

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE CINC SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN *Mus musculus*



ANGELA MARIA CASTAÑEDA MANQUILLO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

POPAYÁN

2022

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE CINC SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN *Mus Musculus*

ANGELA MARIA CASTAÑEDA MANQUILLO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniera Física

Director

PhD. Jorge Enrique Rodríguez Páez

Profesor Departamento de Física

Codirectora

Bióloga María Mercedes Ramírez de Valdenebro

Unidad de Microscopía Electrónica - Unicauca

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

POPAYÁN

2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director: _____

Jorge Enrique Rodríguez Páez, Ph.D.

Jurado: _____

Victoria Eugenia Niño, Mg

Jurado: _____

María Isabella Benítez Salazar, Ing

Popayán, 2022

DEDICATORIA

Para mi hogar, familia Manquillo Escobar.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, abuelos, tíos, hermana por su fe y apoyo incondicional hacia todos mis proyectos.

A Gerardo por su constante apoyo y construcción de sueños juntos.

A mi director, el profesor Jorge Rodríguez, por su guía y confianza, quien además es un gran ser humano e investigador.

Al increíble equipo de investigación ID 5129, conformado por las profesionales Patricia Mosquera, Paola Arciniegas, María Mercedes Ramírez, Melissa Portela, Karol Mosquera, María Edith y Karen Ángel. Por su amistad y asesoría siempre dispuesta a educar.

A mis colegas Angie y Julián, por su colaboración y asesoría en el desarrollo del prototipo.

A la Universidad del Cauca y al programa de Ingeniería Física por dirigir mi formación como profesional y favorecer los procesos de investigación necesarios para el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBUC) y la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca, por poner a nuestra disposición el uso de sus espacios y talento humano.

Al biólogo Andrés Felipe Liévano, por su asesoría en la realización del análisis estadístico de los datos.

Tabla de contenido

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivo General | 16 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 16 |
| 1.1. Introducción. | 17 |
| 1.2. Nanopartículas, características y usos | 18 |
| 1.3. Propiedades del ZnO | 19 |
| 1.4. Métodos de obtención de las ZnO NPs | 20 |
| 1.4.1. Métodos químicos | 21 |
| 1.5 Obtención y caracterización de las ZnO NPs por una ruta química (procedimiento experimental) | 23 |
| 1.5.1 Análisis Térmico | 27 |
| 1.5.2. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) | 29 |
| 1.5.3 Espectroscopia Raman | 31 |
| 1.5.4. Difracción de rayos X | 33 |
| 1.5.5 Espectroscopia de Electrones Foto emitidos (XPS) | 35 |
| 1.5.7 Microscopia electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia EDS | 39 |
| 1.6.1 Obtención del extracto a base de ajo a utilizar como solvente | 42 |
| 1.6.2. Obtención de ZnO-NPs por el método precipitación controlada usando el extracto de ajo como solvente | 44 |
| 1.6.3 Seguimiento del proceso de síntesis del ZnO, por ruta verde, y característica del producto final: uso de espectroscopia IR. | 46 |

| | |
|--|----|
| 1.6.4 Caracterización de los biohíbridos con base en ZnO: Espectroscopia Raman | 51 |
| 1.6.5 Comportamiento de los biohíbridos con base en ZnO frente a tratamiento térmicos: Análisis térmico | 53 |
| 1.6.6 Estructura cristalina de los biohíbridos con base en ZnO | 55 |
| 1.6.7 Análisis de los biohíbridos con base en ZnO utilizando XPS | 56 |
| 1.6.8 Morfología y tamaño de partícula de los biohíbridos sintetizados por una ruta verde: microscopía electrónica | 58 |
| 1.7. CONCLUSIONES | 61 |
| Referencias | 62 |
| CAPÍTULO 2. EFECTOS DE LAS ZNO NPS SOBRE LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DEL BIOMODELO MUS MUSCULUS | 71 |
| 2.1 Toxicidad de las nanopartículas | 72 |
| 2.2 Efectos tóxicos de las ZnO-NPs | 72 |
| 2.3 Aspectos experimentales para evaluar la toxicidad de las ZnO NPs sintetizadas | 73 |
| 2.3.2 Montaje experimental: Diseño y prototipo de la cámara de nebulización para NPs en suspensión | 74 |
| 2.3.2.1 Prueba del diseño experimental | 83 |
| 2.3.3 Exposición de los biomodelos a atmósferas de ZnO NPs | 86 |
| 2.3.4. Obtención de las muestras biológicas que contengan células espermáticas | 88 |
| 2.4 Análisis estadístico de los resultados | 91 |
| 2.4.1 Concentración | 92 |
| 2.4.2 Motilidad | 94 |

| | |
|--|------------|
| 2.4.2.1. Motilidad progresiva | 94 |
| 2.4.2.2 Motilidad no progresiva | 96 |
| 2.4.2.3 Inmotilidad | 96 |
| 2.4.5 Vitalidad | 97 |
| Discusión | 98 |
| Conclusiones | 101 |
| Referencias | 102 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Modos vibracionales activos en Raman y sus procesos asociados correspondientes a ZnO-NPs sintetizadas por una ruta química (Referente: Cuscó et al., (2007)) | 28 |
| Tabla 2. Información sobre los picos que aparecen en el difractograma de rayos x correspondiente a la muestra de ZnO sintetizada por el método Pechini. | 30 |
| Tabla 3. Modos vibracionales activos en Raman y sus procesos asociados correspondientes a los nano biohíbridos con base en ZnO sintetizadas por una ruta verde (Referente: Cuscó et al., (2007)) | 47 |
| Tabla 4. Segunda prueba de caracterización equipo de nebulización. | 72 |
| Tabla 5. Tercera prueba caracterización equipo | 72 |
| Tabla 6. Prueba dosis 100-caracterización equipo de nebulización. | 73 |
| Tabla 7. Diseño experimental usado | 75 |
| Tabla 8. . Comparaciones por pares de Wilcoxon para la concentración de espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. | 80 |
| Tabla 9. Comparaciones por pares de Tukey para la motilidad progresiva de espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. | 81 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 . (a) Curva de calentamiento. (b). Esquema que indica el método de síntesis por una ruta química, complejo polimérico Pechinni modificado, utilizado para obtener el ZnO. 22
- Figura 2. Curva de valoración potenciométrica del sistema complejo de cinc – etilenglicol – ácido acético utilizando el NH₄OH como base. 24
- Figura 3. Curvas de ATD/TG correspondiente al precalcinado obtenido durante el desarrollo del método Pechinni modificado para sintetizar ZnO. 25
- Figura 4. (a) Muestra del precalcinado obtenido a 300 °C, durante el proceso de síntesis, y (b) su espectro IR correspondiente. 26
- Figura 5. (a) Muestra de precalcinado tratada a 550°C/5h y (b) su espectro IR correspondiente 26
- Figura 6. Espectro Raman de las ZnO-NPs sintetizadas por Pechinni y tratado térmicamente a 550°C 28
- Figura 7. Difractograma de rayos x correspondiente al ZnO sintetizado utilizando el método Pechini modificado. 30
- Figura 8. .(a) Espectro de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) correspondiente al ZnO sintetizado por una ruta química y las deconvoluciones correspondientes de las señales: (b) Zn 2p (c) O 1s y (d) C 1s. 33
- Figura 9. Fotografías obtenidas con microscopia electrónica de transmisión - TEM de las ZnO NPs obtenidas utilizando el método Pechinni. 34
- Figura 10. (a) Fotografías tomadas con MEB del ZnO sintetizado por el método Pechini y (b) espectro EDS con la tabla que indica su composición química elemental. 36
- Figura 11. Curva de calibración potenciométrica y temperatura para sistema de nano híbridos de ZnO base ajo 39
- Figura 12. Esquema del método precipitación controlada, utilizando el extracto ajo como solvente, que se empleó como ruta verde para obtener las ZnO-NPs. 40
- Figura 13. Textura del compuesto de cinc obtenido por síntesis verde, usando extracto de ajo, y tomando como base el método de precipitación controlada. 41

| | |
|---|----|
| Figura 14. Espectros IR que indican la evolución de los grupos funcionales durante la etapa de lavado para sintetizar las nanopartículas de ZnO usando una ruta verde, con el solvente extracto de ajo. | 42 |
| Figura 15. Espectro IR del ajo secado a 40 °C, durante 48 horas | 43 |
| Figura 16. Espectros IR que corresponden al ajo y a los nano-biohíbridos con base en ZnO que se obtuvieron a través de la ruta verde empleada. | 44 |
| Figura 17. Espectros IR correspondientes a muestras de nano biohíbridos, con base en ZnO, sometidos a diferentes temperaturas. | 45 |
| Figura 18. Espectro Raman correspondiente a los nano biohíbridos con base en ZnO sintetizados por una ruta verde, utilizando extracto de ajo. | 47 |
| Figura 19. Curvas de ATD/TG correspondiente a los nano biohíbridos con base en ZnO obtenidas por síntesis verde, utilizando extracto acuoso de ajo. | 48 |
| Figura 20. Difractograma de rayos X correspondiente al nano biohíbridos con base en ZnO sintetizado por una ruta verde (usando extracto de ajo). | 50 |
| Figura 21. (a) Espectro XPS correspondiente a los nano biohíbridos con base en ZnO, sintetizados por una ruta verde, y las deconvoluciones de las señales: (b) Zn 2p, (c) O 1s, (d) C 1s y (e) N 1s. | 51 |
| Figura 22. Micrografías obtenidas con TEM de los nano biohíbridos con base en ZnO sintetizadas por una ruta verde, utilizando extracto de ajo. | 53 |
| Figura 23. Fotografías tomadas con MEB de los nano híbridos con base en ZnO sintetizados por una ruta verde. | 53 |
| Figura 24. Espectro EDS así como su composición química elemental, correspondiente a los nano híbridos de ZnO obtenidos por la ruta verde empleada, usando el extracto de ajo. | 54 |
| Figura 25. . Primer diseño de cámara de nebulización | 68 |
| Figura 26. Segundo diseño de cámara de nebulización. | 68 |
| Figura 27. Tercer diseño de cámara de nebulización. | 69 |
| Figura 28. Cuarto diseño de cámara de nebulización. | 70 |
| Figura 29. Vista frontal y lateral prototipo diseñado. | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 30. Modelo Mus musculus usado | 75 |
| Figura 31. Epidídimo y conducto deferente biomodelo de Mus Musculus. | 77 |
| Figura 32. Diagrama epidídimo ratón Mus Musculus. Fuente: Bertnald et al, 2010 | 78 |
| Figura 33. Diagrama de cajas que relaciona la concentración de espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. Los diagramas de cajas marcados con diferentes letras o combinaciones de letras indican diferencias significativas. | 80 |
| Figura 34. Diagrama de cajas que relaciona los parámetros de motilidad progresiva, motilidad no progresiva e inmovilidad espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. Para el caso de motilidad progresiva los diagramas de cajas marcados con diferentes letras o combinaciones de letras indican diferencias significativas. | 83 |
| Figura 35. Diagrama de cajas que relaciona el porcentaje de vitalidad respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. | 84 |

RESUMEN

Normalmente, las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs) se obtienen empleando métodos químicos, en los que se generan desechos tóxicos, por lo que ha surgido el interés de sintetizarlas usando metodologías amigables con el medio ambiente. Por otro lado, es inquietante determinar el efecto que el método de síntesis puede tener en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, así como sobre su bioactividad; específicamente sobre las células espermáticas de ratones *Mus Musculus*. Fue por esto que, en este trabajo, se obtuvieron ZnO-NPs tanto por una ruta química, complejo polimérico - Pechinni, como por una ruta verde. Para sintetizar las ZnO-NPs, usando la ruta química, se requirió de un tratamiento térmico a 550 °C. Cuando se realizó la síntesis verde, inicialmente se observó la variación de las bandas en los espectros IR correspondientes a los diferentes sedimentos tomados del sistema, durante el lavado sistemático con extracto acuoso de ajo a que fue sometido el precipitado original, registrándose una progresiva transformación química del sólido. El sedimento resultante del proceso de lavado se secó a 80 °C, el espectro obtenido a través de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) mostró la banda característica del ZnO, así como bandas asociadas a los grupos bioactivos del ajo, indicando la formación de un nano-biohíbrido con base en ZnO. Las muestras sintetizadas se caracterizaron utilizando diferentes técnicas convencionales, entre ellas: espectroscopia IR y Raman, Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). La caracterización de las partículas sintetizadas por la ruta química mostró que estas estaban bien cristalizadas, con una estructura tipo wurtzita, y presentaban una morfología esférica, con un tamaño de partícula de 50 nm. Por su parte, las obtenidas por ruta verde fueron amorfas, con estructura laminar: ancho <15 nm y longitud <100 nm. Los espectros Raman de las muestras sintetizadas evidenciaron la presencia de ZnO en las mismas. Después de realizar los ensayos de inhalación de ZnO NPs en suspensión, programados para evaluar el efecto de los sólidos sintetizados sobre las células espermáticas, los nano biohíbridos de ZnO presentaron un ligero efecto protector manifiesto sobre parámetros de calidad espermática, como concentración y vitalidad. Por su parte, las ZnO NPs sintetizadas por el método químico, no presentaron efectos negativos significativos sobre la calidad espermática, en general.

PALABRAS CLAVE: *Allium Sativum*; nanopartículas de óxido de cinc; nano-biohíbridos; inhalación; calidad espermática.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la nanotecnología ha involucrado un avance importante en la ciencia de los materiales, lo que ha generado un gran interés en el estudio de aquellos objetos con tamaños menores a 1 μm (Gogos et al., 2012). La diversidad de formas y composiciones, así como de usos que estos presentan, los ha posicionado como materias primas de alto valor para la industria en general. En el mercado actual, las nanopartículas de óxido de cinc diseñadas (ZnO-NPs) son fabricadas debido a su amplia variedad de aplicaciones, desde nano sensores, protectores solares y absorbentes de Rayos Ultravioleta (UV), nano materiales biocompatibles, entre otras. En los últimos años, se ha incrementado la investigación y aplicación de las ZnO-NPs en la producción de alimentos y como herramienta importante para optimizar los procesos agrícolas (Rakibuzzaman et al., 2018); por ejemplo, se utilizan como nano plaguicida y fertilizante, controlando, por un lado, los microorganismos que atacan a los cultivos y por otro lado actuando como micronutriente para los suelos (Gogos et al., 2012; Sturikova et al., 2018). Es por ello que las ZnO-NPs se han convertido en una opción prometedora como insumo agrícola, presentando ventajas considerables frente a otros óxidos, tal como su comprobada actividad antimicrobiana (Kumar et al., 2018a, b; Li et al., 2009) y antifúngica (Arciniegas-Grijalba et al., 2019).

No obstante, las investigaciones desarrolladas, considerando el uso seguro y extendido de las ZnO-NPs, no son concluyentes. Específicamente, son pocos los estudios realizados para evaluar el efecto de estas nanopartículas (NPs) sobre células espermáticas. Los resultados obtenidos han sido contradictorios. Algunos trabajos sugieren un impacto negativo en la salud humana, tal como lo mostraron los resultados de ensayos *in vitro* en espermatozoides humanos (Barkhordari, 2013) donde se observaron elevados porcentajes de muerte celular, dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración de las NPs (nanopartículas). Por otro lado, su uso ha mostrado efectos benéficos sobre la capacidad funcional en la manipulación de espermatozoides crio, preservados con ZnO-NPs (Isaac et al., 2017). Esto indica que se requiere realizar más estudios para determinar el efecto de las NPs sobre las células espermáticas.

JUSTIFICACIÓN

Las ZnO-NPs poseen propiedades y características novedosas como resultado de su reducido tamaño, que está en el orden de los 100 nm o menos, diferentes a las que presenta el material en bloque: menos semiconductividad y mayor reactividad. Según Behzadi et al., (2017), las NPs pueden ingresar a los organismos a través de diferentes vías, lo cual puede producir una interacción con los sistemas biológicos, tal que es necesario considerar la importancia de realizar investigaciones que permitían evaluar los posibles efectos de las nanopartículas en los seres vivos, específicamente considerando su acción tóxica. Como las ZnO-NPs se pueden obtener utilizando diferentes técnicas, principalmente químicas, surgió el interés en determinar el efecto del método de síntesis sobre la toxicidad de las nanopartículas. Fue por ello que, en este proyecto de grado, se sintetizaron ZnO-NPs utilizando dos métodos: químico (precursor polimérico) (Franco et al., 2010) que corresponde a uno de los más populares a nivel industrial; y verde (método de precipitación controlada) (Rodríguez, 1999), el cual ofrece ventajas relacionadas con la disminución de contaminación ambiental provocada por la síntesis de materiales. Ambas metodologías permitieron obtener productos con características controladas y reproducibles. Por otro lado, para determinar la posible toxicidad de los sólidos sintetizados, se expusieron biomodelos (*Mus musculus*) a atmósferas ricas en ZnO-NPs, con diferentes concentraciones. Debido a que en el mercado no es común encontrar cámaras nebulizadoras de suspensiones, con las características requeridas para realizar este tipo de ensayos, y que, además, las que se comercializan son muy costosas, se diseñó y fabricó un prototipo de cámara de nebulización para cuerpo entero de uso veterinario. Usando este equipo, se diseñó un experimento que permitió determinar si la inhalación de estas ZnO-NPs propiciaba alguna alteración en la calidad espermática de los biomodelos, dado que según se reporta en la literatura, el pequeño tamaño de las NPs permite que puedan ingresar al cuerpo a través de la vía respiratoria, donde debido a la endocitosis de las células epiteliales alveolares, las NPs pueden translocarse a otros órganos, desplazándose desde el pulmón hasta el hígado, bazo, corazón etc., (Jamuna, Ravishankar, 2014) .

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las condiciones de síntesis sobre la toxicidad de las ZnO-NPs, específicamente sobre los espermatozoides del *Mus musculus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar las condiciones más adecuadas para sintetizar ZnO-NPs, por métodos químico y verde, así como las características fisicoquímicas de los sólidos obtenidos, empleando técnicas convencionales de análisis.
- Desarrollar un prototipo de equipo de nebulización de suspensiones de ZnO-NPs para evaluar la toxicidad de estas nanopartículas en biomodelos *Mus musculus*
- Evaluar los cambios citológicos de las células espermáticas de *Mus musculus* expuestos a ZnO-NPs sintetizadas por rutas química y verde.

CAPITULO 1. SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO

1.1. Introducción.

El interés central de este trabajo de grado está relacionado con la evaluación de un material 0D (confinamiento cuántico en las tres direcciones espaciales) de la nanotecnología, específicamente de las nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs), sobre la calidad espermática de un biomodelo. Es por ello que es necesario realizar una breve alusión a este nuevo campo de interés. El origen de la nanotecnología es objeto de debate. Algunos investigadores lo atribuyen a Richard Feynman, cuando en una charla dada en 1959 en el Caltech, expuso su visión del alto potencial de desarrollo que existe a nivel atómico, hablando de la posibilidad de fabricar maquinas a pequeña escala con la capacidad de elaborar, por sí mismas componentes más pequeños de tamaño atómico, de manera análoga a lo que ocurre en los “maravillosos sistemas biológicos”, como él los denominó. Paralelamente, Marvin Minsky proponía la posibilidad de crear “complejas maquinas del tamaño de una pulga o incluso similares a células bacterianas” (Minsky, 1962), las cuales podrían fabricar miles de elementos en cuestión de segundos. Esta idea de un diminuto ‘fabricante’ se desarrolló años después como concepto en la mente de Eric Drexler, quien acuñó la idea de ‘una maquina universal de ensamblaje a nano escala’, la cual debía ser construida átomo por átomo, pero que una vez terminada tendría la capacidad de crear nuevos elementos o incluso replicar su propia estructura. Sin embargo, la idea de un interventor a escala atómica ya había sido propuesta por James Clerk Maxwell, al proponer su ‘demonio’ en la Teoría del Calor publicada en 1871. (Ramsden, Jeremy, 2011).

Este campo del conocimiento ha evolucionado continuamente tal que, en la actualidad, la nanotecnología contempla una amplia variedad de aplicaciones, las cuales han involucrado investigaciones en diferentes áreas. Se encuentran investigadores trabajando en biología, ciencia de materiales, medicina, en las industrias metalúrgica y alimentaria, etc. La diversidad de estudios realizados en el marco de la ciencia de lo nanométrico (10^{-9} m), evidencia el interés generado en este campo de investigación. Esto debido a que las aplicaciones desarrolladas, en las distintas áreas tecnológicas, han contribuido a mejorar nuestro entendimiento y conocimiento de la naturaleza atómica de la materia, al tiempo que ha permitido usar sus características especiales en aplicaciones evidentes de interés para los seres humanos.

1.2. Nanopartículas, características y usos

Los nanomateriales se encuentran en el medio ambiente con relativa facilidad. Los entornos de bajas temperaturas suelen propiciar la formación de nano cristales y permite prevenir su degradación a corto plazo, tal que se pueden identificar en arcillas con tamaños menores a 2 μm y como centros activos de enzimas en moléculas biológicas (Banfiel-Zhangn, 2001). Se tiene evidencia que confirma que desde la época de los romanos se fabricaba cristalería, empleando técnicas empíricas, donde se usaban metales a escala nanométrica (copa de Licurgo); además del extendido uso de nano cristales de PbS como tinte negro para el cabello (Walter et al., 2016). Mas tarde, en Inglaterra (1449), una patente para la fabricación de vidrio coloreado con oro nano particulado fue concedida al fabricante de vidrio John Utynam. Años después, estudios realizados para comprender las propiedades de las legendarias espadas de Damasco revelaron que estas se podrían atribuir a la presencia de nanotubos de carbono embebido en la hoja (Ramsden, Jeremy, 2011).

Como se evidencia, el interés en desarrollar aplicaciones, aprovechando la materia a pequeña escala y sus interesantes propiedades, ha ido aumentando a través de los tiempos. En los últimos años, la posibilidad de diseñar materiales desde sus componentes atómicos, para propiciar la aparición de propiedades novedosas, es un campo de investigación que ha seducido a diferentes áreas del conocimiento, especialmente en los métodos de obtención y las características especiales de las NPs.

1.3. Nanopartículas de ZnO

Dentro de la gran variedad de compuestos químicos, las nanopartículas de óxidos metálicos han generado gran interés debido a sus propiedades especiales, concretamente la reactividad superficial y las propiedades eléctricas que presentan. Según Rounder (2006), las características de las nanopartículas, a nivel superficial y de efectos cuánticos, son las responsables de las diferentes propiedades y comportamiento con respecto al mismo material a escala macroscópica. Específicamente, a nivel de superficie, hay menos estabilidad, por lo cual la energía

necesaria para unirse a átomos en la periferia es muy baja. Uno de los principales efectos de este cambio se observa en el punto de fundición, Cao (2004) describió la disminución de esta temperatura para metales y semiconductores cuyo tamaño de partícula es menor a 100 nm. Los puntos cuánticos se consideran como un tipo nanoestructuras, con comportamiento análogo a una supramolécula, lo cual confiere propiedades magnéticas a metales paramagnéticos como oro y platino. (Mora, Arenas, 2018). Una de las principales características de las NPs está relacionada con el aumento de reactividad del material, el cual, al disminuir de tamaño, la superficie se incrementa hasta 1000 veces (Buzea et al., 2007). Esta característica especial implica que una unidad muy pequeña tenga un área superficial significativamente alta para reaccionar con su entorno.

1.3. Propiedades del ZnO

En la naturaleza, el cinc es un metal maleable del cual se conocen 15 isótopos, de los cuales 5 son estables, y, aproximadamente, la mitad del cinc común se encuentra como isótopo de masa atómica 64. Es uno de los elementos más escasos en el planeta tierra, ocupando el puesto 25 en orden de abundancia de los elementos. Sin embargo, es esencial para el desarrollo de los seres vivos. Es un buen conductor de calor y electricidad presentando, además, una cuarta parte de la eficiencia de la plata para transmitir calor; como elemento puro no es ferromagnético y a 0.91 K actúa como superconductor eléctrico (Lenntech, 2017).

En la información sobre sustancias peligrosas, del Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores de New Jersey, indica que “el óxido de cinc es un polvo inodoro blanco que se usa en pigmentos, caucho, pinturas, cerámicos, plásticos, cosméticos, recubrimientos y fármacos”, y suele usarse como agente para dar volumen, color y protección frente a condiciones del medio ambiente. Está sujeto a reglamentos de la OSHA (Occupational Safety and Health Administration) (2012) y el NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) publicación número 0675, entre otros, debido al peligro que supone, para la salud humana, la inhalación de los vapores producidos durante su calcinación.

El ZnO es un óxido semiconductor II-VI con banda prohibida ancha y directa de 3.37 eV, a 300K. Típicamente, presenta conductividad tipo n, con una concentración de electrones debido, principalmente, a las vacancias de oxígeno, aunque pueden existir en su estructura otro tipo de defectos (Morkoç H, Özgür, 2009). Su estructura es tipo wurzita y, a nivel nanométrico, puede presentar variadas morfologías, como: nano hilos, nano fibras, nanotubos, nano esferas, etc. La forma de las nanopartículas de ZnO dependen de la metodología de obtención, así como del medio utilizado para su síntesis. Específicamente, las películas de ZnO tienen características interesantes, son transparentes a la luz, absorben rayos UV y producen respuesta piezoeléctrica (Mydeen et al., 2020).

A pesar de que, en general, la oxidación de los metales se considera un fenómeno indeseable y se han dedicado grandes esfuerzos en desarrollar técnicas para prevenirlo; la realidad destaca el papel de barrera protectora que éste realiza, pues evita que el medio ambiente agrede el metal. El cinc es uno de los metales más usados en estructuras expuestas a la atmosfera y sus productos de corrosión, de naturaleza alcalina, neutralizan la acidez de la humedad condensada sobre él. De manera general, la fase oxidada es más estable energéticamente.

Por otro lado, las propiedades de un material pueden cambiar drásticamente, con su tamaño y morfología. En la actualidad, las nanopartículas de ZnO (ZnO NPs) son empleadas en gran variedad de aplicaciones (K. Awasthi (Ed), 2021), siendo uno de los óxidos metálicos nano particulados más importantes para la industria. Su importancia en la nanotecnología proviene de las propiedades físicas y químicas especiales que éstas presentan (K. Awasthi 2021). Desde usos en biomedicina, como vehículos para la administración de medicamentos (G. Ciofani (Ed), 2018), hasta usos en agricultura (M. Siddiqui, et al., 2015). El alto valor de su área superficial o superficie específica, propiciado por la alta relación de átomos superficiales a átomos del “bulk” y su elevado valor de energía superficial, confiere a las nanopartículas una alta reactividad química, lo que lleva a considerar que su interacción con los sistemas biológicos requiere de un estudio más sistemático y cuidadoso.

1.4. Métodos de obtención de las ZnO NPs

Dependiendo del objetivo deseado y las condiciones de uso previstas para las nanopartículas, existen diferentes metodologías para obtenerlas. Teóricamente, los métodos de síntesis se clasifican en dos grandes categorías: “Top-Down” (Arriba hacia abajo) y “Bottom-Up” (abajo hacia arriba) (Khaderbad, 2010; Schmid, 2004). La primera categoría está constituida por diferentes procedimientos que buscan la reducción de un material sólido en porciones cada vez más pequeñas. Esta puede incluir acciones físicas, como desgaste y molienda, así como químicas y volatilización-condensación de compuestos. El tipo “Bottom-Up” consiste en ‘fabricar’ nanopartículas, principalmente, condensando sistemas moleculares en solución (Schmid, 2004). En este trabajo, tanto el método de precipitación controlada (verde), como el método de complejo polimérico (químico), corresponden a una técnica tipo “Bottom – Up” considerando las condiciones de infraestructura para la realizar al investigación y el acceso a los reactivos base.

1.4.1. Métodos químicos

En la literatura se mencionan diferentes métodos químicos, algunos de los más populares se listan a continuación:

Método Coloidal: Consiste en disolver un precursor que normalmente es una sal del catión de interés, además de un reductor y estabilizante en fase líquida. Al variar la concentración de los reactivos, reductores y estabilizantes se puede controlar el tamaño y la morfología de las nanopartículas. Una de las ventajas de este método está en la posibilidad de formar dispersiones muy estables en el tiempo, como la dispersión coloidal de oro fabricada por Michael Faraday en 1957, la cual hasta el momento permanece invariable (López-Mora, Gutiérrez-Arenas., 2018).

- **Reduccion fotoquímica:** Se caracteriza por la utilización de altas energías, las cuales generan reductores fuertemente activos, conocidos generalmente como radicales, especies excitadas y electrones. Debido a la ausencia de reductores químicos, y sus correspondientes productos de desechos (impurezas); este metodo permite obtener nanopartículas de alta pureza en condiciones de estado sólido e incluso a bajas temperaturas. Suelen obtenerse

a base de sales en agua, alcohol y solventes orgánicos (López-Mora, Gutiérrez-Arenas., 2018).

● **Irradiación con microondas:** Otra técnica tipo “Bottom Up” que permite obtener nanopartículas con morfología altamente uniforme. La radiación utilizada actúa como campo eléctrico de alta frecuencia calentando el material base, esto debido a que las componentes moleculares de los solventes polares pierden energía durante sus colisiones. Frecuentemente se utiliza para obtener nanopartículas de metales a partir de sus sales precursoras disueltas en etilenglicol. El método es homogéneo, rápido y eficaz, pero genera residuos químicos, significativos, como producto de las reacciones estequiométricas que ocurren a temperaturas mayores a 200 °C (López-Mora, Gutiérrez-Arenas., 2018)

● **Deposición química en fase de vapor:** : Proceso conocido, comúnmente, como CVD (Chemical Vapor Deposition), el cual permite obtener nanomateriales, entre otros aquellos con base en carbono, con alto grado de pureza y cristalinidad, específicamente carbonos nano alótropos (CNA), como los fullerenos, grafenos y nano diamantes; nanotubos de carbón (CNT), etc. El método consiste en propiciar el calentamiento de un horno tubular, en un rango de 500-1000°C, donde un gas inerte es “localizado” en su interior por 36 horas, para, después, permitir la entrada del agente precursor. Dependiendo del tipo de precursor y las condiciones de trabajo, el tiempo de deposición de la película o recubrimiento se determina previamente para, después, enfriar el horno mientras se permite, nuevamente, el ingreso a la cámara del gas inerte. Para extraer el material obtenido, se realizan lavados con ácidos para eliminar trazas de contaminante (material orgánico) (Borja, Stalin, 2020).

● **Metodo de electrodeposición:** Proceso que se utiliza, normalmente, cuando se requiera crecer conductores eléctricos, ya sea metales, semiconductores etc. Se busca sintetizar nanomateriales con área superficial, pureza y cristalinidad elevadas. En el método se usa una membrana (por ejemplo, de policarbonato o alúmina anódica) como plantilla y un precursor del material de interés, tal que sobre esta se producen reacciones electroquímicas. Esta metodología permite fabricar matrices alineadas, en 1D, de nano hilos uniformes. Es necesario someter el material a tratamientos térmicos a altas temperaturas para consolidarlo, lo cual unifica su densidad e integridad mecánica predeterminada (Borja, Stalin; 2020)

● **Metodo de complejo polimérico-Pechinni:** En 1967 A. Pechinni desarrolló una técnica para preparar óxidos de componentes variados, homogéneos y de alta pureza. En el inicio del proceso se favorece la formación de una “resina

polimérica”, a través de reacciones de poli esterificación de un quelato metálico complejo, usando para ello ácidos hidroxicarboxílicos alfa, como el ácido cítrico, y alcoholes polihidroxílicos como el etilenglicol. La idea es obtener, inicialmente, una resina tipo poliéster constituida por cadenas de macromoléculas, dispuestas aleatoriamente, en las cuales los iones metálicos se disponen uniformemente. Muchos iones metálicos, excepto los cationes monovalentes, forman quelatos complejos muy estables con el ácido cítrico ya que este tiene tres grupos de ácido carboxílico y un grupo alcohólico, en la misma molécula. La mayoría de estos complejos metal-ácido cítrico son solubles en agua y etilenglicol, lo cual asegura una mezcla perfecta de los iones metálicos a nivel molecular” (Raba et al., 2011).

El ácido cítrico experimenta, fácilmente, esterificación a temperaturas moderadas, alrededor de 100°C, en presencia de etilenglicol. Si estas condiciones se mantienen durante suficiente tiempo, se favorece la poli esterificación de estos reactivos, conduciendo a la conformación de una resina polimérica sin color. Es muy importante seleccionar precursores adecuados de los iones tal que, al mezclar las cantidades requeridas de los mismos, permitan obtener la estequiometría del óxido metálico de interés y no se presente la segregación de alguno de los iones. Esta condición se debe cumplir rigurosamente porque en el sistema se conservan las proporciones de los iones metálicos iniciales, en el ambiente generado por el complejo ácido cítrico-metal, a 100°C. Posteriormente, la resina polimérica es tratada a temperaturas mayores a 300°C para propiciar la rotura del polímero; sin embargo, durante esta acción, la alta viscosidad de la red impide una separación significativa de los cationes, evitando la separación de fases.

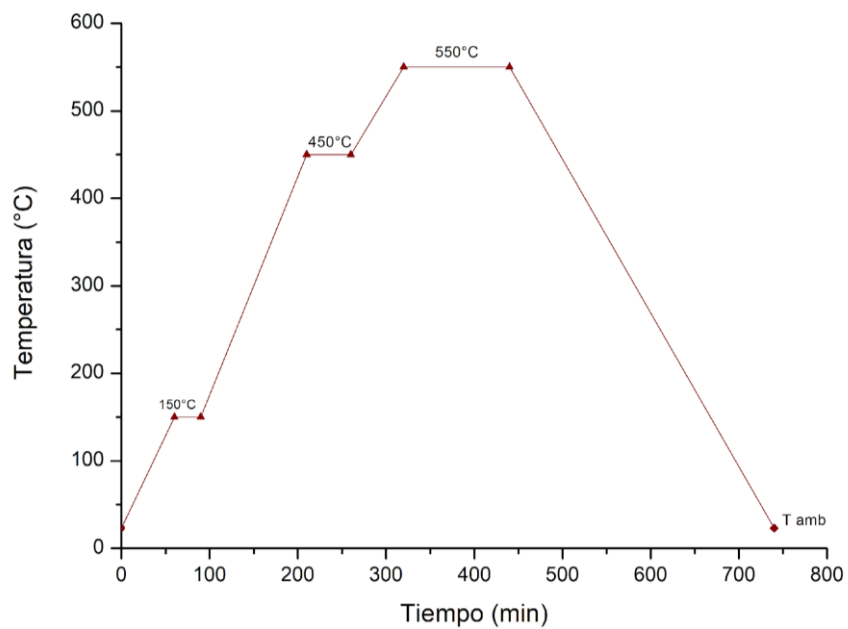
Este método ofrece ventajas frente a otros procesos empleados para obtener óxidos complejos, con varios componentes, pues se basa en el uso de un precursor homogéneo con estructura bien definida, lo cual propicia el conformado de la microestructura deseada, de manera controlada. (Raba et al., 2011)

1.5 Obtención y caracterización de las ZnO NPs por una ruta química (procedimiento experimental)

Los polvos de óxido de cinc ZnO se obtuvieron por un método químico, el denominado: complejo polimérico (Pechinni) (Carbajal-Franco et al., 2010). Para ello, inicialmente, se calentó etilenglicol ($C_6H_6O_2$ Malinckrodt) a $70^\circ C$ y lentamente se adicionó ácido cítrico mono hidrato ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ pureza 99.8% Malinckrodt), manteniendo el sistema en agitación constante, y garantizando una relación 4:1 de etilenglicol (EG):ácido cítrico (AC). Considerando la obtención de 1 g de ZnO-NPs, se mezclaron 3.10 g de etilenglicol y 2.60 g de ácido cítrico y la agitación del sistema se mantuvo por varios minutos para garantizar su homogeneidad (solución transparente). Posteriormente, la mezcla se llevó a temperatura ambiente. Simultáneamente, se disolvió 2.6 g de acetato de cinc (marca Merck) en 13.5 g de agua, en agitación constante. Las dos mezclas se combinaron, agregando lentamente y de manera controlada la suspensión del precursor de cinc a la solución EG:AC; el sistema final se dejó en agitación, a temperatura ambiente, por 40 min.

