

DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE CINC SOBRE EL EPITELIO NASAL RESPIRATORIO
DEL BIOMODELO *Mus musculus*



KAROL ESTEFANY MOSQUERA MURILLO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2023

DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE CINC EL EPITELIO NASAL RESPIRATORIO DEL
BIOMODELO *Mus musculus*

KAROL ESTEFANY MOSQUERA MURILLO

Trabajo de grado para optar por el título de Bióloga

Directora:

LYDA PATRICIA MOSQUERA SÁNCHEZ, PhD

Asesoras:

PAOLA ANDREA ARCINIEGAS GRIJALBA, MSc
MARÍA MERCEDES RAMÍREZ DE VALDENEbro, MSc (c)

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2023

. NOTA DE ACEPTACIÓN

Trabajo de grado aprobado por la
Universidad de Cauca para optar
al Título de Biología

Directora: Lyda

Lyda Patricia Mosquera Sánchez Ph,D

Jurado: Victoria

Victoria Eugenia Niño Castaño, Ph,D

Jurado: Gerardo

Gerardo Andrés Torres Rodríguez, Ph.D

Popayán, 2023

DEDICATORIA

A mi sobrino, Ian Jacob quien ha llegado a alegrarme la vida

A mi padre, Alexandry Mosquera por ser mi gran consejero

A mi madre, Zuly Amparo Murillo por ser mi amiga y fiel confidente

*A mis abuelas Elizabeth Martínez y Aura Elena Fernández por apoyarme en todo
el proceso*

A mi hermano, Erick Anderson Cerón por querer lo mejor para mi

A mi familia, Mosquera Murillo mi mayor motivación

AGRADECIMIENTOS

A mi padre y a mi madre, por exigirme en todo el proceso a dar lo mejor de mí, por el apoyo incondicional, por los días, las noches y largos trasnochos juntos, por animarme en todo momento, por esperar lo mejor de mí y estar siempre orgullosos.

A mis familiares por apoyarme en este proceso, por alegrarse por mi triunfo y por ser uno de mis motivos para progresar como persona y en la vida profesional.

A mis amigos y compañeros quienes me animaron a seguir adelante y comprendieron mi entrega y dedicación por mi estudio.

Al proyecto “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”, operado por el convenio entre la Universidad del Cauca, la Universidad Nacional de Colombia –Sede Palmira, y financiado por Minciencias.

A mis mentores y equipo de trabajo, Patricia Mosquera, Jorge Rodríguez, Paola Arciniegas, María Mercedes Ramírez, Angela Castañeda y Karen Ángel. Quienes me orientaron de la mejor manera, me brindaron su experiencia y conocimiento para hacer de mí una profesional excelente.

Al laboratorio de CYTEMAC, a la UME y al CIBUC de la Universidad del Cauca, por ofrecerme los espacios adecuados para llevar a cabo mi investigación.

A la doctora Ivonne Alejandra Meza, por compartir su tiempo y conocimiento en el campo de la patología con la finalidad de presentar resultados adecuados en la investigación.

Al Técnico Albeiro Polanco, por tener siempre la mejor disposición y ayudar en el procesamiento histológico de las muestras biológicas.

RESUMEN

Las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs) presentan propiedades antimicrobianas adecuadas para emplearse en la biomedicina, remediación ambiental, agricultura, entre otras. Considerando el potencial uso de estas nanopartículas (NPs), en estos campos, es necesario sintetizarlas usando metodologías amigables con el medio ambiente ya que, normalmente, se sintetizan empleando métodos químicos los cuales generan desechos tóxicos. Por otro lado, surge el interés en determinar los potenciales efectos tóxicos, sobre los sistemas biológicos, proporcionados por el método de síntesis empleado en la obtención de las NPs. Por ello, en este trabajo, se analizaron los cambios histológicos sobre el epitelio nasal respiratorio de biomodelos *Mus musculus*, expuestos a atmósferas que contenían ZnO-NPs a diferentes concentraciones (6, 15 y 40 mg/m³). Las NPs fueron sintetizadas por una ruta química (método de Pechini) y por una ruta verde (utilizando el extracto vegetal del *Allium sativum*) y se caracterizaron utilizando técnicas como Espectroscopias IR y Raman, Difracción de rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de Barrido (MEB). Las ZnO-NPs obtenidas por la ruta química presentaron una estructura tipo wurtzita, con morfología esférica y tamaño de partícula de 50 nm. Mientras las obtenidas por la ruta verde fueron amorfas, con estructura laminar: ancho <15 nm y longitud <100 nm. Los espectros Raman evidenciaron la presencia de ZnO en las muestras, independiente del método de síntesis empleado. Los resultados de los tratamientos, a los que fueron sometidos los *Mus musculus*, mostraron que la inhalación de ZnO-NPs obtenidas por ruta química ocasionó cambios morfológicos significativos (metaplasia escamosa y congestión vascular) y respuesta inflamatoria aguda en la exposición a altas concentraciones de las NPs (40 y 15 mg/m³). Estos cambios morfológicos no se observaron cuando se realizó el tratamiento con ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde. Por otro lado, se observaron cambios histológicos significativos con la producción de respuestas inflamatorias crónicas en la exposición a 40 mg/m³ y 6 mg/m³ de ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde y química, respectivamente.

Palabras clave: *Mus musculus*, epitelio nasal respiratorio, nanopartículas de óxido de zinc, inhalación, toxicidad.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo general	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MARCO TEÓRICO.....	19
4.1. Generalidades de la nanotecnología.....	19
4.1.1 Nanopartículas: óxido de cinc.....	19
4.1.2 Síntesis de nanopartículas	21
4.1.3 Toxicidad de las nanopartículas	25
4.2. Características de la cavidad nasal.....	27
4.2.1 Anatomía de la cavidad nasal.....	27
4.2.2 Histología del epitelio nasal respiratorio (NRE)	30
4.2.3 Cambios histológicos del epitelio nasal respiratorio	32
5. ANTECEDENTES	33
6. MARCO METODOLÓGICO	37
6.1. Estandarización de las metodologías para la síntesis de ZnO-NPs por rutas química y verde	37
6.1.1 Síntesis de ZnO-NPs por ruta química.	37
6.1.2 Síntesis de ZnO-NPs por ruta verde (extracto de ajo como solvente). 39	
6.1.3 Caracterización de ZnO-NPs obtenidas por ruta química y verde	41
6.2. Evaluación de la toxicidad de las Zn-NPs sobre el NRE de <i>Mus musculus</i> 43	
6.2.1 Determinación de las concentraciones a aplicar en los tratamientos	43
6.2.2 Preparación de suspensiones de ZnO-NPs obtenidas por ruta química y verde	44
6.2.3 Mantenimiento de los biomodelos	45
6.2.4 Exposición de los biomodelos <i>Mus musculus</i> , a la acción de las ZnO- NPs obtenidas por rutas química y verde.....	46
6.2.5 Obtención de muestras del epitelio nasal respiratorio.	47
6.2.6 Lectura de láminas histológicas del NRE.	51

6.3. Análisis estadístico.....	52
7. RESULTADOS	53
7.1. Adecuación de las metodologías para la síntesis de ZnO-NPs por rutas química y verde	53
7.1.1 Caracterización de ZnO-NPs sintetizadas	53
7.2. Establecimiento de condiciones experimentales en los biomodelos para la obtención de concentraciones de exposición de ZnO-NPs y muestras de tejido del epitelio nasal respiratorio	60
7.2.1 Obtención de la mucosa nasal del biomodelo <i>Mus musculus</i>	60
7.2.2 Ensayos preliminares	62
7.3. Análisis histológico del epitelio nasal respiratorio después de la exposición aérea de ZnO-NPs.....	64
8. DISCUSIÓN	74
9. CONCLUSIONES.....	84
10. RECOMENDACIONES	86
11. BIBLIOGRAFÍA.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dibujos esquemáticos de la sección sagital de los conductos nasales derechos (a) Ratón y (b) Humano. Los colores son los tipos epiteliales el rosa (escamoso), amarillo (zona de transición), azul (respiratorio) y rojo (olfatorio). n, fosa nasal; v, vestíbulo nasal; hp, paladar duro; i, diente incisivo; it, cornete inferior; mt, cornete medio; st, cornete superior; MT, maxiloturbinato; NT, nasoturbinato; ET, cornetes etmoidales; NP, nasofaringe. Fuente: (Treuting et al., 2017). 28

Figura 2. Esquema del pasaje nasal derecho de un ratón. (a) Se indican las superficies rostrales de las secciones transversales (T1-T4) tomadas en diferentes niveles; (b) Secciones transversal al nivel T1 de la cavidad nasal. DM, meato medial dorsal; HP, paladar duro; LM, meato lateral; MM, meato medial; MT, maxiloturbinado; N, nasoturbinado; S, tabique; VM, meato ventral; 1E–6E, cornetes etmoidales. Las áreas coloreadas representan los tipos de epitelios que revisten las regiones intranasales, SE (escamoso), TE (epitelio respiratorio transición), RE (respiratorio) y OE (olfatorio) (Treuting et al., 2017). Los diferentes tipos de epitelios respiratorios (círculos 6, 7 y 8). 6. Epitelio columnar ciliado respiratorio. 7. Epitelio respiratorio con abundantes células caliciformes. 8. Epitelio respiratorio transitorio. Fuente: (Treuting et al., 2017). 29

Figura 3. Micrografía del NRE con técnica H-E (100X). 1: células columnares ciliadas; 2: células basales; 3: Lámina propia; 4: plexo cavernoso nasal; 5: células de la mucosa caliciforme (células globulares) 6: capilar. Fuente: Ruberte et al., 2017. 31

Figura 4. Etapas para obtener ZnO-NPs mediante ruta química..... 38

Figura 5. Proceso de obtención de ZnO-NPs mediante ruta verde. 40

Figura 6. Diagrama de la preparación de las concentraciones a emplear en los grupos de tratamientos. De (a)-(g), se siguen de manera ordenada el diagrama presentado, se observa la cantidad en mililitros (mL) que se debe emplear de solución salina (Sln Salina), así como, de las concentraciones que se van elaborando a lo largo del proceso. Se realizaron 20 segundos de agitación con vórtex y 10 minutos de ultrasonido..... 44

Figura 7. Biomodelos experimentales *Mus musculus* alojados en jaulas de policarbonato y expuestos a la inflación de ZnO-NPs (a) ruta química y (b) ruta verde. 45

Figura 8. Diseño experimental estructurado para evaluar la toxicidad de las ZnO-NPs en biomodelos *Mus musculus* 46

Figura 9. Proceso de fijación de la cabeza del biomodelo *Mus musculus* en formaldehído al 4%. (a) lavado de la cavidad nasal por el conducto nasofaríngeo y (b) observación del proceso de fijación de 36 a 70 horas 48

Figura 10. Descalcificación de la muestra. (a) manipulación cuidadosa de la cabeza del biomodelo con una pinza; (b) inmersión de la cabeza del ratón en la mezcla de TBD-1 y agua destilada y (c) descalcificación del tejido por un periodo de 6 horas. 49

Figura 11. Corte de las muestras de la cabeza de los biomodelos. (a) Extracción de la cabeza del formaldehído; (b) Observación del paladar duro de la cabeza de los biomodelos e identificación de las zonas a cortar (1) Dientes incisivos superiores; (2) Papila incisiva y (3) Primera cresta palatina. 50

Figura 12. Observación de las placas histológicas de la cavidad nasal del ratón *Mus* 51

Figura 13. Espectros de IR de las muestras sólidas sintetizadas. (a) método de Pechini tratada térmicamente a 550°C y (b) sólido obtenido empleando una ruta química y un tratamiento de secado a 90°C..... 54

Figura 14. Espectro Raman de las ZnO-NPs sintetizadas mediante: (a) ruta química y (b) ruta verde..... 56

Figura 15. Difractogramas de rayos X correspondiente a las ZnO-NPs sintetizadas por medio de (a) ruta química y (b) ruta verde. 57

Figura 16. Micrografías obtenidas con MET de las muestras de ZnO-NPS sintetizadas (a) método de Pechini y (b) precipitación controlada empleando el extracto de *A. sativum*..... 57

Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido de las ZnO-NPs obtenidas por (a) ruta química y (b) ruta verde. 58

Figura 18. Espectro EDS y composición química elemental de las ZnO-NPs sintetizadas por: (a) método Pechini y (b) ruta verde. 59

Figura 19. Observación en el estereoscopio de la sección transversal en el nivel T1. (a) Ensayo 1 y 2 y (b) Ensayo 4 y 5 (ver tabla 3). Se observan los diferentes tipos de epitelio respiratorio (círculos 6, 7 y 8). 6. [Epitelio columnar ciliado respiratorio. 7. Epitelio respiratorio con abundantes células caliciformes y 8. Epitelio respiratorio transitorio]. Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia. 61

Figura 20. Observación en el estereoscopio de la sección transversal (a) Nivel T1, ensayo 3 y (b) Nivel T2, ensayo 6 (ver tabla 3). Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia. 61

Figura 21. Ampliación del círculo 7 de la figura 19(a), correspondiente al epitelio respiratorio en diferentes aumentos 4X (a), 10X (b), 40X (c) y 100X (d). Se observan C: Células columnares ciliadas; CB: Células basales; L: Lámina propia. Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia. 62

Figura 22. Micrografías ópticas del NRE de los biomodelos expuestos a 100mg/m³ (a) 10x (bcd 40x). células ciliadas (C); metaplasia escamosa (ME); polimorfonucleares (PMN), linfocitos y plasmocitos (LP); lámina propia (L); Senos paranasales (SP); Moco (Mc). Tinción H-E. Fuente propia 63

Figura 23. Evaluación histopatológica cualitativa y micrografías ópticas del epitelio nasal respiratorio de los biomodelos expuestos a: (a) 0 mg/m³; (b) 6 mg/m³; (c) 15 mg/m³ y (d) 40 mg/m³ de ZnO-NPs sintetizadas mediante ruta química (abcd- 40X). células ciliadas (C); metaplasia escamosa (ME); polimorfonucleares (PMN), vasos sanguíneos (V); lámina propia (L). Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia. 65

Figura 24. Evaluación histopatológica cualitativa y micrografías ópticas del NRE de los biomodelos expuestos a: (a) 0 mg/m³, (b) 40 mg/m³, (c) y (d) 6 mg/m³ ZnO-NPs sintetizadas mediante ruta química (abc- 40X; d-100X). Células ciliadas (C), Mastocitos (M); Degranulación de mastocitos (G); lámina propia (L). Linfocitos y plasmocitos (LP). Tinción con H-E. Fuente propia. 66

Figura 25. Micrografías ópticas del epitelio nasal respiratorio de los biomodelos expuestos a: (a) 6 mg/m³ y (b) 40 mg/m³ de ZnO-NPs sintetizadas mediante ruta química (ab- 40X). Se observa la presencia de vasos congestivos. células ciliadas (C);,vasos sanguíneos (V); congestión vascular (CV); lámina propia (L). Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia. 67

Figura 26. Gráfico de barras agrupado para comparar las lesiones histopatológicas provocadas por la exposición de *Mus musculus* a atmosferas que contenían ZnO-NPs por ruta química y verde: (a) metaplasia escamosa; (b) polimorfonucleares intranasales; (c) congestión vascular y (d) mastocitos en degranulación. Las alteraciones se categorizaron como escasa, moderada o abundante..... 68

Figura 27. Evaluación histopatológica cualitativa y micrografías ópticas del epitelio nasal respiratorio correspondientes a los *Mus musculus* expuestos a: (a) 0 mg/m³; (b) 6 mg/m³; (c) 15 mg/m³ y (d) 40 mg/m³ de ZnO-NPs sintetizadas utilizando la ruta verde diseñada para este trabajo (abcd- 40X). [células ciliadas (C); lámina propia

(L); vasos sanguíneos (V); material basófilo (MB); linfocitos y plasmocitos (LP); mastocitos (M)]. Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia..... 72

Figura 28. Gráfico de barras agrupado para comparar las lesiones histopatológicas provocadas por la exposición a atmósferas que contenían ZnO-NPs sintetizadas por ruta química y verde: (a) material basófilo y (b) plasmocitos y linfocitos. Las lesiones se categorizaron como presencia o ausencia. 73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cortes realizados en los biomodelos *Mus musculus* expuestos a 100 mg/m³ de ZnO-NPs. 50

Tabla 2. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: polimorfonucleares en la luz de la cavidad nasal. 69

Tabla 3. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: ausencia de cilios o metaplasia escamosa del NRE..... 69

Tabla 4. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: congestión de los vasos sanguíneos..... 69

Tabla 5. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: mastocitos en degranulación..... 70

Tabla 6. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: presencia o ausencia de material basófilo circular..... 71

Tabla 7. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: linfocitos y plasmocitos subyacentes al NRE. 73

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país en vía de desarrollo, donde la producción agrícola es una de las principales bases económicas (Perfetti et al., 2013). Para mantener los cultivos sanos y favorecer la producción, los agricultores se ven obligados a emplear fertilizantes, pesticidas, herbicidas y plaguicidas (agroquímicos) elaborados con base en compuestos químicos altamente tóxicos y peligrosos, que producen efectos no favorables en la salud de la población por la bioacumulación de sus componentes (Polanco et al., 2016; Puerto et al., 2014). Se han reportado diversos síntomas en la población rural, como: irritación en la piel, náusea, diarrea, reacciones alérgicas respiratorias, edema pulmonar, daño o falla renal, entre otros). Además, se ha encontrado que pueden causar genotoxicidad (daño en el ADN y los cromosomas), tal como se ha reportado para el herbicida-glifosato (Cortina Campuzano et al., 2017).

