scientific Research Publishing, Inc, 01(02), pp. 129–135.

Puvvada, N., Rajput, S., Prashanth Kumar, B., Sarkar, S., Konar, S., Brunt, K. R., Rao, R. R., Mazumdar, A., Das, S. K., Basu, R., Fisher, P. B., Mandal, M. y Pathak, A. (2015) "Novel ZnO hollow-nanocarriers containing paclitaxel targeting folate-receptors in a malignant pH-microenvironment for effective monitoring and promoting breast tumor regression", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 11760.

Raghupathi, K. R., Koodali, R. T. y Manna, A. C. (2011) "Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles", *Langmuir*. American Chemical Society, 27(7), pp. 4020–4028.

Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P. y Wingett, D. G. (2010) "Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications", *Expert Opinion on Drug Delivery*. Taylor & Francis, pp. 1063–1077.

Rink, L. y Gabriel, P. (2000) "Zinc and the immune system", in *Proceedings of the Nutrition Society*. CAB International, pp. 541–552.

Rout, G. R. y Das, P. (2009) "Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc", in *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, pp. 873–884.

Rubinsztein, D. C., Mariño, G. y Kroemer, G. (2011) "Autophagy and aging", *Cell*. Elsevier B.V., pp. 682–695.

Sahoo, S., Maiti, M., Ganguly, A., George, J. J. y Bhowmick, A. K. (2007) "Effect of zinc oxide nanoparticles as cure activator on the properties of natural rubber and nitrile rubber", *Journal of Applied Polymer Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 105(4), pp. 2407–2415.

Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M. I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R. y Boccio, J. (2000) "Zinc as an essential micronutrient: A review", *Nutrition Research*, pp. 737–755.

Sandstead, H. H. (1991) "Zinc Deficiency: A Public Health Problem?", *American Journal of Diseases of Children*. American Medical Association, 145(8), pp. 853–859.

Sangani, M. H., Moghaddam, N. N. y Forghanifard, M. M. (2015) "Inhibitory effect of zinc oxide nanoparticles on pseudomonas aeruginosa biofilm formation", *Nanomed J*. Mashhad University of Medical Sciences, 2(2), pp. 298–301.

Sharma, H., Kumar, K., Choudhary, C., Mishra, P. K. y Vaidya, B. (2016) "Development and characterization of metal oxide nanoparticles for the delivery of anticancer drug", *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd., 44(2), pp. 672–679.

Sharma, V., Anderson, D. y Dhawan, A. (2012) "Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and



ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2)", *Apoptosis*. Springer, 17(8), pp. 852–870.

Spanhel, L. y Anderson, M. A. (1991) "Semiconductor Clusters in the Sol-Gel Process: Quantized Aggregation, Gelation, and Crystal Growth in Concentrated ZnO Colloids", *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 113(8), pp. 2826–2833.

Stanković, A., Dimitrijević, S. y Uskoković, D. (2013) "Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different surface stabilizing agents", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier, 102, pp. 21–28.

Syracuse Research Corporation (2005) *Toxicological Profile for Zinc*. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=SZ1ytupE5ngC&oi=fnd&pg=PR2&dq=Toxicological+Profile+for+Zinc&ots=WSzgiI8qjN&sig=gvgfG7UAfQEHyCiK0s4Zb5SFD1I#v=onepage&q=ISBN&f=false> (Accedido: 10 de junio de 2021).

Tang, X., Choo, E. S. G., Li, L., Ding, J. y Xue, J. (2010) "Synthesis of zno nanoparticles with tunable emission colors and their cell labeling applications", *Chemistry of Materials*. American Chemical Society, 22(11), pp. 3383–3388.

Tsonev, T. y Lidon, F. (2012) "Zinc in plants - An overview", *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, pp. 322–333.

Vallee, B. L. y Falchuk, K. H. (1993) "The biochemical basis of zinc physiology", *Physiological Reviews*. American Physiological Society Bethesda, MD, pp. 79–118.

Vašák, M. y Hasler, D. W. (2000) "Metallothioneins: New functional and structural insights", *Current Opinion in Chemical Biology*. Current Biology Ltd, pp. 177–183.

Wang, Y. de, Ma, C. L., Sun, X. D. y Li, H. De (2002) "Preparation of nanocrystalline metal oxide powders with the surfactant-mediated method", *Inorganic Chemistry Communications*. Elsevier, 5(10), pp. 751–755.

Wastney, M. E., Aamodt, R. L., Rumble, W. F. y Henkin, R. I. (1986) "Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans", *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 251(2), pp. R398–R408.

Weiss, D. J., Mason, T. F. D., Zhao, F. J., Kirk, G. J. D., Coles, B. J. y Horstwood, M. S. A. (2005) "Isotopic discrimination of zinc in higher plants", *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd, 165(3), pp. 703–710.

Xie, Q., Dai, Z., Liang, J., Xu, L., Yu, W. y Qian, Y. (2005) "Synthesis of ZnO three-dimensional architectures and their optical properties", *Solid State Communications*. Pergamon, 136(5), pp. 304–307.

Yadav, V. (2013) "Nanotechnology, Big things from a Tiny World: A Review", *Advance in Electronic and Electric Engineering*, 3(6), pp. 771–778.

Yu, K. N., Yoon, T. J., Minai-Tehrani, A., Kim, J. E., Park, S. J., Jeong, M. S., Ha, S. W., Lee, J. K., Kim, J. S. y Cho, M. H. (2013) "Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation", *Toxicology in Vitro*. Pergamon, 27(4), pp. 1187–1195.

Zhang, J., Qin, X., Wang, B., Xu, G., Qin, Z., Wang, J., Wu, L., Ju, X., Bose, D. D., Qiu, F., Zhou, H. y Zou, Z. (2017) "Zinc oxide nanoparticles harness autophagy to induce cell death in lung epithelial cells", *Cell Death and Disease*. Springer Nature, 8(7), pp. e2954–e2954.