Pasado este tiempo y garantizando una mezcla homogénea (transparente y sin presencia de precipitado y/o sedimento), se registraron sus valores de pH y temperatura. A continuación, se procedió a adicionar, de manera controlada, hidróxido de amonio (NH_4OH , Merck), hasta alcanzar un pH de ~ 9 . Mientras se adicionaba la base débil, se registraron los valores del volumen de precipitante adicionado y el correspondiente valor de pH del sistema, obteniéndose una curva de valoración, la cual dio información del comportamiento del sistema, durante la adición del NH_4OH , y se utilizó como medio de control de esta etapa del proceso. Finalmente, la mezcla se colocó sobre una plancha calefactora a $120^\circ C$, en agitación constante, durante el tiempo necesario para la formación de la resina viscosa. Esta resina se colocó en un horno, a $300^\circ C$ durante ~ 4 horas, hasta que se formó un "puff". Este material se colocó en un mortero de ágata y se molió obteniéndose un polvo negro al que se le denominó precalcinado. De este producto se tomaron muestras para registrar su espectro IR y, además, para realizarle un análisis térmico con el objetivo de determinar la temperatura de tratamiento más adecuada para obtener el ZnO de interés. Considerando los resultados del análisis térmico, el precalcinado se trató a $550^\circ C$, durante 5 horas, ver Figura 1a. El producto resultante, un polvo de color blanco, se maceró y se utilizó para realizar las diferentes técnicas de caracterización para conocer las características fisicoquímicas del ZnO sintetizado, antes de evaluar su efecto sobre la calidad espermática del biomodelo. En la Figura 1b se muestra el esquema del proceso de síntesis empleado para obtener el ZnO por esta ruta química.

(a)



(b)

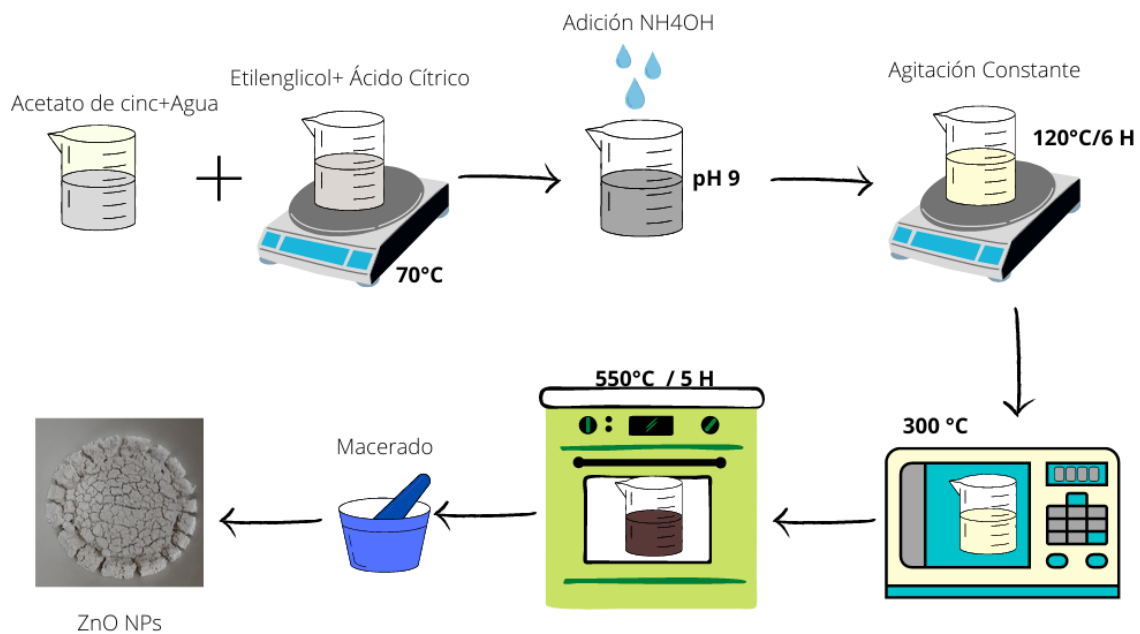


Figura 1 . (a) Curva de calentamiento. (b). Esquema que indica el método de síntesis por una ruta química, complejo polimérico Pechinni modificado, utilizado para obtener el ZnO.

Con el objetivo de garantizar la repetibilidad del proceso de síntesis, se registró la variación del pH del sistema complejo de cinc – etilenglicol – ácido acético al adicionarle el agente precipitante, NH_4OH , y la variación de la temperatura. La curva de calibración obtenida para este sistema se observa en la Figura 2, Observando la curva de valoración, Figura 2, se pueden evidenciar 3 zonas en ella, considerando la variación de su pendiente. Inicialmente, cuando la temperatura del sistema era $\square 24.5^\circ\text{C}$ 26.6°C y el valor de su pH de $\square 3$, el sistema presento un color blanco y un aspecto viscoso. Al comenzar la adición del hidróxido de amonio, el pH y la temperatura aumentaron, presentándose cambio en estos parámetros como consecuencia de reacciones exotérmicas (evidenciadas por aumentos locales de temperatura) que ocurrirían al interior del sistema durante esta etapa. Cuando el pH del sistema alcanza un valor entre 3 y 6, la tonalidad del sistema se tornó transparente, y la curva de valoración adquirió un comportamiento lineal, con pendiente constante, indicando un consumo continuo y regular de los grupos hidroxilos - OH^- suministrados por la base débil. La reacción de éstos OH^- , con las especies químicas presentes en el sistema favorecerían reacciones de hidrolisis y condensación (Rasavi et al., 2012).

En la siguiente zona de la curva de valoración, Figura 2, el pH vario entre 6 y 8, de manera significativa, indicando poco consumo de especies OH^- por parte del sistema. Además, se evidencio un aumento de temperatura como resultado de reacciones exotérmicas al interior de la suspensión. En la etapa final, Figura 2, se presentó una tercera zona, entre pH 8 y 9, donde la temperatura del sistema descendió y el consumo de NH_4OH , por parte del sistema, fue lento y constante. Una vez se alcanzó en el sistema un pH de 9, se detuvo la adición del agente precipitante y el sistema se mantuvo durante 15 minutos en esta condición.

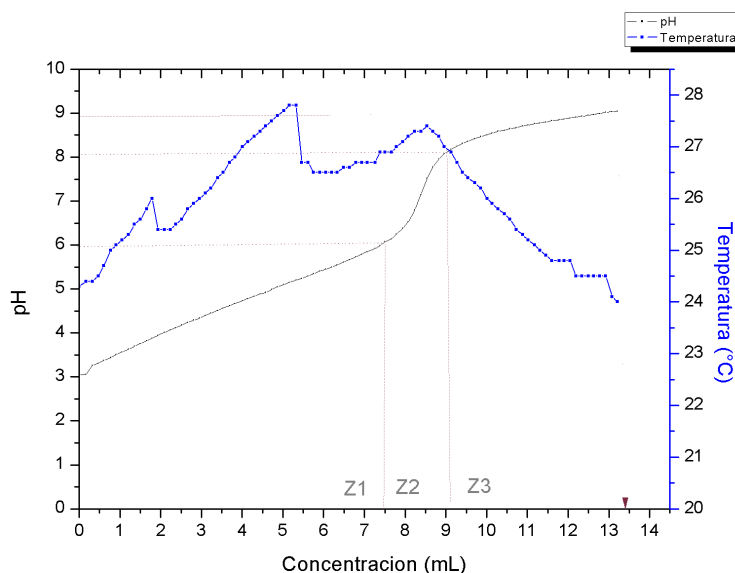


Figura 2. Curva de valoración potenciométrica del sistema complejo de cinc – etilenglicol – ácido acético utilizando el NH₄OH como base.

El sistema que se obtuvo al finalizar el proceso anteriormente y registrado en la curva de valoración de la Figura 2, fue el que se utilizó para realizar los tratamientos térmicos indicados en la Figura 1 y para caracterizarlo posteriormente utilizando las técnicas convencionales que se mencionan a continuación, las cuales dieron información sobre la estructura y propiedades fisicoquímicas del sistema.

1.5.1 Análisis Térmico

El análisis térmico que se le realizó a la muestra precalcificada, que considero un Análisis termogravimétrico (TG) y análisis térmico diferencial (ATD), permitió determinar el comportamiento del sólido ante un calentamiento predeterminado y conocer los eventos fisicoquímicos que propicio la energía térmica suministrada al sistema (Martínez, 2006) . El análisis térmico se realizó utilizando el equipo universal V2.5H de TA Instruments (SDTQ 600) a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min, en flujo de aire de 100ml/min hasta una temperatura máxima de 1000°C, a condiciones ambientales del laboratorio: temperaturas min.18 °C y máx. 27 °C, y humedad relativa: min. 40% máx. 80%.

Las curvas de ATD/TG obtenidas para la muestra de precalcinado se indican en la Figura 3. En la curva de TG, Figura 3, se observa, alrededor de 100°C, una pérdida inicial de masa característica de un proceso de desorción (Gonzales Granados, 2015) y correspondería a la volatilización del agua fisisorbida. A partir de los 350 °C se observa una descomposición térmica, oxidación de la fase orgánica asociada a un pico exotérmico (ver Figura 3 curva ATD), que genera productos volátiles, de allí la gran pérdida de masa que se registra en la curva de TG (Figura 3), y la formación de compuestos de oxi-carbonato de cinc. Posteriormente, a los \approx 400 °C, se evidencia una segunda descomposición en la muestra (también de naturaleza exotérmica – Figura 3 curva ATD) que correspondería a la formación del óxido correspondiente. Finalmente, a partir de los 500 °C, la muestra no experimenta más pérdida apreciable de masa, solo cambios en las características térmicas (capacidad y conductividad térmica) del sólido como lo indica el cambio apreciable en la línea de base de la curva ATD, debido a la cristalización del ZnO.

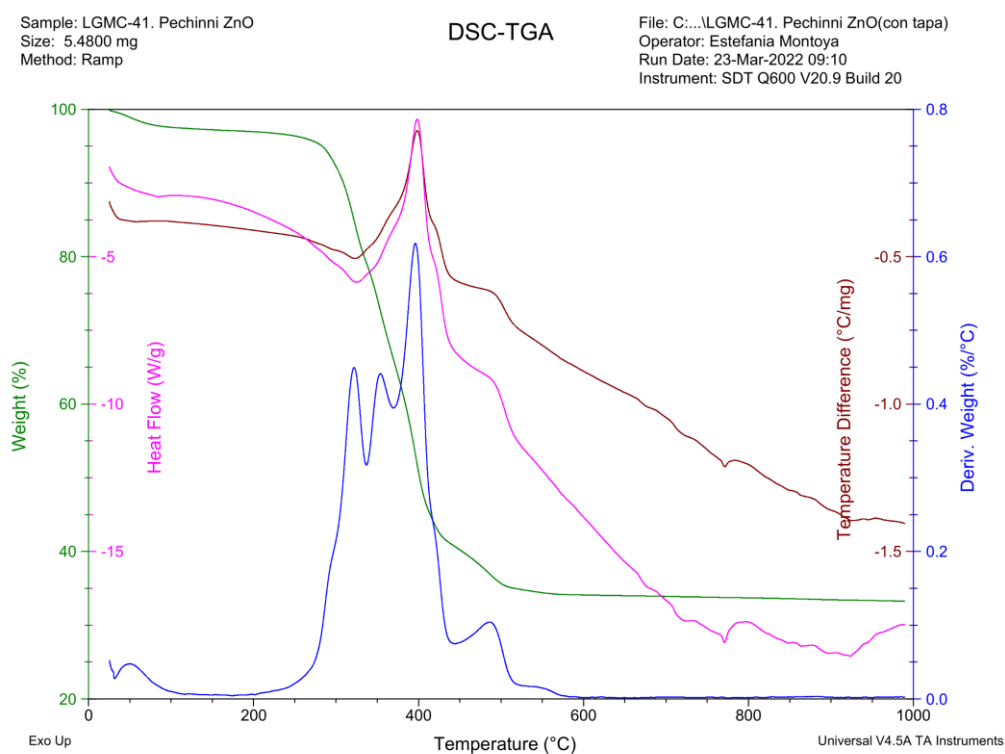


Figura 3. Curvas de ATD/TG correspondiente al precalcinado obtenido durante el desarrollo del método Pechinni modificado para sintetizar ZnO.

1.5.2. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia IR se usó para identificar los grupos funcionales presentes en las muestras de interés. En ella se utiliza el cambio que experimenta la radiación electromagnética incidente, en el rango del infrarrojo, al interactuar con el sólido expuesto (Socrates G, 2004). Esta radiación puede perturbar los modos vibracionales característicos del sólido, excitándolos, y permitiendo con ello la identificación de estos; esto debido al efecto de resonancia propiciada por la coincidencia de los valores de las respectivas frecuencias, el de la radiación incidente y el característico del modo vibracional correspondiente, generando transferencia de energía (A. R. West, 2014). Esta técnica de caracterización es una herramienta muy útil para determinar la presencia de los diferentes grupos funcionales que existen en los sólidos y su evolución tras someterlos a tratamientos químicos y/o térmicos a distintas temperaturas (entre 300°C y 550 °C, principalmente). Para ello se utilizó un espectrómetro Nicolet iS10 con un divisor de haz de KBr.

En la Figura 4 se observa la muestra de precalcinado, obtenida a 300 °C la cual presentó una apariencia grisácea (Figura 4(a)), y su correspondiente espectro IR, Figura 4(b).

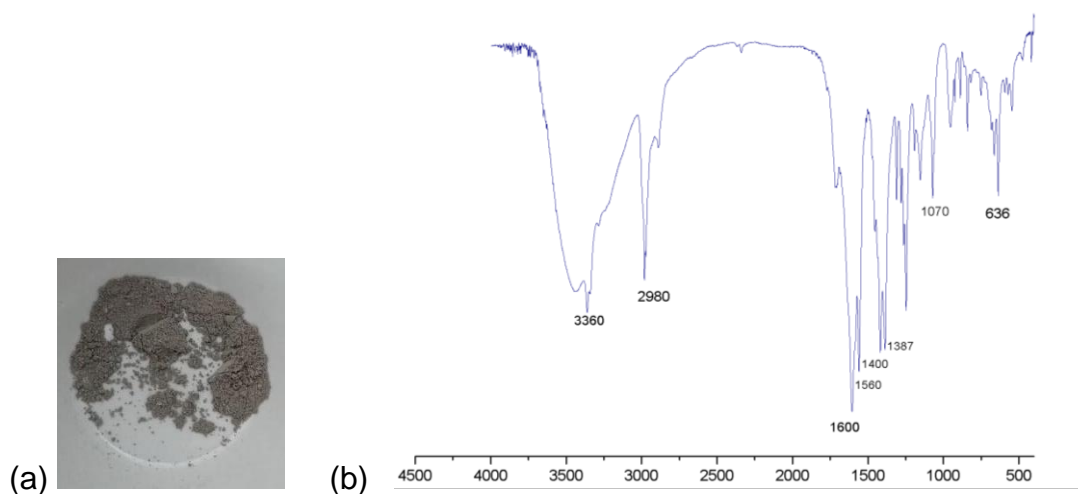


Figura 4. (a) Muestra del precalcinado obtenido a 300 °C, durante el proceso de síntesis, y (b) su espectro IR correspondiente.

Posteriormente, con base en los resultados del análisis térmico que se le realizó al precalcinado (Figura 3), este se trató térmicamente a 550°C, por 5 horas, obteniéndose un polvo de apariencia blanquecina, como el que se muestra en la Figura 5(a). Su correspondiente espectro IR se indica en la Figura 5(b).

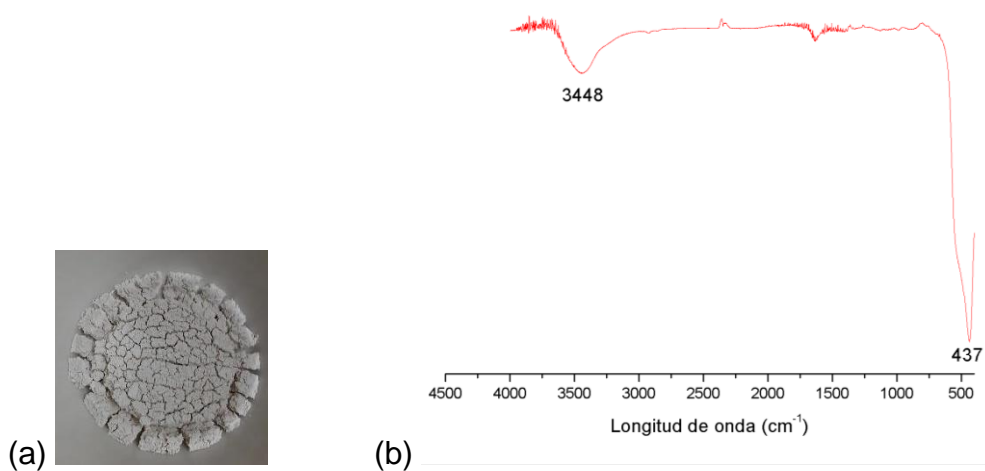


Figura 5. (a) Muestra de precalcinado tratada a 550°C/5h y (b) su espectro IR correspondiente.

En el espectro de la Figura 4(b) se observan bandas en las posiciones de 3360, 2960, 1700, 1600, 1500, 1400, 1387, 1247, 1070 y 636 cm^{-1} . La banda alrededor de 1600 cm^{-1} se puede asociar a moléculas de agua presentes en la muestra. Entre 3360 y 2960 cm^{-1} se ubican las bandas características de los grupos hidroxilo – OH y la de los enlaces C - H, respectivamente, mientras que la banda a 1070 cm^{-1} se podría asociar al enlace C-N, correspondiente a una amina primaria (Socrates G, 2004). Además, la banda a 636 cm^{-1} indicaría la presencia del enlace Metal-Oxígeno, en este caso Zn-O (Xiong G, 2006). Finalmente, las bandas en el intervalo entre 1387 a 1500 cm^{-1} se podrían asociar a grupos carboxilo - COO⁻, específicamente a los diferentes modos de vibración asimétrica y simétrica del COO⁻ presente en la muestra (M de Andrade Gomes et al., 2013).

Al realizar el tratamiento térmico del precalcinado, a 550 °C, varios de los grupos funcionales se volatilizan, dando como resultado el espectro IR de la Figura 5(b), correspondiente al producto final. En él se observa una banda intensa alrededor de 437 cm^{-1} , característica del ZnO, lo que indicaría que el tratamiento del precalcinado a 550 °C propiciaría la formación del óxido de interés.

1.5.3 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica de caracterización vibracional y permite complementar la información suministrada por la espectroscopia IR. En la espectroscopia Raman se analizan los modos vibracionales del sólido considerando las dispersiones, tipo Stokes y Anti-Stokes, que se generan cuando los grupos funcionales se relajan y tratan de volver a su estado fundamental después de ser excitados por la radiación incidente. Para obtener los espectros Raman de las muestras de interés se utilizó el equipo Raman QE Pro-Raman 01629 con tiempo de integración de 1 segundo, perteneciente al departamento de física de la Universidad del Cauca.

En la Figura 6 se observa el espectro Raman obtenido para la muestra de ZnO sintetizada por el método Pechinni. El ZnO tiene una estructura tipo wurtzita, correspondiente al grupo espacial P63mc, con dos unidades fórmula por celda unitaria primitiva. Para un cristal perfecto de ZnO sólo los fonones ópticos del grupo puntual Γ de la zona de Brillouin están involucrados en la dispersión Raman de primer orden. Los fonones ópticos del centro de la zona predicen la existencia de los siguientes modos polares $\Gamma_{\text{opt}} = A_1 + 2B_1 + E_1 + 2E_2$, donde los modos con simetría E degenerados de segundo orden y los modos polares A_1 y E_1 son activos tanto en Raman como en IR y se dividen en modos ópticos transversales (TO) y modos ópticos longitudinales (LO). Para el modo E_2 se tendrían dos modos: $E_{2\text{high}}$, asociado con las vibraciones de los átomos de oxígeno, y $E_{2\text{low}}$ asociado con la subred de átomos de Zn. A pesar de la alta relación señal – ruido que presenta el espectro y el espectro de fluorescencia que “sirve” de “línea de base” al espectro Raman, utilizando la información reportada en la literatura, se pudieron identificar las bandas características del ZnO. Se destacan (ver Figura 6) las correspondientes al modo no resonante $E_{2\text{high}}$, a $\sim 441 \text{ cm}^{-1}$ asociado, principalmente, a la vibración del oxígeno y cuya pronunciada asimetría se puede atribuir al desorden reticular que presenta el sólido (presencia de defectos de oxígeno), así como al fenómeno de confinamiento fonónico. Además, en el espectro (Figura 6), se pueden observar los modos ópticos transversales $A_1(\text{TO})$, en 367 cm^{-1} , así como modos ópticos lineales $A_1(\text{LO})$ a $\sim 573 \text{ cm}^{-1}$ que, por su ensanchamiento, indicaría la existencia de defectos en la estructura cristalina del óxido sintetizado. La banda observada a $\sim 240 \text{ cm}^{-1}$, exhibe simetría A_1 , y puede ser atribuido a un sobre tono del TA (modo acústico transversal). En Serrano et al., (2004) se asigna este modo a $2TA$, mientras que, en Calleja et al., (1977), a $2E_{2\text{low}}$. Además, en el espectro Raman aparecen los modos denominados multifonónicos y los modos Raman de segundo orden que

se ubican, principalmente, por encima de los 600 cm^{-1} . La banda ubicada a 640 cm^{-1} contendría combinaciones TA+LO. El modo ubicado a $\sim 699 \text{ cm}^{-1}$ se puede atribuir a combinaciones ópticas y acústicas (LA + TO). Por otro lado, como se observa en este espectro Raman (Figura 6), la intensidad de las bandas asociadas a los modos Raman de primer orden (A1(TO) y E2high) es similar a los del segundo orden (mayores a 600 cm^{-1}). Además, el espectro Raman analizado, se encuentra sobre el espectro de fotoluminiscencia propiciado por la relajación de los electrones excitados inicialmente.

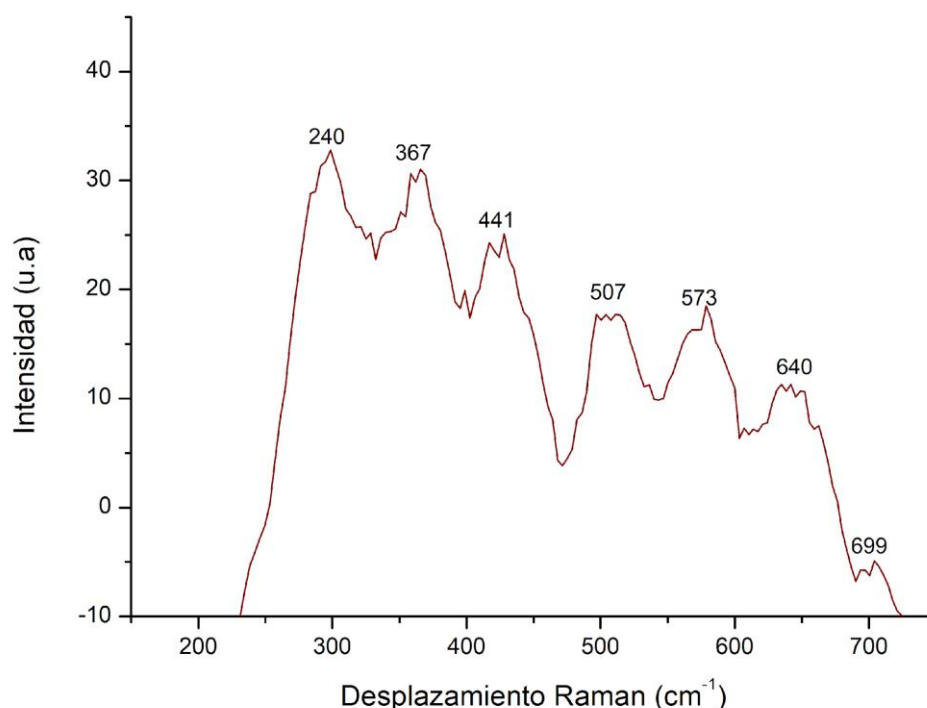


Figura 6. Espectro Raman de las ZnO-NPs sintetizadas por Pechinni y tratado térmicamente a 550°C

En la Tabla 1 se indican las frecuencias Raman obtenidas para las ZnO NPs, sintetizadas en este trabajo utilizando el método Pechinni, y sus procesos asociados (Se tomó como referencia el trabajo de Cuscó et al., (2007)):

Tabla 1. Modos vibracionales activos en Raman y sus procesos asociados correspondientes a ZnO-NPs sintetizadas por una ruta química (Referente: Cuscó et al., (2007))

| REF [cm ⁻¹] | ZnO NPs [cm ⁻¹] | Proceso asociado |
|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 203 | 240 | 2E ₂ ^{low} |
| 378 | 367 | A ₁ (TO) |
| 438 | 441 | E ₂ ^{high} |
| 483 | 507 | 2LA |
| 574 | 573 | A ₁ (LO) |
| 657 | 640 | TA+LO |
| 700 | 699 | LA+TO |

1.5.4. Difracción de rayos X

La difracción de rayos (DRX) suministra información sobre la naturaleza amorfa o cristalina del sólido y, específicamente, de las fases cristalinas presentes en el material sintetizado. Para ello, un haz de rayos x se hace incidir sobre el sólido a analizar y, dependiendo de la estructura cristalina que este posea, se presentarán interferencias constructivas de los rayos x “dispersados” por los planos característicos del material (ley de Bragg $n\lambda = 2d\sin\theta$, donde “n” es un número entero que indica el orden de la difracción, “λ” la longitud de onda de la radiación incidente; “d” el espaciamiento entre los planos que propiciaron la interferencia constructiva y “θ” ángulo de Bragg o sea el ángulo de incidencia del haz sobre los planos (hkl) respectivos). Los difractogramas de rayos x de los sólidos de interés fueron registrados utilizando el equipo Bruker modelo D8 ADVANCE con Geometría DaVinci, Registro de datos en el rango de 2,0o (2θ) a 70o (2θ), tiempo por paso 0,6 s, paso: 0,02035o (2θ) (Tiempo duración medida 30 minutos).

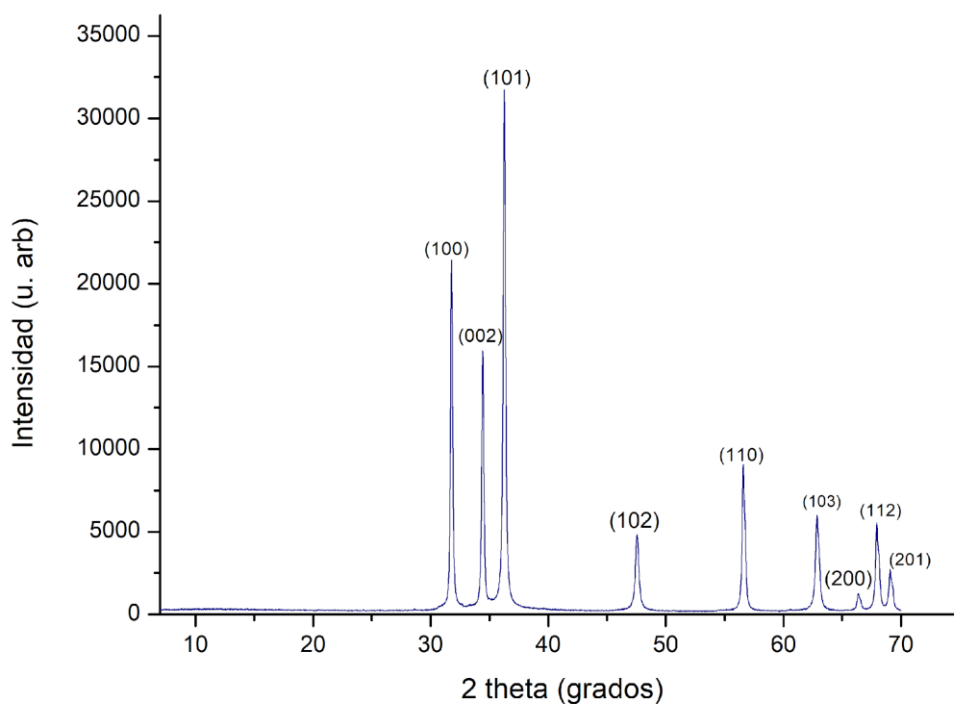


Figura 7. Difractograma de rayos x correspondiente al ZnO sintetizado utilizando el método Pechini modificado.

En la Figura 7 se muestra el difractograma de rayos x correspondiente al sólido sintetizado por Pechini (ver Figura 1) y en él se observan los picos característicos del ZnO (PDF 96-230-0113). La información general obtenida de los datos de DRX se indica en la tabla 2:

Tabla 2. Información sobre los picos que aparecen en el difractograma de rayos x correspondiente a la muestra de ZnO sintetizada por el método Pechini.

| Plano cristalográfico | 2 θ | Tamaño cristalito (nm) |
|-----------------------|------------|---------------------------|
| (100) | 31.77 | 88 |
| (002) | 34.42 | 79 |

| | | |
|--------------|-------|-----------|
| (101) | 36.24 | 41 |
| (102) | 47.54 | 62 |
| (110) | 56.60 | 59 |
| (103) | 62.85 | 54 |
| (200) | 66.37 | 56 |
| (112) | 67.93 | 55 |
| (201) | 69.07 | 51 |

La muestra sintetizada utilizando el método Pechini, Figura 1, presentó una estructura cristalina tipo wurtzita, muy bien cristalizada como lo indican los picos esbeltos presentes en el difractograma (Figura 7). De los datos de difracción de rayos x obtenidos se pudo determinar el tamaño del cristalito de ZnO sintetizado usando el método químico. Para ello, se determinó la ubicación y el ancho a la altura media del pico de mayor intensidad, con índices de Miller (101), datos que se reemplazaron en la ecuación de Debye Scherrer $t_c = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)}$, considerando que el factor de forma tendría un valor $k=0.9$, el ancho a la altura media del pico, $\beta=0.2219$, $2\theta = 36.24$ y $\lambda=1.54060 \text{ \AA}$. El cálculo, utilizando la información indicada, llevó a determinar que el tamaño de cristalito tenía un valor de 41 nm. En la tabla 2 se reportan los tamaños de cristalito obtenidos considerando las otras direcciones cristalográficas de la muestra.

1.5.5 Espectroscopía de Electrones Foto emitidos (XPS)

Las técnicas de espectroscopia electrónica, a la que corresponde la espectroscopia de electrones foto emitidos (XPS), miden la energía cinética de los electrones que son emitidos de la materia debido al bombardeo de esta con radiación ionizante o con partículas de alta energía. La radiación ionizante o las partículas de alta energía propician la ionización de un electrón que esté en las capas internas o de la de valencia. La energía cinética E de electrón ionizado es igual a la diferencia entre la

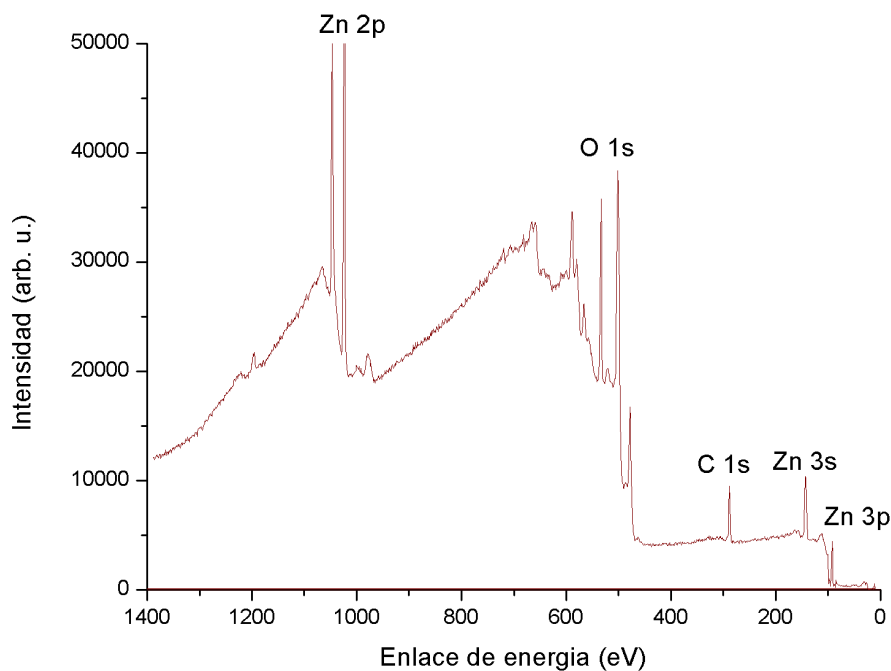
energía $h\nu$ de la radiación incidente y la energía de enlace o potencial de ionización E_0 del electrón. Para un átomo dado, el rango de valores de E_0 es característico para cada elemento y es por ello que al medir E y por lo tanto E_0 , es posible identificar los átomos. Para el caso de XPS, los electrones ionizados provienen de las capas internas de los átomos (por ejemplo, de los orbitales 1s o 2p). Esta técnica permite analizar la composición química del material de forma superficial, ofreciendo información sobre los estados de oxidación. Los ensayos se realizaron en un espectrómetro foto electrónico de rayos-X (NAP-XPS), marca Specs, con un analizador PHOIBOS 150 1D-DLD, usando una fuente monocromática de Al-K α (1486.7 eV, 13 kV, 100 W), con energía de paso de 86.36 eV para los espectros generales y 20 eV para los espectros de alta resolución. El paso fue de 1 eV para los espectros generales y de 0.1 eV para los espectros de alta resolución. Para cada espectro de alta resolución se realizaron 20 ciclos y para los espectros generales 5 ciclos. Se usó compensación de carga de 3 eV y 20 μ A.