A nivel mundial, los investigadores han realizado estudios para reemplazar el uso de agroquímicos, haciendo uso de los resultados de una nueva disciplina denominada nanotecnología (NT). La NT, usa tecnologías para manipular y controlar la nanomateria, por ejemplo, las nanopartículas (NPs), que se encuentra en un rango de 1 a 100 nanómetros (nm) en al menos una de sus dimensiones (Rana et al., 2020; Selmaní et al., 2022). Uno de los nanomateriales con gran potencial de aplicación son las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs), las cuales presentan interés económico e industrial por sus propiedades ópticas, eléctricas, térmicas y foto catalíticas únicas, las cuales permiten que se pueden emplear en la fabricación de cosméticos, textiles, polvos cerámicos funcionales, entre otros (Bandeira et al., 2020). Además, su actividad antimicrobiana y anticancerígena, las hace adecuadas para emplearse en biomedicina, remediación ambiental y agricultura (Mishra et al., 2017).

Específicamente, en la agricultura, se está evaluando la capacidad de uso de las NPs como fungicidas y/o insecticidas, en control de plagas y enfermedades en cultivos de café (Arciniegas-Grijalba et al., 2017; Mosquera Sánchez et al., 2020; Patiño-Portela et al., 2021) tomate (López-Lima et al., 2020), trigo (S. Mishra et al., 2014), aguacate (Chávez-Magdaleno et al., 2018), etc., Además, otras investigaciones se enfocan en fortalecer la productividad de cultivos a bajos costos (Chand Mali et al., 2020).

Considerando el potencial uso de las ZnO-NPs en diversos productos del cuidado humano y ambiental, por ejemplo, es importante emplear procesos de síntesis que tengan un enfoque ecológico y respetuoso con el ambiente (denominadas síntesis o ruta verde), debido a que, normalmente las NPs se obtienen empleando procesos que requiere mucha energía y generan residuos tóxicos (síntesis o ruta química) (Agarwal et al., 2017; Bandeira et al., 2020). Por otro lado, surge el interés por determinar si las ZnO-NPs presentan toxicidad, ya que hasta el momento el ZnO a nivel microscópico para la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) es considerado no tóxico (Sruthi et al., 2018).

Debido a lo anterior, se han realizado investigaciones que reportan resultados sobre la evaluación de la toxicidad de las ZnO-NPs en biomodelos experimentales. Estos indican que, tras la inhalación las NPs, ingresan al organismo y viajan a otras partes del cuerpo induciendo efectos como: inflamación alérgica y eosinofílica en las vías respiratorias (Huang et al., 2015; Luyts et al., 2018) y alteraciones en diversos órganos (hígado, riñón, pulmón, bazo, cerebro, páncreas, sangre, etc.) (Huang et al., 2015, 2019; Sruthi et al., 2018; Vysloužil et al., 2020). Por otro lado, otros estudios indican que este proceso de inhalación puede ocasionar inflamación pulmonar mínima, citotoxicidad o cambios significativos a nivel del organismo (Adamcakova et al., 2014). A pesar de estos resultados, en la actualidad aún hay controversia sobre la toxicidad de ZnO-NPs, ya que las propiedades fisicoquímicas

de las NPs determinan su toxicidad y estas dependen del método de síntesis empleado.

Considerando que el campo de la toxicidad de NPs (denominado nanotoxicidad) es muy amplio, donde se han presentado resultados que se encuentran en tema de discusión y en consecuencia se requiere ampliar el conocimiento en esta importante temática. En este estudio, se obtuvieron ZnO-NPs, mediante las rutas química y verde, y se evaluó el efecto tóxico que produce su inhalación sobre el epitelio nasal respiratorio (NRE) del biomodelo *Mus musculus*. La Investigación desarrolló en el marco del proyecto titulado “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”, financiado por Minciencias, ejecutado por Universidad el Cauca en convenio con la Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira. El cual tuvo como propósito determinar la toxicidad *In Vivo* de los nanomateriales de óxido de cinc obtenidas por rutas química y verde sobre células del epitelio respiratorio nasal y células espermáticas empleando ratones *Mus musculus*.

2. JUSTIFICACIÓN

La NT presenta aplicaciones en diversos campos, entre ellos la agricultura, actividad que es considerada una de las principales fuentes de alimentación y base económica importante para muchos países, específicamente para Colombia. El uso de esta tecnología, en un futuro cercano, será una realidad, ya que se desea emplear como una posible alternativa al uso de agroquímicos tradicionales, los cuales perjudican la salud de los agricultores y población rural. Es por ello, que se requiere realizar estudios que determinen los efectos nocivos o beneficiosos que puedan propiciar las NPs, en especial las de óxido de cinc (ZnO), a la salud humana y ambiental (Wani et al., 2017).

Las ZnO-NPs tienen un potencial uso en la biomedicina y en la agricultura porque presentan propiedades anticancerosas, antibacterianas y antifúngicas únicas (Moezzi et al., 2012). Aunque el ZnO, a concentración menor al 25%, se considere seguro y haya sido aprobado por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) para productos cosméticos, la toxicidad de las ZnO-NPs sigue siendo una preocupación y tema de discusión. Dado que, diversos estudios muestran la toxicidad o beneficios que las NPs puedan generar (Adamcakova et al., 2014; Bahadar et al., 2016; Chuang et al., 2014; Morimoto et al., 2016; Sirelkhatim et al., 2015; Srivastav et al., 2016; Król et al., 2017). Es por ello importante seguir explorando sobre el campo de la nanotoxicidad.

Por otro lado, una alternativa a la síntesis por ruta química, considerando su efecto no amigable con el medio ambiente, es la ruta verde, la cual utiliza sustancias químicas de origen natural en lugar de compuestos reductores contaminantes que generen residuos tóxicos para el ambiente (Vera et al., 2017; Rana et al., 2020), Es por ello que, los estudios actuales, han adoptado esta metodología. Así, por ejemplo, se han utilizado bulbos de ajo (*Allium sativum*), con propiedades antimicrobianas (Pizzorno et al., 2020), para sintetizar ZnO-NPs. Para este estudio,

se utilizó el extracto de ajo con el objetivo de potencializar las propiedades antifúngicas que normalmente presentan estas NPs y no solo como medio reductor. El interés era incorporar o adherir los compuestos bioactivos del ajo al ZnO, durante el proceso de la síntesis por ruta verde (Benitez-Salazar et al., 2021).

Considerando que, las NPs presentan alta movilidad y se pueden dispersar en el aire, una de las principales vías de contacto con el organismo es por inhalación. Por ello estudios, han reportado efectos tóxicos producidos por la ZnO-NPs, poniendo atención en determinar los cambios producidos en pulmones, corazón, intestino, riñón, entre otros (Huang et al., 2015, 2019; Sruthi et al., 2018; Vysloužil et al., 2020), Sin embargo, no evaluaron los posibles cambios, en el epitelio nasal respiratorio (NRE), a pesar de su importancia en los procesos vitales de defensa (Ross, 2017). Es por esto, el interés de evaluar la afectación del NRE, que se encuentra ubicado en la cavidad nasal y está en contacto directo con las sustancias que ingresan por vía inhalatoria (Santana Báez et al., 2018). El NRE, contiene células ciliadas, que actúan como una “barredora mucociliar”, y sirven como mecanismo de barrera, contra pequeñas partículas que traten de ingresar al organismo (Ross, 2017).

Para realizar los ensayos en este trabajo se empleó el *Mus musculus*, como biomodelo experimental porque presenta diversos atributos que lo hacen comparable con los humanos (el 99,5% de los genes del ratón tienen una homología en el ser humano y el sistema inmune es muy similar) (Ruberte et al., 2017). Estos atributos le propician un valor predictivo a la condición humana y suministra un medio para que las investigaciones puedan probar hipótesis (Treuting et al., 2017).

Por lo mencionado, este trabajo aportó conocimientos sobre el efecto que propician las ZnO-NPs, obtenidas por rutas de síntesis química y verde, en 3 concentraciones (40, 15 y 6mg/m³), sobre el NRE del *Mus musculus*. Además, los resultados pueden servir como referentes en futuras investigaciones que evalúen el efecto tóxico de las NPs sobre el tejido nasal de este biomodelo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto tóxico de nanopartículas de óxido de cinc, obtenidas por ruta química y verde, sobre el epitelio nasal respiratorio del biomodelo *Mus musculus*.

3.2. Objetivos específicos

- Establecer una metodología para obtener nanopartículas de óxido de cinc de manera controlada y reproducible, por rutas química y verde.
- Determinar el procedimiento más adecuado para la obtención y procesamiento de las muestras biológicas del epitelio nasal respiratorio.
- Analizar y comparar los efectos de la exposición a nanopartículas de óxido de cinc obtenidas por las dos rutas de síntesis, sobre el epitelio nasal respiratorio del biomodelo empleado.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Generalidades de la nanotecnología

En 1959, el físico estadounidense, Richard Feynman en la reunión anual de la American Physical Society (APS), indicó las ideas básicas de la nanotecnología, al postular la idea de “utilizar estructuras atómicas construyendo átomos sobre átomos” (Mendoza & Rodríguez-López, 2007; Serena & Correia, 2003). Sin embargo, realmente, el término de NT fue introducido por el profesor Norio Taniguchi, investigador de la Universidad de Ciencias de Tokio en 1974 (Quintili, 2012). En general, la NT es el campo del conocimiento que se encarga de diseñar y usar materiales, sistemas y estructuras que presenten un tamaño inferior a los 100 nm. Dada esta condición, surge el interés de comprender cómo interactúan estos nuevos materiales con otros sistemas, específicamente con los biológicos (Kumar et al., 2023). Dentro de los materiales que considera la NT se incluyen las nanopartículas (NPs), nano fibras, nanocompuestos, nano cables, nanotubos, entre otros (Rana et al., 2020). Para este estudio se consideró el empleo de las nanopartículas.

4.1.1 Nanopartículas: óxido de cinc

Las nanopartículas (NPs), son partículas pequeñas que presentan un tamaño inferior a los 100 nm en al menos una de sus dimensiones. Las NPs se caracterizan por poseer una alta relación superficie/volumen que, junto a su pequeño tamaño, hace que presenten unas propiedades diferentes y en ocasiones únicas, en comparación con su respectivo material a nivel microscópico (Selmaní et al., 2022). Otras características como la estabilidad coloidal, alta eficiencia de atrapamiento, biocompatibilidad, funcionalidad específica y posibilidad de orientar los nanomateriales a tejidos específicos (Hussain et al., 2020), les permitiría interactuar con los sistemas biológicos (Shekhar et al., 2021). Debido a las características y

nuevas propiedades que presentan las NPs, estas se están evaluando considerando la posibilidad de emplearlas en campos como la biomedicina, la agricultura y la remediación ambiental (Król et al., 2017).

En biomedicina se han realizado investigaciones para determinar el potencial uso de las NPs como vehículos para la administración de fármacos y en la producción de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, etc.) (Saeedi et al., 2019), cardiovasculares y autoinmunes (cáncer, VIH, etc.) (Li et al., 2019) Actualmente, las NPs se utilizan en administración de genes y fármacos, separación y purificación de moléculas y células biológicas, detección de patógenos y proteínas, ingeniería de tejidos, imágenes médicas, entre otras aplicaciones (P. K. Mishra et al., 2017; Salata, 2004; Selmaní et al., 2022).

En la agricultura, se está evaluando la capacidad de las NPs para ser utilizadas como fungicidas o insecticidas para controlar plagas y enfermedades en cultivos de café (P. Arciniegas-Grijalba et al., 2017; Mosquera Sánchez et al., 2020; Patiño-Portela et al., 2021) tomate (López-Lima et al., 2020), trigo (S. Mishra et al., 2014), aguacate (Chávez-Magdaleno et al., 2018), etc., Otras investigaciones buscan fortalecer la productividad de cultivos a bajos costos (Chand Mali et al., 2020).

Específicamente para las ZnO-NPs, se debe considerar que el óxido de cinc (ZnO) presenta diversas propiedades ópticas, eléctricas y térmicas de interés: alto índice de refracción, apantallamiento de la radiación UV, naturaleza semiconductor con “gap” ancho y altas capacidad calorífica y conductividad térmica (Król et al., 2017). Por lo tanto, presenta posibilidades muy amplias de uso que se verían favorecidas por el tamaño nanométrico de sus NPs (Moezzi et al., 2012). Propiedades como absorción del ultravioleta (UV) y transparencia a la luz visible, las hace adecuadas como protectores solares y para conformar telas que brinden protección contra la radiación UV. También, se ha estudiado su actividad antimicrobiana y anticancerígena debido a que tienen la capacidad de generar especies reactivas de

oxígeno (ROS). Esto ha llevado a considerar su potencial uso en el control de enfermedades en los sistemas biológicos (P. K. Mishra et al., 2017). Además, presenta diversas aplicaciones en productos comerciales, como: polvos para bebés, champús anticaspa, cosméticos y fibras de celulosa (Pulit-Prociak et al., 2016; Sonia et al., 2017).

Localmente se está evaluando el potencial uso de las Zn-NPs como fungicidas. Arciniegas et al. (2017) y Mosquera et al. (2020) evaluaron *In Vitro* el efecto antifúngico de la ZnO-NPs sintetizadas por una ruta química sobre las cepas de los hongos *Erythricium salmonicolor* y *Colletotrichum spp.* agentes causales de la enfermedad mal rosado y antracnosis en el café, respectivamente. Los resultados mostraron que las ZnO-NPs presentaban capacidad antifúngica eficiente y viable.

Las NPs presentan propiedades fisicoquímicas únicas debido a su tamaño, forma, relación superficie/volumen, composición y grado de aglomeración. Estas características son definidas, en gran parte, por la ruta de síntesis empleada en su obtención y sus correspondientes propiedades relacionadas las hace de interés en áreas como la medicina, biología, física, química, entre otras (Król et al., 2017). Es por ello que, en el presente trabajo, se consideraron dos métodos de síntesis: una ruta química y una ruta verde, para determinar las diferencias en su acción sobre el sistema biológico.

4.1.2 Síntesis de nanopartículas

Las NPs se pueden sintetizar a través de medios: líquido, sólido o gaseoso. El medio más utilizado es líquido debido a su bajo costo, es seguro, además permite un control más eficiente de la forma y tamaño de las NPs porque se pueden controlar los procesos de nucleación y crecimiento que son los que definen estas características del material (Salas et al., 2016). Para la obtención del ZnO se han utilizado diferentes procesos de síntesis, como: el método de precursor polimérico

(Pechini) (Guerrero et al., 2013), precipitación controlada (Rodríguez Paéz et al., 2001), sol-gel (M. Singh et al., 2021), hidrotermal (Khudiar et al., 2021), mecanoquímica (Otis et al., 2021) y combustión (Chandekar et al., 2020), a los que se les denomina comúnmente procesos químicos de síntesis.

Síntesis de nanopartículas por ruta química

La síntesis o ruta química que se utilizó en este estudio, para obtener las ZnO-NPs, fue el método del precursor polimérico (Pechini) que “permite obtener NPs a partir de reacciones de poli-esterificación de complejos metálicos ácidos”. En este método ocurren varios procesos químicos importantes. Cuando interacciona un ácido carboxílico (ácido cítrico) con una sal metálica (acetato de cinc) se propicia una reacción de esterificación que favorece la formación de quelatos metálicos. Si el sistema contiene, además, un alcohol polihidroxílico (etilenglicol) y esta mezcla se somete a un proceso de calentamiento, se favorecería una reacción de poli-esterificación que llevaría a la formación de una resina homogénea. En este proceso de calentamiento se desarrollan varias etapas durante la formación de la resina: “eliminación de alcoholes (~85°C), eliminación de agua y del hidróxido de amonio adicionado (~100°C), formación de poliéster (>100°C) y estabilización del material órgano-metálico como gel polimérico” (Guerrero et al., 2013). Al someter la resina producida a un proceso térmico de precalcinado (<350°C) y luego a un calcinado (500-650°C), para eliminar la materia orgánica, se obtiene un polvo con partículas de tamaño nanométrico (Salas et al., 2016).

Sin embargo, al igual que otros métodos químicos de síntesis provoca contaminación ambiental. Para mitigar este problema, los investigadores buscan desarrollar procesos de síntesis que sean ecológicos con el ambiente. Para ello, se han propuesto nuevas condiciones de reacción para sintetizar las NPs, por ejemplo, reacciones que involucren la transformación directa de enlaces C-H a la estructura desea, proceso que ocurre en “la naturaleza con una variedad de compuestos

orgánicos que pueden ser oxidados por oxígeno molecular u otros donantes de oxígeno en las células de bacterias, hongos, plantas, insectos, peces y mamíferos” (Patiño-Portela et al., 2021). Además, se busca que estas reacciones se desarrollen sin necesidad de utilizar tratamientos térmicos a temperaturas altas (> 100 °C). Adicionalmente, se debería emplear un solvente que fuera natural, económico, no tóxico y de fácil acceso, como el agua, y usar sustratos biológicos. La consideración de estos condicionamientos tiene como finalidad generar beneficios para el proceso de síntesis, tales como la reducción de la cantidad de energía empleada, disminución de los compuestos tóxicos, así como la reducción de costos y residuos químicos, todo para proteger el ambiente (Benítez-Salazar et al., 2021; Pillai et al., 2020)

Síntesis de Nanopartículas por ruta verde

La síntesis por ruta verde de NPs se propone como una metodología alternativa para reducir la contaminación generada por la ruta química. En la ruta verde se puede emplear sustratos biológicos como plantas, bacterias, hongos y algas para reemplazar agentes químicos (Vera et al., 2017). Específicamente, considerando el solvente, de los sustratos biológicos mencionados el más utilizado es el extracto de las plantas ya que este es de fácil acceso y bajo costo, además de no requerir de ningún protocolo de manejo por no presentar un peligro biológico (Bandeira et al., 2020). Para la síntesis por ruta verde de ZnO-NPs, se han empleado diversas partes de la planta como la fruta y la cascara de la fruta (Vishnupriya et al., 2020), hojas (Obeizi et al., 2020), flores (Jamdagni et al., 2018), raíces (Zhang et al., 2020) y semillas (Shobha et al., 2019), entre otras.

Específicamente, en el presente estudio, se empleó como ruta verde una modificación del método de precipitación controlada, utilizando como solvente extracto de ajo. Este método presenta, principalmente, tres etapas: “(1) la formación de complejos metaestables de zinc a través de una lenta adición de amoníaco, (2)

la transformación de fase parcial de precursores de zinc metaestables en óxido de zinc después de lavar la suspensión coloidal inicial con etanol y/o (extracto natural) y (3) la transformación completa en ZnO por tratamiento térmico. El principal fenómeno de este método es la liberación controlada de cationes a partir de una suspensión homogénea” (Rodríguez Paéz et al., 2001). Se utilizó como solvente el extracto de los bulbos de ajo de *A. sativum* ya que presenta diversas características biológicas que lo hacen atractivo.

Como es de conocimiento popular, a lo largo de la historia, los bulbos de ajo se han empleado para prevenir y tratar diversas enfermedades producidas por microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente (Pizzorno et al., 2020). Una de sus características a resaltar es su actividad antimicrobiana contra hongos, bacterias y virus, debido a sus compuestos bioactivos (Chen et al., 2018; Meriga et al., 2012), destacándose el compuesto azufrado denominado alicina, el cual es liberada por la interacción entre aliina y la enzima aliinasa al cortar o triturar el ajo (Ramírez-Concepción et al., 2016). La capacidad antimicrobiana del ajo fue la funcionalidad que motivó el empleo de este extracto natural como solvente en la síntesis de ZnO-NPs. El interés era propiciar y favorecer que las moléculas bioactivas del ajo se “adhirieran” al material inorgánico sintetizado y así poder potencializar las propiedades antifúngicas de estas NPs, que ya se han sido reportadas (Patiño-Portela et al., 2021).

La obtención de las ZnO-NPs se puede realizar utilizando diferentes métodos de síntesis, los cuales les proporcionan las propiedades fisicoquímicas requeridas para emplearse, por ejemplo, en productos de cuidado humano y ambiental. Es por ello que es de interés definir el potencial efecto tóxico que pueda ocasionar la exposición a estas NPs, de trabajadores y consumidores, y determinar si son seguras para los sistemas biológicos (Hussain et al., 2020; Patrón-Romero et al., 2020)

4.1.3 Toxicidad de las nanopartículas

La nanotoxicología, es una rama de la toxicología que aborda el tema de la toxicidad (impactos nocivos) producida por los nanomateriales (Oberdörster et al., 2005). Esta disciplina se encarga de indagar las interacciones de las NPs con los organismos vivos, especialmente la afectación a nivel molecular y celular (Shekhar et al., 2021). Además, la nanotoxicología investiga cómo las características fisicoquímicas de las NPs definidas por la ruta de síntesis, determinan su bioactividad (Sirelkhatim et al., 2015). Para ello, es necesario considerar que su toxicidad depende de cómo responde el cuerpo, la distribución y persistencia en los órganos y si existe algún mecanismo de eliminación (Adamcakova et al., 2014; Hussain et al., 2020).

La nanotoxicología ha puesto en evidencia cómo el tamaño pequeño de las NPs les brinda la capacidad de ser más reactivas biológica y químicamente, lo que influye en su toxicidad. Otros factores que determinan con su toxicidad son la concentración, su composición, la forma, la carga superficial, la estructura, la solubilidad, estado de agregación y vía de exposición (Shekhar et al., 2021). Concretamente el tamaño nanométrico les permitiría ingresar a las células y a las diversas organelas atravesando los tejidos y membranas celulares de manera efectiva, provocando citotoxicidad y genotoxicidad (Hackenberg et al., 2011, 2017), como se evidencia con la generación de especies de oxígeno y radicales libres, lo que puede causar daño mitocondrial, disfunción lisosomal y, en última instancia, mutación y muerte celular (Hussain et al., 2020). Concretamente, se ha reportado alteraciones en los sistemas vivos, como inflamación intersticial y toxicidad pulmonar, estrés del retículo endoplasmático, toxicidad hepática y toxicidad del sistema nervioso central, alteraciones inducidas por las NPs de carbono (Morimoto et al., 2013), plata (Huo et al., 2015) , oro (Alkilany & Murphy, 2010) y dióxido de titanio (Younes et al., 2015), respectivamente. También, se ha reportado alteración de la homeostasis del hierro; actividad citotóxica y estrés oxidativo en el corazón, el cerebro, el hígado y los pulmones, debido a la acción de NPs de óxido de hierro y

de ciertos polvos cerámicos (Laurent et al., 2014; D. Singh et al., 2016). Además, la exposición a NPs de sílice induce agregación de plaquetas, toxicidad reproductiva y fisiológica (Nemmar et al., 2015), mientras que la exposición a NPs de óxido de grafeno provoca la disminución de la viabilidad de las células (Robinson et al., 2011; Shekhar et al., 2021).

Específicamente, se ha observado que la administración de ZnO-NPs, en la ingesta de ratas hembra causó cambios en el análisis de sangre y lesiones patológicas en tejidos del estómago, hígado y riñones (Srivastav et al., 2016). Mientras, la ingesta de estas NPs en machos produjo efectos negativos en la función hepática, generando alteraciones histológicas en el hígado, enzimas del citocromo, enzimas hepáticas y estrés oxidativo (Tang et al., 2016). En otro trabajo, la ingesta en ratones macho ocasionó la pérdida del peso corporal, aumento del contenido de Zn en sangre y la expresión de genes ARNm relacionados con el metabolismo del zinc (Wang et al., 2016).

Aunque no existen límites restringentes de exposición establecidos para las ZnO-NPs, las investigaciones toman como referentes los límites de exposición promedio del ZnO en el aire en tiempos relevantes para el lugar de trabajo (8 y 10 horas). La OSHA (Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional de USA) indica que el límite permisible al humo y el polvo de ZnO es de 5 mg/m³ y de 15 mg/m³ para el polvo total en un turno laboral de 8 horas. Por otro lado, para el NIOSH (Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo de USA) el humo y polvo de ZnO permisible es de 5 mg/m³, para un turno laboral de 10 horas y a corto plazo es de 10 mg/m³ (humo) y 15 mg/m³ (polvo) de ZnO (New Jersey, 2007; Teck, 2018).

Para evaluar los efectos de las NPs, se utilizan métodos de exposición por vía dermatológica e ingesta oral e inhalatoria a biomodelos, siendo esta última la que se empleó en el presente estudio. Con relación a los biomodelos, se utilizan diversas especies de nematodos (Khare et al., 2015), peces (Connolly et al., 2016) y

mamíferos (Rajput et al., 2018). Dentro de estos últimos, los más empleados, son los roedores de laboratorio, esto debido a que comparten características anatómicas, histológicas y fisiológicas con los humanos (Nagar et al., 2022). Además, se definen tiempos de exposición dependiendo de la vida promedio del biomodelo, encontrándose los estudios agudos, exposiciones de corta duración (días o hasta una semana), y los crónicos, para los que la exposición es prolongada (meses, años o a veces puede durar toda la vida) (Moezzi et al., 2012).

4.2. Características de la cavidad nasal

Debido a que los ensayos que se realizaron en este trabajo, para evaluar la toxicidad de las ZnO-NPs, fue la exposición del biomodelo a la inhalación de las mismas, es útil indicar algunas de las características del órgano involucrado. La nariz es un órgano que pertenece al tracto respiratorio superior, presenta una estructura compleja y cumple diversas funciones importantes, debido a que, es el primer sitio donde el aire inhalado ingresa al organismo. Por lo cual, no solo es el órgano encargado del sentido del olfato sino también es responsable de filtrar, calentar y humidificar el aire inhalado antes de que ingresa al tracto respiratorio inferior (tráquea y pulmones) (Renne et al., 2007; Treuting et al., 2017) . Las fosas nasales, son consideradas como una “barredora mucociliar” que es capaz de filtrar, atrapar diversas partículas, vapores o gases a los que se ven expuesto normalmente los organismos (Ross, 2017). Teniendo en cuenta estas funciones, la nariz es considerada el primer mecanismo de defensa del sistema respiratorio y, por tanto, se encuentra vulnerable a sufrir daños agudos o crónicos causados por la exposición a tóxicos transportados por el aire (Harkema et al., 2006).

4.2.1 Anatomía de la cavidad nasal

La cavidad nasal es una estructura hueca, localizada en la región anterior de la cabeza, y constituida por dos porciones; una cartilaginosa y otra porción ósea. Se

encuentra dividida en dos conductos “de aire” o nasales “se extienden desde las aberturas de las fosas nasales (narinas) hasta su desembocadura (coanas) en la nasofaringe”. El aire inhalado fluye por las fosas nasales hacia el vestíbulo (revestido por epitelio escamoso), pasando a la parte más estrecha (la válvula nasal) e ingresando a la cámara nasal principal (revestido por epitelio respiratorio y olfatorio): Luego el aire se transporta hacia la nasofaringe (figura 1) (Chamanza & Wright, 2015; Treuting et al., 2017) y de allí por el resto de la faringe, la laringe, la tráquea y los bronquios hasta alcanzar los pulmones.

La cámara nasal principal, presenta estructuras denominadas cornetes (conchas), revestidas por un tejido mucoso. Los humanos tienen tres cornetes: superior, medio e inferior (figura 1b), mientras que, los ratones poseen cuatro cornetes etmoidales (revestidos por epitelio olfatorio) (1E, 3E, 5E, 6E) (figura 2a), además, de los complejos naso y maxiloturbinados (revestidos por epitelio respiratorio) ubicados en la parte proximal de la cámara nasal principal, (figura 1a) (Ruberte et al., 2017; Treuting et al., 2017). Sin embargo, presentan los mismos epitelios y por ello los roedores son considerados como una especie adecuada y apropiada para evaluar efectos tóxicos y extrapolar los resultados a humanos.

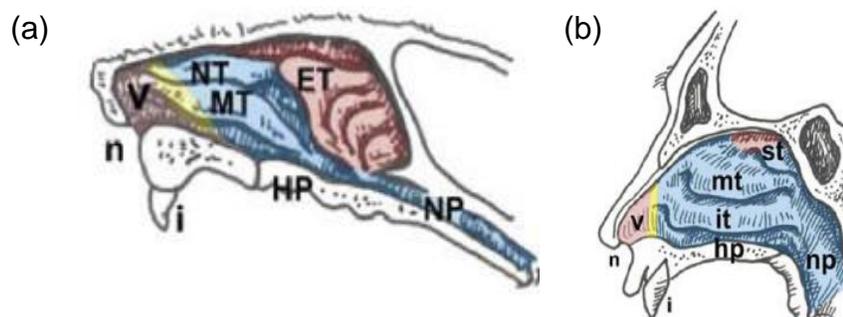


Figura 1. Dibujos esquemáticos de la sección sagital de los conductos nasales derechos (a) Ratón y (b) Humano. Los colores son los tipos epiteliales el rosa (escamoso), amarillo (zona de transición), azul (respiratorio) y rojo (olfatorio). n, fosa nasal; v, vestíbulo nasal; hp, paladar duro; i, diente incisivo; it, cornete inferior; mt, cornete medio; st, cornete superior; MT, maxiloturbinato; NT, nasoturbinato; ET, cornetes etmoidales; NP, nasofaringe. Fuente: (Treuting et al., 2017).

De acuerdo con la distribución de los epitelios que revisten la cavidad nasal, Young (1981) propuso por primera vez el método que se debe realizar para estudios toxicológicos en roedores de laboratorio. Postuló, que la cavidad nasal se debe seccionar transversalmente en diferentes sitios utilizando como puntos de referencia el techo de la boca o los dientes (figura 2 y 3), tal que: “el nivel T1, se toma inmediatamente posterior a los dientes incisivos, el T2 al nivel de la papila incisiva, el T3 a nivel de la segunda cresta palatina y el T4 a nivel de los primeros molares” (Treuting et al., 2017).

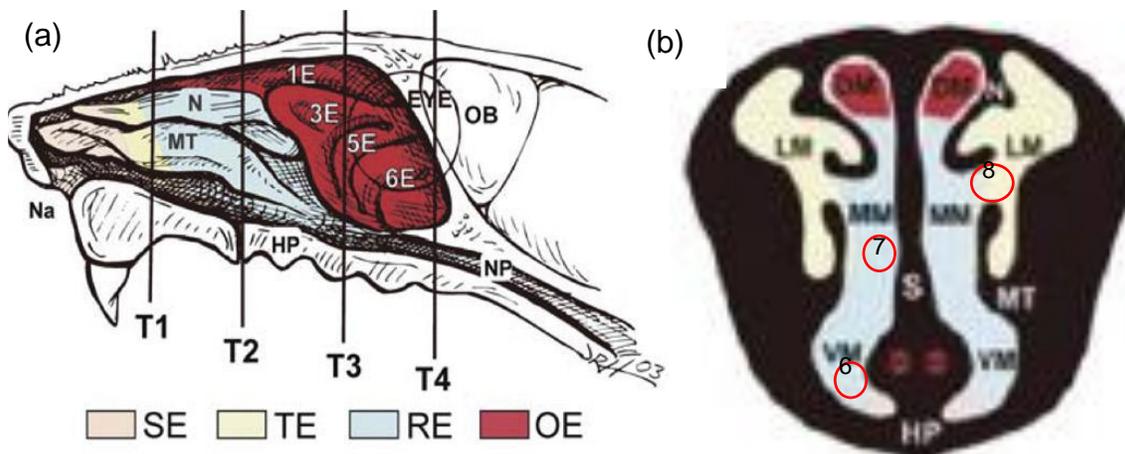


Figura 2. Esquema del pasaje nasal derecho de un ratón. (a) Se indican las superficies rostrales de las secciones transversales (T1-T4) tomadas en diferentes niveles; (b) Secciones transversal al nivel T1 de la cavidad nasal. DM, meato medial dorsal; HP, paladar duro; LM, meato lateral; MM, meato medial; MT, maxilloturbinado; N, nasoturbinado; S, tabique; VM, meato ventral; 1E–6E, cornetes etmoidales. Las áreas coloreadas representan los tipos de epitelios que revisten las regiones intranasales, SE (escamoso), TE (epitelio respiratorio transición), RE (respiratorio) y OE (olfatorio) (Treuting et al., 2017). Los diferentes tipos de epitelios respiratorios (círculos 6, 7 y 8). 6. Epitelio columnar ciliado respiratorio. 7. Epitelio respiratorio con abundantes células caliciformes. 8. Epitelio respiratorio transitorio. Fuente: (Treuting et al., 2017).

4.2.2 Histología del epitelio nasal respiratorio (NRE)

Para determinar el efecto de las ZnO-NPs inhaladas por el biomodelo, sobre el epitelio nasal respiratorio, se utilizó la histología, la cual permite identificar las partes de las células y los tipos de células que componen los tejidos. Además, la histología proporciona la información necesaria para establecer si los tejidos se encuentran en condiciones sanas o si por el contrario presentan patologías, alteraciones o cambios (Ross, 2017). Uno de los métodos más utilizados es la tinción de hematoxilina-eosina (técnica H-E). El tinte hematoxilina tiñe de violeta azulado intenso los núcleos, mientras el tinte de eosina tiñe rosa anaranjado el citoplasma, el tejido conjuntivo y otras estructuras que rodean la célula. Esta técnica se denomina como coloración general o gold estándar, es utilizada como primera coloración de diagnóstico (Salazar & Moreno, 2016). Además, es una técnica económica y sencilla de ejecutar.

Por otro lado, el epitelio nasal respiratorio (NRE), se encuentra ubicado “en la zona proximal de la cámara principal nasal” (figura 1) (Treuting et al., 2017). En los ratones, el NRE recubre la parte media de la cara nasal y la parte central del tabique nasal (Ruberte et al., 2017), además, reviste la lámina propia y ambas estructuras conforman la mucosa. Su función principal es participar en un mecanismo de defensa contra moléculas extrañas que puedan ingresar al organismo y acondicionar el aire inspirado (Ross, 2017). Por lo tanto, se considera la primera defensa del sistema respiratorio.

El NRE, histológicamente se clasifica como un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado, constituido por células ciliadas, que recubren la superficie del epitelio tal que los cilios se ven como pelos cortos que se proyectan desde la superficie celular apical y actúan como una “barredora mucociliar” para eliminar pequeñas partículas inhaladas), células caliciformes (se extienden en el epitelio, sintetizan y secretan moco), células basales (“sirven como una población celular de

reserva que mantiene el reemplazo de células individuales en el epitelio”) y células columnares / cuboidales no ciliadas (Ross, 2017; Ruberte et al., 2017) (figura 3).