En la Figura 8 se muestra el espectro completo de XPS correspondiente a la muestra de ZnO sintetizada por ruta química (Figura 8). El espectro deconvolucionado, correspondiente al Zn 2p (Figura 8(b)), muestra picos a 1023.69 eV y 1046.84 eV que se pueden asignar a los picos de Zn (2p $_{3/2}$) y Zn (2p $_{1/2}$) respectivamente (Liang, Wuang, 2018). Además, los picos ubicados a 976.37 y 1005.21 eV, según los cálculos teóricos realizados por Rössler et al. (2006), indicarían la presencia de “clústeres” de ZnO en la superficie del sólido. La geometría aguda del primer pico puede indicar que el elemento Zn existe en la superficie de la muestra principalmente en forma de Zn $^{2+}$.

En la región del espectro asociada al O (1s) (Figura 8(c)), se observa un pico asimétrico el cual, al ser deconvolucionado usando el software Fityk, permitió identificar dos contribuciones: picos a 532.7 y 533.76 eV. Para realizar la asignación de los mismos a las especies de oxígeno correspondientes, se tomaron como referente tres gaussianas cercanas, centradas en 530.15 \pm 0.15, 531.25 \pm 0.20 y 532.40 \pm 0.15 eV reportadas por Chen et al., 2000, que se pueden asociar al oxígeno reticular (OL) o iones O $^{2-}$ en sitios intrínsecos, a iones O $^{2-}$ en la región deficiente de oxígeno o a las Vo y al oxígeno quimisorbido Oi u oxígenos superficiales, respectivamente. Los picos obtenidos de la señal O 1s en el presente trabajo (Figura 8(c)) están desplazados con respecto a los de la referencia, como también se presentó en el trabajo de Kwoka et al. 2020 (M. Kwoka, et al., 2020), y se podrían atribuir a especies de oxígeno quimisorbido Oi u oxígenos débilmente ligados a la superficie (por ejemplo O $_2$, H $_2$ O o grupos hidroxilos adsorbidos), asociadas al pico

532.7 eV, y al enlace del dióxido de carbono adventicio O-C=O en la superficie de ZnO, correspondiente al pico ubicado a 533.76 eV.

El espectro deconvolucionado de la señal del C (1s) (Figura 8(d)) presento un pico ubicado a 287.7 eV que se podría asociar al enlace C=O tanto del CO₂ adsorbido como a especies carbonatas estructurales (Mar et al., 1992). El pico ubicado a 291.9 eV correspondería al enlace del dióxido de carbono adventicio O-C=O ligado a la superficie de ZnO y los picos a 284,03 y 285,64 eV podrían dar información de los enlaces Zn-O-C y Zn-C, respectivamente (A. S. Alshammari, et al., 2015). La falta de consenso que se encuentra en la literatura, con relación a la asociación de los picos en el espectro XPS a los posibles enlaces presentes en la muestra, se evidencia si se considera, por ejemplo, la asignación que realizó Pan et al. (L. Pan, et al, 2016) a la señal del C1s que observaron en el espectro XPS de su muestra: el pico a 284.6 eV se lo asociaron al hidrocarburo adventicio y el ubicado a 286.6 eV a especies carbonatadas ligadas débilmente a la superficie del ZnO (por ejemplo los enlaces -CO₃, C-O y C=O). Además, es necesario reiterar que, como lo indicó Al-Gaashani et al. (2013) en su trabajo, la ubicación de los picos en el espectro XPS es afectada por la morfología que presenten las ZnO-NPs.



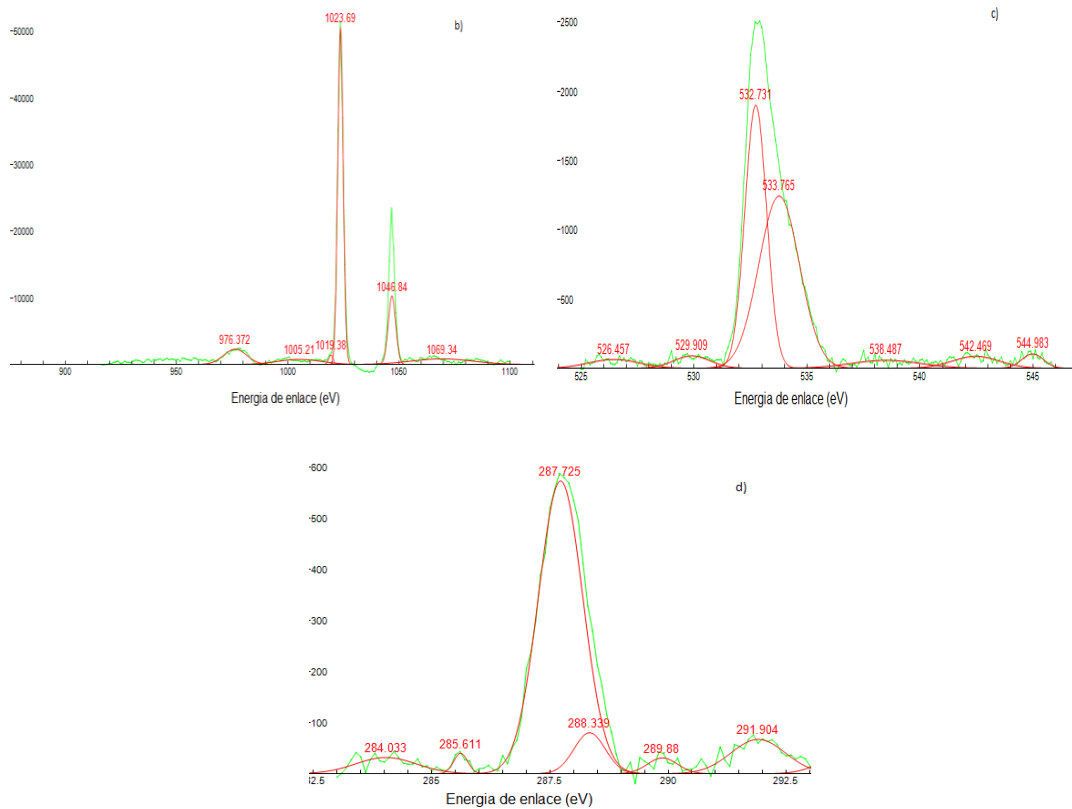


Figura 8. (a) Espectro de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) correspondiente al ZnO sintetizado por una ruta química y las deconvoluciones correspondientes de las señales: (b) Zn 2p (c) O 1s y (d) C 1s.

La microscopía electrónica de transmisión aprovecha los fenómenos físico-atómicos que ocurren cuando un haz de electrones acelerados colisiona con una muestra, debidamente preparada. Esta técnica permite obtener información sobre la estructura de una muestra, es decir, si es amorfa o cristalina.

Las micrografías obtenidas de las partículas de ZnO sintetizadas por el método Pechinni (Figura 9) muestran que estas presentaban una morfología esférica, con un tamaño medio de partícula primaria de ~ 32 nm, con tendencia a formar aglomerados. Comparando este valor con el tamaño de cristalito obtenido por DRX (ver Tabla 2), se puede concluir que en la muestra existe una apreciable cantidad de monocristales.

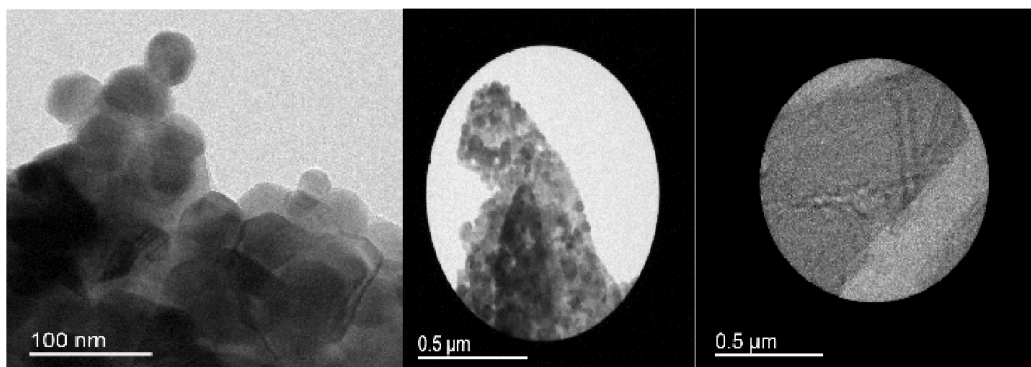


Figura 9. Fotografías obtenidas con microscopía electrónica de transmisión - TEM de las ZnO NPs obtenidas utilizando el método Pechinni.

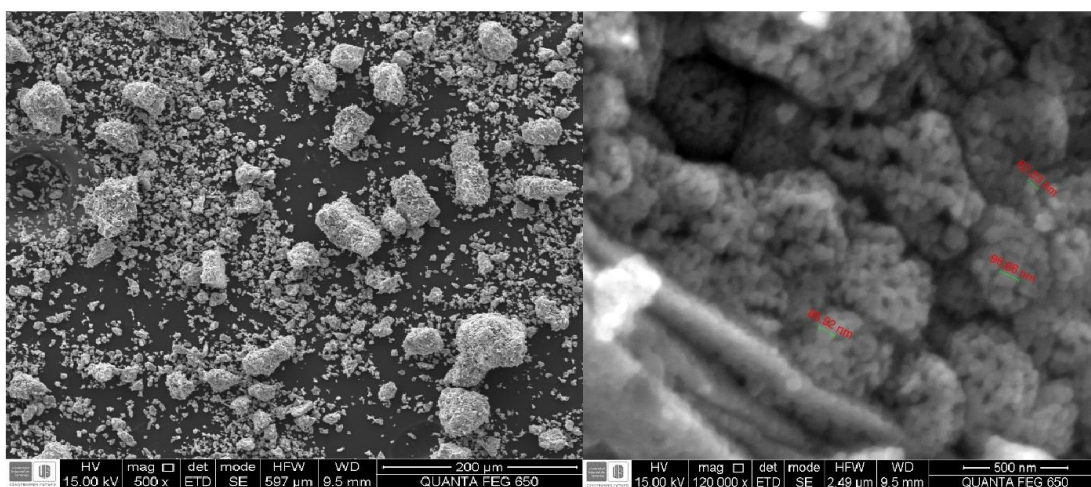
1.5.7 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia EDS

Esta técnica de caracterización se emplea para determinar el estado de aglomeración de los polvos sintetizados, así como para conocer su morfología y tamaño de partícula; adicionalmente, utilizando la microsonda, se puede obtener información de su composición química elemental (Grundy et al., 1976). Para realizar esta caracterización se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) QUANTA FEG 650 que poseía un detector para imágenes utilizando Electrones secundarios (SE): Everhart Thornley detector ETD Electrones retro dispersados (BSE) y Back scattered electrón detector (BSED) tipo SSD. Para realizar el análisis químico elemental se utilizó el Detector EDAX APOLO X resolución de 126.1 eV (en. Mn $K\alpha$) que permitió llevar a cabo el análisis EDS (Energy-Dispersive Spectroscopy), utilizando el Software EDX Genesis. Que suministro información semicuantitativa de los elementos químicos. Las imágenes fueron tomadas en las siguientes condiciones de trabajo: alto vacío y voltaje de aceleración: 15 kV.

Las micrografías obtenidas de las ZnO NPs, sintetizadas por el método Pechini, se muestran en la **Figura 10(a)**. En ellas se observa la presencia de grandes aglomerados y/o agregados, del orden de las micras, así como aglomerados del orden de los 500 nm conformados por las nanopartículas de ZnO (ver **Figura 10(a)**). Además, como lo indican las micrografías tomadas con MEB (**Figura 10(A)**), las

partículas primarias eran menores a los 100 nm, reiterando lo observado con MET (Figura 9).

Se utilizó la espectroscopía EDS para determinar la composición química elemental de la muestra obteniéndose el espectro y la tabla que se muestran en la Figura 10(b). El espectro indica que los elementos presentes en la muestra fueron Zn, O y C y según los datos composicionales, dados en la tabla (Figura 10(b)), la muestra presentó una buena estequiometría (considerando que la masa atómica del O es 15.99 u y la del Zn 65.38 u), con principal impureza el carbón (12.011 u).



(a)

| Element | Wt% | At% |
|---------|-------|-------|
| O | | |
| C | 0.72 | 2.40 |
| O | 19.18 | 48.26 |
| Zn | 80.11 | 49.34 |

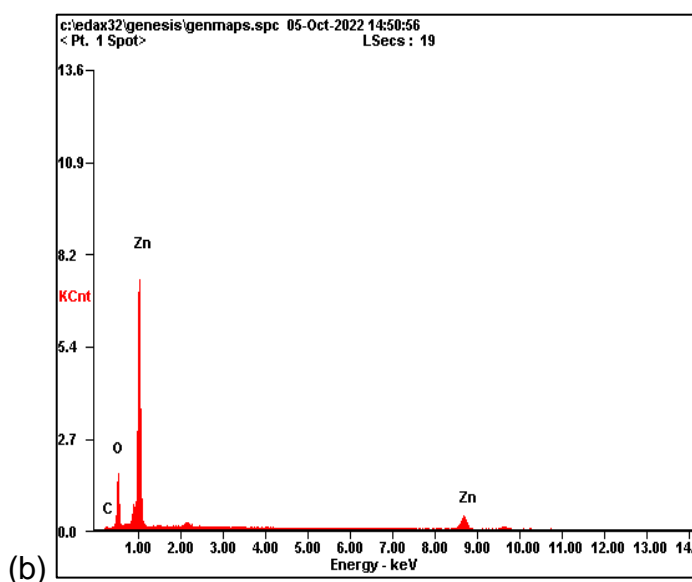


Figura 10. (a) Fotografías tomadas con MEB del ZnO sintetizado por el método Pechini y (b) espectro EDS con la tabla que indica su composición química elemental.

1.6. Obtención y caracterización de las ZnO NPs por una ruta verde (procedimiento experimental)

Las nanopartículas se obtienen, normalmente, utilizando procesos fisicoquímicos que no presentan una alta eficiencia, tal como ocurre, en general con la síntesis de los productos químicos (B. M. Trost, 1991). La baja eficiencia del proceso de síntesis ha generado gran interés tanto en el manejo de los desechos, así como en la conservación de los recursos. Estos procesos propician contaminación ambiental (M. A. Mitchnick, et al, 1999), lo que ha llevado a considerar el desarrollo de “procesos verdes” (C. J. Li, 2013). Ya que las reacciones químicas juegan un papel importante en la síntesis de los productos, incluyendo las nanopartículas, la “química verde” está interesada en desarrollar procesos (“síntesis verde”) que involucre condiciones para que las reacciones suministren beneficios relacionados con los reactivos y con la eficiencia energética, selectividad del producto, simplicidad operacional y seguridad tanto sanitaria como ambiental, entre otros requerimientos. Es por esto que reacciones innovadoras, con ventajas específicas, han sido evaluadas considerando, por ejemplo, la directa conversión de los enlaces C – H en la estructura deseada sin que se requiera transformaciones químicas o térmicas adicionales (B. A. Arndtsen, et al., 2004). En la naturaleza, este proceso ocurre de manera frecuente ya que una variedad de compuestos orgánicos puede, de manera fácil, ser oxidadas por moléculas de oxígeno u otros donadores de oxígeno por las células de las bacterias, hongos, plantas, insectos, pescados y mamíferos (S. Shapiro et al., 1998) El solvente es un material auxiliar que se emplea

durante la síntesis y aunque no es una parte integral del compuesto que reacciona, este desempeña un papel importante en la producción química del producto de interés. En la síntesis química clásica, el solvente debe facilitar la transferencia de masa para modular las reacciones químicas considerando la velocidad de la reacción, eficiencia, conversión y selectividad (C. J. Li, B. M. Trost, 2008.). En el presente estudio se utilizó como solvente agua para obtener las ZnO-NPs por una ruta verde debido a que esta es barata, natural y amigable con el medio ambiente. Además, considerando que el uso de sistemas biológicos o sus derivados como bacterias, hongos, algas o extractos de plantas, permiten realizar la biosíntesis de nanopartículas aprovechando su capacidad de reducir iones metálicos mediante sus metabolitos secundarios presentes (Morales-Díaz et al., 2016), en este trabajo se empleó el extracto de *Allium sativum* (ajo).

La síntesis verde utilizada en este trabajo se basó en el denominado método de precipitación controlada (Rodríguez, 1999), usando como solvente extracto de ajo (realmente el ajo se dispersó en agua utilizando un proceso de licuado). De manera general, inicialmente, en el extracto natural se disolvió el precursor de cinc (acetato de cinc di hidratado). Posteriormente, de manera controlada, se agregó a la mezcla el agente precipitante, hidróxido de amonio, manteniendo el sistema en agitación constante hasta alcanzar un pH de trabajo. En esta condición, el sistema se dejó en reposo por 24 horas para, posteriormente, realizarle lavados periódicos al precipitado, eliminando el solvente del sistema, por decantación, y redispersando el sólido húmedo resultante en extracto natural fresco utilizando un equipo de alta cizalla. La suspensión se dejó reposar durante 24 horas y se le volvió a realizar el proceso de lavado indicado anteriormente. Esta acción se realizó 6 días seguidos, hasta garantizar que, en el sólido seco, tomado al precipitado lavado, predominaba el óxido de cinc. Alcanzada esta condición, el sólido resultante se secó. Según Rodríguez et al., (1998), en el proceso de precipitación controlada se debe formar, inicialmente, un complejo de cinc que se fue modificando con el lavado de la suspensión coloidal obtenida al adicionar hidróxido de amonio a la solución inicial.

1.6.1 Obtención del extracto a base de ajo a utilizar como solvente

El ajo es un producto base de la cocina en diversos países y es consumido por su profundo sabor y sus propiedades terapéuticas en la salud humana. Anualmente se producen ~12 millones de toneladas, principalmente, en China (74%), Corea, India

y Estados Unidos. Según Ramírez-Concepción et al., (2016) se conoce que el ajo contiene diversos componentes activos, como: aminoácidos, minerales, vitaminas y en cantidades menores ácido fólico, ácido pantoténico y niacina. Sin embargo, se destacan los componentes azufrados, como: la alicina, aliina, alixina, alil metano, tiosulfonato, dialil disulfuro, dialil trisulfuro, alil metil trisulfonato, s-alil mercaptocisteína, ajoene, 2-vinil-4h-1, 2-ditiina, 5-alilcistina y adenosina, que contribuyen en el efecto benéfico para la salud. El nombre científico del ajo es *Allium sativum* y el género *Allium* se compone de más de 320 especies de plantas entre las que se encuentra el ajo común. Este tiene un alto contenido de compuestos fenólicos, polifenoles y fitoesteroles, además de importantes minerales que absorbe de la tierra como potasio, magnesio, fierro y calcio (Ramírez-Concepción et al., 2016). En conclusión, el interés de investigar la composición química del ajo ha permitido identificar más de 200 sustancias a las cuales se les atribuyen propiedades benéficas para la salud de los humanos y las plantas, destacándose la Aliina (S-alilasteina sulfoxido), compuesto inodoro y estable en soluciones acuosas (Stoll, Seebeck, 1951), además de ser el más abundante en el ajo fresco.

Por lo mencionado, para este trabajo se decidió utilizar como solvente agua que contenía ajo (extracto de ajo que realmente era ajo dispersado en agua mediante un proceso de licuado), tal que en la obtención de la mezcla se protegió y favoreció la presencia de los compuestos activos de la planta. Se usaron ajos frescos obtenidos en una de las plazas de mercado de la ciudad de Popayán - Colombia. El acondicionamiento de los ajos se realizó en el laboratorio de CYTEMAC – Universidad del Cauca. Inicialmente, se les retiró la cáscara externa y el tallo madre, se lavaron con agua, desinfectaron con alcohol al 75% y se secaron al aire, a condiciones ambientales. Para obtener el extracto de ajo, se empleó 200 mL de agua destilada y 20 g de ajo, para una concentración del 10%. Posteriormente, mediante medios físicos, se procedió a dispersar el ajo en el agua destilada y para ello se usó una licuadora marca Oster, proceso que duró 5 min. La mezcla obtenida presentó una tonalidad verdosa y se tamizó utilizando un colador de tela casero para separar los fragmentos residuales del ajo más grandes. La suspensión obtenida se utilizó como solvente para obtener las ZnO-NPs usando el método de precipitación controlada adaptado para ubicarse dentro de las leyes de la 'química verde' (Pájaro Castro, Olivero Vergel, 2011).

1.6.2. Obtención de ZnO-NPs por el método precipitación controlada usando el extracto de ajo como solvente

Como se mencionó anteriormente, para la obtención de ZnO-NPs por ruta verde se utilizó el método de precipitación controlada, usando como solvente el extracto natural de ajo. Inicialmente se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de precursor para obtener 3 g de ZnO-NPs, siendo esta 8.09 g de acetato de cinc di hidrato ((CH₃COO)₂Zn.2H₂O - Merck), reactivo que se diluyó en el extracto natural (200 mL). Posteriormente, se adicionó al sistema, de manera controlada, el agente precipitante, hidróxido de amonio (NH₄OH - Merck), manteniendo el sistema en agitación constante. El sistema se llevó desde un pH ácido, 5, hasta alcanzar un pH básico de 9. Durante la adición del agente precipitante, se registraron los cambios del pH, temperatura, tonalidad y textura que se presentaron en la mezcla. Con esta información se obtuvo la curva de valoración potenciométrica, gráfica del pH en función del volumen de NH₄OH adicionado al sistema (Figura 11), la cual se utilizó para controlar el proceso y garantizar la reproducibilidad de este.

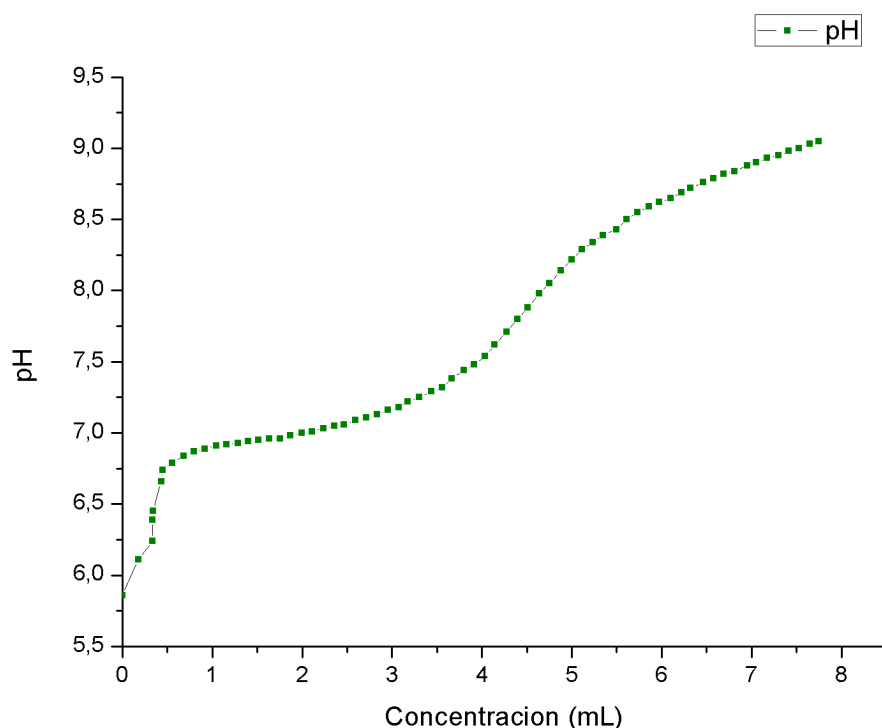


Figura 11. Curva de calibración potenciométrica y temperatura para sistema de nano híbridos de ZnO base ajo

Al alcanzar el pH de trabajo, pH 9, el sistema se dejó reposar durante 24 horas, y se procedió a realizar el proceso de lavado del precipitado utilizando extracto de ajo fresco. El lavado consistió en separar, por centrifugado a 1500 rpm, el sobrenadante del precipitado para eliminar el extracto natural sobrante y recolectar el precipitado obtenido. Este sedimento sólido se mezcló con 200 mL del extracto de ajo fresco, producido el mismo día del lavado, y se redispersó utilizando un equipo de alta cizalla, el ultraturrax T-50 a 7.600 rpm, durante 5 minutos. El sistema se dejó reposar durante 2 minutos y nuevamente se dispersó, bajo las mismas condiciones indicadas, por otros 5 minutos. Posteriormente, la suspensión se dejó envejecer, a condiciones ambientales durante 24 horas, antes de realizarle el siguiente lavado. En total se realizaron 6 lavados.

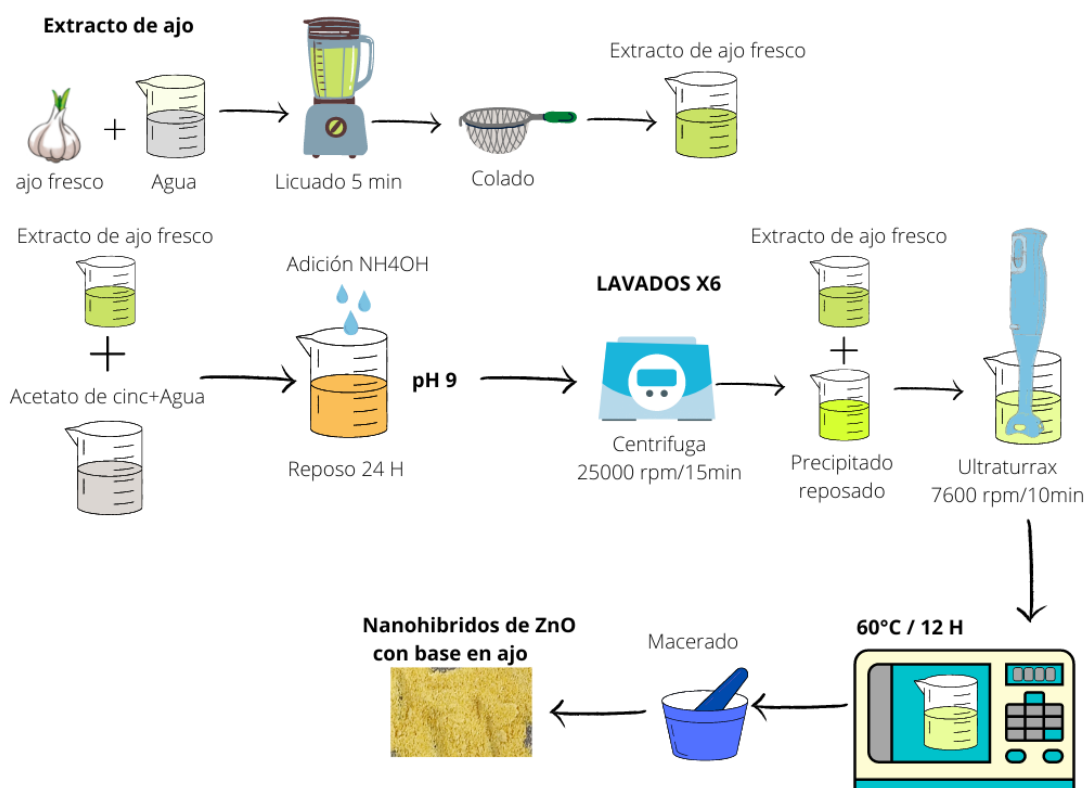


Figura 12. Esquema del método precipitación controlada, utilizando el extracto ajo como solvente, que se empleó como ruta verde para obtener las ZnO-NPs.

Finalmente, después de realizar los 6 lavados, el sistema se dejó reposar 24 horas más después de haberle realizado el último tratamiento de alta cizalla. Esta suspensión se secó en un horno convencional casero, marca Haceb, a una temperatura de 60°C y durante aproximadamente 12 horas. El “sólido” que se

obtuvo y que presento un color ámbar, se maceró para obtener el polvo del compuesto de cinc utilizando síntesis verde (Figura 13); el sólido cambio de color, tornándose amarillo, y fue este el que se caracterizó.



Figura 13. Textura del compuesto de cinc obtenido por síntesis verde, usando extracto de ajo, y tomando como base el método de precipitación controlada.

1.6.3 Seguimiento del proceso de síntesis del ZnO, por ruta verde, y característica del producto final: uso de espectroscopia IR.

La espectroscopia IR se usó como herramienta para conocer la evolución de los grupos funcionales presente en el sólido a medida que se avanzaba en el proceso de lavado, tal como se muestra en la Figura 14. Para ello se tomó del sistema una muestra sólida cada vez que se realizó el cambio de solvente (agua con ajo) para dispersar el sedimento y dejar envejecer la suspensión obtenida durante 24 horas.

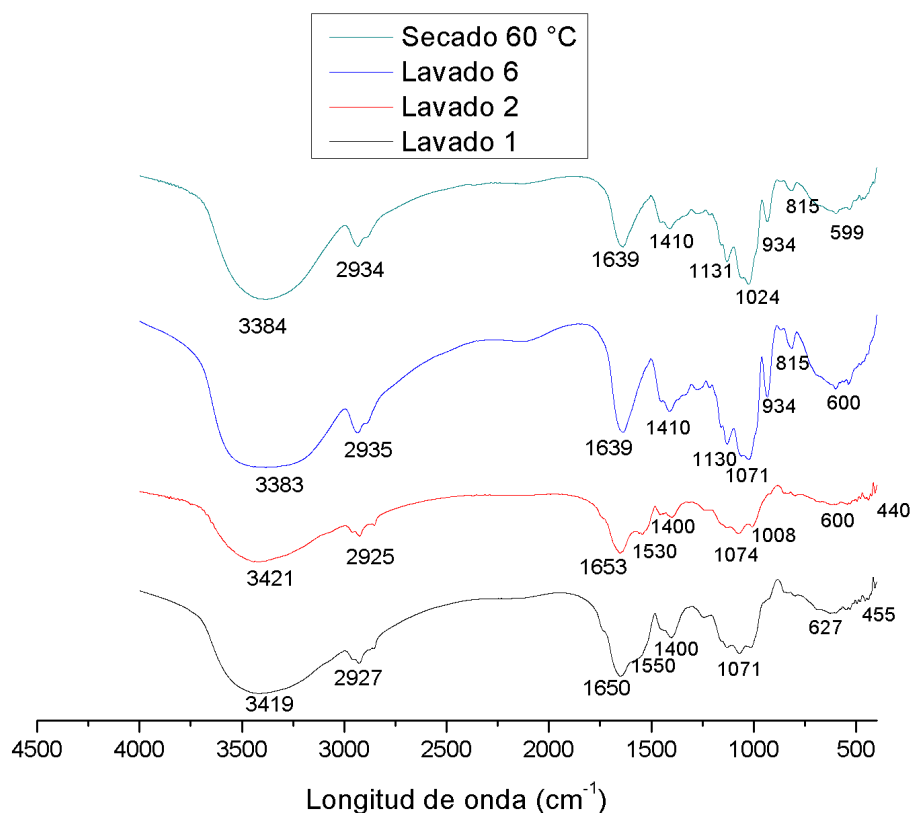


Figura 14. Espectros IR que indican la evolución de los grupos funcionales durante la etapa de lavado para sintetizar las nanopartículas de ZnO usando una ruta verde, con el solvente extracto de ajo.

En la Figura 14 se observa que el doblete alrededor de 1500 cm^{-1} , $1550\text{--}1410\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo funcional carboxilo COO^- proveniente del ion acetato del precursor, fue disminuyendo su intensidad hasta prácticamente desaparecer (ver el espectro IR de la muestra del lavado 6 – Figura 14), efecto que podría haber sido ocasionado por el ambiente reductor propiciado por el ajo que iría modificando o rompiendo estos enlaces. Los espectros IR de la Figura 14 presentaron varias bandas, entre 1000 y 1500 cm^{-1} , que se podrían asociar a las biomoléculas presentes en el ajo que se habrían adherido o interactuado con la superficie del compuesto de cinc. Para evaluar esta hipótesis, se procedió a registrar el espectro IR del ajo. Para ello, el ajo se secó a 40 °C , durante 48 horas, hasta que se obtuvo un polvo de tono mostaza. El espectro IR del ajo se muestra en la Figura 15.

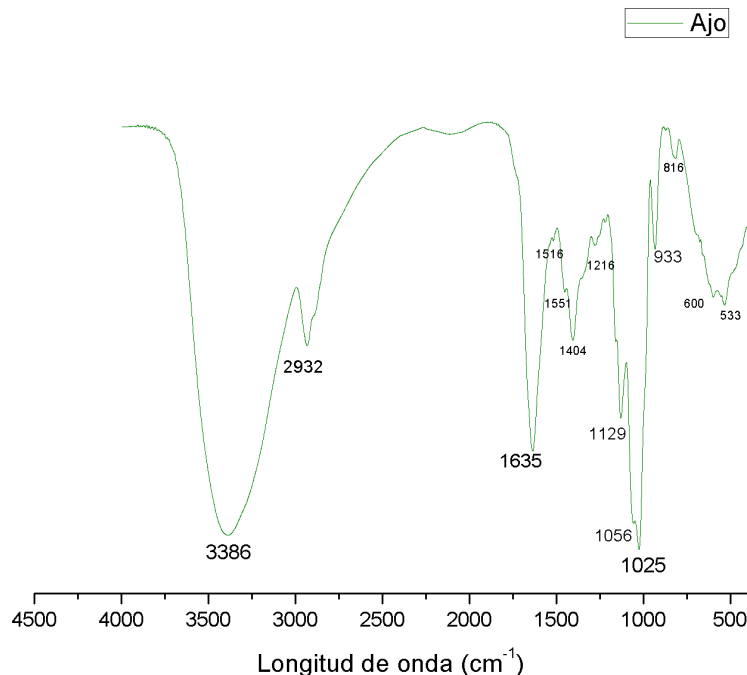


Figura 15. Espectro IR del ajo secado a 40 °C, durante 48 horas

En el espectro IR del ajo, Figura 15, se observa una banda alrededor de 3386 cm^{-1} la cual se puede asociar al estiramiento del grupo hidroxilo O-H; una banda a 2932 cm^{-1} que correspondería al estiramiento de enlaces C-H de hibridación sp^3 y la banda en 1635 cm^{-1} que podría relacionarse con los carbonilos presentes en diversos grupos funcionales. La asignación a ciertos grupos funcionales, de las otras bandas que aparecen en el espectro IR del ajo (Figura 15) se realiza como se indica a continuación. La banda a 1404 cm^{-1} se puede asignar al grupo -O-H de los carboxilatos que estarían presentes debido a la alta concentración de lípidos en la constitución del ajo. Por otro lado, las bandas a 1130 cm^{-1} y 1025 cm^{-1} estarían relacionadas con la absorción del sulfoxido S=O y a las vibraciones de las aminas primarias C-N, grupos cuya presencia se puede justificar considerando que forman parte de los compuestos azufrados que existen en el ajo, como la aliina y sus descomposiciones. Específicamente, la banda a 933 cm^{-1} se asigna a la -C-H, deformación del =CH₂, y la ubicada a 815 cm^{-1} a las aminas primarias N-H, ambas atribuidas al grupo amino de la aliina (Figueroa-López et al., 2014). Finalmente, la banda a aproximadamente 600 cm^{-1} se asocia con los alquinos C-H de hibridación sp^3 (Rastogi, Aruchalam, 2011).