Subyacente al NRE se encuentra la lámina propia, es un tejido conjuntivo laxo, el cual presenta diversos tipos de células residentes que se encuentran relacionadas con el sistema inmune, como mastocitos, macrófagos y “células errantes transitorias que migran desde los vasos sanguíneos locales al responder a estímulos específicos” como los neutrófilos, basófilos y eosinófilos (leucocitos polimorfonucleares (PMN)), linfocitos y plasmocitos. Es decir, que el tejido conjuntivo es considerado el lugar “donde las células del sistema inmunitario enfrentan y destruyen a los agentes patógenos” o sustancias extrañas que ingresen al organismo (Ross, 2017).

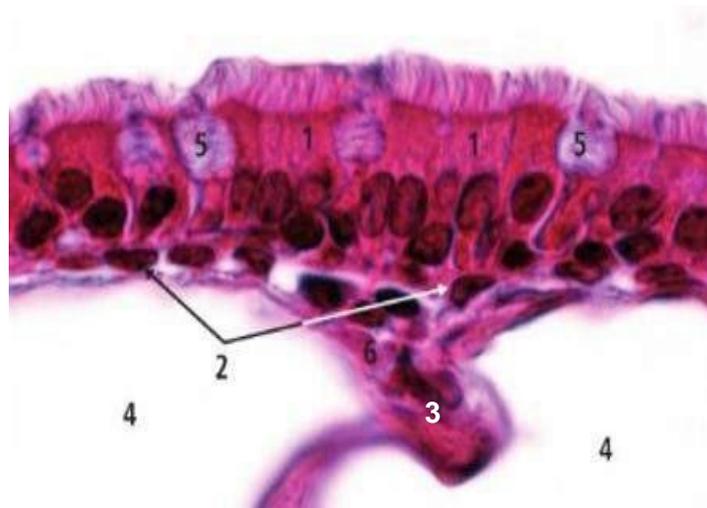


Figura 3. Micrografía del NRE con técnica H-E (100X). 1: células columnares ciliadas; 2: células basales; 3: Lámina propia; 4: plexo cavernoso nasal; 5: células de la mucosa caliciforme (células globulares) 6: capilar. Fuente: Ruberte et al., 2017.

4.2.3 Cambios histológicos del epitelio nasal respiratorio

Los cambios o transformaciones histológicas que se pueden identificar en el NRE son de tipo inflamatorio o morfométrico (Renne et al., 2007; Harkema et al., 2006):

- **Metaplasia escamosa:** como referencia, cada célula de la mucosa de la nariz posee aproximadamente 200 cilios, cada uno con una longitud de 4-7 μm . “La pérdida de cilios o disminución en su longitud en el epitelio respiratorio proporciona evidencia temprana adicional de lesión relacionada con la exposición” (Renne et al., 2007).

- **Hiperplasia del epitelio:** “La hiperplasia es el aumento anormal de tamaño que sufre un órgano o un tejido orgánico debido al incremento del número de células normales que lo forman”. La cual es considerada una alteración propia del epitelio, debido a que se está generando un aumento en la secreción de moco (Ross, 2017).

- **Aumento de células inmunitarias en la lámina propia o en la zona intranasal:** Comúnmente, las células del sistema inmune se encuentran en pequeñas cantidades en la nariz. Sin embargo, incrementan cuando se presenta una inflamación o alergia causada por sustancias extrañas que entran al organismo (Ross, 2017).

5. ANTECEDENTES

En la revisión realizada por Król et al. (2017), se indica que, a pesar de que las ZnO-NPs poseen propiedades novedosas para ser empleadas en múltiples campos, existe preocupación por el peligro o riesgo que estas puedan representar para el medio natural y los seres vivos. Es importante resaltar que Zn participa en funciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo humano y su deficiencia puede generar alteraciones en las funciones fisiológicas y metabólicas (Romero- Rosas & Cobarrubias-Gómez, 2020). A pesar de su importancia, “no existe un lugar anatómico específico que funcione como reserva de cinc y por ende no hay reservas convencionales en tejidos que pueden ser liberadas o almacenadas en respuesta a variaciones en la dieta” (Romaña et al., 2010). Por lo tanto, el Zn proveniente de la dieta es la que permite mantener un control homeostático del metabolismo del Zn (absorción y excreción), realizado por el epitelio intestinal y tejido pancreático. Las vías de excreción del Zn son la orina, sudor, semen y cabello, por lo que, no hay referentes donde se evidencie que el metabolismo celular del Zn puede generar cambios estructurales en células o tejidos. No obstante, se ha observado un exceso de Zn en el organismo de trabajadores expuestos a inhalación de vapores de ZnO, causando “un trastorno denominado fiebre por vapores de metal, cuyos síntomas son fiebre, dolor muscular, náuseas, tos y sabor metálico” (Wani et al., 2017).

Con base a lo mencionado, es de gran importancia determinar los posibles efectos tóxicos que puedan generar las ZnO-NPs. Se han realizado investigaciones que evaluaron los efectos sistémicos después de la inhalación a ZnO-NPs en humanos. En un estudio realizado por Monsé et al. (2018) pudieron demostrar la relación entre la concentración-respuestas de las ZnO-NPs y los efectos sistémicos, la concentración a $0,5 \text{ mg/m}^3$ no produjeron efectos relevantes, por el contrario, la exposición a concentraciones de $1,0$ y $2,0 \text{ mg/m}^3$ durante 4 horas, indujeron efectos sistémicos reversibles en las proteínas de fase aguda (proteína C reactiva (CRP), amiloide A sérico (SAA)) y neutrófilos en sangre, siendo más severos a $2,0 \text{ mg/m}^3$

de ZnO-NPs (Monsé et al., 2018). Por otro lado, los efectos en los mismos sujetos, demostraron cambios reversibles en parámetros de la inflamación de las vías respiratorias (neutrófilos e interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6), metaloproteinasa de matriz (MMP-9) e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP-1), pero, no hubo relación entre dosis-respuesta (Monsé et al., 2019).

En otro estudio más reciente, observaron que después de la exposición a 2,0 mg/m³ por 2 horas de ZnO-NPs, dos sujetos, presentaron aumentos leves de la temperatura corporal, no detectaron cambios significativos en los parámetros de sangre (neutrófilos, los monocitos y las proteínas de fase aguda) y esputo, al contrario, la exposición de micropartículas de ZnO en la misma concentración, ocasionó efectos más fuertes en los parámetros de sangre, pero los otros parámetros no presentaron cambios relevantes (Monsé et al., 2021). Con estos resultados se evidencia los efectos sistémicos que puede provocar la inhalación de ZnO-NPs, sin embargo, fueron reversibles y en comparación con el efecto de la inhalación de ZnO microscópico, no se comprueba que las ZnO-NPs sean más tóxicas, lo indican la necesidad de seguir indagando sobre los efectos de exposición de NPs.

A nivel de vías respiratorias, la preocupación sobre los efectos de las ZnO-NPs se ha evidenciado en estudios *In Vitro*, los cuales evaluaron la genotoxicidad y citotoxicidad de estas NPs en células de la mucosa nasal humana. La investigación realizada por Hackenberg et al. (2011), observaron daño del ADN en la concentración a 50 µg/mL y mostraron un aumento de la secreción de IL-8 indicando como consecuencia efectos proinflamatorios provocados por la exposición de ZnO-NPs en concentraciones de 5 y 10 µg/mL. Siendo el mismo énfasis, Hackenberg et al. (2017), demuestran que la viabilidad celular se vio reducida después de exposiciones en suspensiones de ZnO-NPs a una concentración de 5, 10 y 20 µg/mL, además, se exhibieron roturas o daño en la cadena de ADN a concentración de 0,1 y 1 µg/mL de ZnO-NPs.

En relación con, los efectos de la inhalación de ZnO-NPs en ratones de laboratorio (estudio *In Vivo*), se han reportado diversas investigaciones enfocadas en los efectos pulmonares. Adamcakova et al. (2014), mostraron, en un estudio subagudo y subcrónico el efecto de la inhalación de ZnO-NPs a una concentración promedio de 3.5 mg/m³ en ratones macho. Evaluaron la inflamación pulmonar, citotoxicidad, estrés oxidativo, mecánica pulmonar y algunos parámetros hematológicos. Según sus resultados, solo se evidencia un aumento significativo en el número de macrófagos totales y Zn en los pulmones. Por lo cual, concluyen que en la inhalación de ZnO-NPs causó inflamación pulmonar mínima, citotoxicidad o cambios. Además, los resultados sugieren que el tiempo, la concentración de exposición y el tiempo después de la exposición son parámetros determinantes para detectar los efectos tóxicos de las ZnO-NPs, puesto que, estas nanopartículas tienen la capacidad de viajar por el torrente sanguíneo y afectar a otros órganos, o pueden ser eliminadas.

Por otro lado, Huang et al. (2019) realizaron una investigación donde ratones fueron expuestos a ZnO-NPs por inhalación con una dosis de 2,5 mg/m³ y durante 5 horas. Los investigadores indicaron que, se presentaba una infiltración de linfocitos e histiocitos espumosos en el espacio alveolar alrededor del bronquiolo terminal, que fueron disminuyendo con el tiempo después de la exposición. Además, encontraron un aumento significativo en el recuento de neutrófilos y eosinófilos en el fluido del líquido bronco alveolar, por lo cual, concluyeron que la inhalación de ZnO-NPs indujo inflamación en las vías respiratorias del biomodelo.

En otro estudio más reciente, realizado por Vyslouži et al. (2020), expusieron a ratones a dos concentraciones de ZnO-NPs por inhalación durante un periodo subcrónico. Ellos evidenciaron que la exposición a concentraciones bajas presentó un aumento en la cantidad de Zn en el hígado, mientras que, a la exposición de concentración más alta influyó significativamente en el contenido de Zn en los pulmones. Además, detectaron cambios en la expresión de varios genes que están involucrados en la homeostasis del Zn, por ejemplo, transcripciones más altas de

Mt-2, Slc30a1, Slc30a5 y Slc30a7, mientras que, Mt1, Mtf, Slc30a4 Slc30a6 Slc30a9 no cambiaron significativamente. provocando así alteraciones en los sistemas biológicos. La homeostasis del Zn, se considera importante debido a que, el Zn participa como nutriente esencial en las funciones de diversas proteínas como la metaloenzimas, citocinas, factores de transcripción y de crecimiento para humanos y animales. Por ello, concluyen que un periodo de exposición prolongado tendría consecuencias más graves como la fiebre por humos metálicos.

A pesar de que hay poca información sobre reportes que describan, de manera precisa y cuidadosa, las lesiones que experimenta el NRE después de la exposición a atmósferas que contienen ZnO-NPs, se reporta efectos sobre epitelio olfatorio (EO). Gao et al. (2013), expusieron por instilación intranasal a ratas macho en suspensiones de ZnO-NPs obteniendo una concentración de 40 mg/mL, con un tamaño de 30 nm. Los resultados de la histología, revelaron respuestas inflamatorias con la presencia de infiltrado de células inmunitarias en la lámina propia del EO, también, identificaron dilatación de los vasos sanguíneos, desorganización y encogimiento de las células del epitelio columnar, pero al cabo de 7 días el EO se recuperó. Empleando microscopía electrónica de transmisión (MET), identificaron destrucción de las mitocondrias en las células epiteliales, lo que sugiere que la exposición a ZnO-NPs podría inducir disfunción metabólica de la energía celular (Gao et al., 2013).

Por otra parte, hay artículos que describen alteraciones histopatológicas propias que se observan en el NRE, por exposición a otros compuestos (Harkema et al., 2006). La exposición repetida a formaldehído indujo alteraciones en el NRE generando pérdida de las células mucosas y los cilios (metaplasia escamosa), hiperplasia o proliferación celular de las células mucosas e infiltrados neutrófilos focales (Chang et al., 1983; Monticello et al., 1990); otras sustancias que provocan cambios histológicos en la cavidad nasal son el ozono (H. Y. Cho et al., 1999; Harkema et al., 1987, 1999) y el cloro gaseoso (Wolf. K et al., 1995).

6. MARCO METODOLÓGICO

El estudio se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBUC), en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Materiales Cerámicos (CYTEMAC) y en la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) de la Universidad del Cauca. Su desarrollo comprendió seis etapas: Obtención y caracterización de ZnO-NPs por rutas química y verde, exposición de los biomodelos *Mus musculus*, a la acción de las ZnO-NPs considerando los dos métodos de síntesis empleados, obtención del NRE y procesamiento de las muestras biológicas del NRE, lectura de láminas histológicas del epitelio NRE y análisis estadístico.

6.1. Estandarización de las metodologías para la síntesis de ZnO-NPs por rutas química y verde

6.1.1 Síntesis de ZnO-NPs por ruta química.

Las ZnO-NPs por ruta química fueron obtenidas empleando el método de complejo polimérico (Pechini) (Salas et al., 2016). Para ello se utilizó 2.70 g de acetato de cinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Merck), reactivo que se empleó como precursor del catión cinc, y para propiciar las reacciones de esterificación y poliesterificación, características de este método de síntesis, se emplearon 2.60 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - Merck) y 3.10 g del etilenglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ - Merck).

El proceso de síntesis inicio calentando etilenglicol a 70°C mientras se adiciono lentamente ácido cítrico simultáneamente, en otro beaker, se diluyó el acetato de cinc dihidratado en 13,5 g de agua destilada. Ambas disoluciones se mantuvieron en agitación constante, hasta obtener un aspecto homogéneo, y posteriormente se mezclaron a temperatura ambiente, manteniendo la agitación constante, hasta obtener una mezcla con apariencia translúcida. A la mezcla resultante se le añadió, de manera controlada, hidróxido de amonio (NH_4OH -Merck) hasta alcanzar un

pH=9, acción que debió de favorecer reacciones de hidrólisis y condensación en el sistema. Durante la adición de NH_4OH se registró el volumen suministrado, el valor del pH correspondiente y la temperatura del sistema, esto con el fin de obtener la curva de valoración potenciométrica, así como información de la naturaleza endotérmica y/o exotérmica de las reacciones que ocurrían en el sistema, información que permitió controlar las condiciones de reacción y garantizar la reproducibilidad del proceso. (Benítez-Salazar et al., 2021).

A continuación, la mezcla a pH=9 se calentó a 130°C , durante 6 horas y en agitación constante, hasta que se conformó una resina de color blanco (resultado, principalmente, de las reacciones de poliesterificación). Posteriormente, esta resina fue sometida a un tratamiento térmico de 300°C , en un horno (Haced) durante 5 horas, obteniéndose un precalcinado de color marrón, el cual se macero en un mortero de ágata para pulverizar la muestra. Finalmente, el precalcinado molido se sometió a tratamientos térmicos empleando una mufla (Terrígeno), la cual se programó utilizando un cronograma de calentamiento predefinido hasta alcanzar una temperatura de 550°C , obteniéndose un polvo calcinado de color blanco (figura 4) (Benítez-Salazar et al., 2021).

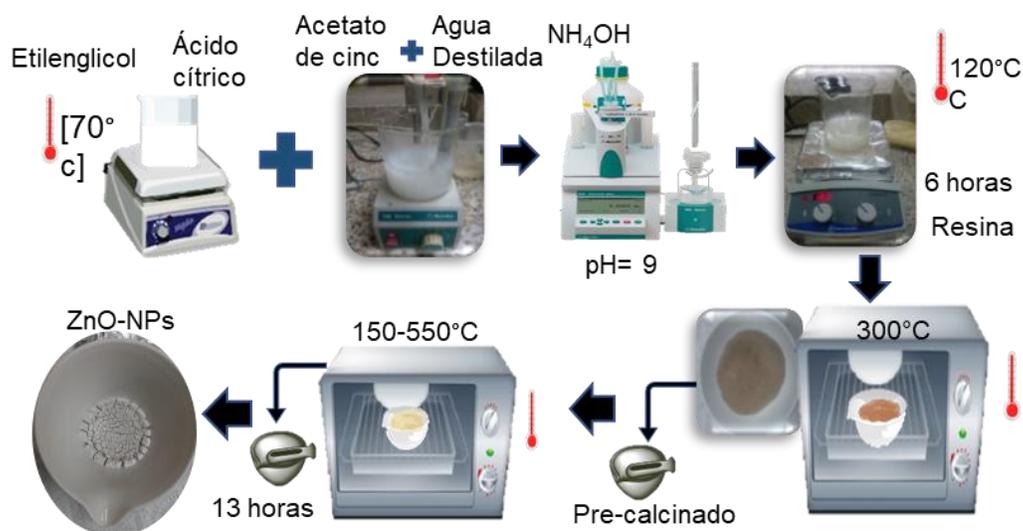


Figura 4. Etapas para obtener ZnO-NPs mediante ruta química.

6.1.2 Síntesis de ZnO-NPs por ruta verde (extracto de ajo como solvente).

Se considera el empleo de una síntesis verde, empleando extractos vegetales, para reducir los efectos contaminantes del proceso de síntesis y, además, garantizar la obtención de productos que sean más amigables con el ambiente. Es por esto que, en este estudio, se utilizó extracto de ajo (*A. sativum*) como solvente (Benitez-Salazar et al., 2021; Patiño-Portela et al., 2021)

Obtención del extracto natural de ajo.

En la síntesis verde empleada, se usó como solvente una suspensión triturada de bulbos de ajo (*A. sativum*), considerando que este producto biológico presenta actividad antifúngica y antibacteriana (Chen et al., 2018; Pizzorno et al., 2020). Los ajos, frescos y en buen estado, se adquirieron en un mercado local de la ciudad de Popayán. Estos fueron llevados al laboratorio de CYTEMAC de la Universidad del Cauca, donde se les retiró la cáscara externa y el tallo madre, se lavaron y desinfectaron. De estos ajos desinfectados, se pesó 20 gramos y se diluyeron en 200 mililitros (mL) de agua destilada, utilizando un proceso de trituración empleando una licuadora OSTER, por 5 minutos. A continuación, la suspensión se tamizó, obteniéndose lo que se denominó el extracto natural de ajo (parte acuosa), la cual se utilizó como solvente para obtener las ZnO-NPs (Benitez-Salazar et al., 2021).

Síntesis de las ZnO- NPs por ruta verde.

Para obtener las ZnO-NPs por ruta verde, se tomó como proceso base el método de precipitación controlada (Rodríguez Paéz et al., 2001). Para ello se disolvió 8,08 g del precursor del cinc (acetato de cinc dihidrato ((CH₃COO)₂Zn.2H₂O)) en 200 mL del extracto natural de ajo obtenido. A esta suspensión, en una agitación constante, se le adicionó hidróxido de amonio (NH₄OH), como agente precipitante, hasta que se alcanzó un pH básico, igual a 9. Posteriormente, la suspensión obtenida se dejó

reposar por un periodo de 24 horas. A esta suspensión se le realizó un proceso de lavado, el que consistió en eliminar, por decantación, el extracto vegetal sobrenadante y al sedimento obtenido se adicionó 200 mL de extracto natural de ajo, fresco y conformado el mismo día del lavado. La mezcla resultante se dispersó empleando un equipo de alta cizalla (ultraturrax T50), a 7.600 rpm durante 5 minutos; esta suspensión se dejó reposar por 2 minutos y se volvió a dispersar durante 5 minutos, bajo las mismas condiciones. La suspensión obtenida se dejó reposar durante 24 horas y al día siguiente se le realizó otro proceso de lavado, bajo las mismas condiciones. El procedimiento indicado se repitió en seis (6) ocasiones. Este procedimiento buscaba favorecer la conversión directa de los enlaces C-H en las estructuras deseadas y evitar el tratamiento térmico, como ocurre en la síntesis química convencional (ver Rodríguez-Páez et al., 2001).

Después de realizados los 6 lavados correspondientes, el sistema se sometió a un tratamiento de secado, empleando un horno a una temperatura de 60°C durante ~12 horas. Finalmente, el sólido resultante se macero en un mortero de ágata para obtener las ZnO-NPs sintetizadas por una ruta verde (figura 5)

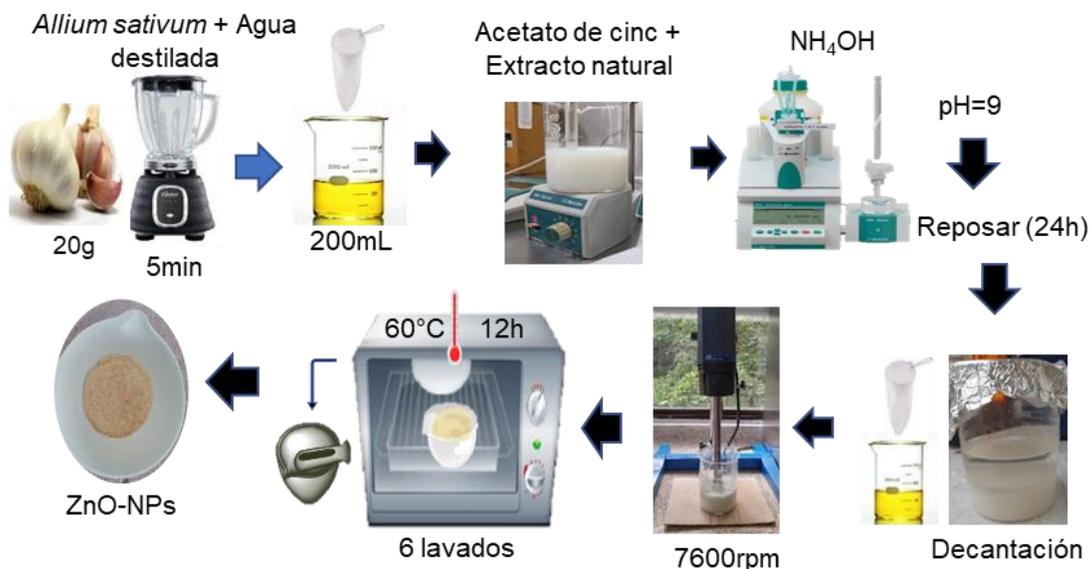


Figura 5. Proceso de obtención de ZnO-NPs mediante ruta verde.

6.1.3 Caracterización de ZnO-NPs obtenidas por ruta química y verde

Las ZnO-NPs obtenidas, empleado los dos procesos de síntesis descritos en el ítem anterior, fueron caracterizadas usando los siguientes métodos convencionales de análisis (Benitez-Salazar et al., 2021; Patrón-Romero et al., 2020; Pillai et al., 2020)

Espectroscopía Infrarroja con Transformada Rápida de Fourier (FT-IR):

Permitió identificar los grupos funcionales presentes en las muestras sintetizadas. Se fundamenta en la acción de la radiación infrarroja que incide sobre la muestra a analizar. Esta radiación activa modos vibracionales característicos del material sintetizado, lo que permite determinar la presencia de los grupos funcionales que conforman su estructura. Para obtener los espectros IR de las muestras de interés, estas se mezclaron con Bromuro de potasio (KBr) seco, en una concentración de 10% y 90% (p/p) respectivamente, y la mezcla se prensó. Luego, el sólido prensado en forma de pastilla, se colocó en el portamuestra del espectrofotómetro (Termo Nicolet IR 200) y se realizó el barrido correspondiente entre 400 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} .

Espectroscopía Raman: es una técnica complementaria a la espectroscopia IR, en la cual se analiza la transición electrónica entre los modos vibracionales permitidos en el sistema y a los que les corresponde ciertos niveles de energía del sólido (espectro fonónico característico del material). Esta técnica considera las dispersiones tipo Stokes y Anti-Stokes que se producen cuando los grupos funciones, después de ser excitados por la radiación incidente, se relajan y regresan a un estado energético fundamental. Los espectros Raman de las NPs sintetizadas se obtuvieron empleando el equipo Raman QE Pro-Raman 01629 con tiempo de integración de 1 segundo, perteneciente al departamento de física de la Universidad del Cauca.

Difracción de Rayos X (DRX): esta técnica de caracterización brindó información de la naturaleza amorfa o cristalina del material sintetizado, así como de las fases

cristalinas presentes en él. En esta técnica, un haz de rayos X se hace incidir sobre la muestra y la interacción material – radiación genera picos de interferencia constructiva entre los rayos X dispersados por los planos característicos de cada material, a ángulos específicos. Por lo tanto, los picos que se generan se pueden comparar con patrones estándares de bases de datos, lo que permite identificar las fases cristalinas del material sintetizado. Para ello, se empleó un equipo Bruker modelo D8 ADVANCE con Geometría DaVinci, Registro de datos en el rango de $2,0^\circ$ (2θ) a 70° (2θ), tiempo por paso 0,6 s, paso: $0,02035^\circ$ (2θ) (Tiempo duración medida 30 minutos).

Microscopía Electrónica: esta técnica permitió determinar el estado de aglomeración, la morfología y el tamaño de la NPs. Para obtener las micrografías con Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), se empleó el equipo JEOL JEM-2100, con filamento hexaboruro de lantano (LaB_6) y tensión de aceleración de 200 kV, operando en modos TEM, con resoluciones espaciales de 0,25 nm y 1 nm, respectivamente, y disponibilidad de cámaras de alta resoluciones para grandes áreas micrométricas y nanométricas (CMOS, 4kx4k). Por otro lado, para obtener las micrografías con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), las muestras se colocaron sobre “stubs” metálicos, con cinta adhesiva de carbón y recubiertas con oro. Se empleó el equipo 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. Adicionalmente, para obtener información semicuantitativa de los elementos químicos presentes en las NPs sintetizadas, se realizó el análisis de las mismas con Espectroscopia de dispersión de energía (EDS) empleando un detector EDAX APOLO X resolución de 126.1 eV (en. Mn $K\alpha$), utilizando el Software EDX Genesis.

6.2. Evaluación de la toxicidad de las Zn-NPs sobre el NRE de *Mus musculus*

Considerando los aspectos éticos requeridos para realizar el presente trabajo, en Colombia el uso y cuidado de los animales en experimentación se encuentra dentro de las leyes establecidas: “(1) Ley 84 de 27 de diciembre de 1989; Estatuto Nacional de Protección de los Animales. (2) Resolución 008430 de 4 de octubre de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; Título V, Artículos 87 al 93 y la (3) Ley 576 del 2000, por la cual se dicta el código de ética para el ejercicio profesional de la medicina veterinaria y la zootécnica” (Congreso de Colombia, 1989; Republica de Colombia, 1993; Vásquez López, 2007). El presente estudio, fue avalado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca con la resolución, Acta N° 6.1-1.25/008 de 9 de mayo de 2018.

6.2.1 Determinación de las concentraciones a aplicar en los tratamientos

Debido a que no se ha establecido una dosis estándar para evaluar la exposición a las ZnO-NPs fue necesario realizar ensayos preliminares para determinar las dosis a emplear en los experimentos. Para ello, se tomó como base la literatura que reporta los límites de exposición promedio a ZnO en el aire, a nivel industrial (New Jersey, 2007; Teck, 2018). Se emplearon 6 individuos del biomodelo *M. musculus* los cuales fueron expuestos en la cámara de nebulización de cuerpo entero (Castañeda Manquillo, 2022) durante 30 minutos, 2 veces al día por un periodo de una semana, a una dosis de 100 mg/m³ de ZnO-NPs obtenidas por ruta química. La concentración de 100 mg/m³ se consideró, desde el principio como una dosis alta, según lo reportado en la literatura, y fue utilizada con el objetivo de analizar el comportamiento de los individuos, los posibles cambios histológicos en el NRE y permitió definir el área a analizar en el NRE. Con base a los resultados previamente obtenidos del ensayo preliminar, se establecieron 3 dosis de exposiciones a concentraciones de 40, 15 y 6 mg/m³ (Castañeda Manquillo, 2022).

6.2.2 Preparación de suspensiones de ZnO-NPs obtenidas por ruta química y verde

Se prepararon suspensiones de ZnO-NPs obtenidas por ruta química y verde empleando como solvente solución salina (Sln NaCl 0,9%) y se obtuvieron a tres concentraciones: 40 mg/m³, 15 mg/m³ y 6 mg/m³. Para ello se prepararon 3 soluciones madres a concentraciones de 2000 mg/m³, 500 mg/m³ y 100 mg/m³, respectivamente. A partir de la última suspensión, se obtuvo la concentración alta (40 mg/m³), de la cual se partió para preparar la segunda concentración (15 mg/m³) y finalmente la última suspensión (6 mg/m³) (figura 6).

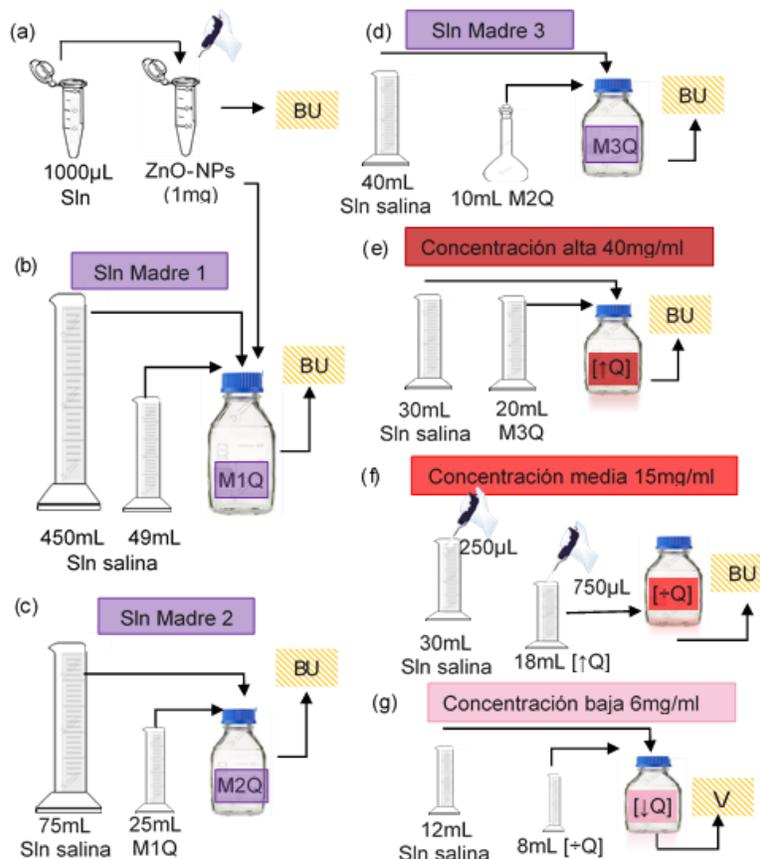


Figura 6. Diagrama de la preparación de las concentraciones a emplear en los grupos de tratamientos. De (a)-(g), se siguen de manera ordenada el diagrama presentado, se observa la cantidad en mililitros (mL) que se debe emplear de solución salina (Sln Salina), así como, de las concentraciones que se van elaborando a lo largo del proceso. Se realizaron 20 segundos de agitación con vórtex y 10 minutos de ultrasonido.

6.2.3 Mantenimiento de los biomodelos

Para realizar los ensayos de exposición a las ZnO-NPs sintetizadas, se emplearon ratones de la especie *M. musculus* (CFW, machos, 6 semanas de edad, Laboratorio Intermedio de Investigación Preclínica y Bioterio de Murinos - El bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle), los cuales fueron aclimatados durante 2 semanas previas al inicio del proceso de la experimentación. Durante el periodo de aclimatación y experimentación, los biomodelos fueron observados para detectar cambios de comportamiento, heridas o muerte (Romero-Fernández et al., 2016). Estos fueron alojados en jaulas de policarbonato (5 ratones por jaula) con encamado de procesado de madera Álamo (Aspen Shavings Ref. 322, del fabricante NEPCO, Northeastern Products Co.) manteniéndolos en una habitación donde la temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad de $55 \pm 7\%$, parámetros que fueron controlados, y con un ciclo de luz/ oscuridad de 12 horas. A los biomodelos se les proporcionó alimento (autoclavable de marca LabDiet, fórmula Laboratory Rodent Diet 5001*) y agua a voluntad (figura 7).

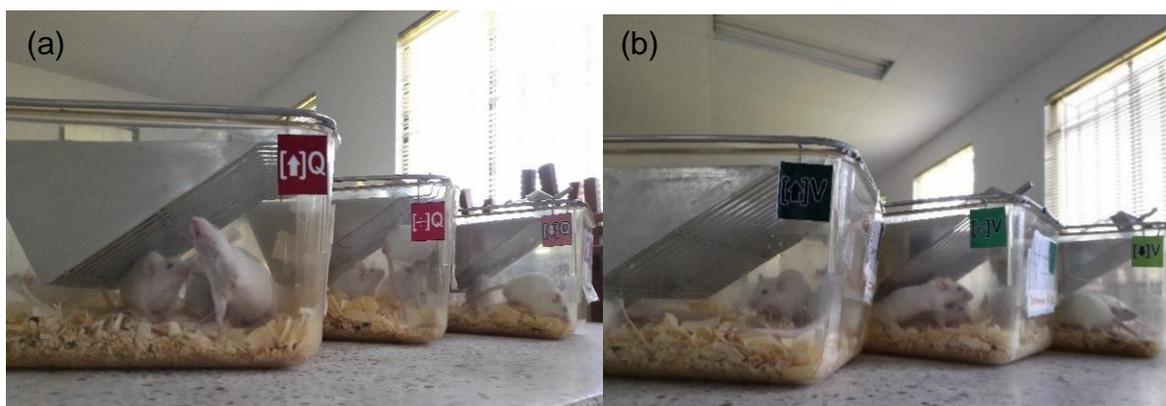


Figura 7. Biomodelos experimentales *Mus musculus* alojados en jaulas de policarbonato y expuestos a la inflamación de ZnO-NPs (a) ruta química y (b) ruta verde.

6.2.4 Exposición de los biomodelos *Mus musculus*, a la acción de las ZnO-NPs obtenidas por rutas química y verde

Cuando los individuos *M. musculus* alcanzaron su madurez sexual (8 semanas de edad), se dividieron en 3 grupos: 5 de control negativo (solución salina 0.9%), 15 para ruta química y 15 para ruta verde. Posteriormente, los individuos de ruta química y verde se dividieron en subgrupos (5 individuos por subgrupo) considerando la concentración de la suspensión de las ZnO-NPs a emplear: dosis baja (6 mg/m^3), dosis media (15 mg/m^3) y dosis alta (40 mg/m^3) (Teck, 2018; New Jersey, 2007). Los *M. musculus* fueron expuestos a atmósferas que contenían las ZnO-NPs en una cámara de inhalación de cuerpo entero (elaborada por un grupo de estudiantes de ingeniería física de la Universidad del Cauca) 30 minutos / día, 3 días / semana en un periodo de 2 meses (figura 8) (Castañeda Manquillo, 2022). Teniendo en cuenta que, la esperanza de vida de los *M. musculus* es de 2 años aproximadamente, este tiempo estipulado puede considerarse como una exposición crónica (Adamcakova et al., 2014; Vysloužil et al., 2020).