Observando la Figura 14, específicamente el espectro IR correspondiente al sólido del lavado 6, en él se observa una banda ancha alrededor de 599 cm^{-1} que debería contener la banda característica del ZnO (ver la Figura 5). Pero, además, en el espectro IR del ajo (Figura 15), tal como se indicó, se presentó una banda ancha alrededor de 550 cm^{-1} , por lo que la banda a 599 cm^{-1} (Figura 14 espectro IR del sólido lavado 6), también contendría información de esta banda del ajo. Por lo tanto, considerando este resultado, es posible que el sólido obtenido del proceso de síntesis por ruta verde contuviera ZnO y que éste estuviera recubierto por biomoléculas del ajo (conformándose una estructura tipo “core-shell”), Debido a que las biomoléculas de ajo estarían sobre la superficie del sólido, en el espectro IR del sólido – sexto lavado (Figura 14), las bandas asociadas a estas biomoléculas fueron muy evidentes.

Para verificar esta hipótesis, se comparó el espectro IR del ajo con los espectros IR de los sólidos obtenidos del proceso de lavado (Figura 14), específicamente con el correspondiente al sexto lavado (ver Figura 16). Con base en el análisis del espectro IR del ajo (Figura 15), realizado anteriormente, y observando con cuidado el espectro IR del sólido correspondiente al lavado 6 (ver figura 14), se puede concluir que las bandas a 2932 , 1639 , 1410 , 1129 , 1024 , 934 , 815 y 599 cm^{-1} son características del ajo (ver Figuras 15 y 16), mientras que la banda alrededor de 440 cm^{-1} , que es más evidente en muestras sometidas a menos lavados (ver Figura 14), es representativa del enlace Zn-O. De acuerdo con lo mencionado y lo que indica la secuencia de espectros IR de la Figura 14, a medida que se avanzó con el proceso de envejecimiento y dispersión del precipitado del sistema, en una nueva solución de agua con ajo o sea con el lavado del sedimento, se fue consolidando sobre el compuesto de cinc un recubrimiento conformado por biomoléculas de ajo, dando origen a un compuesto biohíbrido con base en ZnO.

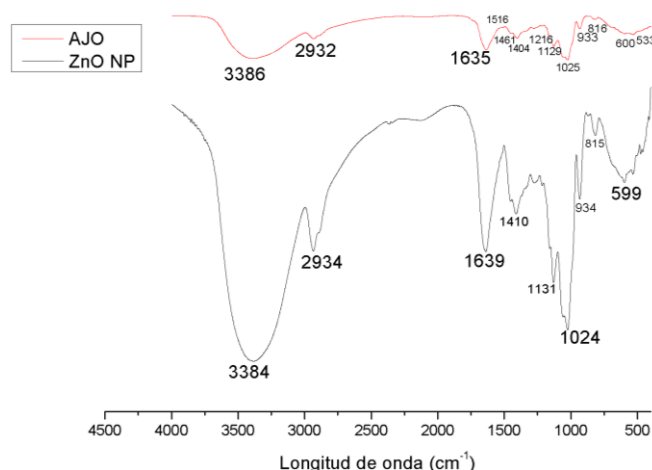


Figura 16. Espectros IR que corresponden al ajo y a los nano-biohíbridos con base en ZnO que se obtuvieron a través de la ruta verde empleada.

Para conocer el comportamiento térmico de los compuestos biohíbridos con base en ZnO, sintetizados por la ruta verde utilizada en este trabajo, se observó la evolución de sus grupos funcionales con la temperatura. Para ello, los biohíbridos se trataron a diferentes temperaturas y a los sólidos obtenidos se les registro su espectro IR, tal como se muestra en la Figura 17. Lo más evidente, que se observa en estos espectros IR (Figura 17), es que al aumentar la temperatura de tratamiento muchos de los compuestos azufrados del ajo se descomponen y se volatilizan y se va haciendo más evidente la banda característica del ZnO (entre 421 y 560 cm^{-1}). Además, la estructura “core-shell” de los nano biohíbridos obtenidos utilizando la ruta verde propuesta en este trabajo, presenta unas características químicas especiales que se evidenciaron a través de las reacciones que se desarrollaron entre las biomoléculas del ajo, “capa – Shell”, con el compuesto de cinc, “Core”, que ocasionaron el desplazamiento de las bandas a medida que se calentaba la muestra, así como las diferencias apreciables entre el espectro IR del ZnO “puro” (Figura 5) y el del nano biohíbrido tratado a 550 °C (Figura 17). A nivel macroscópico, fue evidente el cambio que sufrieron los nano biohíbridos al ser tratados térmicamente; se observó un cambio en la tonalidad del material, tal que a 550 °C se obtuvo un polvo con tonalidad blanquecina.

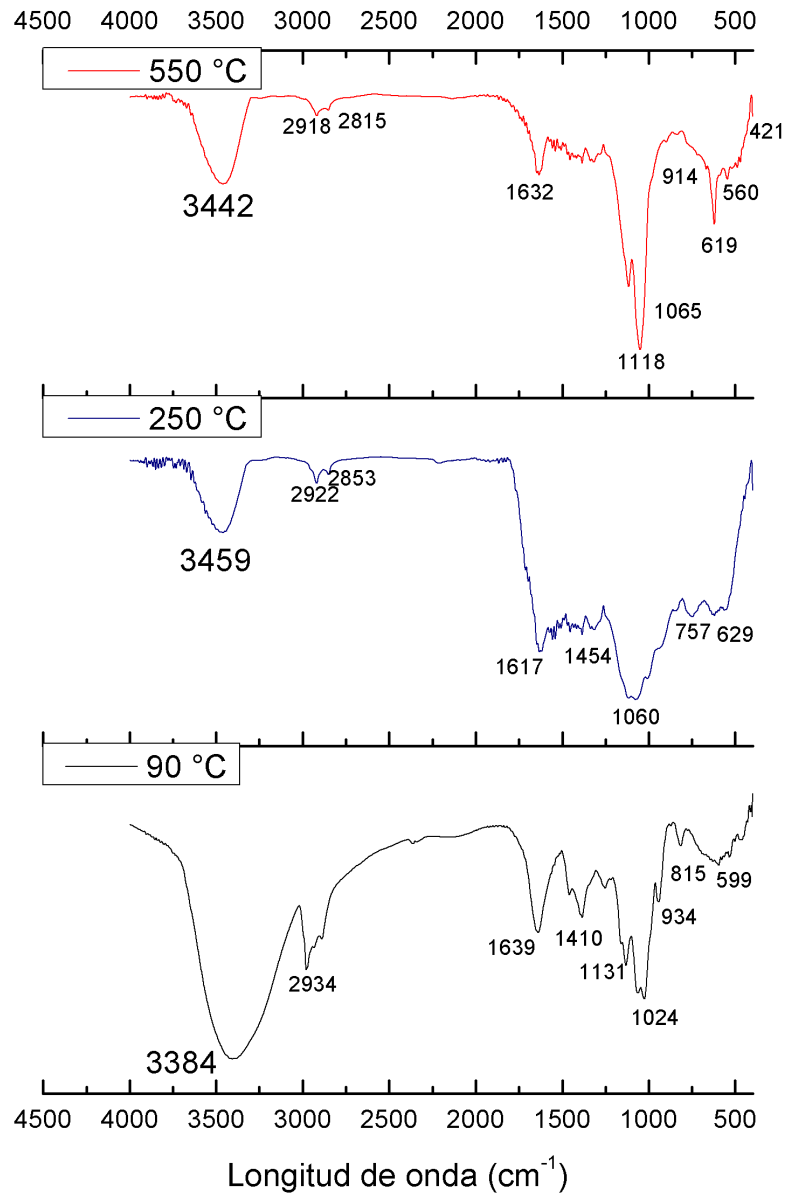


Figura 17. Espectros IR correspondientes a muestras de nano biohíbridos, con base en ZnO, sometidos a diferentes temperaturas.

1.6.4 Caracterización de los biohíbridos con base en ZnO: Espectroscopia Raman

Para el biohíbrido con base en ZnO, sintetizado por la ruta verde empleada en este trabajo utilizando el extracto de ajo, se obtuvo el espectro Raman que se muestra en la Figura 18, muy similar al espectro Raman correspondiente al de las ZnO-NPs sintetizadas por Pechini (Figura 6). Esto reitera que, realmente, los nano biohíbridos estaban constituidos por ZnO, condición que no fue muy evidente utilizando los resultados de espectroscopia IR (Figuras 5 y 16). Además, se validaría el modelo propuesto de estructura “Core – Shell” para estos nano biohíbridos, considerando el ZnO como “Core” (espectroscopia Raman – Figuras 6 y 18) y “Shell” o capa las biomoléculas del ajo (Figura 16).

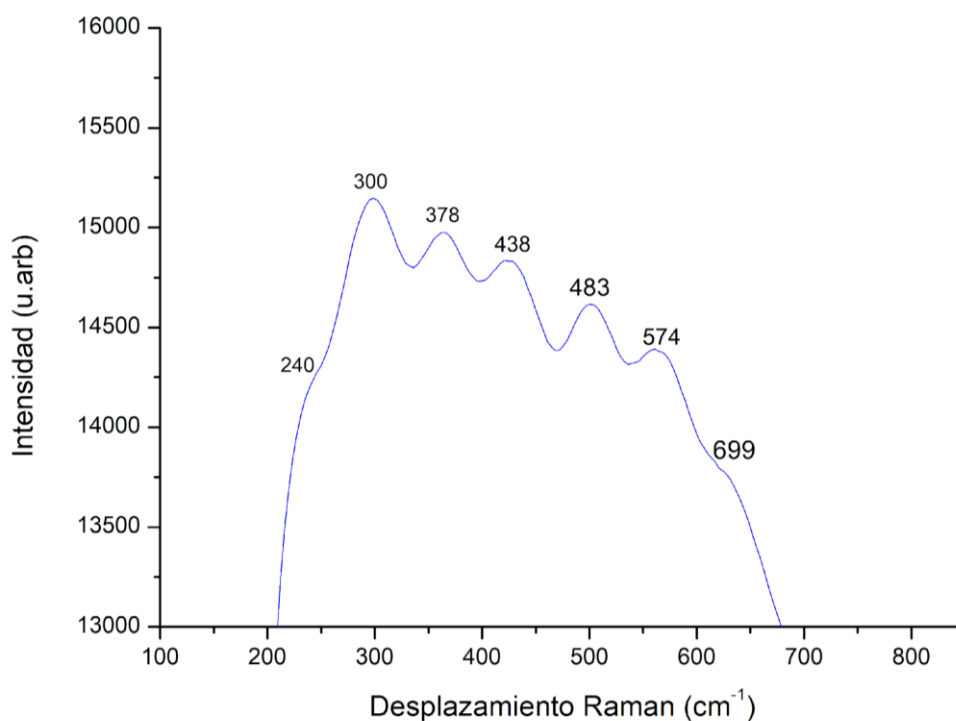


Figura 18. Espectro Raman correspondiente a los nano biohíbridos con base en ZnO sintetizados por una ruta verde, utilizando extracto de ajo.

En la Figura 18 se muestra el espectro Raman, correspondiente al nano biohíbrido con base en ZnO sintetizada por una ruta verde utilizando extracto de ajo, y en la Tabla 2 la ubicación de las bandas activas en Raman más importantes y los procesos asociados a las mismas. Comparando este espectro Raman con el de las ZnO-NPs obtenidas con Pechini (Figura 6), el cambio más evidente es el desplazamiento de las bandas del espectro del biohíbrido (Figura 18) hacia bajos números de onda con relación a la ubicación de las bandas correspondientes a las ZnO-NPs (Figura 6). Este comportamiento indicaría, tomando como referencia lo

indicado por Taziwa et al., (2017) en su trabajo sobre muestras de ZnO que contenían carbón (C-ZnO), que el ZnO obtenido por la ruta verde contendría biomoléculas del ajo como “impurezas”, tal como lo indicaron los resultados de espectroscopia IR (Figuras 16 y 17). Este desplazamiento hacia bajos números de onda era de esperar si el oxígeno del enlace Zn – O es sustituido por el carbón, como debería ocurrir al formarse los compuestos orgánicos de cinc en estas muestras, ya que el C tiene una masa menor que el O. Además, la existencia de un modo multifonónico a 605 cm⁻¹ (Figura 18), relacionado con el fonón ubicado a 304 cm⁻¹ y que se desplaza hacia bajas frecuencias con relación al del ZnO -NPs (308 cm⁻¹ – Figura 6), reiteraría la presencia de carbono en el sólido sintetizado por la ruta verde, proveniente de las biomoléculas de ajo que lo recubre.

Tabla 3. Modos vibracionales activos en Raman y sus procesos asociados correspondientes a los nano biohíbridos con base en ZnO sintetizadas por una ruta verde (Referente: Cuscó et al., (2007))

| REF [cm ⁻¹] | ZnO NPs [cm ⁻¹] | Proceso asociado |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 203 | 240 | 2E ₂ ^{low} |
| 378 | 363 | A ₁ (TO) |
| 438 | 430 | E ₂ ^{high} |
| 483 | 500 | 2LA |
| 574 | 563 | A ₁ (LO) |
| 700 | 699 | LA+TO |

1.6.5 Comportamiento de los biohíbridos con base en ZnO frente a tratamiento térmico: Análisis térmico

Con el objetivo de conocer el comportamiento térmico de los biohíbridos con base en ZnO, obtenidos por la ruta verde empleada, se realizó un análisis térmico de los mismos. Para ello se utilizó el mismo equipo de caracterización que se usó para

analizar el precalcinado obtenido al realizar la ruta química para la obtención del ZnO. Las curvas de ATD/TG obtenidas de estos sólidos se muestran en la Figura 19.

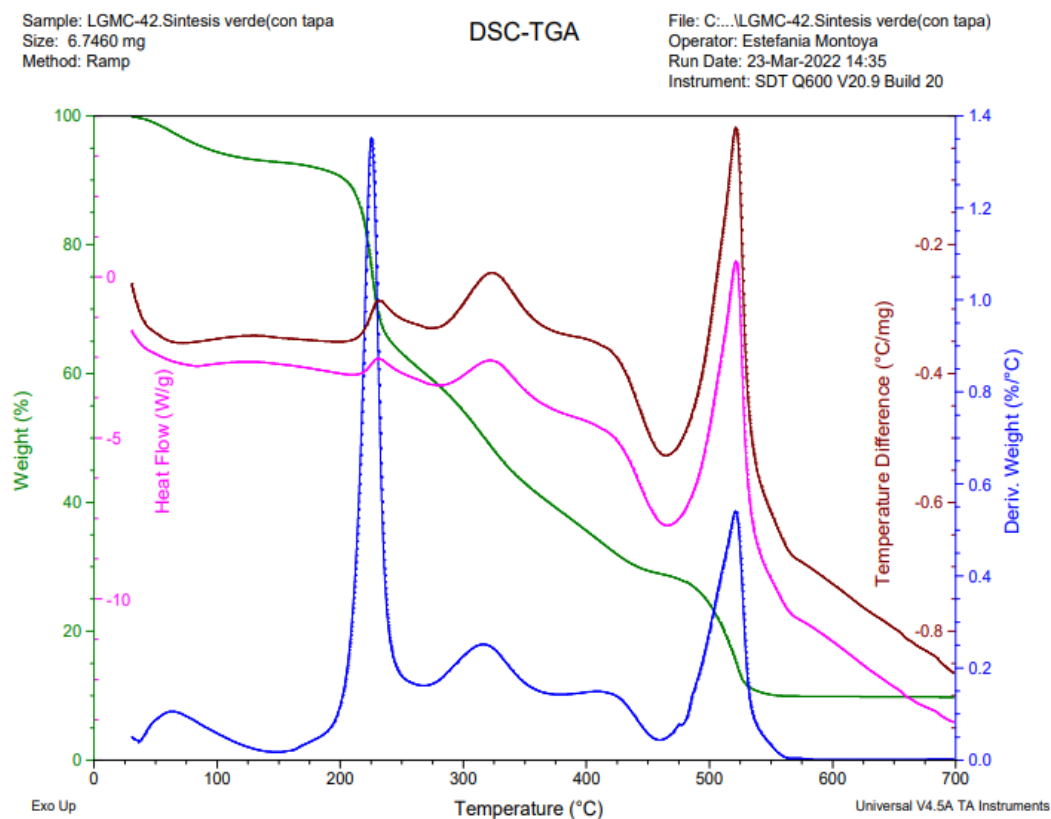


Figura 19. Curvas de ATD/TG correspondiente a los nano biohíbridos con base en ZnO obtenidas por síntesis verde, utilizando extracto acuoso de ajo.

Las curvas de ATD/TG de la Figura 19 dan información sobre los eventos fisicoquímicos que experimento el biohíbrido con base en ZnO al ser sometido a un tratamiento térmico programado. Inicialmente, alrededor de 100°C, se observó una pérdida de masa característica de un proceso de desorción (Granados, 2015), asociado a un pequeño pico endotérmico que aparece en la curva de ATD a esta temperatura. Los picos exotérmicos a ≈ 220 , ≈ 330 y ≈ 520 °C corresponderían a la descomposición térmica de los compuestos orgánicos presentes en el ajo y que recubrirían al ZnO, reacciones exotérmicas de oxidación de la fase orgánica que justificarían el corrimiento de las bandas en los espectros IR de la Figura 17,

indicando la aparición de nuevos grupos funcionales como producto de esta calcinación. Estas reacciones de combustión de la fase orgánica produjeron volátiles cuyo desprendimiento propicio la correspondiente reducción en la masa de la muestra, tal como lo indica la curva TG (Figura 19). A partir de 550°C, la muestra no sufrió ningún otro evento fisicoquímico y mantuvo su peso constante. Es por ello por lo que se puede considerar que en esta etapa se consolidaría la cristalización del ZnO. Estos resultados de ATD/TG (Figura 19) validarían la propuesta de conformación de una estructura Core-Shell en los sólidos obtenidos, durante la síntesis verde con extracto acuoso de ajo, ya que las curvas mostraron la volatilización de compuestos con base en carbono, correspondientes a las biomoléculas del ajo que rodearían al sólido inorgánico tal como lo mostraron los resultados de espectroscopia IR (Figura 16).

1.6.6 Estructura cristalina de los biohíbridos con base en ZnO

Con el objetivo de determinar la estructura cristalina de los biohíbridos con base en ZnO, obtenidos por la ruta verde de síntesis empleada en este trabajo, se les tomó el difractograma de rayos x. El DRX correspondiente a estos biohíbridos se muestra en la Figura 20. En él, es evidente su naturaleza amorfa, porque no presenta ninguna banda definida que se pueda relacionar con algún plano cristalográfico.

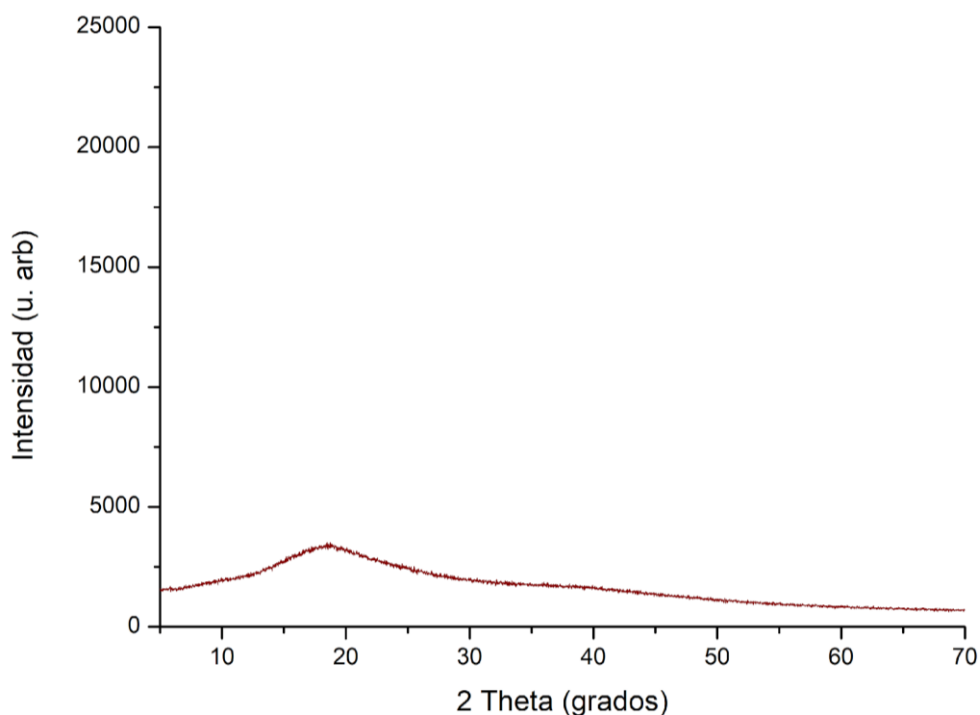


Figura 20. Difractograma de rayos X correspondiente al nano biohíbridos con base en ZnO sintetizado por una ruta verde (usando extracto de ajo).

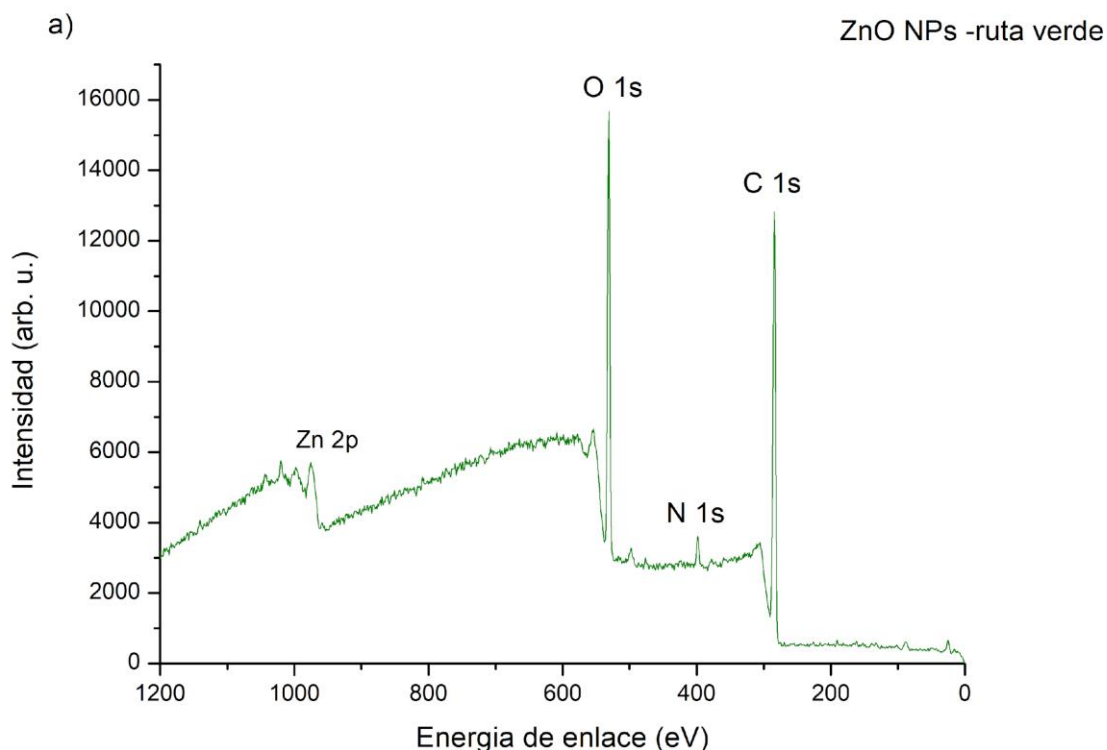
1.6.7 Análisis de los biohíbridos con base en ZnO utilizando XPS

En la Figura 21(a) se muestra el espectro general de XPS obtenido para el sólido sintetizado por la ruta verde. Al analizar la señal del Zn en el espectro (Figura 21(b)), a pesar de la alta señal -ruido que este presente, se identificaron dos picos importantes a 1020.23 y 1043.19 eV, los cuales se pueden asignar al Zn 2p_{3/2} y Zn 2p_{1/2}, respectivamente (Liang, Wuang, 2018). Considerando el trabajo de Rössler et al. (Rössler et al., 2006), otras posibles asociaciones de energías de enlace a estos picos podrían ser Zn²⁺(H₂O)₄ 2p (1042.3 eV), Zn⁺ 2p (1042.3 eV) y Zn²⁺ 2p_{1/2} (1046.7 eV). Además, el pico ubicado en 1068.39 eV se podría asociar al Zn⁺ 2p y el que se encuentra a 1005.9 eV podría indicar la presencia de “clústeres” de ZnO, según los cálculos de Rössler et al. (Rössler et al., 2006).

En la Figura 21(c) se muestra la deconvolución de la señal O 1s del espectro XPS, destacándose los picos ubicados a 530.27, 532.09 y 532.94 eV. El primero de ellos, 530.27 eV, se puede asociar al oxígeno reticular O_L o sea a los iones O^{2-} en sitios intrínsecos (Chen et al., 2000; M. Chen, et al., 2011). El pico ubicado a 532.09 eV podría corresponder a especies de oxígeno Quimi sorbido O_i u oxígenos débilmente ligados a la superficie (por ejemplo, O_2 , H_2O o grupos hidroxilos adsorbidos), y el que se encuentra a 532.94 eV a especies carbonatadas tipo C-O y C=O. Para la señal C 1s (Figura 2(d)), su deconvolución, usando el software Fityk, mostro dos picos representativos: 287.81 y 289.05 eV. El primero, 287.81 eV, se podría asociar al enlace C=O, tanto del CO_2 adsorbido como de las especies carbonatas estructurales (Mar et al., 1992), mientras que el ubicado a 289.05 eV se podría atribuir a una forma del oxido de carbón tipo O = C-O (M. Kwoka, et al, 2020).

Adicionalmente, se observa en el espectro XPS (Figura 21(a)) la presencia de la señal N 1s (Figura 21(e)) que al deconvolucionarla presenta picos representativos a 398.6 eV, asociado a un enlace Zn-O-N; 399.6 eV, que puede corresponder al enlace N - H o a un grupo amino con un hidrógeno (C-N-H), y 401.4 eV, relacionado con el enlace N - N (Oh, Shin, 2013; A. Ievtushenko, et al., (2017); L. C. Chen, et al, 2008).

(a)



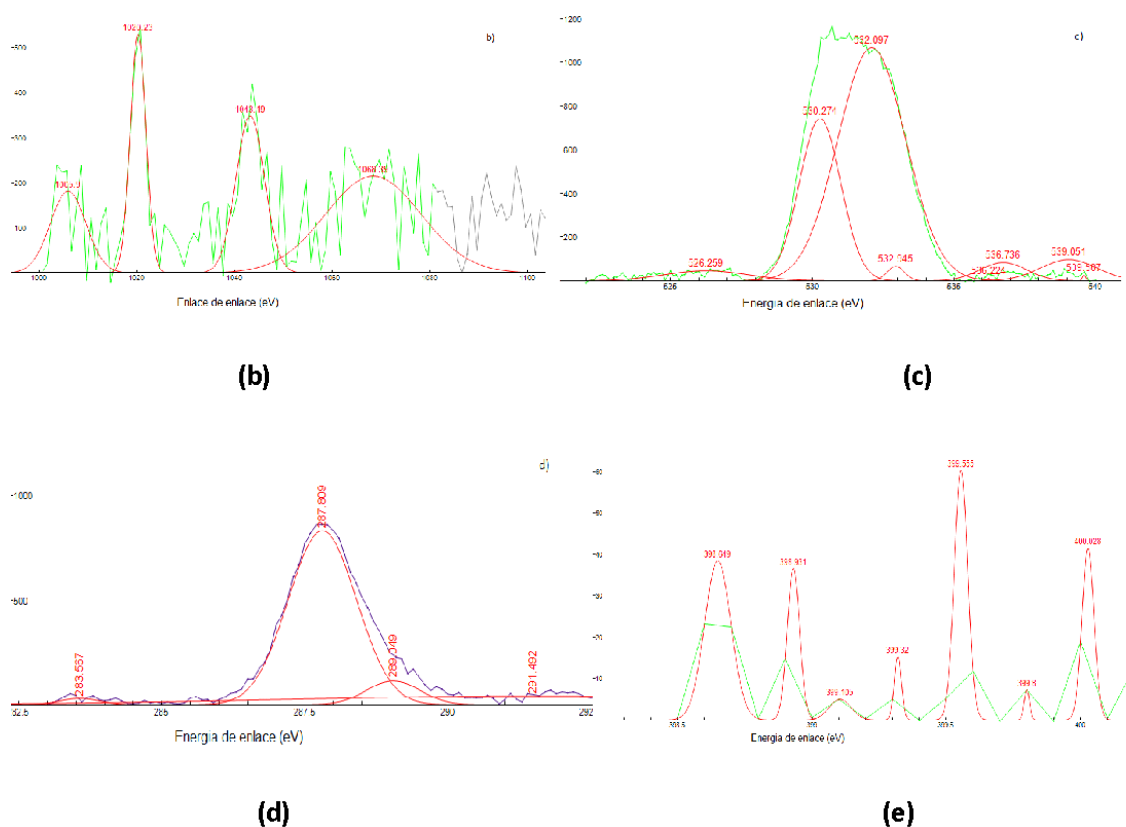


Figura 21. (a) Espectro XPS correspondiente a los nano biohíbridos con base en ZnO, sintetizados por una ruta verde, y las deconvoluciones de las señales: (b) Zn 2p, (c) O 1s, (d) C 1s y (e) N 1s.

1.6.8 Morfología y tamaño de partícula de los biohíbridos sintetizados por una ruta verde: microscopía electrónica

En la Figura 22 se muestran las micrográficas obtenidas de las partículas de los nano biohíbridos con base en ZnO, obtenidos por síntesis verde. En estas fotografías se observa que las partículas presentan una morfología laminar, con alta tendencia a la aglomeración, láminas de ~60 nm de largo y ~10 nm de ancho (ver Figura 22), dimensiones que valida su naturaleza nanométrica.

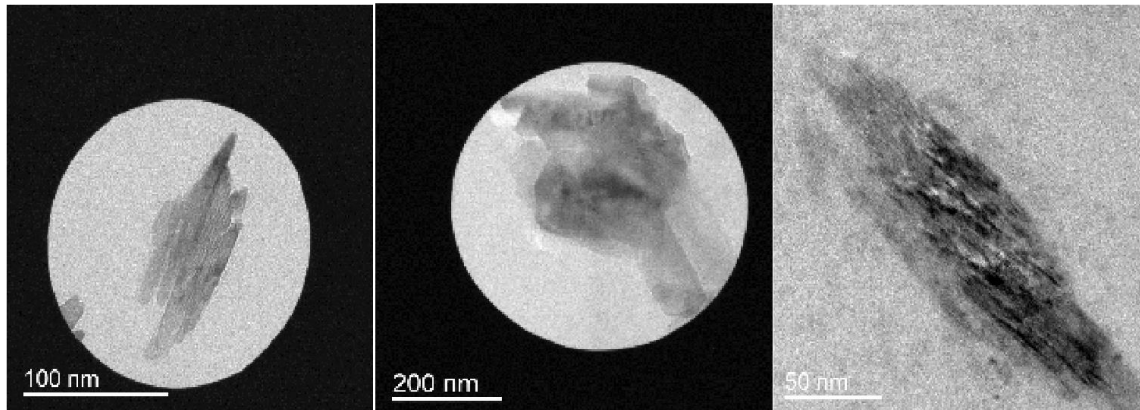
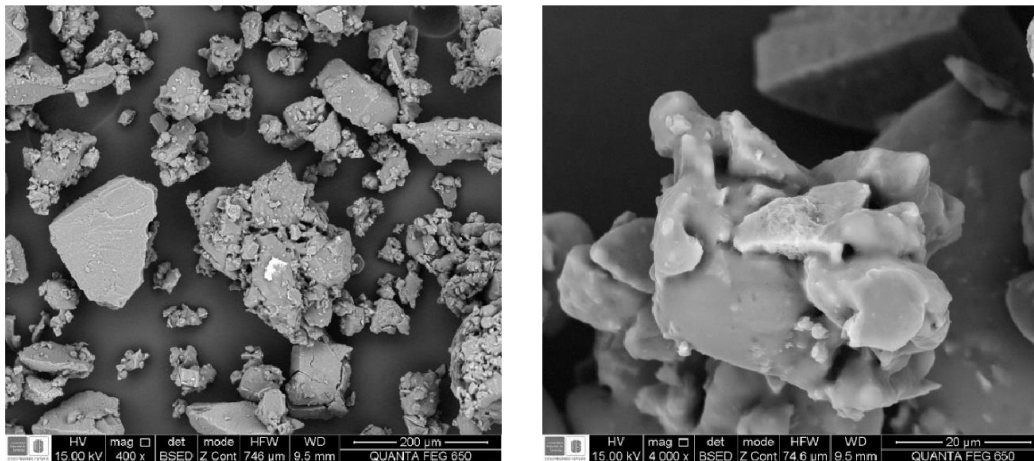


Figura 22. Micrografías obtenidas con TEM de los nano biohíbridos con base en ZnO sintetizadas por una ruta verde, utilizando extracto de ajo.

En la Figura 23 se muestran las fotografías obtenidas con MEB de los nano híbridos. En ellas se observa la característica irregular de su morfología, la tendencia de los nano biohíbridos a formar aglomerados blandos y duros (agregados) de tamaño micrométrico.



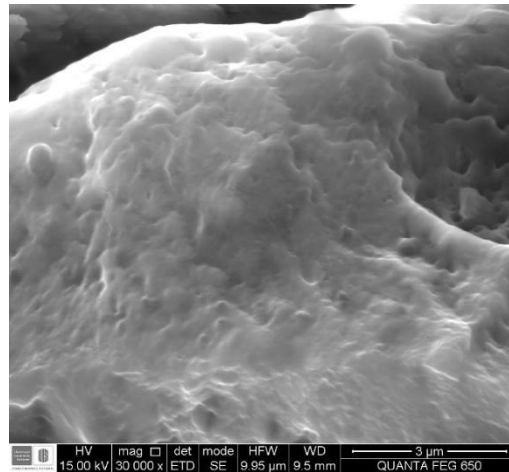
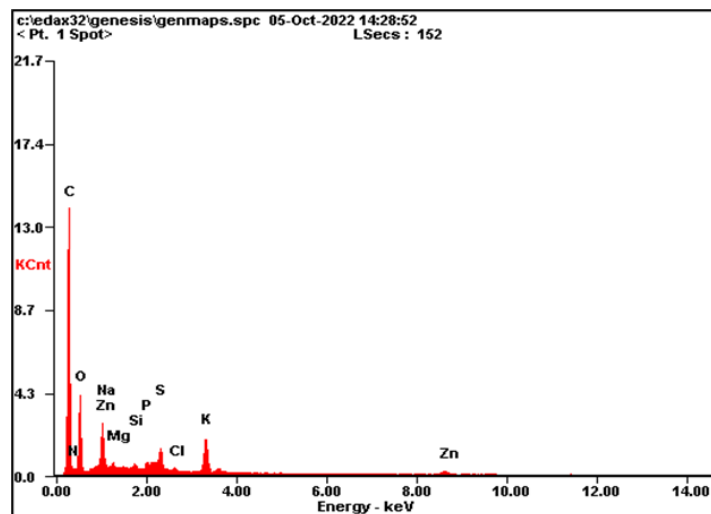


Figura 23. Fotografías tomadas con MEB de los nano híbridos con base en ZnO sintetizados por una ruta verde.