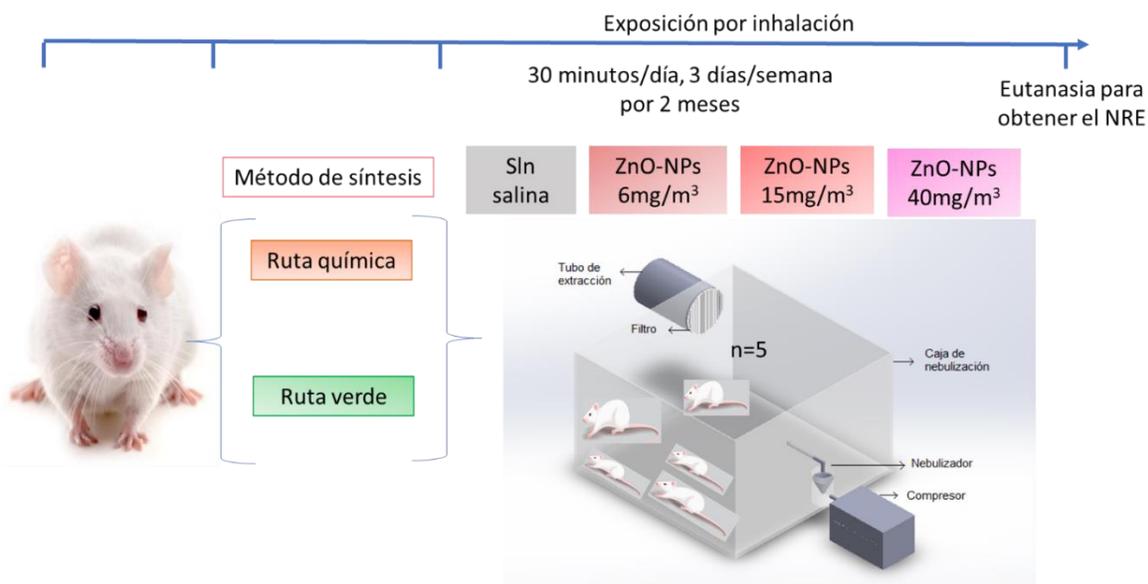


Figura 8. Diseño experimental estructurado para evaluar la toxicidad de las ZnO-NPs en biomodelos *Mus musculus*

6.2.5 Obtención de muestras del epitelio nasal respiratorio.

El procesamiento histológico de las muestras de las células del NRE de *M. musculus*, requirió de la eutanasia de los individuos, esto debido a que la cavidad nasal del biomodelo es demasiado pequeña para tomar una biopsia de la muestra usando un cepillo citológico. Por lo tanto, se realizó el procesamiento completo de la cabeza del biomodelo, teniendo en cuenta que los cortes se deben realizar con base a las estructuras ubicadas en la cavidad bucal superior del modelo experimental (ver figura 2).

Eutanasia de los biomodelos *Mus musculus*.

Para realizar la eutanasia de los biomodelos *M. musculus* se seleccionó un método que les ocasionara el menor sufrimiento, por ello, se les realizó la eutanasia aplicando analgésicos por vía intramuscular: ketamina (100mg/kg) y xilacina (20 mg/kg) y su posterior exanguinación con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo, durante el procedimiento (AVMA, 2020; Javeriana, 2021).

Extracción del tejido epitelial nasal del biomodelo *Mus musculus*.

En la revisión bibliográfica, permitió acceder a un protocolo estándar para obtener y procesar el NRE del ratón *M. musculus*. Por lo tanto, se procedió a emplear esta metodología que fue planteada por Young (1981), con algunas modificaciones. De igual forma, el procedimiento es mencionado y citado por otros autores como Ruberte et al., (2017) y Treuting et al., (2017).

De acuerdo al protocolo, para el procedimiento experimental, previamente se realizó una limpieza y lavado de la zona de trabajo y de los materiales empleados, respectivamente. De igual forma, se trabajó siguiendo con las normas de bioseguridad necesarias para el desarrollo de la presente investigación.

Específicamente, considerando el procedimiento, para establecer y practicar el protocolo que se utilizó para obtener la mucosa nasal de los biomodelos *M. musculus*, se procesaron, inicialmente, los 6 individuos expuestos a 100 mg/m^3 , en los ensayos preliminares, y para ello se ejecutaron los siguientes pasos.

Posterior a la eutanasia de los ratones y una vez realizado el correspondiente lavado de la cavidad nasal por medio de la abertura posterior del conducto faríngeo (figura 9(a)), se procedió a colocar, inmediatamente, la cabeza en formalina neutra taponada al 10 % (figura 9) y se dejó fijar aproximadamente 36 horas (Luna, 1968) (ver figura 9(b)), tiempo que se encuentra dentro del rango propuesto por Luna, 1968. Además, la cavidad nasal está compuesta de una parte ósea y otra cartilaginosa, debido a esto, el tiempo de fijación debe ser mayor para proceder a alcanzar un tiempo de penetración óptimo del fijador (formaldehído). Teniendo el tiempo adecuado, la muestra se pudo descalcificar y evitar daños en el tejido al momento de realizar el corte. Por lo anterior, se estableció que el tiempo de fijación para el tejido nasal fuera de 36 horas, con el objetivo de optimizar el procedimiento.

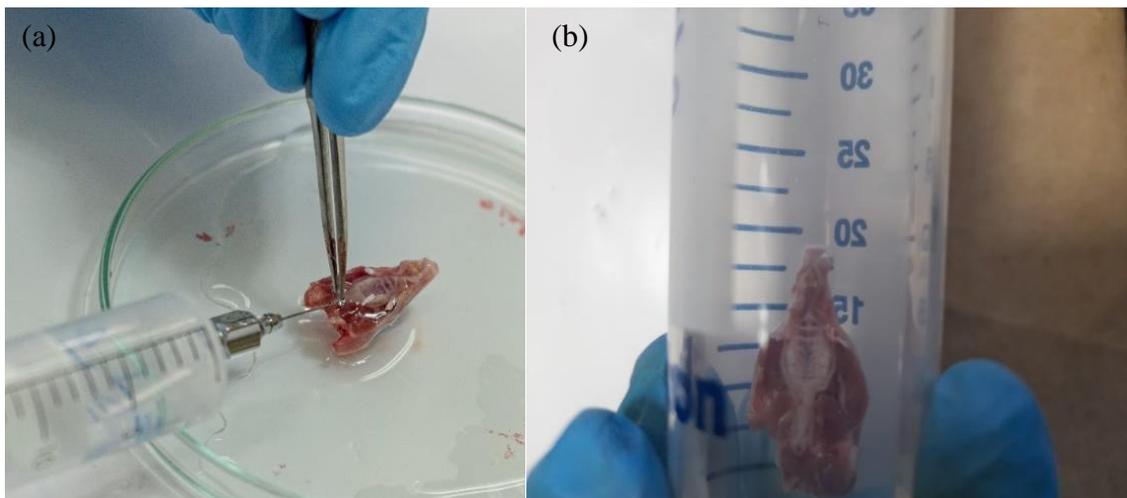


Figura 9. Proceso de fijación de la cabeza del biomodelo *Mus musculus* en formaldehído al 4%. (a) lavado de la cavidad nasal por el conducto nasofaríngeo y (b) observación del proceso de fijación de 36 a 70 horas

Pasado el tiempo de fijación, se procedió a descalcificar la muestra. Las muestras de los seis biomodelos se tomaron con unas pinzas y se sumergieron en una mezcla de 15 mL del descalcificador TBD 1- Ácido clorhídrico en 5 mL de agua destilada, durante un tiempo de 6 horas (figura 10). Después, a los tejidos se les realizaron dos lavados con alcohol, al 70 % (cada lavado de 10 minutos), para volver a colocar en 20 mL de formaldehído al 4%, tal que, pasado cierto tiempo, se procedió a realizar los cortes correspondientes para su procesamiento histológico.

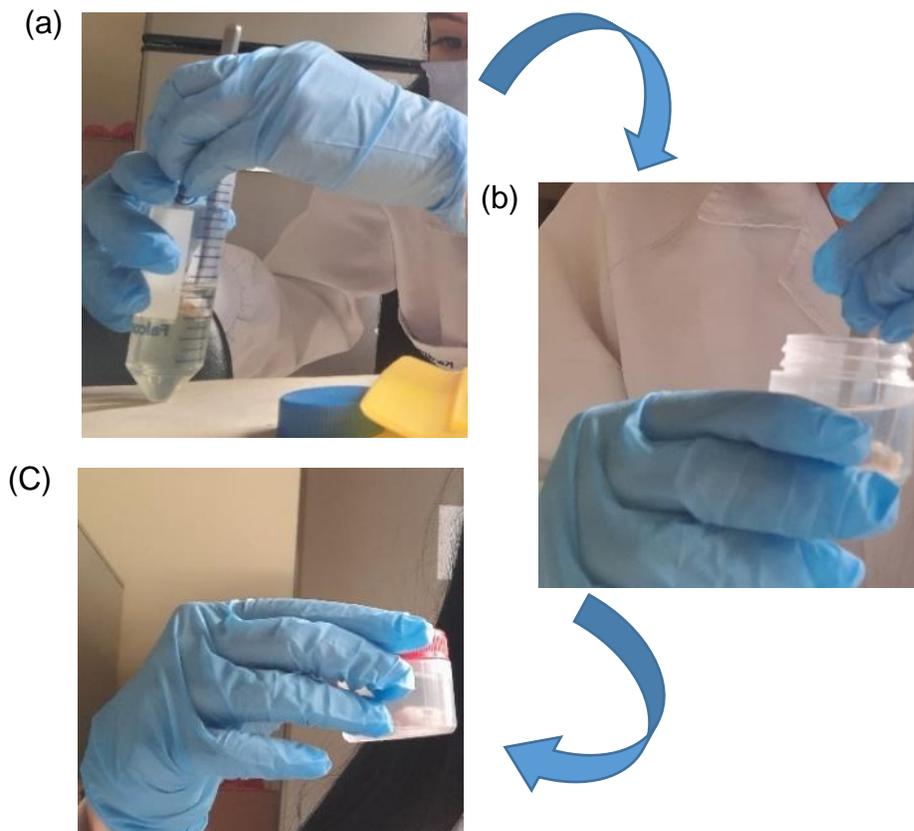


Figura 10. Descalcificación de la muestra. (a) manipulación cuidadosa de la cabeza del biomodelo con una pinza; (b) inmersión de la cabeza del ratón en la mezcla de TBD-1 y agua destilada y (c) descalcificación del tejido por un periodo de 6 horas.

La cabeza descalcificada se retiró de la formalina y se colocó sobre una tabla de cortar de manera que el techo de la boca (el paladar duro) quedará hacia arriba. A continuación, con un bisturí bien tajante, se realizaron diferentes cortes perpendiculares al plano del paladar duro y del tabique nasal. Se tomaron secciones

de la cavidad nasal que se encontraban ubicadas posterior a los dientes incisivos y antes de la primera cresta palatina (figura 11) (tabla 3). Se obtuvieron dos secciones correspondientes a la parte anterior y posterior de la cavidad nasal, rotuladas como Nivel T1 y T2, respectivamente

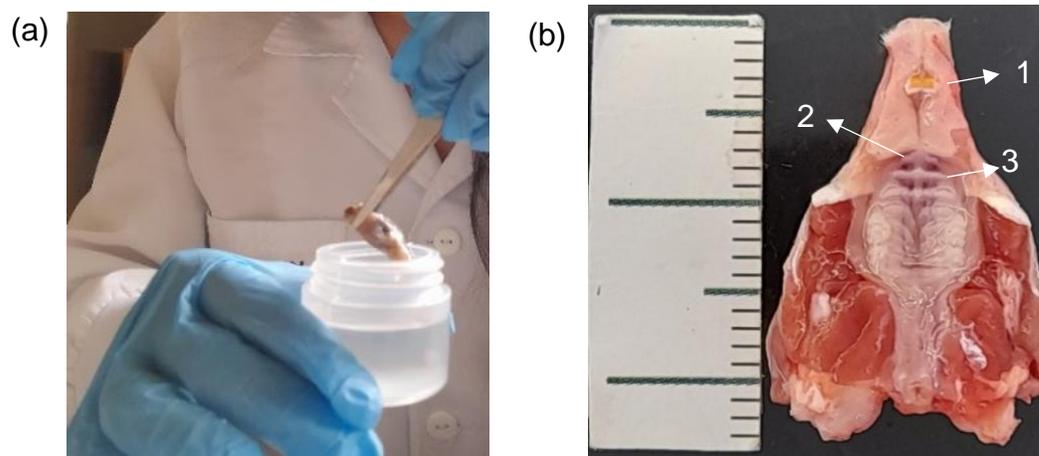


Figura 11. Corte de las muestras de la cabeza de los biomodelos. (a) Extracción de la cabeza del formaldehído; (b) Observación del paladar duro de la cabeza de los biomodelos e identificación de las zonas a cortar (1) Dientes incisivos superiores; (2) Papila incisiva y (3) Primera cresta palatina.

Tabla 1. Cortes realizados en los biomodelos *Mus musculus* expuestos a 100 mg/m³ de ZnO-NPs.

Ensayo	Cortes
1, 2, 4 y 5	-Corte 1: Anterior a la primera cresta palatina (Nivel T2). -Corte 2: 2-3 mm anterior a el primer corte (Nivel T1).
3 y 6	-Corte 1: Inmediatamente posterior a los dientes incisivos (Nivel T1). -Corte 2: A través de la cresta palatina (Nivel T2).

Procesamiento histológico del NRE del biomodelo *Mus musculus*.

El procesamiento y tinción de las muestras, se realizó con base los reportado por Luna (1968) y otros autores como Salazar & Moreno (2016) con algunas modificaciones realizadas por el técnico Albeiro Polanco Osorio (2022). Estos procedimientos se desarrollaron en el laboratorio de morfología de la Universidad del Cauca. Las modificaciones que se realizaron estaban relacionadas con la

concentración de los reactivos, el tiempo de tinción y la cantidad de reactivos a utilizar.

6.2.6 Lectura de láminas histológicas del NRE.

La lectura de las láminas histológicas se realizó empleando un microscopio Nikon-eclipse 80i. acoplado a una cámara (Nikon Digital Sight DS-2Mv) y se fotografiaron haciendo uso del programa captura de imágenes Nis Elements de la UME de la Universidad del Cauca (figura 12). Las alteraciones en el NRE después de la exposición a ZnO-NPs fueron determinadas y descritas por el médico especialista en anatomía patológica Ivonne Alejandra Meza-Cabrera (2022). Se realizó la descripción histopatológica del NRE de cada individuo y se determinaron como variables a evaluar: metaplasia escamosa, congestión vascular y células inmunitarias, en la lámina propia: Además, se consideraron los niveles de cantidad, asignando categorías: no presenta, escaso, moderado y abundante.



Figura 12. Observación de las placas histológicas de la cavidad nasal del ratón *Mus musculus*.

6.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se realizaron tablas de contingencia con base en la frecuencia de las patologías encontradas (metaplasia escamosa, congestión vascular y células inmunitarias) y el nivel de cantidad (no presenta, escaso, moderado y abundante), en otros casos, presencia o ausencia de la patología. Considerando la naturaleza de los datos, se aplicó el test G a los datos correspondientes a las patologías obtenidas de los biomodelos expuestos a NPs obtenidas por ruta química y ruta verde con el grupo control y se aceptó que existía asociación entre las variables estudiadas cuando el valor de p fue menor que 0,05. Para el análisis de los datos se utilizó el programa BioEstat Version 5.3 (SANTOS Dos Santos, 2007).

7. RESULTADOS

7.1. Adecuación de las metodologías para la síntesis de ZnO-NPs por rutas química y verde

Las rutas empleadas para sintetizar las ZnO-NPs son de gran importancia, debido a que estas determinan, de manera apreciable, las propiedades y características fisicoquímicas del material obtenido. En este estudio se sintetizaron las NPs utilizando tanto una ruta química y ruta verde, esto con el objetivo de determinar el cambio en las características y la toxicidad de las NPs obtenidas, considerando el método de síntesis. Teniendo en cuenta que la síntesis química involucra condiciones de reacción más agresivas, se optó por emplear una síntesis verde que fuera coherente con las políticas internacionales de cuidado del medio ambiente y afín a los principios de la química verde (Bandeira et al., 2020). Por otro lado, los efectos adversos de las NPs sobre los sistemas biológicos son relativamente desconocidos, por lo tanto, emplear una síntesis más amigable con el ambiente podría conducir a reducir su toxicidad e impacto ambiental (Kharissova et al., 2013).

7.1.1 Caracterización de ZnO-NPs sintetizadas

Grupos funcionales presentes en las muestras sintetizadas

En la figura 13(a) se observa el espectro infrarrojo del polvo de ZnO obtenido empleando el método Pechini, tratado a 550 °C. En el espectro se observa una banda a 3440 cm⁻¹ que se puede asociar a grupos hidroxilos (OH), así como una banda intensa en los 450 cm⁻¹ característica del ZnO (Salas et al., 2016).