En la Figura 24 se muestra el espectro de EDS, así como la tabla que indica la composición química elemental, de los nano biohíbridos con base en ZnO sintetizados por la ruta verde usada en este trabajo. La composición química del nano biohíbrido, como se indica en la Figura 24, mostro la presencia de diferentes elementos que pueden aparecer como componentes de los compuestos fenólicos, base del ajo, además de la presencia de Zn. En la tabla de la Figura 24, se indica el porcentaje de dichos elementos, donde se puede apreciar la alta presencia en la superficie de C y O, además de la evidencia de trazas de otros elementos (N, Mg, P, S, Na, K, principalmente), que fueron absorbidos por la planta de ajo, como nutrientes, y forman parte de su composición química.



| Elemento | Wt% | At% |
|----------|-------|-------|
| C | 55.75 | 70.03 |
| N | 3.04 | 3.28 |
| O | 20.27 | 19.11 |
| Na | 1.01 | 0.66 |
| Mg | 0.58 | 0.36 |
| Si | 0.54 | 0.29 |
| K | 6.39 | 2.46 |
| Zn | 8.54 | 1.97 |

Figura 24. Espectro EDS, así como su composición química elemental, correspondiente a los nano híbridos de ZnO obtenidos por la ruta verde empleada, usando el extracto de ajo.

1.7. CONCLUSIONES

- Haciendo uso de las metodologías propuestas en este trabajo se obtuvieron nanopartículas de ZnO por dos rutas, química y verde, de manera controlada y reproducible. Las técnicas de caracterización empleadas mostraron que ellas presentaban importantes diferencias en sus características fisicoquímicas, dependiendo del método de síntesis empleado para su obtención.
- Las ZnO-NPs sintetizadas por el método de complejo polimérico Pechini (ruta química) requirió de un tratamiento térmico a 550 °C, del precalcinado, para obtener el ZnO de interés. las partículas primarias del ZnO sintetizado presentaron un tamaño de partícula promedio menor a 100 nm, con morfología esférica y tendencia a aglomerarse de manera especial, conformando barras o láminas de tamaño micrométrico. El ZnO presentó alta pureza química.
- El proceso utilizado para obtener las ZnO-NPs por ruta verde, aproximadamente a 100 °C, se basó en la metodología de precipitación controlada, usando como solvente extracto de ajo, y se enmarcó en los estándares de la química verde. El seguimiento de

una de las etapas importantes del proceso, el lavado del precipitado, evidencio la transformación química del precipitado inicial, obteniéndose al final un nano biohíbrido de ZnO, con una estructura “Core – Shell” validada por varias de las técnicas de caracterización empleadas. El “Core” estaría conformado, principalmente, por el óxido de cinc y la “Shell” por biomoléculas que contiene el ajo. Los nano biohíbridos de ZnO presentaron una morfología laminar, con dimensiones nanométricas (≈ 60 nm de largo y ≈ 10 nm de ancho) y estructura cristalina amorfa.

- En general, las nanopartículas de ZnO sintetizadas en este trabajo, tanto por ruta química como por una ruta verde, presentaron una alta concentración de defectos, desorden reticular y confinamiento fonónico, en general, con presencia de fonones ópticos superficiales y carbón superficial, específicamente en las muestras sintetizadas por la ruta verde, lo anterior observado principalmente en los resultados de XPS. Estas características hacen prever que el ZnO obtenido, tanto por ruta química o ruta verde, tiene una alta capacidad para interactuar con los sistemas biológicos y dadas sus potenciales aplicaciones es muy importante determinar su toxicidad, que es el interés más relevante del presente proyecto de investigación.

Referencias

A. Ievtushenko, O. Khyzhun, I. Shteplyuk, O. Bykov, R. Jakiela, S. Tkach, E. Kuzmenko, V. Baturin, O. Karpenko, O. Olifan, G. Lashkarev, X-ray photoelectron spectroscopy study of highly-doped ZnO:Al,N films grown at O-rich conditions, *Journal of Alloys and Compounds* 722 (2017) 683-689;

Arciniegas-Grijalba PA, Patiño-Portela MC, Mosquera-Sánchez LP, Guerra Sierra BE, Muñoz-Florez JE, Erazo-Castillo LA, Rodríguez-Páez JE. ZnO-based nanofungicides: Synthesis, characterization and their effect on the coffee fungi *Mycena citricolor* and *Colletotrichum* sp. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 May;98:808-825. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.031. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30813087.

A, S. Alshammari, L. Chi, X. Chen, A. Bagabas, D. Kramer, A. Alromaeh, Z. Jiang, Visible-light photocatalysis on C-doped ZnO derived from polymer-assisted pyrolysis, *RSC Adv.* 5 (2015) 27690–27698

B. A. Arndtsen, R. G. Bergman, T. A. Mobley, T. H. Peterson, Selective intermolecular carbon-hydrogen bond activation by synthetic metal complexes in homogeneous solution, *Acc. Chem. Res.* 28 (1995) 154-162; R. H. Crabtree, Organometallic alkane CH activation, *J. Organomet. Chem.* 689 (2004) 4083-4091

Banfield, J. & Zhang, Hengzhong. (2001). Nanoparticles in the Environment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry.* 44. 1-58. 10.2138/rmg.2001.44.01.

Barkhordari, A., Hekmatimoghaddam, S., Jebali, A., Khalili, M. A., Talebi, A., & Noorani, M. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. *Iranian journal of reproductive medicine*, 11(9), 767.

Benitez-Salazar M. I., Niño-Castaño V.E, Dueñas-Cuellar R.A., Caldas-Arias L., Fernández I., Rodríguez-Páez J.E, Chemical synthesis versus green synthesis to obtain ZnO powders: Evaluation of the antibacterial capacity of the nanoparticles obtained by the chemical method, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 9, Issue 6, 2021, 106544, ISSN 2213-3437, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106544>.

C. J. Li, B. M. Trost, Green chemistry for chemical synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 13197-13202

C. J. Li, Reflection and perspective on green chemistry development for chemical synthesis - Daoist insights, *Green Chem.* 18 (2016) 1836-1838; J. Virkutyte, R. S. Varma, *Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements*, ACS Publications, Washington. USA, 2013

Carbajal-Franco, G., Avila-García, A., Tiburcio-Silver, A., Gouvêa, D., & Castro, R.

H. (2010). Microstructural effects of Sn addition to Fe₂O₃ thin films. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(2), 1338-1342.

Ch. P. Poole Jr. y F. J. Owens, *Introducción a la Nanotecnología*, Reverté, Barcelona, 2007.

Chem. Soc. 24(5), 393–406 (2020) Heidi Rubí Ramírez-Concepción , Liliana Narcedalia Castro-Velasco , Erika Martínez-Santiago (2016), Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium Sativum*). Vol. 3 Núm. 8 (2016): Salud y Administración.

De Andrade Gomes, M., Valerio, M. E. G., Rey, J. F. Q., & Macedo, Z. S. (2013). Comparative study of structural and optical properties of ZnO nanostructures prepared by three different aqueous solution methods. *Materials Chemistry and Physics*, 142(1), 325-332.

G. Ciofani (Ed), *Smart nanoparticles for biomedicine*, Micro&Nano Technologies Series, Elsevier Inc., Amsterdam, 2018

González Granados, Z., Pérez Expósito, M. J., Lecue Francia, L. E., San Miguel Gómez-Ullate, L., Ferrari-Fernández, B., Castro Martín, Y., ... & Mendoza Gallego, C. (2015). Procedimiento de preparación de películas cerámicas sinterizadas fotoactivas, película obtenida y sus usos.

Gogos, Knauer, and Bucheli. "Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *J.Agric. Food Chem.* 60 (2012): 9781—9792.

Iribarren A, Fernández P, Piqueras J. Cathodoluminescence characterization of ZnO:Te microstructures obtained with ZnTe and TeO₂ doping precursors. *Superlattice Microst.* 2008;43:600-04

Isaac, A. V., Kumari, S., Nair, R., Urs, D. R., Salian, S. R., Kalthur, G., ... & Pasricha, R. (2017). Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*, 494(3-4), 656-662.

Jayarambabu, Naradala. (2014). Germination and Growth Characteristics of Mungbean Seeds (*Vigna radiata* L.) affected by Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles. *International Journal of Current Engineering and Technology*. 4. 5.

Jamuna, B. A., & Ravishankar, R. V. (2014). Environmental risk, human health, and toxic effects of nanoparticles. *Nanomaterials for environmental protection*, 523-535.

J. Bautista, Producción y caracterización de capas cerámicas SiO₂-TiO₂-ZrO₂ sintetizadas por el método SOL-GEL para aplicaciones anticorrosivas, Tesis Maestría, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 2006.

J. Ramsden, *Nanotechnology: An Introduction*, Elsevier, 2011.

Khaderbad, M. A., Kushagra, A., Ravikanth, M., & Rao, V. R. (2010). "Bottom-up" Approaches for Nanoelectronics. *IntechOpen*.

K. Awasthi (Ed), *Nanostructured zinc oxide, Metal oxide series*, Elsevier Inc. Amsterdam, 2021

López-Mora, Y., Gutiérrez-Arenas, D.A., Cuca-García, J.M, Síntesis de nanopartículas y su aplicación en la nutrición animal synthesis of nanoparticles and their application in animal nutrition. *Agroproductividad*: Vol. 11, Núm. 6, junio. 2018. pp: 85-90; 2018.

L. Pan, T. Muhammad, L. Ma, Z. F. Huang, S. Wang, L. Wang, J. J. Zou, X. Zhang, MOF-derived C-doped ZnO prepared via a two-step calcination forefficient photocatalysis, *Applied Catalysis B: Environmental* 189 (2016) 181–191

Lenntech, 2017, Propiedades químicas del Zinc - Efectos del Zinc sobre la salud - Efectos ambientales del Zinc, <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/zn.htm#ixzz7eLxsKUgD>

Li, X., Xing, Y., Jiang, Y., Ding, Y., & Li, W. (2009). Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. *International journal of food science & technology*, 44(11), 2161-2168.

L. C. Chen, Y. J. Tu, Y. S. Wang, R. S. Kan, C. M. Huang, Characterization and photoreactivity of N-, S-, and C-doped ZnO under UV and visible light illumination, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 199 (2008) 170–178

M. Chen, Z. Wang, D. Han, F. Gu, G. Guo, High-sensitivity NO₂ gas sensors based on flower-like and tube-like ZnO nanomaterials, *Sensors and Actuators B* 157 (2011) 565– 574

M. Kwoka, A. Kulis-Kapuscinska, D. Zappa, E. Comini, J. Szuber, Novel insight on the local Surface properties of ZnO nanowires, *Nanotechnology* 31 (2020) 465705

M. Siddiqui, M. H. Al-Whaibi, F. Mohammad (Es), Nanotechnology and plant science, Springer International Publishing Switzerland, 2015

M. Trost, The atom economy-a search for synthetic efficiency, Science 254 (1991) 1471-1477

Martínez, L. R. (2006). Calorimetría y análisis térmico. Laboratorio de Termofísica, 1, 111.

M. Kwoka, A. Kulis-Kapuscinska, D. Zappa, E. Comini, J. Szuber, Novel insight on the local Surface properties of ZnO nanowires, Nanotechnology 31 (2020) 465705

M. A. Mitchnick, D. Fairhurst, S. R. Pinnell, Microfine zinc oxide (Z-cote) as a photostable UVA/UVB sun block agent, J. Am. Acad. Dermatol. 40 (1999) 85-90

Mydeen, S.S., et al.: Biosynthesis of ZnO nanoparticles through extract from Prosopis juliflora plant leaf: Antibacterial activities and a new approach by rust-induced photocatalysis. J. Saudi

Mydeen, S. S., Kumar, R. R., Sambathkumar, S., Kottaisamy, M., & Vasantha, V. S. (2020). Facile synthesis of ZnO/AC nanocomposites using prosopis Juliflora for enhanced photocatalytic degradation of methylene blue and antibacterial activity. Optik, 224, 165426.

Morales-Díaz, A. B., Juárez-Maldonado, A., Morelos-Moreno, Á., González-Morales, S., & Benavides-Mendoza, A. (2016). Biofabricación de nanopartículas de metales usando células vegetales o extractos de plantas. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 7(5), 1211-1224.

Morkoç H, Özgür Ü, Zinc Oxide. Fundamentals, Materials and Device Technology. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009.

Morkoç, H., & Özgür, Ü. (2008). Zinc oxide: fundamentals, materials and device technology. John Wiley & Sons.

M.L. Minsky, Where is our microtechnology? in: The Scientist Speculates, I.J. Good, (Ed.), Heinemann, London, 1962, pp. 139.

O. Lupan, G.A. Emelchenko, V.V. Ursaki, G. Chai, A.N. Redkin, A.N. Gruzintsev, I.M. Tiginyanu, L. Chow, L.K. Ono, B. Roldan Cuenya, H. Heinrich, E.E. Yakimov, Synthesis and characterization of ZnO nanowires for nanosensor applications, Materials Research Bulletin, 45 (2010) 1026-1032.

Osha.gov [Internet]. Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration; [updated 2012 Sep 6]. Available from: https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_277000.html [Google Scholar]

Pájaro Castro, N. P., & Olivero Verbel, J. T. (2011). Química verde: un nuevo reto. Ciencia e ingeniería Neogranadina, 21(2), 169-182.

Ramírez-Concepción, H. R., Castro-Velasco, L. N., & Martínez-Santiago, E. (2016). Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). Revista Salud y Administración, 3(8), 39-47.

Raba, A. M., Bautista, J., & Murillo, E. (2016, February). Synthesis and characterization of the oxide nanoparticles obtained by the polymeric precursor method. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 687, No. 1, p. 012084). IOP Publishing.

Rakibuzzaman M., S.K. Rahul, M.I. Ifaz, O. Gani, A.F.M. Jamal Uddin Nano Sidhu technology in agriculture: future aspects in Bangladesh Int. J. Bus. Soc. Sci. Res., 7 (2018), pp. 6-9 <http://www.ijbssr.com/currentissueview/14013296>

Razavi, R. S., Loghman-Estarki, M. R., & Farhadi-Khouzani, M. (2012). Synthesis and characterization of ZnO nano-structures by polymeric precursor route. Acta Physica Polonica-Series A General Physics, 121(1), 98.

R. Al-Gaashani, S. Radiman, A. R. Daud, N. Tabet, Y. Al-Douri, XPS and optical studies of different morphologies of ZnO nanostructures prepared by microwave methods, Ceramics International 39 (2013) 2283–2292

Rössler, N., Kotsis, K., & Staemmler, V. (2006). Ab initio calculations for the Zn 2s and 2p core level binding energies in Zn oxo compounds and ZnO. Physical Chemistry Chemical Physics, 8(6), 697-706.

S. Shapiro, E. Caspi, The steric course of enzymic hydroxylation at primary carbon atoms, Tetrahedron 54 (1998) 5005-5040).

R. A. Sheldon, Green solvents for sustainable organic synthesis: State of the art, Green Chem. 7 (2005) 267

Stoll, A., & Seebeck, E. (1951). The specificity of the alliinase from *Allium sativum*. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences, 232(15), 1441-1442.

Kumar et al., 2018 Schmid G (2004) Nanoparticles. Wiley-VCH, Weinheim

Sturikova H, Krystofova O, Huska D, Adam V (2018) Zinc, zinc nanoparticles and plants. *J Hazard Mater* 349:101–110

Socrates G (2004) Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. Wiley, Chichester Ph. Walter, et al., Early use of PbS nanotechnology

S.Y. Huang, Q.J. Cheng, S. Xu, D.Y. Wei, H.P. Zhou, J.D. Long, I. Levchenko, K. Ostrikov, Self-organized ZnO nanodot arrays: Effective control using SiNx interlayers and low-temperature plasmas, *Journal of Applied Physics*, 111 (2012) 036101.

Valerio, Tatiana & Maia, Guilherme & Gonçalves, Letícia & Viomar, Aline & Banczek, Everson & Rodrigues, Paulo. (2019). Study of the Nb₂O₅ Insertion in ZnO to Dye-sensitized Solar Cells. *Materials Research*. 22. 10.1590/1980-5373-mr-2018-0864.

for an ancient hair dying formula, *Nano Lett.* 6 (2006) 2215–2219.

West, A. R. (2022). *Solid state chemistry and its applications*. John Wiley & Sons.

X.Q. Cao, R. V. (2004). Ceramic materials for thermal barrier coatings. *Journal of the European Ceramic Society*, 1-10.

Xiong, G., Pal, U., Serrano, J. G., Ucer, K. B., & Williams, R. T. (2006). Photoluminescence and FTIR study of ZnO nanoparticles: the impurity and defect perspective. *physica status solidi c*, 3(10), 3577-3581.

CAPÍTULO 2. EFECTOS DE LAS ZNO NPS SOBRE LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DEL BIOMODELO MUS MUSCULUS

En el ambiente se encuentran diferentes tipos de elementos que pueden considerarse peligrosos para la salud humana y ambiental, los óxidos metálicos suelen hacer parte de la lista de sustancias con efectos adversos sobre diversos sistemas biológicos. Específicamente, el cinc es un oligoelemento esencial que puede hallarse en todos los tejidos corporales como cerebro, músculos, piel etc., además regula variados procesos metabólicos al ser un componente principal para diversos sistemas enzimáticos (Jiang et al, 2018).

El óxido de cinc nano particulado (ZnO-NP) es generalmente usado en evaluaciones antibacteriales (Benítez-Salazar et al, 2021), cosméticas y protección solar (Newman et al, 2009). El ZnO-NP comúnmente es usado como aditivo alimentario, generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Rasmussen et al, 2010), lo cual ha implicado un aumento significativo en su uso no solo en aplicaciones tecnológicas sino también en aplicaciones médicas, como tratamiento para combatir el cáncer, diabetes (Zhang, Xiong, 2015), liberación de medicamentos in situ (Xiong, 2013), antiinflamatorio entre otros (Mishra et al, 2017). Los efectos negativos sobre la salud humana han sido reportados *in vivo* e *in vitro*, (Cho et al., 2011; Cho et al., 2013). Según estudios realizados evaluando la administración pulmonar de ZnO NPs produjo estrés oxidativo, citotoxicidad e inflamación pulmonar en ratas Sprague-Dawley (Chuang et al., 2014), mientras en pruebas de inhalación en humanos, exposición a 2 horas de ZnO NPs, no se encontró efectos adversos en la salud después del tratamiento (Beckett et al., 2005). La situación es interesante dada la variedad de metodologías empleadas y los resultados encontrados evaluando este tipo de materiales sobre diversos sistemas biológicos.

Uno de los procesos vitales para la vida es la reproducción, la cual en diferentes especies implica la unión de dos células sexuales, las cuales contienen la información genética necesaria para crear un nuevo individuo. Los óvulos y espermatozoides son los gametos que interactúan en el proceso reproductivo de mamíferos, como los humanos.

Los espermatozoides son células completamente diferenciadas, las cuales dependen de su habilidad de trasladarse para lograr fecundar el óvulo; este movimiento se concentra en la acción del flagelo o 'cola', una estructura modificada del cilio cuya función principal es permitir el desplazamiento de la célula a través de líquido extracelular. Cuando se afecta, puede disminuir las probabilidades de fecundación. Los estudios sobre el efecto de sustancias sobre estas células son amplios, por citar algunos, Tellez-Lopez et al., (2014), evaluaron capacidad espermática y testicular en ratas macho *Wistar*, después de administrar extracto metanólico de *Tagetes Lucida*, encontrando que este disminuye la calidad espermática al afectar la estructura testicular. Hong et al., (2015) evaluó el efecto de la exposición a TiO₂ NPs sobre espermatozoides de ratones, encontrando una espermatogénesis reducida debida a cambios en la expresión de ciertos genes específicos de los testículos. En este trabajo se evaluó el efecto sobre la calidad espermática al someter a inhalación de ZnO NPs sintetizadas por ruta verde y química a ratones macho *Mus Musculus*, como una manera de aportar al estudio del efecto de distintas sustancias sobre las células reproductoras en mamíferos.

2.1 Toxicidad de las nanopartículas

La nano toxicología es una rama de la ciencia, relativamente reciente, la cual busca entender cómo las características fisicoquímicas de un compuesto pueden definir su bioactividad, la posibilidad de generar toxicidad en órganos si permanece; además de definir los límites de exposición no dañinos. Generalmente se desarrollan protocolos de evaluación, donde se define el modo de exposición (oral, dérmico, respiratorio, etc.), la concentración, el tiempo promedio de acuerdo con la vida del biomodelo y el tipo (agudo, crónico) (De Metales, 2009).

2.2 Efectos tóxicos de las ZnO-NPs

La discusión respecto a la actividad bioquímica que las nanopartículas de ZnO puedan ejercer en diferentes sistemas biológicos es un tema que genera gran interés. Los resultados al respecto no son concluyentes, debido a que, dependiendo del tipo de administración, síntesis y dosis, las nanopartículas pueden o no producir

efectos significativos sobre los sistemas. Para el caso de ZnO-NPs sintetizadas por métodos verdes, se encontró que no son tóxicas y compatibles para el contacto con la piel (Journal , 2014); los resultados de esta investigación permitieron ampliar su uso en productos diseñados como protectores solares en la industria.

Las células sexuales, contienen la información genética necesaria para dar vida a un nuevo individuo y su afectación propiciaría cambios que podrían ocasionar enfermedades, mutaciones e incluso hasta la pérdida de una especie, son pocos los estudios realizados para evaluar el efecto de las NPs sobre las células espermáticas, por ejemplo (Wang et al., 2017; Falchi,et al., 2018; Iftikhar et al., 2021). Hong et al., (2015) evaluaron el efecto de la exposición de ratones a TiO₂ NPs, sobre sus espermatozoides, y encontraron una espermatogénesis reducida debida a cambios en la expresión de ciertos genes específicos de los testículos. En el caso de las ZnO-NPs (Liu et al., 2018), los resultados obtenidos han sido contradictorios. Algunos trabajos sugieren un impacto negativo en la salud humana, tal como lo mostraron los resultados de ensayos in vitro (Barkhordari, 2013) donde se observaron elevados porcentajes de muerte celular, dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración de las NPs. Por otro lado, también se han reportado efectos benéficos sobre la capacidad funcional en la manipulación de espermatozoides crio preservados con ZnO-NPs (Isaac et al., 2017). Esta variedad en los resultados indica que se requiere realizar más estudios para determinar el efecto de las NPs sobre las células espermáticas.

2.3 Aspectos experimentales para evaluar la toxicidad de las ZnO NPs sintetizadas

Los biomodelos en la actualidad representan una alternativa real de investigación en diferentes áreas del conocimiento, contribuyendo transcendentalmente al bienestar humano y animal. Gracias al desarrollo de biomodelos, o modelos de experimentación, se han descubierto fármacos, tratamientos a enfermedades que antes parecían incurables, y se han entendido patologías permitiendo que los pacientes logren tener una mejor calidad de vida (Research, 1988; Romero-Fernández et al., 2016).

En general, se conoce que las células mononucleares fagocíticas pueden engullir NPs que ingresen al organismo tras exposición inhalatoria, permitiéndoles alcanzar el sistema circulatorio y translocarse en diferentes tejidos y órganos, acumulándose incluso en los órganos reproductores (Ifitkhar, 2021). La capacidad reproductiva se puede ver afectada por diferentes factores ambientales. Según Bernardi et al, (2010), investigaciones realizadas en ratones expuestos a ambientes hipóxicos, consumo crónico de alcohol, administración de agroquímicos; produjeron destrucción del epitelio germinal, modificaron estructura tubular, alteración de transporte de los espermatozoides y maduración de los gametos, etc. (Bustos Obregón et al., 2005; Martini et al., 2004; van Thiel et al., 1979; Adams et al., 1997; Calleja et al., 1997; Bustos Obregón et al., 2007).

La espermatogénesis ha sido descrita como un sistema que, dadas sus implicaciones a nivel de diferenciación celular, con procesos sincrónicos y órgano especializado donde ocurre, funciona como un modelo experimental bastante preciso para evaluar posibles afectaciones que agentes tóxicos puedan ocasionar sobre el metabolismo celular (Bruce, Meistrich, 1972). Independientemente del mecanismo que produzca trastornos en esta etapa, sus efectos pueden implicar disminución, malformación o incluso muerte de células germinales, las dos primeras son observables en los espermatozoides maduros. (Ríos, 1992). Sobre estos últimos se realizan estudios de calidad espermática que permiten obtener información sobre la fertilidad de los individuos (Foote, 2002).

2.3.2 Montaje experimental: Diseño y prototipo de la cámara de nebulización para NPs en suspensión

Para realizar las pruebas, fue necesario diseñar un equipo que permitiera someter los biomodelos a atmosferas de nanopartículas en suspensión. Al realizar la investigación se encontró que en el mercado colombiano no hay productos que ofrezcan este servicio, aunque se halló algunas inhalo cámaras de uso veterinario, estaban diseñadas para animales más grandes (perros, gatos) y su propósito principal consistía en aplicar anestesia. A nivel internacional equipos de prueba para evaluar inhalación de productos en biomodelos, existen, pero son costosos y requieren una disposición e instalación especiales. Dadas las anteriores condiciones, se procedió a generar una solución de bajo costo y personalizada para

las necesidades de la experimentación. El proceso pasó por varias etapas de diseño y pruebas, hasta desarrollar el prototipo que fue utilizado.

En esencia se trabajó usando dispositivos compresores de aire que se pueden encontrar en el país. Se decidió usar nebulizadores de uso médico, los cuales son dispositivos que transforman un líquido en aerosol y se utilizan para administrar suspensiones de fármacos o soluciones para inhalarse a través de mascarilla facial o boquilla. Los fármacos que se administran a través de los nebulizadores son antibióticos, broncodilatadores, corticoides y mucolíticos.

Existen tres tipos de sistemas de nebulización: nebulizadores neumáticos o tipo jet, nebulizadores ultrasónicos y nebulizadores de malla. En cualquiera de los tres tipos, para inhalar el aerosol se precisa una pieza bucal, una mascarilla naso bucal, conexión en T a tráquea, mascarilla traqueal u horquilla nasal. La eficacia de la nebulización depende de un gran número de factores, incluyendo el sistema compresor-nebulizador utilizado, el mantenimiento de este, las características del fármaco a nebulizar (ZnO NP s) y la técnica de inhalación del paciente (biomodelos), entre otros. No sólo las características técnicas del nebulizador afectan al rendimiento de la nebulización, sino que también afectan al rendimiento de esta todos los componentes que precisan para la nebulización de un fármaco (tubos de conexión, filtros, tipo de nebulizador, etc.).

Ventajas

- No requieren coordinación ni pausa respiratoria.
- Permite administrar diferentes fármacos y sus mezclas, así como modificar la concentración.

Inconvenientes

- La eficacia es variable, según el nebulizador, y depende de la técnica y de factores del modelo a evaluar.
- Los tiempos de tratamiento son prolongados.
- Son fuente potencial de contaminación, especialmente si el mantenimiento es inadecuado.

El nebulizador funciona generalmente por medio de aire comprimido u oxígeno a presión, que entra en el nebulizador a través de un pequeño orificio. Para su funcionamiento, los nebulizadores neumáticos precisan de una fuente generadora (bombona de oxígeno, aire comprimido). Están compuestos por un reservorio en el que se deposita el líquido que debe nebulizar, un orificio de entrada de gas y un tubo capilar por el que asciende el líquido. Convierte un líquido en pequeñas gotas (atomización), en su mayoría dentro del rango de las partículas respirables (1-5 μm), mediante la fuerza de un gas presurizado. El tamaño de las partículas depende de la solución (densidad, viscosidad y tensión superficial) así como de la velocidad y el flujo del gas. Un aumento de la velocidad del gas disminuye el tamaño de las gotas (nebuliza 6-8 L/min). Existen diferencias significativas del porcentaje de partículas respirables entre los distintos nebulizadores comercializados (30-60%). Se presentan dificultades al nebulizar suspensiones, como es el interés del presente trabajo. La fracción ineficaz del fármaco (volumen residual) del nebulizador o volumen de solución que permanece en el nebulizador y tubuladuras al finalizar la nebulización es variable (0,2-4ml). Se minimiza usando nebulizadores de forma cónica, agitando el nebulizador periódicamente durante la inhalación, así como utilizando un volumen de llenado de entre 4 a 5 ml. El patrón respiratorio influye en la cantidad de aerosol que se deposita en el tracto respiratorio inferior. Se recomienda un patrón lento, a volumen corriente, intercalando inspiraciones profundas y evitando la hiperventilación. Hay varios tipos de nebulizadores según el funcionamiento durante la inhalación. Los más utilizados son los nebulizadores convencionales con débito constante, los nebulizadores con efecto Venturi activo durante la inspiración y los dosimétricos o de liberación adaptada.

Para el prototipo se usó un nebulizador de tipo jet convencional con débito constante, el cual genera un flujo de aerosol de forma continua, tanto en inspiración como en espiración. Con estos nebulizadores se produce una pérdida en el ambiente durante la fase respiratoria de entre un 60-70% de la dosis que se pone en el nebulizador (dosis nominal). Esta pérdida, además de contaminar el ambiente, puede perjudicar a las personas del entorno en el que se realice la terapia inhalada. El modelo usado fue AN 821-Nebulife con las siguientes características de funcionamiento:

| | |
|--|---|
| Modelo | AN 821 – Nebulife |
| Uso | Neonatos, niños y adultos |
| Capacidad de medicación | 2 mL a 8 mL |
| velocidad de medicación | ≥0.2 mL/min |
| Radio máximo de vapor | ≥0.2 mL/min |
| Presión máxima de compresión | ≥0.1 MPa |
| Flujo de aire comprimido | ≥ 8L/min |
| Partículas atomizadas | 0.5-6 µm |
| MMAD (Promedio de partículas atomizadas) | 2 µm |
| Ruido | ≤65dB (A) |
| Apagado | Manual (máximo 30 minutos de uso continuo y 30 min de descanso) |
| Fuente de poder | Eléctrica ≤65 VA |
| Voltaje | 110 VAC ± 10% 60Hz |
| Compatibilidad Electromagnética | Tipo BF |
| Peso | 1.55 kg |
| Dimensión | Aprox 269*169.5*96 (mm) |
| Prueba de agua | IPX1 |
| Garantía | 2 años |
| Registro INVIMA | vigente INVIMA-20-0049286 |
| Contenido | Caja de empaque, compresor, tubo de aire, copa de medicación, micronebulizador (naranja), mascarilla niños, mascarilla adultos, boquilla, 5 filtros, un fusible y manual. |

Fuente: Homelife, descripción Nebulizador de Compresion Nebulife

Conociendo las limitaciones y especificaciones requeridas se procedió a diseñar. En una primera etapa, se propusieron y estructuraron tres prototipos de la cámara de nebulización, los cuales, en una segunda fase subsecuente, fueron objeto de mejoras tras realizar pruebas de manipulación y simulación de exposición, con el fin de optimizar sus características según los requerimientos y obtener un único diseño para implementar. El primer prototipo consideraba que en su interior se colocarían los modelos biológicos (Mus Musculus), dentro de jaulas metálicas estándar, para

ser expuestos al vapor de la nebulización que ingresaría por los orificios que se encuentran en la tapa superior de la cámara, tal como se indica en la figura 25.

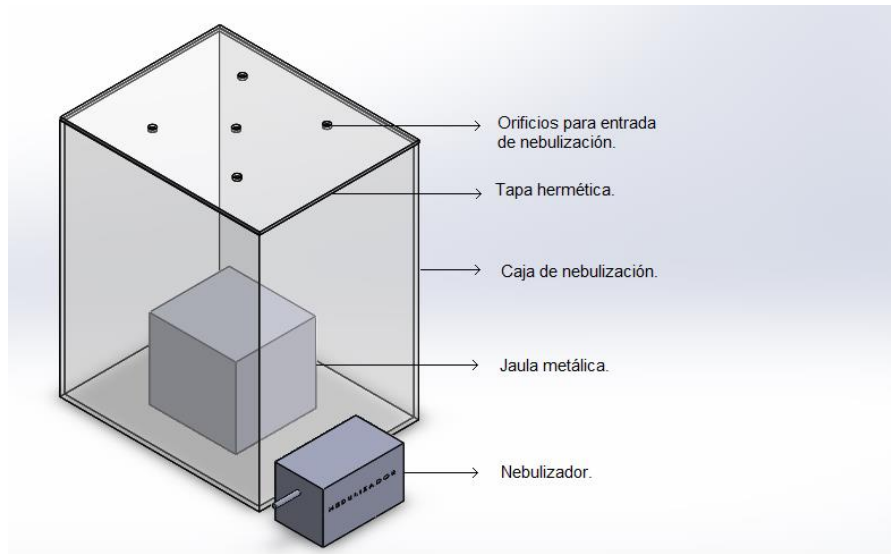


Figura 25. . Primer diseño de cámara de nebulización

Sin embargo, al realizar pruebas con el nebulizador se detectó la necesidad de reubicar los orificios de entrada puesto que el vapor tiende a fluir de manera ascendente; este comportamiento del fluido no permitiría que ingresara en las vías respiratorias de los ejemplares de manera homogénea o que, por otro lado, no llegara a un entorno cercano del animal, presentándose “puntos ciegos” dentro de la cámara de nebulización. Tal que, se procedió a reubicar la entrada del nebulizador, tal como se ilustra en la figura 26.

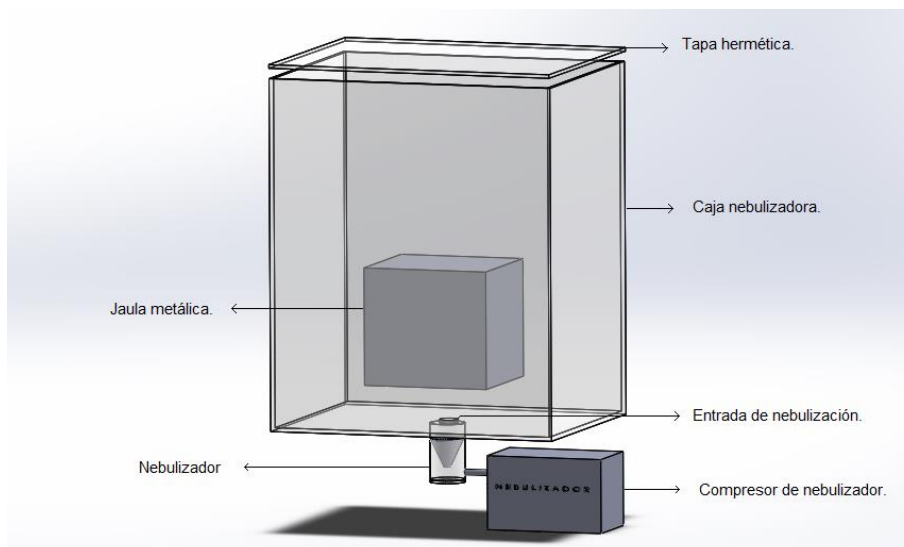


Figura 26. Segundo diseño de cámara de nebulización.