Por otro lado, en el espectro IR de la muestra sólida correspondiente al sexto lavado, empleando el extracto de *Allium sativum* como solvente (figura 13(b)), se observan las bandas a 3450 cm⁻¹, que se puede atribuir a los grupos hidroxilos (OH), otra a

$\sim 2950\text{ cm}^{-1}$, que se podría asignar a enlaces CH y una a $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ que correspondería a grupos carbonilos (C=O). Las bandas alrededor de 1000 cm^{-1} se pueden asignar a los compuestos azufrados del ajo, como la aliína y sus derivados, específicamente podrían corresponder a modos vibracionales de los sulfóxidos S=O y a vibraciones de estiramiento de aminas primarias (C-N). Las bandas alrededor del 900 y 800 cm^{-1} se podrían asignar al enlace -C-H, deformación del =CH₂, y a las aminas primarias N-H del grupo amino de la aliína, respectivamente (Figuerola-López et al., 2015). Finalmente, se observa una banda a 450 cm^{-1} característica del ZnO.

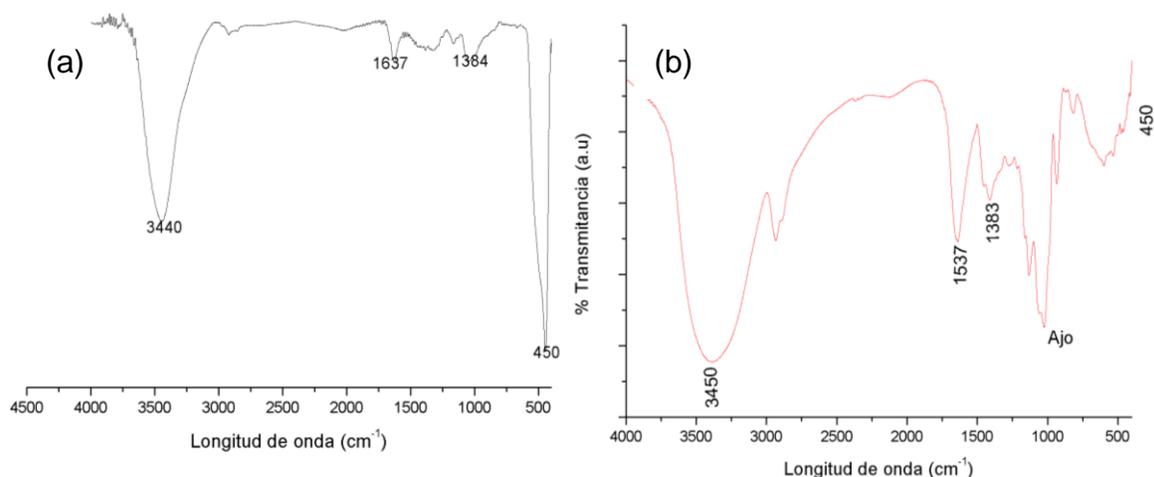


Figura 13. Espectros de IR de las muestras sólidas sintetizadas. (a) método de Pechini tratada térmicamente a 550°C y (b) sólido obtenido empleando una ruta química y un tratamiento de secado a 90°C .

Para complementar la caracterización de las ZnO-NPs sintetizadas se utilizó la espectroscopia Raman. Según la teoría de grupos, las ZnO-NPs tipo wurtzita, pertenecientes al grupo espacial $P6_3mc$ exhiben los modos polares y no polares de primer orden. Los fonones ópticos del centro de la zona de Brillouin predicen la existencia de los siguientes modos polares $\Gamma_{\text{opt}} = A_1 + 2B_1 + E_1 + 2E_2$, donde A_1 y B_1 son modos polares activos, que se dividen en modos fonónicos ópticos longitudinales (LO) y transversales (TO). El E_2 es un modo no polar que se divide en dos modos fonónicos ópticos de frecuencia alta (E_2^{High}) y baja (E_2^{Low}), los cuales

corresponden a la vibración de los átomos de oxígeno y a la de la subred de átomos de Zn, respectivamente (Musa et al., 2017).

En la figura 14(a) se muestra el espectro Raman de las ZnO-NPs obtenidas por la ruta química, destacándose el pico principal $E2^{High}$, a $\sim 441\text{ cm}^{-1}$, asociado a la vibración del oxígeno, característico de la estructura tipo wurtzita hexagonal del ZnO (Ahmad et al., 2021). Además, se observan los modos fonónicos ópticos transversales $A1(TO)$, asociados al pico ubicado en 367 cm^{-1} , y longitudinales $A1(LO)$, a $\sim 573\text{ cm}^{-1}$, tal que el ensanchamiento que presentan estos picos indicaría la existencia de defectos en la estructura cristalina del ZnO sintetizado (Alim et al., 2005). Según lo reportado por Cusco et al (2007), la banda observada a $\sim 240\text{ cm}^{-1}$ se puede asignar al modo $2E2^{low}$. En el espectro Raman también se observaron modos multifonónicos o de segundo orden que corresponderían a los picos ubicados a 640 cm^{-1} y $\sim 699\text{ cm}^{-1}$, los cuales se pueden asignar a una combinación del modo acústico transversal (TA) con el modo óptico longitudinal (LO) y al modo acústico longitudinal (LA) con modo óptico transversal (TO), respectivamente (Cuscó et al., 2007).

En la figura 14(b) se muestra el espectro Raman correspondiente a las ZnO-NPs sintetizadas utilizando la ruta verde estructurada en el presente trabajo. En este espectro se observa que las bandas y modos vibracionales asociadas a estas, son similares a los que presenta el espectro de Raman de las ZnO-NPs sintetizadas por ruta química, sin embargo se evidencia un leve desplazamiento de las bandas hacia bajos número de onda debido a la presencia del carbono contenido en las biomoléculas del ajo, empleado como solvente para la síntesis por ruta verde, tal que, al estas interactuar con la superficie del sólido se presentaría un intercambio de oxígeno por carbono, siendo este último más liviano. Con el espectro Raman, se logró confirmar que los sólidos obtenidos, mediante las dos rutas de síntesis, estos estaban constituidos por ZnO.

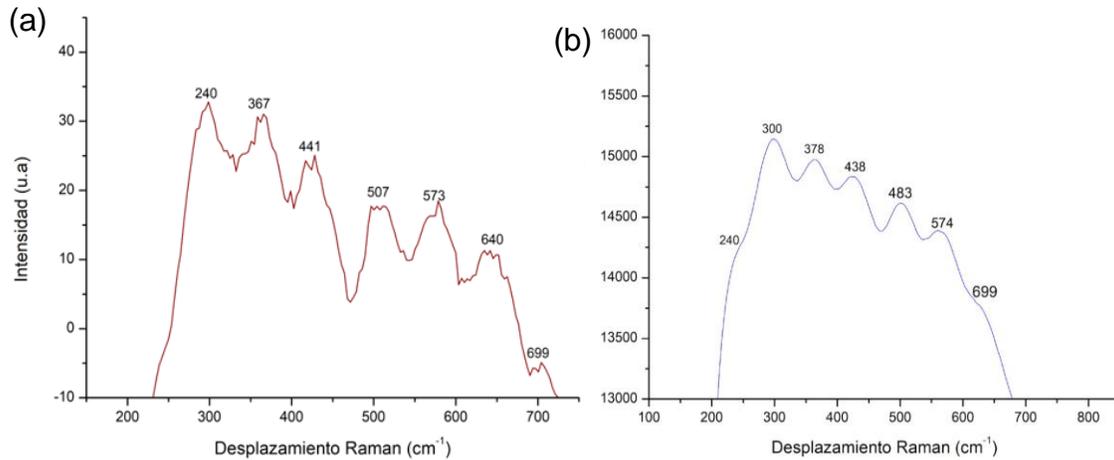


Figura 14. Espectro Raman de las ZnO-NPs sintetizadas mediante: (a) ruta química y (b) ruta verde.

Estructura cristalina de los materiales sintetizados

En la figura 15(a) se muestra el difractograma de ratos X de las NPs sintetizadas por el método de Pechini. La muestra presento una estructura cristalina, correspondiente al ZnO tipo wurtzita (PDF 96-230-0113), bien cristalizado como indican los esbeltos picos en el difractograma (figura 15(a)). Con los datos obtenidos, se pudo determinar el tamaño de cristalito del material sintetizado por ruta química. Para ello, se usó la ubicación y el ancho a la altura media del pico de mayor intensidad, que corresponde a los índices de Miller (101), en la ecuación de Debye Scherrer ($t_c = K\lambda / (\beta \cos(\theta))$), tomando un factor de forma $k=0.9$ y valores del ancho a la altura media de $\beta=334.8$ y longitud de la radiación de $\lambda=1.054060$ Å. El cálculo dio como resultado un tamaño de cristalito de ~ 41 nm. Por otro lado, el difractograma de las NPs obtenidas por ruta verde, presentó un “lomo” ampliamente ensanchado, característico de los materiales amorfos (figura 15(b)).

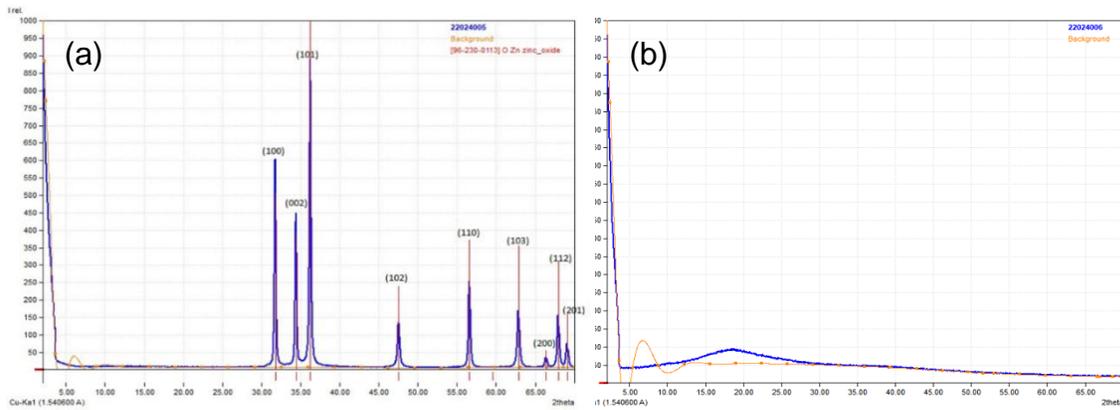


Figura 15. Difractogramas de rayos X correspondiente a las ZnO-NPs sintetizadas por medio de (a) ruta química y (b) ruta verde.

Tamaño y morfología de las ZnO-NPs obtenidas por ruta química y verde

En las micrográficas obtenidas con MET (figura 16), se puede apreciar que empleando el método de Pechini, se obtuvieron ZnO-NPs que presentaron morfología esferoidal, con un tamaño de partícula primaria del ~ 50 nm y con tendencia a formar aglomerados (figura 16(a)). Dado el tamaño de partícula obtenido, ~ 50 nm, y el tamaño de cristalito calculado usando los datos de DRX, ~ 41 nm, estas partículas primarias podrían ser monocristalinas. Por otro lado, las NPs obtenidas por ruta verde muestran una morfología laminar, de ~ 60 nm de largo y ~ 10 nm de ancho y alta tendencia a formar aglomerados (figura 16(b)).

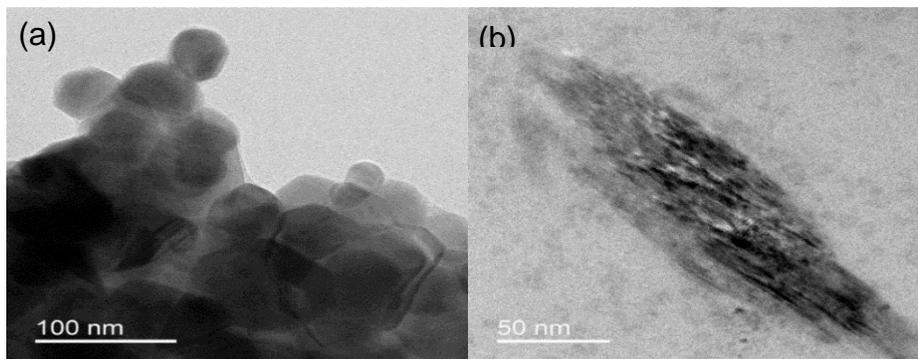


Figura 16. Micrográficas obtenidas con MET de las muestras de ZnO-NPS sintetizadas (a) método de Pechini y (b) precipitación controlada empleando el extracto de *A. sativum*

En las micrografías obtenidas con MEB, el ZnO obtenido empleando el método Pechini (figura 17(a)) presentó grandes aglomerados, del orden de las micras, así como pequeños, con un tamaño de 500 nm. Además, se evidencio que las partículas primarias presentaban un tamaño menor a los 100 nm. Por otro lado, en la figura 17(b) donde se muestra las micrografías obtenidas con MEB de la ZnO-NPs obtenidas por la ruta verde, se observó que las partículas presentaron una morfología irregular, con tendencia a formar tanto aglomerados blandos como duros (agregados), de tamaño micrométrico y con estructura laminar.

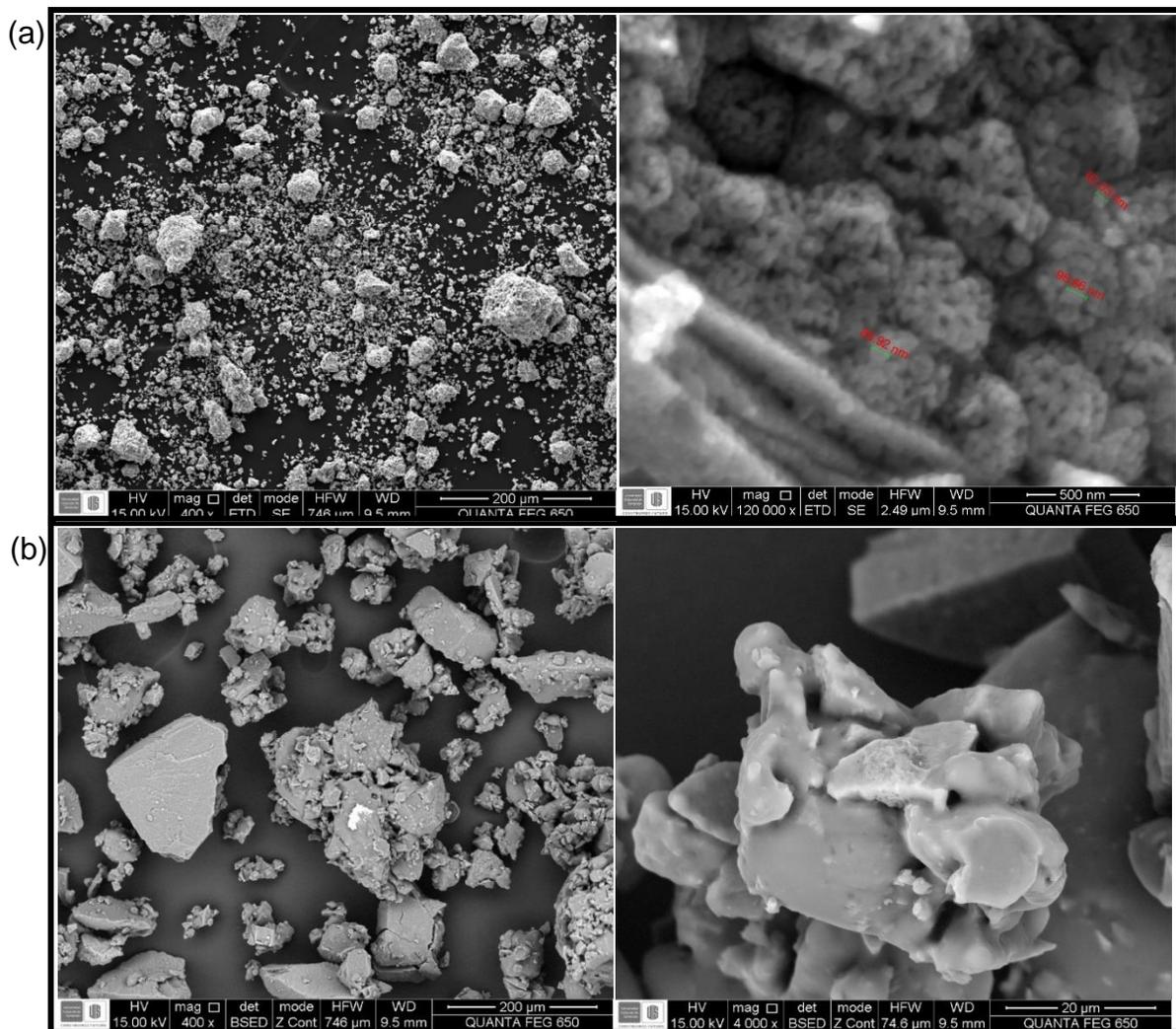
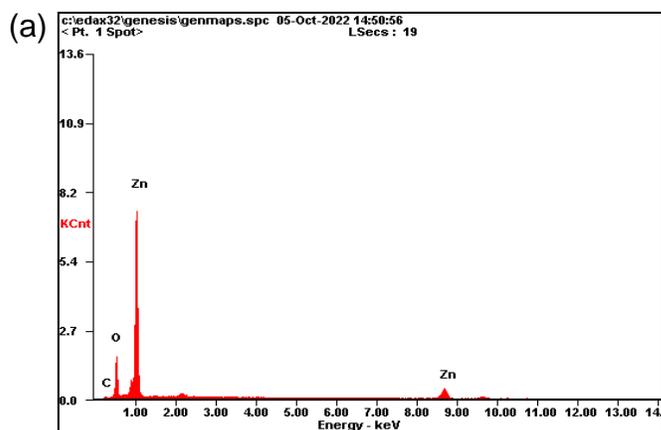
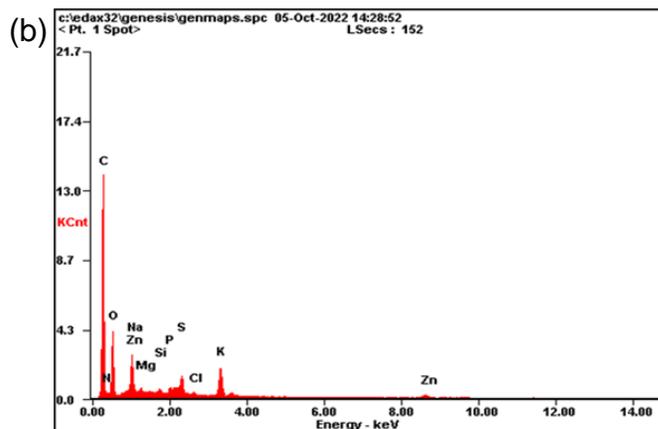


Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido de las ZnO-NPs obtenidas por (a) ruta química y (b) ruta verde.