El segundo diseño, evitaba los ‘puntos ciegos’ al permitir el flujo de la nebulización desde debajo de la caja, pero presentó nuevos problemas, como humedad del lecho lo cual podría ser una condición de riesgo para la salud de los biomodelos. Esto llevó a realizar modificaciones a la cámara, como cambiar la disposición del nebulizador, ubicándolo de forma lateral en la caja de nebulización (figura 27) con el propósito de garantizar una distribución homogénea del vapor al momento de “nebulizar” los modelos animales, sin causar una humectación excesiva del medio sobre el que ellos se encontrarán. Este diseño además incluyó la consideración de un tubo de extracción con filtro incluido para evitar la salida de la “atmósfera nebulizada” al ambiente.

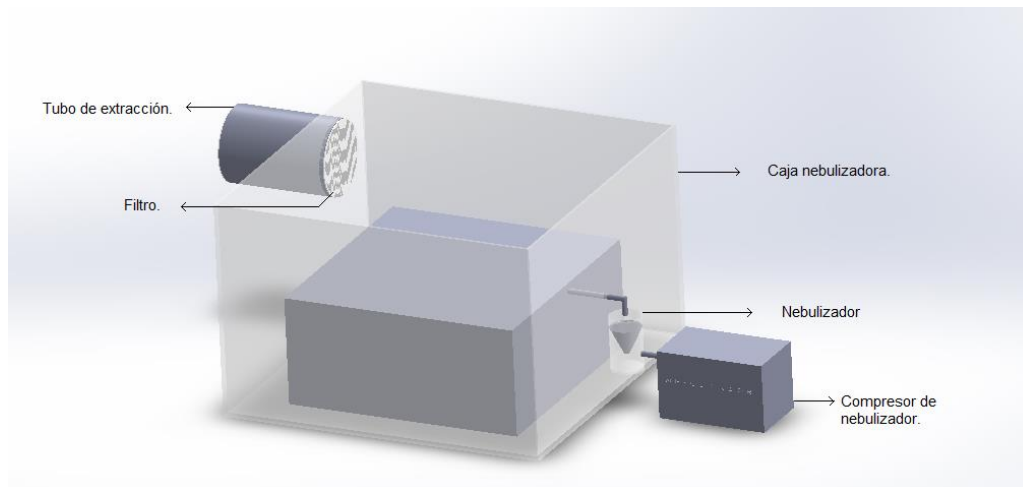


Figura 27. Tercer diseño de cámara de nebulización.

Por otro lado, en el siguiente diseño (figura 28), se planteó no hacer uso de una jaula convencional interna debido a que la “nebulización” se aplicará en pequeños intervalos de tiempo (30 min) y, posteriormente, los ratones se trasladarán a jaulas externas en donde permanecerán hasta la siguiente “nebulización”.

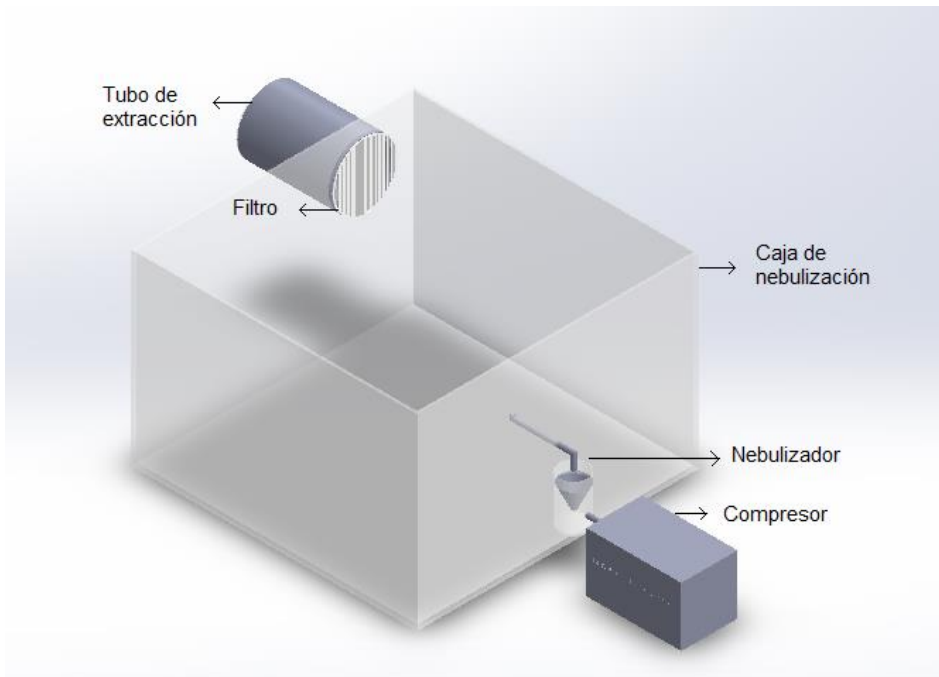


Figura 28. Cuarto diseño de cámara de nebulización.

Siguiendo el diseño de la figura 28, se implementó el montaje de los 7 equipos necesarios para realizar la exposición. Se inició por realizar el corte del material seleccionado para el cuerpo de las cámaras de nebulización. En cuanto al material de la cámara de nebulización y las jaulas de permanencia, pueden ser metálicas o de plástico (polipropileno, policarbonato, poliestireno y polisulfona); estos materiales deben resistir las altas temperaturas que se utilizan durante la esterilización por auto clavado, así como tener una superficie lisa que permita fácil limpieza y la observación de los diferentes comportamientos que presenten los roedores. Debido a esto se optó por el policarbonato macizo color cristal de 3mm de espesor con superficie lisa. Algunas propiedades por las cuales se escogió este material se indican a continuación:

- Aislante termoacústico (Resiste temperaturas extremas, conservando sus propiedades ópticas y mecánicas).
- Alta claridad y transmisión de luz (88 - 90%)
- Temperatura de servicio (-40 hasta 120 °C)
- Alta resistencia al impacto

También, se dedicó especial atención en mejorar los diámetros de entrada y extracción de los biomodelos, pues la entrada propuesta inicialmente, resultó ser ineficiente en permitir una manipulación sencilla, dado su reducido tamaño. Buscando mejorar este aspecto, se realizaron pruebas de manipulación, específicamente introducción y extracción de un ejemplar de la cepa *Mus Musculus* al interior de la cámara de nebulización, evidenciándose la necesidad de ampliar en un 75% el diámetro de la abertura de introducción de tal manera que permita un agarre cómodo y alcance rápido del espécimen. Las anteriores consideraciones son importantes en cuanto a minimizar el nivel de estrés o incomodidad de los biomodelos al ser manipulados antes y después de la exposición. En cuanto al material de los tapones, buscando la versatilidad del equipo, se decidió por tapones formados en torno, fabricados a partir de material reciclado de llantas de grandes vehículos; esto se hizo teniendo en cuenta la maleabilidad del material para tomar la forma del tapón, las propiedades de rigidez y elasticidad que le permiten soportar la relación de presiones atmosférica e interna durante la exposición, la disponibilidad de la materia prima y su bajo costo.

El prototipo final usado puede observarse en la figura 29 a continuación:



Figura 29. Vista frontal y lateral prototipo diseñado.

Durante la investigación, se determinaron algunos de los parámetros importantes para el diseño y montaje de la cámara de nebulización, entre los cuales se encuentra su forma y medidas, las cuales deben estar relacionadas con las dimensiones de las jaulas en donde se van a alojar los ratones *Mus musculus* durante gran parte del proceso experimental. El área mínima que debe tener cada ejemplar, para moverse y expresar posturas normales de conducta y sociabilidad, están determinadas por el peso de cada animal. En la siguiente tabla se muestra el espacio asignado a roedores alojados en grupos de acuerdo con su gramaje.

| Peso (gr) | Área (cm ²) | Altura mínima de la caja (cm) |
|------------|-------------------------|-------------------------------|
| Menor a 10 | 38.71 | 12.7 |
| 10 - 15 | 51.61 | |
| 15 - 25 | 77.42 | |
| Mayor a 25 | 96.77 | |

Fuente: de http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf

Considerando los bosquejos de los posibles diseños de la cámara para tratar los ratones con atmósferas ricas en ZnO-NPs (figuras 28 a 30), se procedió a realizar el montaje de la cámara que se considera más conveniente o sea el diseño 4 (figura 28). Para ello se realizaron los diferentes cortes de la lámina de policarbonato macizo, con la ayuda de una cortadora láser, garantizando cortes de calidad en la superficie del corte para que permita un buen sellado de las caras de la cámara; para la unión de las partes y su sellado se utilizó una solución de pegamento (Weld on 3 polygal). Para periodos de tiempo cortos, los anteriores requerimientos se cumplen, pero como se necesita que la nebulización se realice durante un tiempo mínimo de 30 minutos, se debe reducir la presión que se genera al interior de la cámara para evitar sobrepresiones y que se empiece a generar contaminación hacia el exterior de la cámara (hay que garantizar un adecuado cuidado de los roedores). Para resolver este inconveniente, se optó por acoplar filtros a la cámara de nebulización que tuvieran tamaño de poro micrométrico.

Luego de realizar una búsqueda cuidadosa de los diferentes filtros y sus correspondientes especificaciones, se optó por los filtros MidiSart 2000 de diámetro 64 mm y tamaño de poro 0.2 μm con membrana de PTFE hidrofóbica.

La cámara diseñada se sometió a una primera prueba de validación utilizando el nebulizador escogido. Para la primera etapa de validación, la cámara debía cumplir los siguientes requerimientos:

1. Mantenimiento de la nube emitida por el nebulizador en el interior de la cámara.
2. Homogeneidad del vapor de nebulización al interior de la cámara.
3. Tiempo mínimo de nebulización por el equipo de una “dosis” (30 minutos).
4. Hermeticidad, protección de los investigadores ante la nube de nebulización.

2.3.2.1 Prueba del diseño experimental

Superada esta fase de prueba básica, donde se observó que el prototipo cumplió con los anteriores puntos, se procedió a una siguiente evaluación con biomodelos, donde se buscó observar cómo los factores de respiración, la presión interna, humedad y temperatura afectaban el desempeño del equipo. Se realizaron 3 pruebas de caracterización del equipo, efectuando la siguiente metodología: un biomodelo fue ubicado al interior del equipo durante 30 minutos; se dispuso una dosis inicial de solución salina de 4mL. Al finalizar cada prueba se midió con ayuda de una jeringa, la nebulización restante en el recipiente, luego por una sustracción se determinó la nebulización efectiva. Durante la exposición se evaluó el comportamiento del biomodelo, siguiendo los lineamientos de la Manejo y Cuidado de Biomodelos para la Investigación Científica (2009). Los resultados en términos de nebulización obtenida para esta fase se consignan en la tabla 4(Elaboración propia.):

Tabla 4. Segunda prueba de caracterización equipo de nebulización.

| Prueba | Tiempo exposición (min) | Dosis inicial (mL) | Dosis efectiva (mL) |
|--------|-------------------------|--------------------|---------------------|
| 1 | 30 | 4 | 3 |
| 2 | | | 3.5 |
| 3 | | | 2 |

Los datos obtenidos en esta etapa respecto a la dosis efectiva fueron variables. Dudas como el efecto de más cuerpos al interior de la cámara, comportamiento en grupo de los biomodelos y control de contaminación provocado por la apertura de la tapa del nebulizador, motivaron a ampliar la prueba, tal que se procedió a exponer 6 biomodelos (añadiendo 5) a una atmosfera de solución salina usando el equipo de nebulización. Los resultados obtenidos se ubican en la tabla 5:

Tabla 5. Tercera prueba caracterización equipo

| Prueba | Tiempo de exposición (min) | Disposición Tapa | Dosis efectiva (mL) |
|-------------------------------------|----------------------------|------------------|---------------------|
| 1 | 30 | ¼ abierta | 1.0 |
| 2 | | ½ abierta | 1.5 |
| 3 | | ½ abierta | 1.0 |
| 4 | | Cerrada | 1.7 |
| 5 | | Cerrada | 1.0 |
| Promedio dosis efectiva (mL) | | | 1.2 |

Los resultados obtenidos permitieron observar que aumentando el número de individuos la dosis efectiva promedio fue de 1.0 mL, además se optó por usar la tapa

½ abierta y cubrir la parte superior con papel vinil que permitía que la relación de presión del dispositivo con la atmosfera circundante no se viera afectada, al tiempo que evito que la nube de solución salina fuera liberada en el ambiente, sino que se condensara al interior del recipiente.

Finalmente, se ejecutó la caracterización final, realizando una prueba preliminar de dosis 100, la cual permitió poner a prueba el equipo en las condiciones reales de funcionamiento, al tiempo que se probaba una guía para la determinación de las dosis a evaluar en un futuro. La metodología usada consistió en preparar una suspensión de 100 mg/L usando las nanopartículas y solución salina al 9% como medio dispersor, de la cual se tomaron 4 mL como dosis inicial; se mantuvo el número de individuos (6), se observó el comportamiento de los biomodelos y se mantuvieron las condiciones de diseño igual a la prueba 2. Las ZnO-NPs usadas fueron las sintetizadas por método químico Pechinni. Los resultados obtenidos se consigan en la tabla 6:

Tabla 6. Prueba dosis 100-caracterización equipo de nebulización.

| Prueba | Tiempo de exposición (min) | Dosis inicial (mL) | Dosis efectiva (mL) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 | 30 | 4 | 1.6 |
| 2 | | | 1.4 |
| 3 | | | 1 |
| 4 | | | 1.6 |
| 5 | | | 1.6 |
| 6 | | | 1 |
| 7 | | | 1 |
| Promedio dosis efectiva (mL) | | | 1.3 |

Durante la ejecución de esta etapa se midieron los niveles de ruido ambiental con una aplicación en smartphone la cual usa los parlantes del equipo, para evaluar que

al interior de la caja no sobrepasaran los 67 dB, como se recomienda en la literatura (Zakem, 1974)

2.3.3 Exposición de los biomodelos a atmósferas de ZnO NPs

El uso de los animales de experimentación ha sido uno de los pilares fundamentales en el desarrollo de las ciencias de la salud. Este desarrollo ha permitido un avance cada vez más acelerado sobre los conocimientos de tipo biológico, bienestar del hombre y de los propios animales. El evitar o disminuir el sufrimiento de las especies sometidas a procesos de experimentación ha sido objeto de estudios en las últimas décadas (Smith et al., 2007). Por lo anterior el desarrollo de esta investigación fue cuidadosa de acatar todos los protocolos para mantener en condiciones dignas a cada uno de los biomodelos experimentales y teniendo en cuenta las reglas de las 3R, en todos los procedimientos metodológicos. Este proyecto se encuentra enmarcado dentro de las normativas planteadas en la Resolución N° 008430 de 1993 y la Ley 84 de 1989 por la cual se adopta el Estatuto Nacional de protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia.

El modelo seleccionado para la evaluación fue el ratón *Mus Musculus*, cepa CFW considerado en el mundo de la investigación como uno de los más aptos dada la importante similitud genética con el ser humano (85%), lo cual permite estudiar en ellos una amplia variedad de enfermedades y efectos relacionados con funciones metabólicas, neurológicas, inmunes, entre otras de medicamentos y sustancias de interés (Phifer-Rixey, Nachman, 2015). Se obtuvieron 35 machos provenientes del bioterio de la facultad de Salud de la Universidad del Valle, con 6 semanas de edad, los cuales pasaron por el proceso de aclimatación y disminución de niveles de estrés antes de ser sometidos al tratamiento (figura 30).



Figura 30. Modelo *Mus musculus* usado

Definición de dosis y preparación de las suspensiones

Los tratamientos se prepararon haciendo diluciones de las ZnO NPs química y nano híbridos en solución salina al 0.9 %. Se desarrolló una metodología que permitió obtener 3 dosis de cada línea de síntesis, 40 ppm, 15ppm, 6 ppm. Inicialmente, en 1 L de solución salina, se dispersó 0.001g de los polvos de ZnO NPs obtenidos por síntesis química. Esta solución se llevó a ultrasonido por 10 minutos y Vortex 20 veces para asegurar la dispersión de la solución. En un recipiente nuevo se midió 450 mL de solución salina y completó con 50 mL de la solución con NPs inicial, en este momento se obtiene una solución madre 1, la cual se lleva a ultrasonido y Vortex como la primera ocasión. Posteriormente se toman 25 mL de esta solución madre 2, y se completa con 75 mL de solución salina al 0.9%; se realiza el mismo tratamiento de ultrasonido y vortex. El procedimiento se realiza una vez más, ahora separando 10 mL de la solución madre 3 y se completa con 40 mL de solución salina al 0.9%. A partir de este punto, se desarrollan las diluciones para obtener dosis alta: tomando 20 mL solución madre 3 con 30 mL de solución salina, dosis media: 18.75 mL de dosis alta con 31.25 mL de solución salina y finalmente dosis baja: 8 mL de dosis media más 12 mL de solución salina. Después de cada proceso se ubica en ultrasonido y vortex para dispersión; las dosis se miden en jeringas de 3 mL y se aplican rápidamente como tratamiento.

Diseño experimental

Los biomodelos fueron ubicados en 7 tratamientos: control, química alta, media y baja; verde alta, media y baja (tabla 7). Se ubicaron al interior de las cámaras justo antes de iniciar el tratamiento, para reducir los niveles de estrés que pudiera afectarlos. Inmediatamente después de finalizado el tiempo de nebulización estimado, los biomodelos fueron ubicados en cajas limpias con alimento y agua frescos, hasta la siguiente exposición. Fueron expuestos durante 30 minutos diarios, 3 veces por semana durante 13 semanas.

Tabla 7. Diseño experimental usado

| Grupos de estudio | Tratamiento | Concentraciones | Número de ratones n=35 |
|--------------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| Control negativo | Solución salina | 0.9% | 5 |
| Grupo experimental | ZnO-NPs | 6 mg/m ³ | 5 |
| | | 15 mg/m ³ | 5 |
| | | 40 mg/m ³ | 5 |
| | Nano-bio-híbridos | 6 mg/m ³ | 5 |
| | | 15 mg/m ³ | 5 |
| | | 40 mg/m ³ | 5 |

2.3.4. Obtención de las muestras biológicas que contengan células espermáticas

Después de transcurrido el tiempo de los tratamientos (90 días), los ratones se sacrificaron y para ello se eligió un método que no causa sufrimiento y que garantiza la muerte inmediata, evitando una prolongación de sufrimiento del modelo experimental. (Ver Anexo A). Una vez realizado el sacrificio de los animales experimentales, se procedió a obtener la muestra de células espermáticas mediante una orquiectomía testicular total de los ratones, donde se extrajo los testículos junto con el epidídimo y conducto deferente (Figura 32), luego, se separaron el epidídimo y conducto deferente (Figura 31). Los procedimientos se realizaron siguiendo el protocolo estandarizado durante el presente proyecto para estas técnicas (Ver Anexos B.)



Figura 31. Epidídimo y conducto deferente biomodelo de *Mus Musculus*.

La concentración (número de espermatozoides por mililitro), morfología (el tamaño y la forma de los espermatozoides) y motilidad (movilidad) de los espermatozoides fueron analizada en muestras de semen provenientes de los vasos deferentes y de la cola de los epidídimos, dado que, en los primeros, se observa una baja concentración, pero una alta motilidad, mientras que en los últimos se encuentra una buena concentración espermática y también una buena motilidad (Sztein et al., 2000). El recuento de espermatozoides por mililitro de semen y el porcentaje de células espermáticas anormales se realizó sobre el semen obtenido de machos adultos. Para tales efectos la región más caudal de los epidídimos y los conductos deferentes se colocaron en una placa de Petri con 2ml de solución de NaCl al 0.9% inmediatamente después de su extracción para la obtención de las células espermáticas (Ver anexo B).

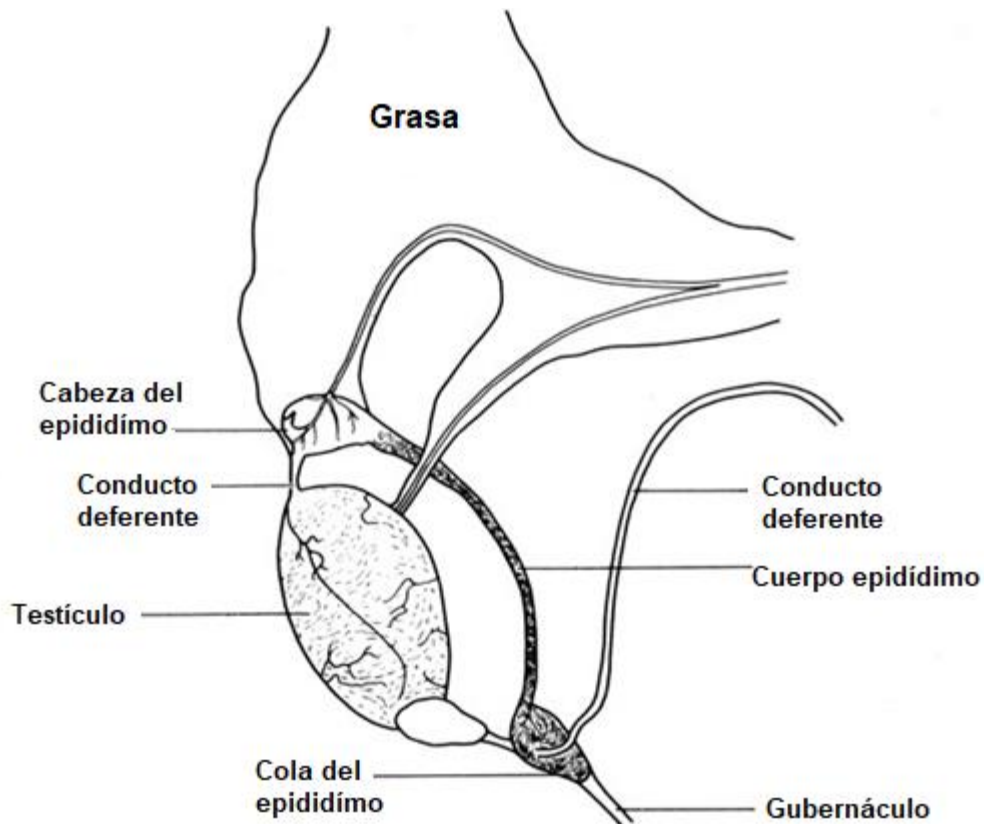


Figura 32. Diagrama epidídimo ratón *Mus Musculus*. Adaptado de Bertnald et al, 2010

Con una aguja 30G se realizaron diversas incisiones a fin de facilitar la dispersión del esperma y el recuento de espermatozoides se realizó en cámara hemocitométrica de Neubauer siguiendo el procedimiento utilizado para el conteo de glóbulos rojos. La cantidad de espermatozoides por macho se expresó en millones/mililitro de suspensión (NE). La morfología se evaluó en alícuotas (volumen repartido en partes iguales) de suspensión fijadas en formol y extendidas en un portaobjetos, las que se colorearon con eosina y se examinaron bajo microscopio óptico a 1000 aumentos. (AN) (Bustos-Obregón 2000). Este procedimiento fue repetido dos veces, para asegurarse trabajar con el promedio de las medidas, contando 100 espermatozoides. Los parámetros para definir los 3 estadios de movimiento se siguieron Movilidad Progresiva (MP), Movilidad No Progresiva (MNP) e Inmóviles (IM), de los que no presentaban ningún tipo de movimiento (WHO, 2010) (Ver anexo B).

2.4 Análisis estadístico de los resultados

Con el objetivo de describir y entender los patrones de los datos obtenidos a partir de los experimentos, al igual que identificar posibles datos atípicos, se realizó un análisis exploratorio de datos por medio de estadística descriptiva, gráficos de dispersión y diagramas de caja. Los datos atípicos fueron revisados para asegurar que no correspondieran a errores, pero si éstos persistían y existía certeza de no ser producto de errores, se procedió a aplicar técnicas estadísticas que fuesen robustas a la presencia de este tipo de datos. De igual forma, todos los análisis fueron ejecutados nuevamente sin los valores atípicos para determinar la influencia de estos en las conclusiones de las pruebas estadísticas aplicadas.

Para cada una de las variables observadas, se revisó el ajuste a la distribución normal, empleando histogramas de frecuencias y por medio de la prueba de Shapiro-Wilks. Por otra parte, el supuesto de homogeneidad de varianzas fue revisado con el estadístico de Levene. Posteriormente, con el fin de evaluar la independencia de las variables, respuesta respecto al peso de las unidades experimentales, se aplicaron correlaciones paramétricas de Pearson y no paramétricas de Kendall .

Teniendo en cuenta la estructura jerárquica del diseño experimental utilizado, se procedió a evaluar la relación de los patrones observados de cada parámetro respecto a las diferentes concentraciones de los dos tratamientos aplicados, así como con los grupos control. Para ello, en primera instancia se ajustó un modelo de ANOVA anidado en donde cada parámetro (vitalidad, motilidad y concentración) corresponde a la variable dependiente y las dos variables nominales están representadas por: los tratamientos (ruta química y ruta verde) y las concentraciones (6 mg/m^3 , 15 mg/m^3 y 40 mg/m^3), estando estas últimas anidadas dentro de los dos tipos de tratamiento. Sin embargo, al observar que el diseño experimental es balanceado (igual número de observaciones para cada concentración), se optó por aplicar un modelo de ANOVA de una vía, utilizando como variable ordinal las concentraciones de cada tratamiento, ya que se obtienen los mismos resultados del ANOVA anidado y su interpretación es más sencilla (McDonald 2014.).

Una vez que los modelos ANOVA de una vía fueron fijados para cada parámetro, los supuestos de normalidad y homogeneidad fueron evaluados nuevamente por medio de gráficos Q-Q de normalidad y gráficos de residuos en función de los valores predichos. En el caso de los modelos que no cumplieron dichos supuestos se empleó un modelo de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis de una vía. En los modelos que resultaron significativos ($p \leq 0.05$), se procedió a realizar comparaciones posthoc entre concentraciones, empleando comparaciones por pares de Tukey para los modelos paramétricos y comparaciones por pares de Wilcoxon para los modelos no paramétricos.

Para el desarrollo de todos los análisis estadísticos, se utilizó el lenguaje de computación estadística R (R Core Team 2021), mediante el software de libre acceso RStudio (RStudio Team 2022), empleando los paquetes 'dplyr', 'stats' y 'ggplot2' (R Core Team 2021, Wickham 2016, Wickham et al. 2021).

2.4.1 Concentración

De acuerdo con la correlación de Kendall, se encontró que la concentración de espermatozoides y el peso de las unidades experimentales no muestran una relación significativa ($\text{Tau} = 0.186886$, $p = 0.1227$). Por otra parte, al estimar el efecto de los tratamientos aplicados sobre los valores de concentración por medio del ANOVA de Kruskal-Wallis, se encontró que los tratamientos exhiben un efecto significativo sobre la concentración de espermatozoides ($H_{6,27} = 18.017$, $p = 0.006189$). Las comparaciones, por pares de Wilcoxon, mostraron que dicho efecto es significativo entre los siguientes tratamientos: ruta química [40 mg/m³] vs. ruta química [6 mg/m³], ruta química [40 mg/m³] vs. ruta verde [40 mg/m³], y ruta verde [40 mg/m³] vs. ruta verde [6 mg/m³] (ver Figura 33, Tabla 8).

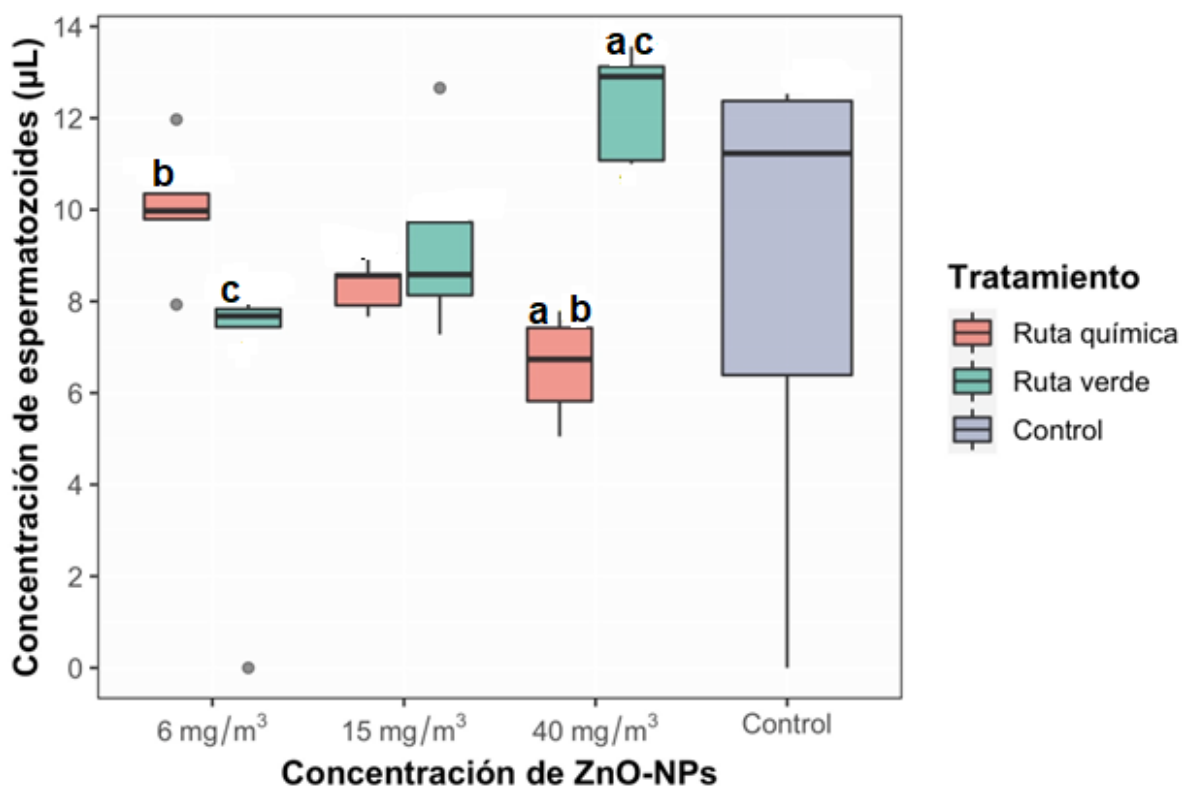


Figura 33. Diagrama de cajas que relaciona la concentración de espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. Los diagramas de bigotes y barras marcados con letras diferentes implican diferencias significativas, los diagramas con letras en común indican que existen diferencias significativas entre ellos. A=Química vs Verde concentración [40 mg/m³]; b=Química [40 mg/m³] vs Química[6mg/m³] c=Verde [40 mg/m³] vs Verde [6mg/m³]

Es importante mencionar que existe un patrón inverso entre las concentraciones de las dos rutas; es decir que a medida que aumenta la concentración en la ruta verde, aumenta la concentración de espermatozoides, mientras que con el aumento de la concentración en la ruta química disminuye la concentración de espermatozoides (Figura 33).

Tabla 8. Comparaciones por pares de Wilcoxon para la concentración de espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. * $p < 0.05$ implica diferencias significativas entre los tratamientos y dosis versus grupo control. # $p < 0.05$ implica diferencias significativas entre metodología química versus verde a igual dosis. & $p < 0.05$ indica diferencias significativas entre distintas dosis de la misma metodología.

| | Control | Ruta química [40 mg/m ³] | Ruta química [15 mg/m ³] | Ruta química [6 mg/m ³] | Ruta verde [40 mg/m ³] | Ruta verde [15 mg/m ³] |
|---|---------|---|---|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Ruta química [40 mg/m ³] | 0.589 | - | - | - | - | - |
| Ruta química [15 mg/m ³] | 0.806 | 0.056 | - | - | - | - |
| Ruta química [6 mg/m ³] | 0.905 | 0.042^{&} | 0.133 | - | - | - |
| Ruta verde [40 mg/m ³] | 0.359 | 0.042[#] | 0.042 | 0.095 | - | - |
| Ruta verde [15 mg/m ³] | 0.905 | 0.133 | 0.905 | 0.686 | 0.133 | - |
| Ruta verde [6 mg/m ³] | 0.608 | 0.464 | 0.182 | 0.056 | 0.042^{&} | 0.333 |

2.4.2 Motilidad

2.4.2.1. Motilidad progresiva

La correlación de Pearson entre la motilidad progresiva de espermatozoides y el peso de los ratones muestra que no existe una relación significativa entre estas dos

variables ($r = 0.02292554$, $p = 0.8976$). En cuanto al efecto generado por los tratamientos sobre el parámetro de motilidad progresiva, el ANOVA de una vía mostró que existe un efecto significativo ($F_{6,27} = 3.364$, $p = 0.0132$). Al aplicar la prueba de Tukey para comparaciones por pares, se encontró que existen diferencias significativas entre los tratamientos de ruta verde [15 mg/m^3] vs. ruta verde [6 mg/m^3] (Tabla 9, Figura 34a).

Tabla 9. Comparaciones por pares de Tukey para la motilidad progresiva de espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados.

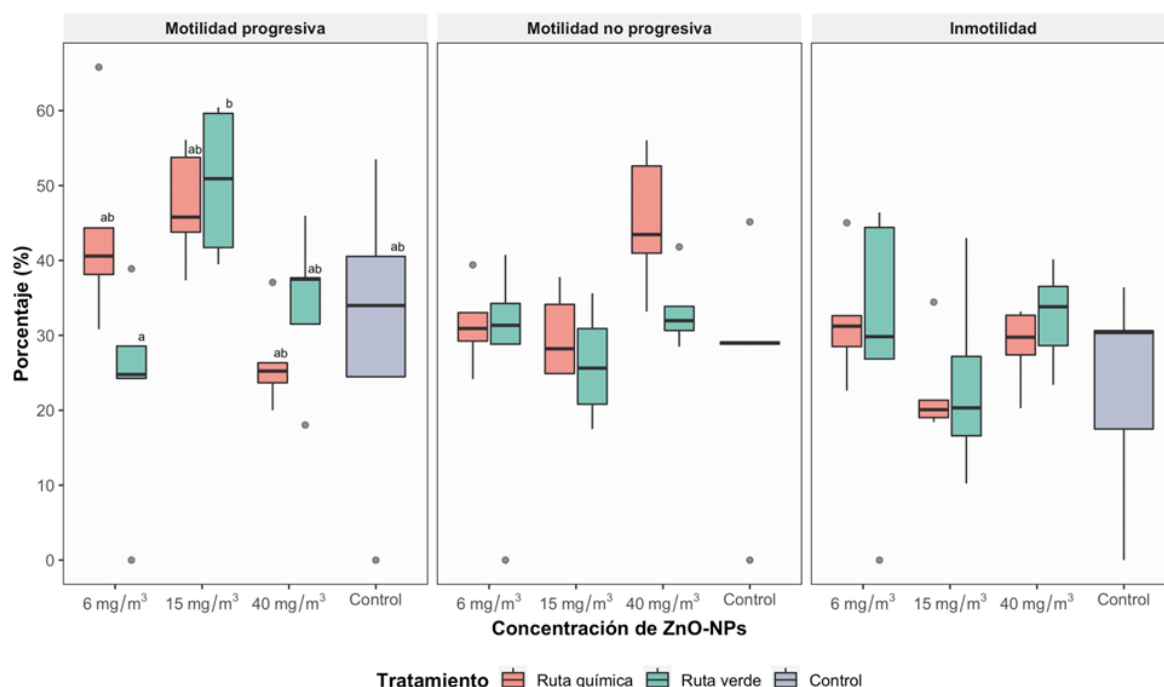
| | Control | Ruta química [40 mg/m ³] | Ruta química [15 mg/m ³] | Ruta química [6 mg/m ³] | Ruta verde [40 mg/m ³] | Ruta verde [15 mg/m ³] |
|---|-----------|---|---|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Ruta química [40 mg/m ³] | 0.9985681 | - | - | - | - | - |
| Ruta química [15 mg/m ³] | 0.3759325 | 0.1612663 | - | - | - | - |
| Ruta química [6 mg/m ³] | 0.633545 | 0.3352877 | 0.99944 | - | - | - |
| Ruta verde [40 mg/m ³] | 0.9992009 | 0.9582955 | 0.6506036 | 0.8779277 | - | - |
| Ruta verde [15 mg/m ³] | 0.2566903 | 0.1058034 | 0.9997768 | 0.9861687 | 0.4829233 | - |
| Ruta verde [6 mg/m ³] | 0.9692347 | 0.9996397 | 0.0725473 | 0.171102 | 0.8191161 | 0.0476195 |

2.4.2.2 Motilidad no progresiva

Al evaluar la relación entre el peso de las unidades experimentales y la motilidad progresiva por medio de la correlación de Kendall, se encontró que no existe una correlación significativa entre las dos variables ($\text{Tau} = -0.1528799$, $p = 0.2071$). En cuanto al efecto generado por las diferentes concentraciones de las dos rutas aplicadas al parámetro de motilidad no progresiva, el ANOVA de Kruskal-Wallis muestra que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($H_{6,27} = 10.274$, $p = 0.1136$), (Figura 34b, ANEXO 1).

2.4.2.3 Inmotilidad

Teniendo en cuenta los resultados de la correlación de Pearson entre el parámetro de Inmotilidad y el peso de los ratones, no se encontró una correlación significativa entre las dos variables ($r = -0.1667122$, $p = 0.346$). Por otra parte, al evaluar el efecto de los tratamientos aplicados sobre la Inmotilidad de los espermatozoides, por medio del ANOVA, se encontró que no existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones ($F_{6,27} = 0.681$, $p = 0.667$) (Figura 34a, ANEXO 1).



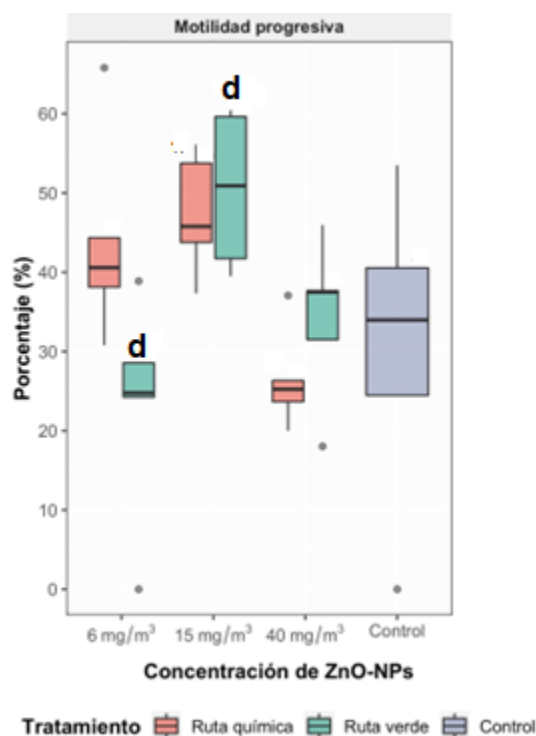


Figura 34. (a) Diagrama de cajas que relaciona los parámetros de motilidad progresiva, motilidad no progresiva e inmovilidad espermatozoides respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados. (b) Diagrama de cajas de motilidad progresiva. Diagramas con letras en común indican que existen diferencias significativas entre ellos; d=Verde[15mg/m3] vs Verde[6mg/m3]

2.4.5 Vitalidad

Al estimar la dependencia entre el parámetro de vitalidad y el peso de las unidades experimentales, la correlación de Pearson mostró que existe una relación inversa y significativa entre las dos variables ($r = -0.3561612$, $p = 0.03869$), es decir que a medida que el peso de los ratones aumenta, la vitalidad tiende a disminuir. Por otra parte, al evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de los tratamientos sobre la vitalidad, por medio del ANOVA paramétrico, se encontró que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de vitalidad obtenidos, bajo las tres concentraciones de las dos rutas evaluadas ($F_{6,27} = 1.003$, $p = 0.444$). Sin embargo, en el caso particular de la ruta química, el porcentaje de vitalidad tiende a disminuir a medida que la concentración de ZnO-NPs aumenta (Figura 35, ANEXO 1).

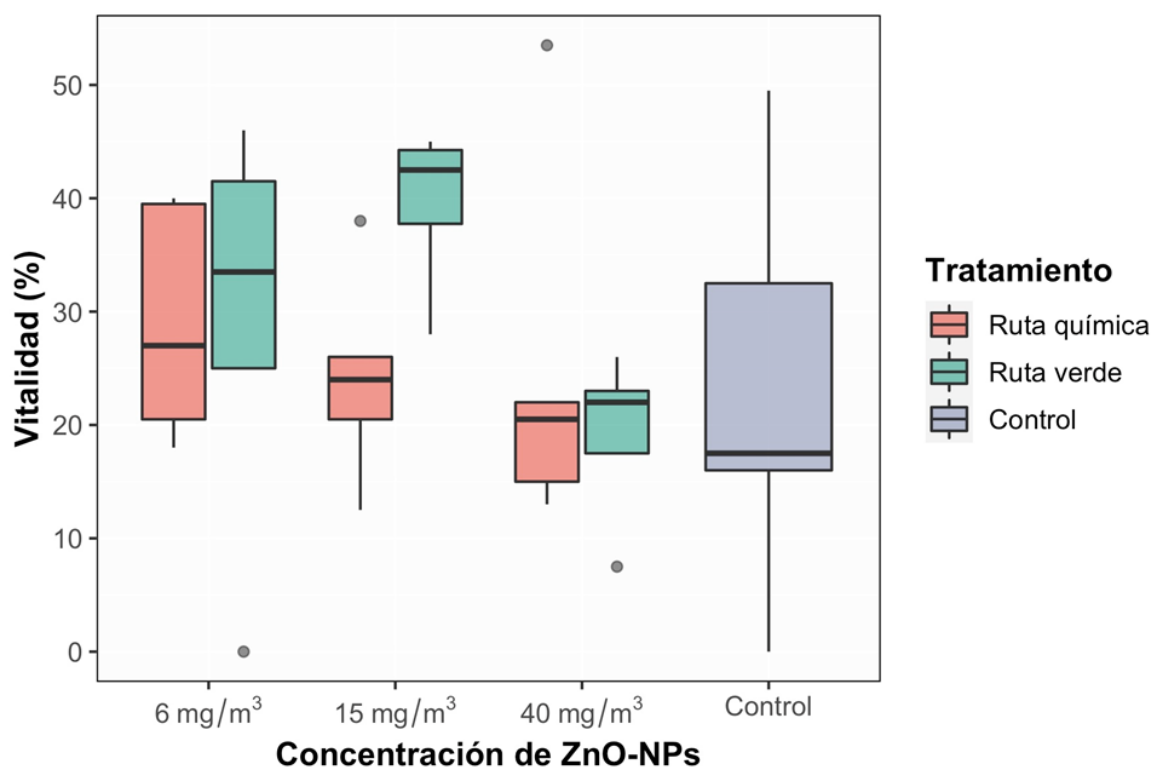


Figura 35. Diagrama de cajas que relaciona el porcentaje de vitalidad respecto a las diferentes concentraciones de los tratamientos aplicados.

Discusión

Se conocen informes respecto a los efectos inducidos por ZnO NPs independientemente de la ruta de exposición (oral, dérmica, intravenosa e inhalatoria), donde se ha observado que éstas tienen el potencial de pasar a través de importantes barreras fisiológicas e inducir toxicidad gracias a su pequeño tamaño (menor a 100 nm) y alta relación área superficial-masa (Hong et al., 2016; Ogunsuyi et al., 2018). Entre los efectos adversos provocados por ZnO NPs fabricadas, se ha detectado disminución del conteo espermático con espermatogénesis reducida, variaciones en enzimas testiculares y estrés oxidativo creciente en órganos reproductores masculinos (Meena et al., 2015; Hong et al., 2015; Moridian et al., 2015; Talebi et al., 2013).

Según Sikka y Hellstrom (2016), la concentración de espermatozoides maduros es el parámetro con más información sobre la disfunción testicular. Los datos obtenidos en nuestro trabajo muestran que la dosis de ZnO NPs obtenidas por síntesis química, [40 mg/m³], afecta de manera negativa, reduciendo el recuento total de espermatozoides, respecto a los tratamientos de química [6 mg/m³] y verde [40 mg/m³]. Estos resultados son consistentes con la observación de disminución de

concentración de espermatozoides dependiente de la dosis, que concluyeron en los estudios de Hussein et al., 2016, Talebi et al, 2013; Srivastav et al. 2017; Pinho et al. 2020, Iqbal et al 2021; donde la disminución de células espermáticas en la muestra disminuyó al aumentar la concentración de ZnO NPs administradas. Según estudios evaluando la acción sobre esperma de ZnO NPs, como Han et al, (2016), se ha evidenciado *in vitro e in vivo* que al inyectar ZnO NPs en ratones macho, se provocó alteraciones estructurales en el epitelio seminífero y anomalías espermáticas. Además, las ZnO NPs fueron internalizadas por las células de Leydig y las células de Sertoli, y esto resultó en citotoxicidad causado por el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto propiciaría una disminución significativa de células espermáticas a mayor dosis de ZnO NPs. Las ZnO NPs usadas en dicha investigación tenían un tamaño promedio de partícula menor a ~70 nm, similar al tamaño obtenido en nuestro trabajo (menor a ~100 nm); sin embargo, dado que los medios de ingreso al organismo fueron diferentes, además de las dosis y en general la metodología; el mecanismo de afectación a las células requiere mayor investigación para comprender su funcionamiento.

Por otro lado, Opeoluwa et al (2020), evaluó el efecto de inyectar intraperitonealmente, ZnO NPs usando dosis en un rango desde 9.38-75 mg/kg durante 5 semanas; encontrando fenómenos como disminución de la motilidad espermática, número reducido de espermatozoides y aumento de anomalías. Ellos indican que se desconoce el mecanismo exacto de la toxicidad testicular inducida por ZnO NPs. Sin embargo, proponen como vía indirecta, para iniciar la toxicidad testicular, el estrés oxidativo. Este indicador, acompañado de medición de hormonas relacionadas con la respuesta a la inflamación provocada dentro del tejido testicular, permitió a los investigadores proponer que las ZnO NPs tenían potencial para alterar los procesos a nivel de tejidos glandulares y de testículo, mas no directamente a la pared celular de los espermatozoides. Tal que, la exposición y posterior interacción de las ZnO NPs con los procesos de espermatogénesis; debe ser estudiada con atención, dado que se encuentran afectaciones, que, si bien no son letales, tienen un efecto de disminución, el cual, dado el funcionamiento de la espermatogénesis, puede no ser significativo al detener la exposición a las ZnO NPs y dando tiempo al organismo de eliminarlas a través de los órganos y procesos excretores.

En cuanto a los efectos producidos por los nano bio híbridos obtenidos por síntesis verde, utilizando extracto de *Allium sativum*, indican, como lo muestran los resultados de la figura 33 y 36, que se evidencia una función estimulante sobre las células espermáticas, ya que la dosis de [40 mg/m³]; aumenta la motilidad

progresiva de las células espermáticas respecto a la dosis [6mg/m³] de la misma ruta. Esta acción se podría justificar con la presencia del ajo en las muestras. Según Iqbal et al., 2021; al alimentar ratas albinas con pellets cubiertos de ZnO NPs obtenidas usando extracto de *Allium cepa*, la motilidad progresiva de los espermatozoides aumentó. En este estudio se relaciona la reducción de ROS provocada por la acción antiinflamatoria propiciada principalmente por los compuestos organosulfurados presentes tanto en cebolla (*Allium cepa*) como en ajo (*Allium sativum*) (Guillamon, 2008). Se reporta que el ajo tiene capacidad para aumentar los niveles de glutatión (GSH) (antioxidante), en las células y al mismo tiempo disminuir los niveles de la forma oxidada del glutatión (GSSG). Simultáneamente, activa la enzima superóxido dismutasa en las células. Asimismo, el efecto antioxidante de los compuestos del ajo reforzaría el mecanismo de captación de radicales endógenos. Se conoce, que conforme aumenta la concentración de ácidos grasos poliinsaturados (ácido docosahexaenoico) y bajan los niveles de expresión de antioxidantes, los espermatozoides son muy susceptibles a los ataques de ROS (Chen, Allam, Duan, & Haidl, 2013). Ramírez-Concepción et al (2016) reportaron sobre el efecto antioxidante que tiene el extracto de *Allium sativum*, ya que en estudios in vitro realizados con células amnióticas humanas, observaron la disminución de la producción de radicales libres. Se tiene evidencia del efecto antioxidante de *Allium sativum* sobre los hepatocitos de la peroxidación lipídica al proteger su membrana celular (González et al., 2014). Resultados similares obtuvo López (2007). Tal que, los nanobios híbridos podrían funcionar como un 'elemento de transporte', una vez se encuentren al interior del organismo, el Core de ZnO actuaría como vehículo, que dado su reducido tamaño permitiría la traslocación de las biomoléculas del ajo a los tejidos, interactuando con los procesos enzimáticos y apantallando los posibles efectos negativos sobre los parámetros de calidad espermática en general, que el ZnO nano particulado pudiera provocar.

Conclusiones

- Los tratamientos a los que los biomodelos fueron expuestos pusieron en evidencia los efectos propiciados por ZnO NPs, sintetizadas por ruta química, y los nano híbridos obtenidos por ruta verde, usando el ajo. Se observó una posible acción de estimulación provocada por los nanobios híbridos, debido a la presencia de los compuestos fenólicos del ajo en su superficie. Por otra parte, los resultados mostraron disminución de concentración de células espermáticas cuando se utilizaron ZnO NPs obtenidas por ruta química, en su dosis alta (40 mg/m³).
- Aunque para la dosis alta de síntesis química, se obtuvieron valores de concentración baja de espermatozoides, los daños producidos no se consideran trascendentales, debido a que los demás parámetros relacionados con la calidad espermática no se vieron afectados.
- El método de síntesis fue determinante para provocar diferencias en las características fisicoquímicas de las NPs obtenidas en este trabajo. Los efectos provocados sobre los parámetros evaluados fueron interesantes, pues mientras la dosis química de [40 mg/m³], disminuyó la cantidad de células espermáticas, la dosis verde [15 mg/m³] provocó una estimulación sobre la motilidad progresiva. Dado que respecto al grupo control no se encontraron diferencias significativas, se puede concluir que la calidad espermática del biomodelo *Mus musculus* NO fue afectada significativamente tras la exposición a inhalación de ZnO NPs obtenidas por ruta química y verde, en este trabajo.
- Dado que la evaluación de la calidad espermática implica una variedad de parámetros amplia, que van desde el espermiograma convencional hasta evaluación de ROS, PMM, ensayo de la cromatina espermática (SCSA), evaluación de la lipoperoxidación de la membrana espermática, ensayo cometa, etc., (Mayorga-Torres et al., 2013); el análisis realizado en este trabajo es descriptivo estadísticamente y se sugiere complementar con alguna de las técnicas arriba descritas y ultraestructura ciliar, para formular una teoría sobre el mecanismo de interacción adecuada a la variedad de información recopilada.
- Se sugiere evaluar la acción del extracto natural como un grupo de estudio adicional para mejorar la comprensión sobre el efecto de este, respecto al óxido metálico nano particulado.

Referencias

Barkhordari, A., Hekmatimoghaddam, S., Jebali, A., Khalili, M. A., Talebi, A., & Noorani, M. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. *Iranian journal of reproductive medicine*, 11(9), 767.

Beckett WS, Chalupa DF, Pauly-Brown A, Speers DM, Stewart JC, Frampton MW, Utell MJ, Huang LS, Cox C, Zareba W, Oberdörster G (2005) Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. *Am J Respir Crit Care Med* 171(10):1129–1135

Cho, W. S., Duffin, R., Howie, S. E., Scotton, C. J., Wallace, W. A., MacNee, W., ... & Donaldson, K. (2011). Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), 1-16.

Cho, W. S., Kang, B. C., Lee, J. K., Jeong, J., Che, J. H., & Seok, S. H. (2013). Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and fibre toxicology*, 10(1), 1-9.

Chuang, H. C., Juan, H. T., Chang, C. N., Yan, Y. H., Yuan, T. H., Wang, J. S., ... & Cheng, T. J. (2014). Cardiopulmonary toxicity of pulmonary exposure to occupationally relevant zinc oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(6), 593-604.

DE METALES, Y. C. (2009). ANEXO 10 GUÍA SOBRE TRANSFORMACIÓN/DISOLUCIÓN DE METALES Y COMPUESTOS METÁLICOS EN MEDIO ACUOSO.

Falchi L., W. A. Khalil, M. Hassan, W. F. A. Marei, Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function, *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 6 (2018) 265–269.

Guillamón, E. (2018). Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 59(3), 185-196.

González M, Guerra G, Maza J, Cruz A. Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo. *Rev Cub de Med Fis y Rehab*. 2014; 6(1): 61-71.

Han Z, Yan Q, Ge W, Liu ZG, Gurunathan S, De Felici M, Shen W, Zhang XF. Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *Int J Nanomedicine*. 2016 Oct 11;11:5187-5203. doi: 10.2147/IJN.S111447. PMID: 27785022; PMCID: PMC5066861.

Hong, F., Wang, Y., Zhou, Y., Zhang, Q., Ge, Y., Chen, M., ... Wang, L. (2016). Exposure to TiO₂ nanoparticles induces immunological dysfunction in mouse testis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 346–355. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05262>

Iftikhar M., A. Noureen , M. Uzair, F. Jabeen, M. A. Daim, T. Cappello, Perspectives of Nanoparticles in Male Infertility: Evidence for Induced Abnormalities in Sperm Production, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (2021) 1758

Khorsandi, L., Orazizadeh, M., Mansouri, E., Hemadi, M., & Moradi-Gharibvand, N. (2016). Morphometric and stereological assessment of the effects of titanium dioxide nanoparticles on the mouse testicular tissue. *Bratislavske Lekarske Listy*, 117, 659–664. https://doi.org/10.4149/bll_2016_127

Khorsandi, L., Orazizadeh, M., Moradi-Gharibvand, N., Hemadi, M., & Mansouri, E. (2017). Beneficial effects of quercetin on titanium dioxide nanoparticles induced spermatogenesis defects in mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 5595–5606. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8325-2>

McDonald, J.H. 2014. *Handbook of Biological Statistics*, 3rd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland.

Meena R, Kajal K, Paulraj R (2015) Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male Wistar rat. *Appl Biochem Biotechnol* 1752:825–840

Moridian M, Khorsandi L, Talebi AR (2015) Morphometric and stereological assessment of the effects of zinc oxide nanoparticles on the mouse testicular tissue. *Bratisl Lek Listy* 1165:321–325

B.J.M. Mayorga-Torres, W. Cardona-Maya, Á. Cadavid, M. Camargo, Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozooespermáticos, *Actas Urológicas Españolas*, Volume 37, Issue 4, 2013, Pages 221-227, ISSN 0210-4806, <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2012.06.008>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0210480612003294>)

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Wickham H., François R., Henry L. and K. Müller. 2021. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>

Wickham, H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

Callahan, Temperature dependence of Raman scattering in ZnO, Physical Review B 75 (2007) 165202; L. P. Etcheverry, W. Hernandez Floresb, D. Langie da Silvac, E. Ceretta Moreirab, Annealing Effects on the Structural and Optical Properties of ZnO Nanostructures, Materials Research. 21(2) (2018) e20170936; M. Scepanovic, M. Grujic-Brojcin, K. Vojisavljevic, S. Bernik, T. Sreckovic, Raman study of structural disorder in ZnO Nanopowders, J. Raman Spectrosc. 41 (2010) 914–921.

Liu Q., C. Xu, G. Ji, H. Liu, Y. Mo, D. J. Tollerud, A. Gu, Q. Zhang, Sublethal effects of zinc oxide nanoparticles on male reproductive cells, Toxicology in Vitro 35 (2016) 131–138

López MT. El ajo, propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. OFFARM. 2007; 26(1):79-81.

L. P. Etcheverry, W. Hernandez Floresb, D. Langie da Silvac, E. Ceretta Moreirab, Annealing Effects on the Structural and Optical Properties of ZnO Nanostructures, Materials Research. 21(2) (2018) e20170936

M. Scepanovic, M. Grujic-Brojcin, K. Vojisavljevic, S. Bernik, T. Sreckovic, Raman study of structural disorder in ZnO Nanopowders, J. Raman Spectrosc. 41 (2010) 914–921

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(12), 1825-1834.

Newman, M. D., Stotland, M., & Ellis, J. I. (2009). The safety of nanosized particles in titanium dioxide—and zinc oxide—based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(4), 685-692.

Ogunsuyi, O. M., Ogunsuyi, O. I., Akanni, O., Alabi, O. A., Alimba, C. G., Adaramoye, O. A., ... & Bakare, A. A. (2020). Alteration of sperm parameters and reproductive hormones in Swiss mice via oxidative stress after co-exposure to titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles. *Andrologia*, 52(10), e13758.

Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P., & Wingett, D. G. (2010). Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert opinion on drug delivery*, 7(9), 1063-1077.



Talebi AR, Khorsandi L, Moridian M (2013) The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *J Assist Reprod Gen* 309:1203–1209

Wang Enyin, Yan Huang, Qingyun Du, Yingpu Sun, Silver nanoparticle induced toxicity to human sperm by increasing ROS (reactive oxygen species) production and DNA damage, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 52 (2017) 193-199

Xiong, H. M. (2013). ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. *Advanced Materials*, 25(37), 5329-5335.

Zakem, H. B., & CW, A. (1974). The effects of noise level and elevated ambient temperatures upon selected reproductive traits in female Swiss-Webster mice.

Zhang, Z. Y., & Xiong, H. M. (2015). Photoluminescent ZnO nanoparticles and their biological applications. *Materials*, 8(6), 3101-3127.

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO A PROTOCOLO 1</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR EL PARÁMETRO DE MOTILIDAD</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

1. OBJETIVO

Establecer las categorías de movimiento de los espermatozoides empleando la Técnica de Contraste de Fases.

2. PROCEDIMIENTO

CONCEPTOS BÁSICOS

El parámetro de la motilidad de los espermatozoides dentro del semen debe evaluarse lo antes posible después de la aspersión de la muestra, preferiblemente a los 30 minutos, pero en cualquier caso dentro de la hora siguiente a la eyaculación, para limitar los efectos nocivos de la deshidratación, el pH o los cambios de temperatura sobre la motilidad (Cao et al., 2011).

Categorías de movimiento de los espermatozoides

Se recomienda un sistema simple para clasificar la motilidad que distinga a los espermatozoides con motilidad progresiva o no progresiva de los que están inmóviles. La motilidad de cada espermatozoide se clasifica de la siguiente manera:

Motilidad progresiva (PR): espermatozoides que se mueven de forma activa, ya sea de forma lineal o en un círculo grande, independientemente de la velocidad.



Motilidad no progresiva (NP): todos los demás patrones de motilidad con ausencia de progresión, nadando en pequeños círculos, la fuerza flagelar apenas desplaza la cabeza, o cuando solo se puede observar un latido flagelar.

Inmotilidad (como primario): sin movimiento.

2.1 PROCEDIMIENTO

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | <i>María Mercedes Ramírez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba</i> | APROBÓ: | Jorge E. Rodríguez Páez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigadora Principal |

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA
El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

| | | |
|---|---|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO A PROTOCOLO 1</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR EL PARÁMETRO DE MOTILIDAD</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

2.1.1 Preparación y evaluación de la motilidad de una muestra

- Teniendo en cuenta que la motilidad se va evaluar a 37 ° C, encienda el baño María 10 minutos antes para permitir que la temperatura se estabilice.
- Enseguida, incube la muestra a 37 ° C empleando una gradilla individual de icopor. La preparación debe realizarse con portaobjetos y cubreobjetos precalentados
- Antes de extraer una alícuota de semen para su evaluación, mezcle bien la muestra en el recipiente original, pero no tan vigorosamente para evitar que se formen burbujas de aire.
- Retire una alícuota de semen inmediatamente después de la mezcla, sin dejar tiempo para que los espermatozoides sedimenten de la suspensión.
- Vuelva a mezclar la muestra de semen antes de retirar una alícuota repetida.
- Coloque un volumen estándar de semen, 10 µm sobre un portaobjetos de vidrio limpio precalentado.
- Cúbralo con un cubreobjetos de 22 mm × 22 mm precalentado
- Asegúrese de evitar la formación de burbujas de aire entre el cubreobjetos y el portaobjetos.
- Evalúe la preparación húmeda recién hecha tan pronto como el contenido ya no se desplace.
- Espere a que la muestra deje de derivar (en 60 segundos).
- Examine el portaobjetos con óptica de contraste de fase con un aumento de 200X o 400X.
- Busque espermatozoides en un área por lo menos a 5 mm del borde del cubreobjetos (ver Figura 1), para evitar la observación de los efectos del secado sobre la motilidad.
- Evalúe aproximadamente 200 espermatozoides por réplica para el porcentaje de diferentes categorías.
- Compare los valores replicados para verificar si están aceptablemente cerca. Si es así, continúe con los cálculos; si no es así, prepare nuevas muestras.



Nota 1: Se recomienda el uso de una retícula de ocular con rejilla (ver Figura 1a) para limitar el área visualizada; esto permite evaluar la misma área de la diapositiva durante ambas etapas de puntuación. Primero evalúe la motilidad progresiva, luego la motilidad no

ELABORÓ: *María Mercedes Ramírez de Valdenebro* APROBÓ: *Jorge E. Rodríguez Páez*
Paola Andrea Arciniegas Grijalba

CARGO: *Co-investigadoras* CARGO: *Investigadora Principal*

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO A PROTOCOLO 1</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR EL PARÁMETRO DE MOTILIDAD</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

progresiva y la inmotilidad. Limitar el área, y por lo tanto el número de espermatozoides evaluados, asegura que se examinen varias áreas de la preparación para determinar su movilidad.

2.1.2 Recomendaciones



- Cambie de campo con frecuencia. Evite elegir campos sobre la base de la cantidad de espermatozoides móviles observados (la elección del campo debe ser aleatoria).
- Empiece a puntuar un campo determinado en un instante aleatorio. No espere a que los espermatozoides nadan hacia el campo o la cuadrícula para comenzar a puntuar.
- Cuente el número de espermatozoides en cada categoría de motilidad con la ayuda de un contador de laboratorio.
- Evalúe la motilidad de todos los espermatozoides dentro de un área definida del campo. Esto se logra más fácilmente usando un retículo de ocular (ver Fig. 2.4a). Seleccione la parte del campo o cuadrícula que se puntuará a partir de la concentración de esperma, es decir, puntúe solo la fila superior de la cuadrícula si la concentración de esperma es alta; puntúe toda la cuadrícula si la concentración de esperma es baja.
- Escanee y cuente rápidamente para evitar sobrestimar el número de espermatozoides móviles. El objetivo es contar todos los espermatozoides móviles en la sección de la cuadrícula al instante; evite contar tanto a los presentes inicialmente como a los que nadan en la sección de la cuadrícula durante la puntuación, lo que sesgaría el resultado a favor de los espermatozoides móviles.
- Inicialmente, escanee la sección de la cuadrícula que se puntúa para las celdas PR (consulte la Sección 2.5.1). A continuación, cuente los espermatozoides NP y finalmente los espermatozoides IM en la misma sección de la cuadrícula. Con la experiencia, puede ser posible puntuar las tres categorías de movimiento de los espermatozoides a la vez y puntuar áreas más grandes de la cuadrícula.

ELABORÓ: *María Mercedes Ramírez de Valdenebro* APROBÓ: *Jorge E. Rodríguez Páez*
Paola Andrea Arciniegas Grijalba

CARGO: *Co-investigadoras* CARGO: *Investigadora Principal*

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO A PROTOCOLO 1</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR EL PARÁMETRO DE MOTILIDAD</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

- Cuente el número de espermatozoides en cada categoría de motilidad con la ayuda de un contador de laboratorio.
- Evalúe al menos 200 espermatozoides en un total de al menos cinco campos en cada réplica, a fin de lograr un error de muestreo aceptablemente bajo (ver Cuadro 2.5).
- Calcule el porcentaje promedio y la diferencia entre los dos porcentajes para el grado de motilidad más frecuente (PR, NP o IM) en las preparaciones húmedas replicadas.
- Determine la aceptabilidad de la diferencia de la Tabla 2.1 o la Fig. A7.2, Apéndice 7. (Cada uno muestra la diferencia máxima entre dos porcentajes que se espera que ocurra en el 95% de las muestras debido únicamente al error de muestreo).
- Si la diferencia entre los porcentajes es aceptable, informe el porcentaje promedio para cada grado de motilidad (PR, NP e IM). Si la diferencia es demasiado alta, tome dos nuevas alícuotas de la muestra de semen, haga dos nuevas preparaciones y repita la evaluación (ver Cuadro 2.6).
- Informe el porcentaje promedio para cada grado de motilidad al número entero más cercano.

Nota 1: Evalúe solo los espermatozoides intactos (definidos como cabeza y cola; consulte la Sección 2.7.3), ya que solo se cuentan los espermatozoides intactos para la concentración de espermatozoides. No cuente las cabezas de alfiler móviles.



Nota 2: Si los espermatozoides se califican en dos etapas (es decir, PR primero, seguido de NP e IM de la misma área) y se logra un recuento de 200 espermatozoides antes de que se hayan calificado todas las categorías de motilidad de esa área, el recuento debe continuar más allá 200 espermatozoides hasta que se hayan contado todas las categorías, con el fin de evitar sesgos hacia la categoría de motilidad puntuada en primer lugar.

ELABORÓ: *María Mercedes Ramírez de Valdenebro
Paola Andrea Arciniegas Grijalba* APROBÓ: Jorge E. Rodríguez Páez

CARGO: Co-investigadoras CARGO: Investigadora Principal

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA

*El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del
Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes*

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO A PROTOCOLO 1</p> <p>PROTOCOLO PARA EVALUAR EL PARÁMETRO DE MOTILIDAD</p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

Nota 3: Es común sobrestimar la motilidad de los espermatozoides, pero esto a menudo se puede evitar invirtiendo el orden de análisis (NP e IM primero), usando una retícula del ocular y siendo consciente y evitando, en la medida de lo posible, las posibles fuentes de sesgo (consulte la Sección 7.13.3).

Nota 4: En raras ocasiones, con muestras no homogéneas, incluso un tercer conjunto de réplicas puede proporcionar diferencias inaceptables. En este caso, calcule la media de todas las réplicas y anótelos en el informe.

Tabla 2.1 Diferencias aceptables entre dos porcentajes para un promedio dado, determinadas a partir de conteos repetidos de 200 espermatozoides (total 400 contados).

| Average (%) | Acceptable Difference* | Average (%) | Acceptable Difference* |
|-------------|------------------------|-------------|------------------------|
| 0 | 1 | 66-76 | 9 |
| 1 | 2 | 77-83 | 8 |
| 2 | 3 | 84-88 | 7 |
| 3-4 | 4 | 89-92 | 6 |
| 5-7 | 5 | 93-95 | 5 |
| 8-11 | 6 | 96-97 | 4 |
| 12-16 | 7 | 98 | 3 |
| 17-23 | 8 | 99 | 2 |
| 24-34 | 9 | 100 | 1 |
| 35-65 | 10 | | |

Basado en el intervalo de confianza redondeado del 95%.



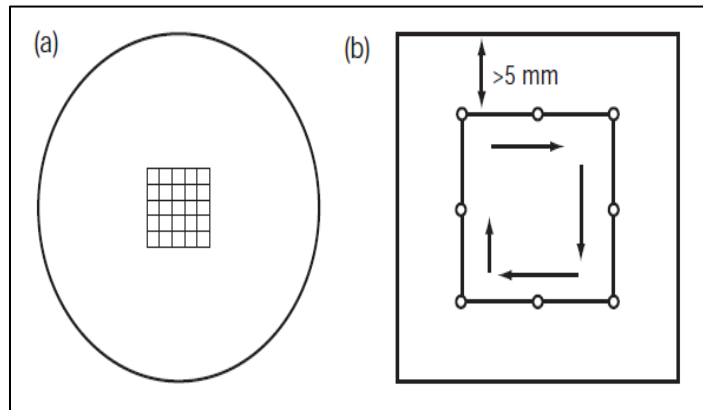
| | | |
|---|---|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO A PROTOCOLO 1</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR EL PARÁMETRO DE MOTILIDAD</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

Figura 1. Ayudas para evaluar la motilidad de los espermatozoides

(a) La retícula de un ocular facilita el recuento de espermatozoides móviles e inmóviles. (b) Selección sistemática de campos para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides, al menos a 5 mm de los bordes del cubreobjetos.






ELABORÓ: *María Mercedes Ramírez de Valdenebro* APROBÓ: *Jorge E. Rodríguez Páez*
Paola Andrea Arciniegas Grijalba

CARGO: *Co-investigadoras* CARGO: *Investigadora Principal*

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

| | | | |
|--|---|---|---|
|  Universidad del Cauca | ANEXO B PROTOCOLO 2 EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE VITALIDAD CON TINCIÓN DE EOSINA - NaCl |  |  Unidad de Microscopía Electrónica Universidad del Cauca |
| <i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i> | | | |
| Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes- Unidad de Microscopía Electrónica | | | |

1. OBJETIVO

Preparar el colorante de Eosina – NaCl para la tinción de las muestras de semen y evaluar el parámetro de vitalidad.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO.

La tinción con Eosina-NaCl es un método de tinción que favorece la determinación morfológica de cabeza y cuello (pieza intermedia) del espermatozoide, además de valorar su forma, permitiendo la categorización de los espermatozoides (1). Este método es simple y rápido. Algunas soluciones de eosina disponibles comercialmente son soluciones acuosas hipotónicas que estresarán los espermatozoides y darán resultados falsos positivos (2). Si usa una solución de este tipo, agregue 0,9 g de NaCl a 100 ml de solución para aumentar la osmolalidad.

3. MATERIALES, REACTIVOS, EQUIPOS Y ELEMENTOS DE PROTECCIÓN.

3.1 Materiales.

- Papel aluminio
- 1 Espátula metálica
- 1 Magneto
- 1 Probeta de 100 mL
- 1 Beaker de 250 mL
- 1 Frasco lavador con agua destilada
- Papel servilleta
- 1 Frasco de vidrio ámbar de 120 mL

3.2 Reactivos




- Cloruro de sodio NaCl
- Eosina

3.3 Equipos

- Balanza analítica

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | <i>María Mercedes Ramírez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba</i> | APROBÓ: | Jorge Enrique Rodríguez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigador Principal |

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA
 El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

| | | | |
|--|---|---|---|
|  Universidad del Cauca | ANEXO B PROTOCOLO 2 EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE VITALIDAD CON TINCIÓN DE EOSINA - NaCl |  |  Unidad de Microscopía Electrónica Universidad del Cauca |
| <i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i> | | | |
| Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes- Unidad de Microscopía Electrónica | | | |

- Plancha de Calentamiento
- Baño María electrónico

3.4 Elementos de protección

- Guantes de látex
- Bata de laboratorio
- Gorro
- Gafas de seguridad

4. PROCEDIMIENTO

4.1 Organización del material de trabajo




1. Hacer 2 canoas pequeñas con aluminio nuevo, limpio y seco para pesar los reactivos.
2. Forrar la espátula previamente con aluminio para pesar los reactivos (Cambiar el aluminio para cada reactivo).
3. Medir en una probeta limpia 100 mL de agua destilada, enseguida, cubrir con aluminio para evitar contaminación.
4. Colocar el beacker sobre la plancha de calentamiento

4.2 Preparación del colorante Eosina - NaCl

1. NaCl 0,9% (p / v): Pesar 0,9 g de NaCl en aluminio con forma de canoa y disolverlos en 100 ml de agua destilada estéril con calentamiento suave.
2. Eosina 0,5% (p / v): Pesar 0,5 g de eosina en aluminio con forma de canoa y disolverlos en 100 ml de NaCl al 0,9%.
3. Agregar las cantidades pesadas a un beaker limpio y seco.
4. Colocar un magneto en el beaker y recubrir con papel aluminio.
5. Calentar la suspensión con la menor temperatura para evitar el sobrecalentamiento y agitar con magneto hasta que hierba. Luego, dejar enfriar a temperatura ambiente.

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | Maria Mercedes Ramirez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba | APROBÓ: | Jorge Enrique Rodríguez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigador Principal |

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA
 El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

| | | | |
|--|---|---|---|
|  Universidad del Cauca | ANEXO B PROTOCOLO 2 EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE VITALIDAD CON TINCIÓN DE EOSINA - NaCl |  |  Unidad de Microscopía Electrónica Universidad del Cauca |
| <i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i> | | | |
| Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes- Unidad de Microscopía Electrónica | | | |




6. Filtrar a través de papel de filtro para eliminar los precipitados gruesos y gelatinosos.
7. Finalmente, depositar y almacenar la solución preparada (Colorante) en un 1 Frasco de vidrio ámbar de 120 mL.

6. EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE VITALIDAD

1. Después de extraer la muestra de semen, mezclar bien la muestra de semen
2. Tomar una alícuota de 5 μ L de semen y combinar con 5 μ L del colorante de eosina en un portaobjetos. Mezcle con una punta de pipeta, haciendo girar la muestra en el portaobjetos.
3. Cubrir con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm y dejar actuar durante 30 segundos.
4. Examine el portaobjetos, preferiblemente con ópticas de contraste de fases con aumentos de 200 x ó 400 x.
5. Cuente el número de células teñidas (muertas) y no teñidas (vitales) con la ayuda de un contador de laboratorio.
6. Evalúe 100 espermatozoides en cada réplica, a fin de lograr un error de muestreo aceptablemente bajo.
7. Calcule el promedio y la diferencia de los dos porcentajes de células vitales de las preparaciones replicadas.

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | <i>María Mercedes Ramírez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba</i> | APROBÓ: | Jorge Enrique Rodríguez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigador Principal |

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA
 El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes



| | | | |
|--|---|---|---|
|  Universidad del Cauca | ANEXO B PROTOCOLO 2 EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE VITALIDAD CON TINCIÓN DE EOSINA - NaCl |  |  Unidad de Microscopía Electrónica Universidad del Cauca |
| IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS | | | |
| Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes- Unidad de Microscopía Electrónica | | | |

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez Lleó C. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class analyzer. Vol. 53, Occupational Medicine. 2003. 246-248 p.
2. Björndahl L et al. (2004). Why the WHO recommendations for eosin–nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. Journal of Andrology, 25:671-678.

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | <i>Maria Mercedes Ramírez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba</i> | APROBÓ: | Jorge Enrique Rodríguez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigador Principal |

Cualquier impresión o copia tomada de este documento se considera COMO COPIA NO CONTROLADA
 El contenido de este documento es de propiedad de las autoras del mismo y de uso exclusivo del Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad del Cauca | ANEXO C PROTOCOLO 3 PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS |  |
| IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS | | |
| Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes | | |

1. OBJETIVO

Determinar las alteraciones morfológicas presentes en células columnares del epitelio respiratorio nasal en buen estado de conservación empleando Técnicas de Contraste de Fases.

2. PROCEDIMIENTO

CONCEPTOS BÁSICOS

Concentración de espermatozoides: Número de espermatozoides por unidad de volumen de semen (nl o ml) es en función del número de espermatozoides emitidos y del volumen de líquido que los diluye.

Número total de espermatozoides: Se refiere al número total de espermatozoides en todo el eyaculado y se obtiene multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen de semen.

2.1 PROCEDIMIENTO

2.1.1 Preparación de fijador para dilución

- Disolver 50 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 10 ml de formalina al 35% (v / v) en 1000 ml de agua purificada.
- Si lo desea, agregue 0,25 g de azul tripán (índice de color 23859) o 5 ml de violeta de genciana saturado (> 4 mg / ml) (índice de color 42555) para resaltar las cabezas de los espermatozoides.
- Conservar a 4 ° C. Si se forman cristales en la solución, páselo por un filtro de 0,45 um antes de usar.

2.1.2 Determinación de la disolución.

La dilución de semen requerida para determinar la concentración y número de espermatozoides, se evalúa a partir de una preparación de semen sin diluir, por lo general a partir de la placa de motilidad (que se evalúa previamente)

- Examinar la placa húmeda utilizada para la evaluación de la motilidad (consulte Anexo A). por HPF ($\times 200$ o $\times 400$)., (Un HPF equivale aproximadamente a 16 nl (a $\times 200$) o 4 nl (a $\times 400$))
- Si se observan espermatozoides, cuéntenlos y determine la dilución necesaria según la siguiente tabla, luego continúa con la sección 3.1.3

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | Maria Mercedes Ramirez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba | APROBÓ: | Jorge E. Rodríguez Páez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigadora Principal |

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras y de uso exclusivo del Grupo GIMAI



ANEXO C PROTOCOLO 3



PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS

*IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO
DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE
SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS*

Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

Tabla 1

| Spermatozoa per ×400 field | Spermatozoa per ×200 field | Dilution required | Semen (μl) | Fixative (μl) | Chamber | Area to be assessed |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------|---------------|---|-----------------------------------|
| >101 | >404 | 1:20 (1 + 19) | 50 | 950 | Improved Neubauer | Grids 5, 4, 6 |
| 16–100 | 64–400 | 1:5 (1 + 4) | 50 | 200 | Improved Neubauer | Grids 5, 4, 6 |
| 2–15 | 8–60 | 1:2 (1 + 1) | 50 | 50 | Improved Neubauer | Grids 5, 4, 6 |
| <2 | <8 | 1:2 (1 + 1) | 50 | 50 | Improved Neubauer or large-volume | All 9 grids or Entire slide |

Nota 2: Para fines de diagnóstico, las muestras de semen para análisis deben tener un volumen mínimo de 50 ul, para evitar errores de pipeteo asociados con volúmenes pequeños.

Nota 3: Si hay muy pocos espermatozoides por campo de visión a la dilución recomendada, prepare otra dilución menor. Si hay demasiados espermatozoides superpuestos por campo de visión a la dilución recomendada, prepare otra dilución mayor.

2.1.3 Preparación de la cámara de Neubauer

- Mezclar bien el semen y preparar diluciones escogidas según la anterior tabla con el fijador en un vial de 1,5 mL
- Humedezca ligeramente la superficie de la cámara respirando sobre ella.
- Asegure el cubreobjetos en la cámara presionándolo firmemente sobre los pilares de la cámara. La iridiscencia (múltiples anillos de Newton) entre las dos superficies de vidrio confirma la posición correcta del cubreobjetos. Cuantas más líneas haya, mejor será el ajuste; solo una o dos líneas pueden indicar problemas con la variación en la profundidad de la cámara.
- Aspire el volumen apropiado de semen inmediatamente después de la mezcla, sin dejar tiempo para que los espermatozoides sedimenten de la suspensión.
- Dispense el semen en el fijador y pipetee suavemente.
- Mezcle bien la muestra de semen nuevamente y prepare la dilución replicada siguiendo los pasos anteriores.
- Mezcle bien la primera dilución agitando con vórtex durante 10 segundos a la velocidad máxima y extraer inmediatamente aproximadamente 10 ul de suspensión fija, para evitar la sedimentación.
- Toque la punta de la pipeta con cuidado contra el borde inferior de la cámara en la ranura en forma de V.
- Presione el émbolo de la pipeta lentamente, permitiendo que la cámara se llene por acción capilar. El cubreobjetos no debe moverse durante el llenado, y la cámara no debe estar demasiado llena.
- Mezcle la segunda dilución, como se indicó anteriormente, y extraiga inmediatamente una segunda alícuota de 10 l. Cargue la segunda cámara siguiendo los pasos anteriores.

| | |
|---|--|
| ELABORÓ: <i>María Mercedes Ramírez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba</i> | APROBÓ: <i>Jorge E. Rodríguez Páez</i> |
| CARGO: <i>Co-Investigadoras</i> | CARGO: <i>Investigadora Principal</i> |

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras y de uso exclusivo del Grupo GIMAI



Universidad
del Cauca

ANEXO C PROTOCOLO 3



PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS

*IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO
DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE
SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS*

Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

- Guarde la cámara en posición horizontal durante al menos 4 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda (por ejemplo, en papel de filtro saturado de agua en una placa de Petri cubierta) para evitar que se seque. Las células inmovilizadas se sedimentarán en la rejilla durante este tiempo.
- Evaluar las muestras en un plazo de 10 a 15 minutos (después de lo cual la evaporación tiene efectos notables sobre la posición del esperma dentro de la cámara).

2.1.4 conteo en la cámara de Neubauer

| Todas las regillas | Regilla 5 | Regilla 5 |
|--|--|--|
| En cada cuadrícula caben 100 nl | En cada cuadrícula grande caben 4 nl En cada fila caben 20 nl | En cada cuadrícula caben 0,25 nl En cada fila caben 4nl |
| | | |
| En cada cuadrícula hay 6,25 nl En cada fila hay 25 nl | En cada cuadrícula hay 5 nl En cada fila hay 20 nl | En cada cuadrícula hay 5 nl En cada fila hay 25 nl |
| | | |

- Cuente solo los espermatozoides enteros (con cabezas y colas).
- El conteo o no de un espermatozoide depende de la ubicación de su cabeza; la orientación de su cola no es importante.
- El límite de un cuadrado está indicado por la línea media de los tres. La mitad de las tres líneas define el límite del cuadrado (línea media).
- Se cuentan todos los espermatozoides dentro del cuadrado central, así como los que tienen la cabeza entre las dos líneas internas, pero no aquellos cuyas cabezas se encuentran entre las dos líneas externas.
- Un espermatozoide con la mayor parte de su cabeza descansando sobre la línea central se cuenta solo si esa línea es la línea inferior o izquierda del cuadrado, pero no si es la línea superior o derecha del cuadrado, esto para evitar contar dos veces un espermatozoide.

Si hay 10 espermatozoides en un campo de 400x de la placa de motilidad, habría 2,5 por nl y 250 por cuadrícula central. Diluir la muestra 1 + 1 (1: 2) como se sugiere reduciría el número de espermatozoides a aproximadamente 125 por cuadrícula; esto daría 375 en las tres 4, 5 y 6; esto es suficiente para un error de muestreo aceptablemente bajo.

ELABORÓ: *María Mercedes Ramírez de Valdenebro*
Paola Andrea Arciniegas Grijalba APROBÓ: *Jorge E. Rodríguez Páez*
CARGO: *Co-investigadoras* CARGO: *Investigadora Principal*

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras y de uso exclusivo del Grupo GIMAI



Universidad
del Cauca

ANEXO C PROTOCOLO 3



PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS

IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO
DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE
SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS

Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes

Si hay 100 espermatozoides por campo de 400x de la placa de motilidad de 4 nl teóricamente hay 25 por nl (25 000 uL o 25 000 000 por ml). Como la rejilla central (número 5) de la cámara Neubauer contiene 100 nl, habría 2500 espermatozoides dentro de ella. Diluir la muestra 1 + 4 (1: 5) reduciría el número de espermatozoides a aproximadamente 500 por cuadrícula, lo cual es suficiente para un error de muestreo aceptablemente bajo.

2.1.5 Evaluación de la concentración de espermatozoides

- Examine la cámara con óptica de contraste de fase con un aumento de $\times 200$ o $\times 400$.
- Primero evalúe la rejilla central (número 5) de un lado de la cámara Neubauer mejorada, fila por fila.
- Continúe contando hasta que se hayan observado al menos 200 espermatozoides y se haya examinado una fila completa (**de cinco cuadrados grandes**). El recuento debe realizarse en filas completas; no te detengas en medio de una fila. Si no se observan 200 espermatozoides en las cinco filas de la cuadrícula central, continúe contando en las filas de 4 cuadrados grandes cuadrículas 4 y 6
- Tome nota del número de filas evaluadas para alcanzar al menos 200 espermatozoides. Se contará el mismo número de filas desde la otra cámara.
- Contar el número de espermatozoides y filas con la ayuda de un contador de laboratorio.
- Cambie a la segunda cámara del y realice el recuento en el mismo número de filas (el mismo volumen) que la primera réplica, incluso si esto produce menos de 200 espermatozoides.
- Calcule la suma y la diferencia de los dos números.
- Determine la aceptabilidad de la diferencia de la **Tabla 2**. (Cada uno muestra la diferencia máxima entre los conteos que se espera que ocurra en el 95% de las muestras debido únicamente al error de muestreo).
- Siempre cuenta al menos 200 espermatozoides en cada réplica para lograr un error de muestreo aceptablemente bajo (**Tabla 3**).



| Tabla 2. Diferencias aceptables entre la suma de las dos réplicas | | | | Tabla 3. Error de muestro según el número de espermatozoides | | | | | |
|---|------------------------|---------|------------------------|--|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| Sum | Acceptable Difference* | Sum | Acceptable Difference* | Total (N) | Sampling error (%) | Total (N) | Sampling error (%) | Total (N) | Sampling error (%) |
| 144-156 | 24 | 329-346 | 36 | 1 | 100 | 25 | 20 | 85 | 10.8 |
| 157-169 | 25 | 347-366 | 37 | 2 | 70.7 | 30 | 18.3 | 90 | 10.5 |
| 170-182 | 26 | 367-385 | 38 | 3 | 57.7 | 35 | 16.9 | 95 | 10.3 |
| 183-196 | 27 | 386-406 | 39 | 4 | 50 | 40 | 15.8 | 100 | 10 |
| 197-211 | 28 | 407-426 | 40 | 5 | 44.7 | 45 | 14.9 | 150 | 8.2 |
| 212-226 | 29 | 427-448 | 41 | 6 | 40.8 | 50 | 14.1 | 200 | 7.1 |
| 227-242 | 30 | 449-470 | 42 | 7 | 37.8 | 55 | 13.5 | 250 | 6.3 |
| 243-258 | 31 | 471-492 | 43 | 8 | 35.4 | 60 | 12.9 | 300 | 5.8 |
| 259-274 | 32 | 493-515 | 44 | 9 | 33.3 | 65 | 12.4 | 350 | 5.3 |
| 275-292 | 33 | 516-538 | 45 | 10 | 31.6 | 70 | 12 | 400 | 5 |
| 293-309 | 34 | 539-562 | 46 | 15 | 25.8 | 75 | 11.5 | 450 | 4.7 |
| 310-328 | 35 | 563-587 | 47 | 20 | 22.4 | 80 | 11.2 | 500 | 4.5 |

2.1.6 Cálculo de la concentración de espermatozoides en el semen

La fórmula para hallar la concentración es

ELABORÓ: *María Mercedes Ramírez de Valdenebro*
Paola Andrea Arciniegas Grijalba APROBÓ: *Jorge E. Rodríguez Páez*
CARGO: *Co-investigadoras* CARGO: *Investigadora Principal*

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras y de uso exclusivo del Grupo GIMAI

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO C PROTOCOLO 3</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

C = (N / n) × (1/20) × factor de dilución.

N= Cantidad de espermatozoides contados en las dos réplicas

n= Cantidad de filas en las que se contaron

Para diluciones 1 + 4 (1: 5), utilizando las cuadrículas 4, 5 y 6 :

$C = (N / n) \times (1/20) \times 5$ espermatozoides por nl

Para diluciones 1 + 19 (1:20), utilizando las cuadrículas 4, 5 y 6, la concentración

$C = (N / n) \times (1/20) \times 20$ espermatozoides por nl

Para diluciones 1:50 (1 + 49), utilizando las cuadrículas 4, 5 y 6, la concentración

$C = (N / n) \times (1/20) \times 50$ espermatozoides por nl

Ejemplo 1. Con una dilución 1 + 19 (1:20), se encuentra que la réplica 1 contiene 201 espermatozoides en siete filas, mientras que la réplica 2 contiene 245 espermatozoides en siete filas. La suma de los valores (201 + 245) es 446 en 14 filas y la diferencia (245-201) es 44. De la Tabla 2.4 se ve que esto excede la diferencia esperada (41), por lo que se hacen nuevas diluciones.

Ejemplo 2. Con una dilución 1 + 19 (1:20), se encuentra que la réplica 1 contiene 220 espermatozoides en cuatro filas, mientras que la réplica 2 contiene 218 espermatozoides en cuatro filas. La suma de los valores (220 + 218) es 438 en ocho filas y la diferencia (220-218) es 2. De la tabla 2.4 se ve que esto es menor que la diferencia esperada (41), por lo que los valores son aceptados.

$C = (N / n) \times (1/20) \times 20$ espermatozoides por nl,

$C = (438/8) \times 1 = 54.75$ espermatozoides / nl, o 55×10^6 espermatozoides por ml

Ejemplo 3. Con una dilución 1 + 19 (1:20), se encuentra que la réplica 1 contiene 98 espermatozoides en 15 filas (cuadrículas 5, 4 y 6), mientras que la réplica 2 contiene 114 espermatozoides en 15 filas (cuadrículas 5, 4 y 6). La suma de los valores (98 + 114) es 212 en 30 filas y la diferencia (114-98) es 16. De la tabla 2.4 se ve que es menor que la que se encuentra por casualidad (29), por lo que los valores son aceptados.

$C = (N / n) \times (1/20) \times 20$ espermatozoides por nl,

$C = (212/30) \times 1.0 = 7.07$ espermatozoides / nl, o 7.1×10^6 espermatozoides por ml de semen espermatozoides por nl. Como se contaron menos de 400 espermatozoides, informe el error de muestreo para 212 espermatozoides que se muestra en la Tabla 2.2 (aproximadamente el 7%).

Nota: En este ejemplo, la muestra se ha diluido en exceso, ya que se encontraron menos de 200 espermatozoides en las cuadrículas 5, 4 y 6; una dilución 1 + 4 (1: 5) hubiera sido más apropiada.

Ejemplo 4. Con una dilución 1 + 4 (1: 5), se encuentra que la réplica 1 contiene 224 espermatozoides en ocho filas, mientras que la réplica 2 contiene 213 espermatozoides en ocho filas. La suma de los valores (224 + 213) es 437 en 16 filas y la diferencia (224-213) es 11. por lo que los valores son aceptados.

$C = (N / n) \times (1/20) \times 5$ espermatozoides por nl,



$C = (437/16) \times 0,25 = 6.825$ espermatozoides / nl, o 6.8×10^6 espermatozoides por ml de semen

Informe la concentración promedio de espermatozoides con dos cifras significativas.

Nota 1: Si se encuentran menos de 200 espermatozoides en las cuadrículas 4, 5 y 6, no continúe contando en las cuadrículas 1, 2, 3, 7, 8 o 9, ya que el volumen de cada fila en estas cuadrículas es diferente al de las filas

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | Maria Mercedes Ramirez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba | APROBÓ: | Jorge E. Rodríguez Páez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigadora Principal |

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras y de uso exclusivo del Grupo GIMAI

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad del Cauca | ANEXO C PROTOCOLO 3 PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS |  |
| IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS | | |
| Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes | | |

de las cuadrículas 4, 5 y 6 (consulte la Sección 2.7.2). En este caso, prepare y evalúe dos diluciones menores. Si es necesaria una dilución 1 + 1 (1 : 2), proceda como en la Sección 2.11.

Nota 2: Evaluar la misma cámara dos veces o evaluar ambas cámaras llenas de una sola dilución no es una réplica verdadera, ya que esto no permitirá la detección de errores de muestreo, mezcla y dilución.

3. CUIDADO DE LA CÁMARA DE RECuento.

Las cámaras de recuento del hemocitómetro deben utilizarse con los cubreobjetos especiales gruesos (grosor número 4, 0,44 mm).

Limpiar la cámara del hemocitómetro y el cubreobjetos con agua y secar bien con un pañuelo después de su uso, ya que cualquier residuo seco puede inhibir la carga. Frotar la superficie de la rejilla eliminará cualquier espermatozoide residual de la muestra anterior.

Remoje las cámaras de recuento y los cubreobjetos en hipoclorito de sodio al 0,1% (1 g / l) o un desinfectante similar durante la noche. Enjuague el desinfectante con agua.

4. QUE HACER EN OTROS CASOS.

Si hay muchas colas de esperma sin cabeza (cabezas de alfiler) o cabezas sin cola, su presencia debe registrarse en el informe. Si se considera necesario, su concentración puede evaluarse de la misma manera o su prevalencia en relación con los espermatozoides puede determinarse a partir de preparaciones teñidas.



4.2 Evaluación de defectos específicos de los espermatozoides

En ocasiones, muchos espermatozoides tendrán un defecto estructural específico. Por ejemplo, el acrosoma puede no desarrollarse, dando lugar al "pequeño defecto de la cabeza redonda" o "globozoospermia". Si la placa basal no se adhiere al núcleo en el polo opuesto al acrosoma durante la espermiación, las cabezas se absorben y solo se encuentran colas en el semen (el defecto de la cabeza de un alfiler).

Nota 1: Las cabezas de alfiler (colas libres) no se cuentan como defectos de la cabeza, ya que no poseen cromatina o estructura de la cabeza anterior a la placa basal.

Nota 2: Debido a que las colas libres (cabezas de alfiler) y las cabezas libres no se cuentan como espermatozoides, no se consideran anomalías de los espermatozoides. Los hombres cuyos espermatozoides presentan todos unos de estos defectos suelen ser infértiles. Estos casos son raros, pero es fundamental que se identifiquen y se informen correctamente. Por lo tanto, informe la presencia de defectos específicos en los espermatozoides, p. Ej. cabezas de espermatozoides libres, cabezas de alfiler (colas libres), cabezas que carecen de acrosomas. Si hay muchos de estos defectos, se puede determinar su prevalencia en relación con los espermatozoides. Si N es el número de células con defectos contados en el mismo número de campos que 400 espermatozoides, y S es la concentración de espermatozoides (10^6 por ml), entonces la concentración (C) de los defectos (10^6 por ml) puede ser calculado a partir de la fórmula **$C = S \times (N / 400)$** .

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | Maria Mercedes Ramirez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba | APROBÓ: | Jorge E. Rodriguez Páez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigadora Principal |

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO C PROTOCOLO 3</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

4.3 Cuando una evaluación precisa del bajo número de espermatozoides no es requerido.

Si el número de espermatozoides por HPF en la preparación húmeda inicial es bajo (0 a 4 por x 400 HPF o 0 a 16 por x 200 HPF), hay varias opciones disponibles.

4.3.1 No tomar más medidas. Si el número de espermatozoides por x 400 HPF es <4 (es decir, <aproximadamente 1 x 10⁶ / ml), es suficiente para la mayoría de los propósitos clínicos informar la concentración de espermatozoides como <2 x 10⁶ / ml (para tener en cuenta el alto error de muestreo asociado con el bajo número de espermatozoides), con una nota sobre si se observaron o no espermatozoides móviles

4.3.2 Examen de muestras centrifugadas para detectar espermatozoides.

Cuando no se observan espermatozoides en ninguna de las preparaciones húmedas, la muestra se puede centrifugar para determinar si hay espermatozoides presentes en una muestra más grande. Mezclar bien la muestra de semen Si la muestra es viscosa, reduzca la viscosidad como se describe en el apéndice A.



- Retirar una alícuota de 1 ml de semen y centrifugar a 3000 g durante 15 minutos.
- Decantar la mayor parte del sobrenadante y resuspender el sedimento de esperma en el resto
- aproximadamente 50 l de plasma seminal.
- Coloque una alícuota de 10 l del sedimento en cada uno de los dos portaobjetos de menos de 22 mm x 22 mm
- cubreobjetos. Esto creará dos preparaciones húmedas de aproximadamente 20 m de profundidad.
- (ver Cuadro 2.4).
- Examine los portaobjetos con óptica de contraste de fase con un aumento de x 200 o x 250.
- Escanee todo el cubreobjetos sistemáticamente campo por campo. Comience en una esquina y escanee a lo largo del eje x hacia el lado opuesto; luego mueva un campo a lo largo del eje y y vuelva a escanear a lo largo de todo el ancho. Continúe de esta manera en zig-zag para hacer
- una búsqueda completa y sistemática de toda la alícuota (ver Fig. 2.9). Siga observando la diapositiva mientras cambia de campo.
- Con un objetivo x 20 y un ocular x 10 de 20 mm de apertura, el campo del microscopio tiene un diámetro de aproximadamente 1000 m (ver Cuadro 2.9). Por tanto, habrá aproximadamente 484 campos (22 x 22) por cubreobjetos de 22 mm x 22 mm a examinar.
- La presencia de espermatozoides en cualquiera de las réplicas indica criptozoospermia.
- La ausencia de espermatozoides en ambas réplicas sugiere azoospermia

Apéndice A. Licuefacción retardada. Ocasionalmente, las muestras pueden no licuarse, lo que dificulta la evaluación del semen. Se puede inducir la licuefacción de algunas muestras mediante la adición de un volumen igual de medio fisiológico (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; véase el apéndice 4, sección A4.2), seguido de pipeteos repetidos. La falta de homogeneidad se puede reducir mediante un paso suave repetido (6-10 veces) a través de una aguja roma de calibre 18 (diámetro interno 0,84 mm) o calibre 19 (diámetro interno 0,69 mm) unida a una jeringa.

Apéndice B. Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | Maria Mercedes Ramirez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba | APROBÓ: | Jorge E. Rodriguez Páez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigadora Principal |

El contenido de este documento es de propiedad de las autoras y de uso exclusivo del Grupo GIMAI

| | | |
|--|---|---|
|  Universidad del Cauca | ANEXO C PROTOCOLO 3 PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES |  |
| IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS | | |
| Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes | | |

1. Glucosa de Dulbecco - PBS: a 750 ml de agua purificada añadir 0,2 g de cloruro de potasio (KCl), 0,2 g de dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄), 0,1 g de cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O), 8,0 g de sodio cloruro (NaCl), 2,16 g de hidrogenofosfato disódico heptahidratado (Na₂HPO₄·7H₂O) y 1,00 g de D-glucosa.
2. Disolver 0,132 g de cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O) en 10 ml de agua purificada y agregar lentamente a la solución anterior con agitación.
3. Ajuste el pH a 7,4 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 mol / l.
4. Completar hasta 1000 ml con agua purificada.

Nota 1: Muchas centrífugas de sobremesa que toman tubos de 15 ml no alcanzarán los 3000 g: utilice una centrífuga de mayor velocidad que tome tubos de 1,5 a 2,0 ml. Asegúrese de que la muestra de semen esté bien mezclada antes de tomar la alícuota.

Nota 2: El escaneo de las diapositivas puede demorar hasta 10 minutos, ya que la muestra tendrá un fondo alto.

Nota 3: Al centrifugar muestras para reproducción asistida, es posible que sea necesario analizar toda la muestra de semen y la mayor parte del sedimento (por ejemplo, cuatro alícuotas de 10 l de sedimento) para encontrar espermatozoides vivos.

Comentario 1: La ausencia de espermatozoides móviles de la alícuota examinada no significa necesariamente que estén ausentes del resto de la muestra.

Comentario 2: Debido a que la centrifugación no sedimenta todos los permatozoos, este método no se puede utilizar para

4.3.3 Examen de muestras no centrifugadas para detectar espermatozoides móviles

Cuando se buscan espermatozoides móviles (por ejemplo, en una muestra de semen posterior a la vasectomía), debe evitarse la dilución de la muestra en una centrifugación fija o de alta velocidad de los espermatozoides. En este caso, solo se puede evaluar una alícuota de la muestra sin diluir.

Mezclar bien la muestra de semen (ver Cuadro 2.3).

Retire una alícuota de 40 l de semen y colóquela debajo de un cubreobjetos de 24 mm x 50 mm.

Esto creará una preparación húmeda de 33 m de profundidad (ver Cuadro 2.4).



Examine el portaobjetos con óptica de contraste de fase con un aumento de x 200 o x 250.

Escanee todo el cubreobjetos sistemáticamente campo por campo. Comience en una esquina y escanee a lo largo del eje x hacia el lado opuesto; luego mueva un campo a lo largo del eje y y escanee a lo largo de todo el ancho. Continúe en esta forma de zig-zag para hacer una búsqueda completa y sistemática de toda la alícuota (ver Fig. 2.9). Siga observando la diapositiva mientras cambia de campo.

Con un objetivo x 20 y un ocular x 10 de 20 mm de apertura, el campo del microscopio tiene un diámetro de aproximadamente 1000 m (ver Cuadro 2.9). Por tanto, se examinarán aproximadamente 1200 campos (24 x 50) por cubreobjetos de 24 mm x 50 mm.

Nota: Este procedimiento puede tardar hasta 10 minutos, ya que la muestra tendrá un fondo alto.

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | Maria Mercedes Ramírez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba | APROBÓ: | Jorge E. Rodríguez Páez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigadora Principal |

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Universidad del Cauca</p> | <p>ANEXO C PROTOCOLO 3</p> <p><i>PROTOCOLO PARA EVALUAR DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS</i></p> |  |
| <p><i>IMPACTO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD AMBIENTAL: EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICA Y VERDE SOBRE CÉLULAS DEL EPITELIO RESPIRATORIO NASAL Y CÉLULAS ESPERMÁTICAS</i></p> | | |
| <p>Universidad del Cauca- Grupo de Investigación en Microscopía y Análisis de Imágenes</p> | | |

$C = (N / n) \times (1/50)$ espermatozoides por nl o $(410/6) / 50 = 1,37$ espermatozoides / nl, o $1,4 \times 10^6$ espermatozoides por ml de semen (a dos cifras significativas).

2.11.1.4 Ejemplos resueltos

Ejemplo 1. Con una dilución 1 + 1 (1: 2), se encuentra que la réplica 1 contiene 200 espermatozoides en dos rejillas, mientras que la réplica 2 contiene 250 espermatozoides en dos rejillas. La suma de los valores (200 + 250) es 450 en cuatro cuadrículas y la diferencia (250-200) es 50. De la Tabla 2.5 se ve que esto excede la diferencia esperada solo por casualidad (42), por lo que los resultados se descartan y Se realizan dos nuevas diluciones replicadas.

Ejemplo 2. Con una dilución 1 + 1 (1: 2), se encuentra que la réplica 1 contiene 210 espermatozoides en tres rejillas, mientras que la réplica 2 contiene 200 espermatozoides en tres rejillas. La suma de los valores (210 + 200) es 410 en seis cuadrículas y la diferencia (210-200) es 10. De la Tabla 2.5, esto se ve como menor que el encontrado por casualidad (40), por lo que los valores son aceptados. . La concentración de espermatozoides en la muestra para una dilución 1 + 1 (1: 2) es $C = (N / n) \times (1/50)$ espermatozoides por nl o $(410/6) / 50 = 1,37$ espermatozoides / nl, o $1,4 \times 10^6$ espermatozoides por ml de semen (a dos cifras significativas).

Ejemplo 3. Con una dilución 1 + 1 (1: 2), se encuentra que la réplica 1 contiene 120 espermatozoides en las nueve rejillas, mientras que la réplica 2 contiene 140 espermatozoides en las nueve rejillas. La suma de los valores (120 + 140) es 260 en 18 cuadrículas y la diferencia (140–120) es 20. De la Tabla 2.5 se ve que es menor que el encontrado por casualidad (32), por lo que los valores son aceptados. . Cuando se evalúan las nueve rejillas en cada cámara (un total de 1.8 l), la concentración de espermatozoides en la muestra para una dilución 1 + 1 (1: 2) es $C = (N / 1.8) \times 2$ espermatozoides por l = $(260 / 1.8) \times 2 = 288.8$ espermatozoides / l, o 290×10^3 espermatozoides por ml de semen (a dos cifras significativas). Como se contaron menos de 400 espermatozoides, informe el error de muestreo para 260 espermatozoides como se indica en la Tabla 2.2 (aproximadamente 6%).

Ejemplo 4. Con una dilución 1 + 1 (1: 2), se encontró que la réplica 1 contenía 10 espermatozoides en las nueve rejillas, mientras que la réplica 2 contenía 8 espermatozoides en las nueve rejillas. Como se contaron menos de 25 espermatozoides, la concentración es $<56\ 000 / \text{ml}$; informan que “se observaron 18 espermatozoides en las réplicas, muy pocos para una determinación precisa de la concentración ($<56\ 000 / \text{ml}$)”.

Ejemplo 5. Con una dilución 1 + 1 (1: 2), no se encuentran espermatozoides en ninguna de las réplicas. Como se contaron menos de 25 espermatozoides, la concentración es $<56\ 000 / \text{ml}$; informan que “No se observaron espermatozoides en las réplicas, muy pocos para una determinación precisa de la concentración ($<56\ 000 / \text{ml}$)”.

| | | | |
|----------|--|---------|-------------------------|
| ELABORÓ: | Maria Mercedes Ramírez de Valdenebro Paola Andrea Arciniegas Grijalba | APROBÓ: | Jorge E. Rodríguez Páez |
| CARGO: | Co-investigadoras | CARGO: | Investigadora Principal |