Para tener más información de los óxidos sintetizados se empleó la espectroscopia EDS. Esta técnica permitió determinar la composición elemental de las muestras. En la figura 18(a) se observa el espectro EDS de las ZnO-NPs obtenidas por el método de Pechini, el cual indica que elementos principales que componen la muestra son el Zn, O y C. Con los datos composicionales de la tabla, se determinó que la muestra presentaba una buena estequiometría, teniendo en cuenta que la masa atómica del O es 15.99 u y la del Zn 65.38 u. Por otro lado, en la figura 18(b), se muestra el espectro EDS de las ZnO-NPs obtenidas por síntesis verde. En la tabla (figura 18(b)) se indica que la composición química de la muestra contiene Zn y O, así como elementos asociados al ajo, como: C, N, Mg, P, S, Na y K que harían parte de su composición química, debido a que forman parte de los nutrientes absorbidos por la planta.



<i>Elemento</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>C</i>	00.72	02.40
<i>O</i>	19.18	48.26
<i>Zn</i>	80.11	49.34



<i>Elemento</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>C</i>	55.75	70.03
<i>N</i>	03.04	03.28
<i>O</i>	20.27	19.11
<i>Na</i>	01.01	00.66
<i>Mg</i>	00.58	00.36
<i>Si</i>	00.54	00.29
<i>P</i>	00.88	00.43
<i>S</i>	02.64	01.24
<i>Cl</i>	00.38	00.16
<i>K</i>	06.39	02.46
<i>Zn</i>	08.54	01.97

Figura 18. Espectro EDS y composición química elemental de las ZnO-NPs sintetizadas por: (a) método Pechini y (b) ruta verde.

7.2. Establecimiento de condiciones experimentales en los biomodelos para la obtención de concentraciones de exposición de ZnO-NPs y muestras de tejido del epitelio nasal respiratorio

7.2.1 Obtención de la mucosa nasal del biomodelo *Mus musculus*

Las placas histológicas de los ensayos preliminares (los 6 biomodelos *M. musculus* expuestos a la atmósfera que contenía 100 mg/m³) se observaron, inicialmente, utilizando el estereoscopio para determinar cuáles placas contenían muestra del epitelio nasal respiratorio. Posteriormente, las placas seleccionadas, se observaron con el microscopio óptico. Los resultados obtenidos fueron contrastados con información obtenida de la literatura consultada sobre la histología de la cavidad nasal de ratón, específicamente en el libro titulado “Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging” (Ruberte et al., 2017) (figura 2).

Considerando las sugerencias enunciadas en la literatura consultada, se determinaron los cortes adecuados que se deberían realizar para obtener una buena muestra, con una gran cantidad de epitelio nasal respiratorio (Ruberte et al., 2017; Treuting et al., 2017). En los cortes realizados, en los ensayos 1, 2, 4 y 5 (tabla 1 y figura 19), se observó una buena correspondencia con la información reportada, por lo cual se estableció que los cortes se deberían realizar siguiendo las zonas establecidas en la tabla 1, en las muestras obtenidas de los biomodelos expuestos a la acción de las NPs. Por otro lado, los cortes realizados en los ensayos 3 y 6 (tabla 1), no presentaron una correspondencia con lo reportado en la literatura, o sea que no fue posible observar abundante epitelio respiratorio (figura 20). Posteriormente, las placas de los ensayos 1, 2, 4 y 5 se observaron con el microscopio óptico, a diferentes aumentos, con el fin de identificar los diferentes tipos de células que conforman el epitelio nasal respiratorio, así como, la lámina propia que se encuentra subyacente a este (figura 21).

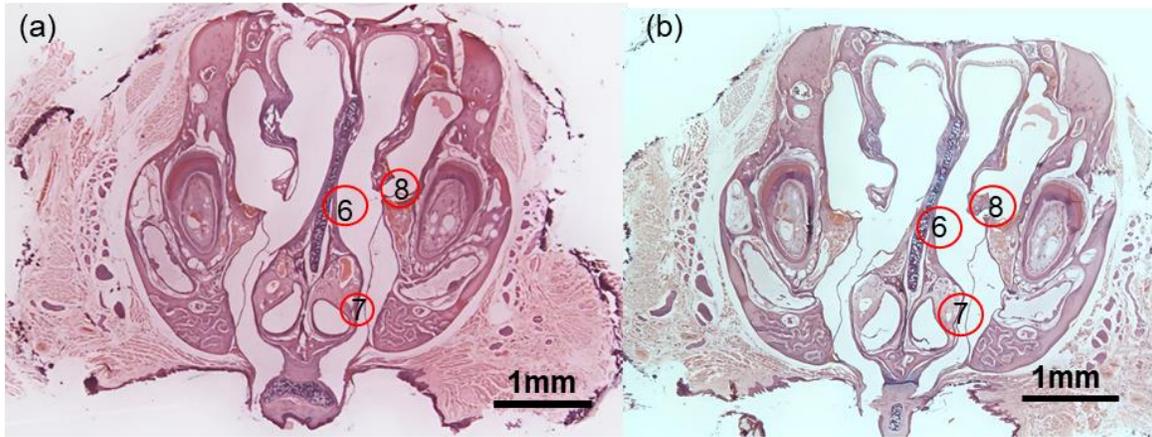


Figura 19. Observación en el estereoscopio de la sección transversal en el nivel T1. (a) Ensayo 1 y 2 y (b) Ensayo 4 y 5 (ver tabla 3). Se observan los diferentes tipos de epitelio respiratorio (círculos 6, 7 y 8). 6. [Epitelio columnar ciliado respiratorio. 7. Epitelio respiratorio con abundantes células caliciformes y 8. Epitelio respiratorio transitorio]. Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia.

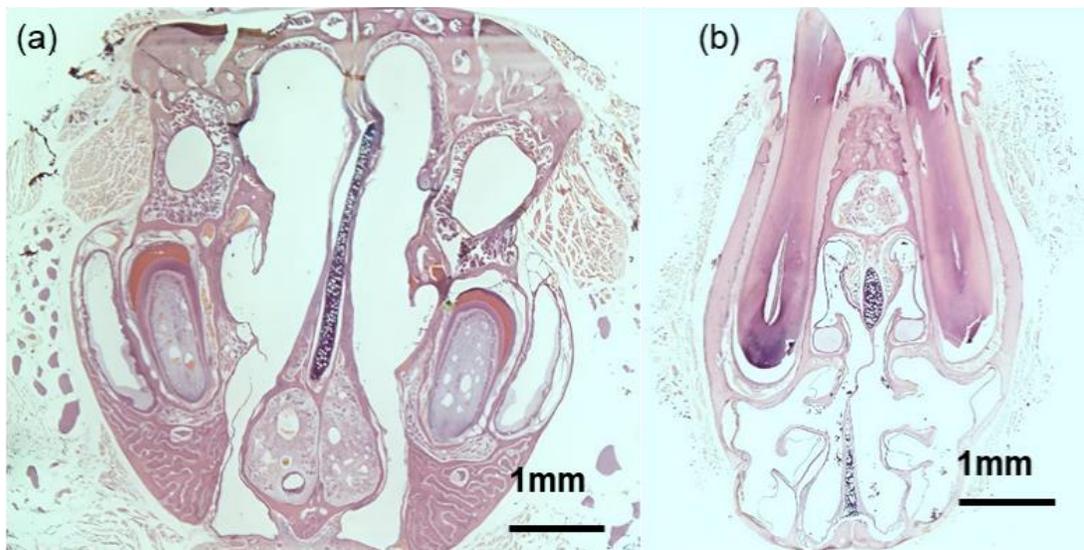


Figura 20. Observación en el estereoscopio de la sección transversal (a) Nivel T1, ensayo 3 y (b) Nivel T2, ensayo 6 (ver tabla 3). Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia.

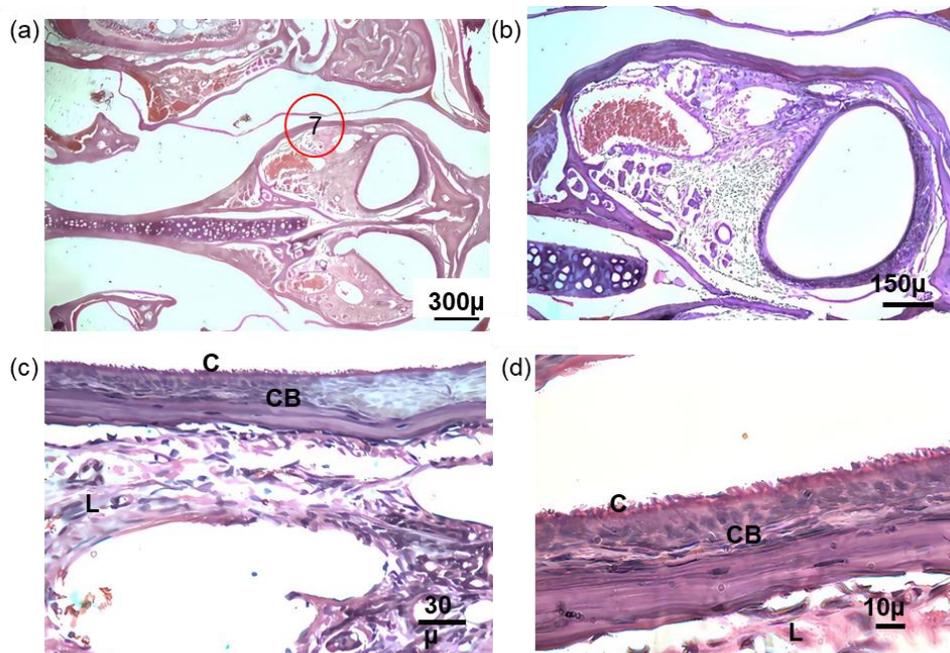


Figura 21. Ampliación del círculo 7 de la figura 19(a), correspondiente al epitelio respiratorio en diferentes aumentos 4X (a), 10X (b), 40X (c) y 100X (d). Se observan C: Células columnares ciliadas; CB: Células basales; L: Lámina propia. Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia.

7.2.2 Ensayos preliminares

La exposición de los biomodelos a 100 mg/m^3 de ZnO-NPs sintetizadas por ruta química, ocasionó en aproximadamente el 17 % de los biomodelos, escasos polimorfonucleares intranasales, escasos linfocitos subepiteliales y metaplasia del epitelio respiratorio, con desprendimiento de algunas células que se ubicaron en la cavidad nasal. Además, el 33% de los biomodelos presentaron escasa congestión vascular y en el 50% se observó que los senos paranasales presentaban abundante moco (figura 22). Por otro lado, se evaluó el comportamiento de los biomodelos en el período de tiempo que eran expuestos a las atmósferas enriquecidas con ZnO-NPs. Los biomodelos presentaron un nivel alto de estrés, al inicio la de inhalación muy activos, pero, transcurrido un tiempo, exhibieron cambio en la expresión facial, en el patrón respiratorio, irritación en la nariz y los ojos. Además, algo muy inusual y notorio fue el aumento de tamaño de las gónadas.

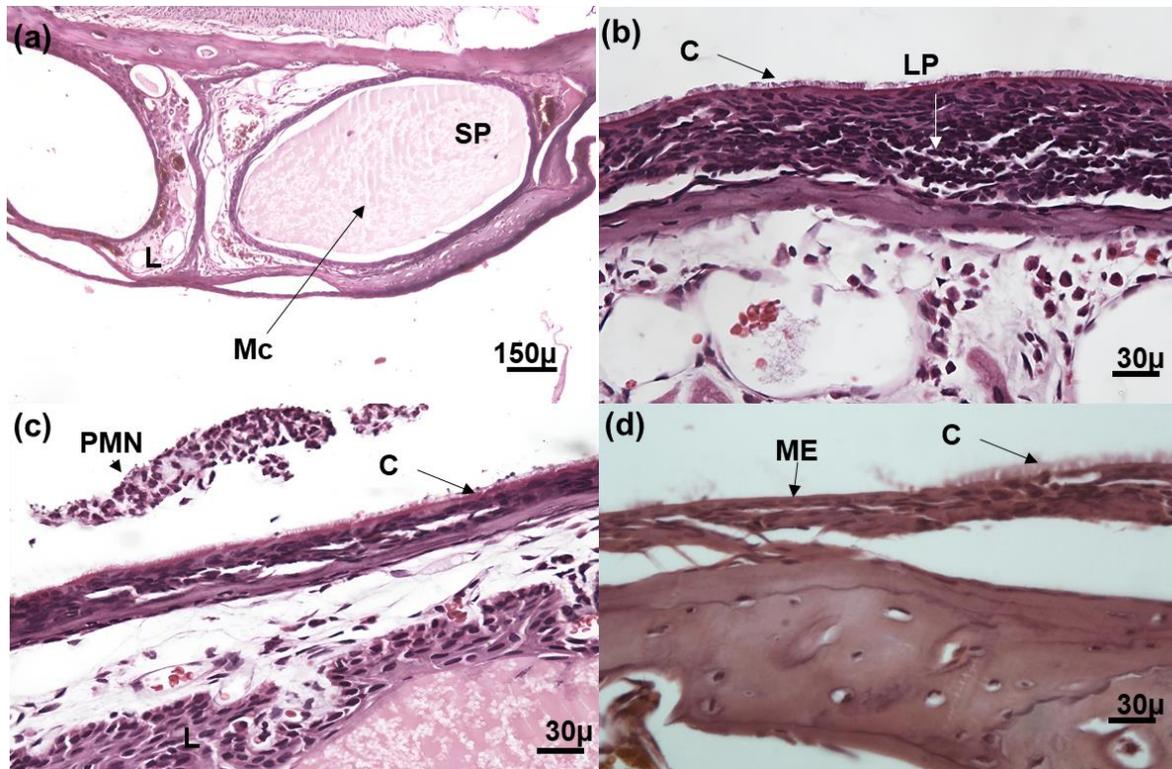


Figura 22. Micrografías ópticas del NRE de los biomodelos expuestos a $100\text{mg}/\text{m}^3$ (a) 10x (bcd 40x). células ciliadas (C); metaplasia escamosa (ME); polimorfonucleares (PMN), linfocitos y plasmocitos (LP); lámina propia (L); Senos paranasales (SP); Moco (Mc). Tinción H-E. Fuente propia

Estos resultados nos indican que, la exposición a una concentración de $100\text{mg}/\text{m}^3$ de ZnO-NPs, provocó histopatologías en el NRE con el reclutamiento de escasas células inmunitarias, lo cual indican, que se presentó una respuesta aguda debido al poco tiempo de exposición. Sin embargo, los biomodelos se observaron con cambios en el comportamiento y alto grado de estrés. Debido a este comportamiento inusual de los biomodelos, se reiteró que la exposición a $100\text{mg}/\text{m}^3$ es una dosis muy alta, no adecuada, para emplearla en la presente evaluación, dado que el estudio era de naturaleza crónica, con un periodo de exposición de dos meses, tiempo en el que se debía garantizar la supervivencia de los individuos. Además, según las normas bioéticas, es una obligación del investigador garantizar el menor dolor y estrés de los biomodelos para así, dentro de la actividad experimental, no generar errores en los objetivos de la investigación.

7.3. Análisis histológico del epitelio nasal respiratorio después de la exposición aérea de ZnO-NPs

La evaluación histopatológica del NRE de los biomodelos *M. musculus*, después de 8 semanas de exposición a atmósferas enriquecidas con las ZnO-NPs sintetizadas mediante ruta química y verde. Mostraron que, la acción de las NPs en el tejido nasal presentó un comportamiento diferente dependiendo de la ruta de síntesis y de la concentración, comparada con los controles. En la exposición a 0 mg/m³ (solución salina) se observó el NRE sin atipias compuesto por abundantes células ciliadas que recubren la cavidad nasal (figura 23(a)), sin embargo, el 40% presento presentó leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la luz de la nariz y solo el 20% presentó mastocitos en degranulación (M) (figura 24(a)).

Por otro lado, la exposición de los biomodelos a las ZnO-NPs sintetizadas por ruta química, indujo pérdida de cilios o metaplasia escamosa (ME) (figura 23(d)) e infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por células inflamatorias, representadas por polimorfonucleares (PMN) en acúmulos intranasales (figura 23(b y c)), abundante (100% de la población) - moderado y escaso (80% de la población) para los biomodelos expuestos a 40 mg/m³, 15 mg/m³ y 6 mg/m³, respectivamente (figura 26). Sin embargo, en los expuestos a la inhalación de ZnO-NPs obtenidas por ruta verde no se evidenciaron lesiones de ME y se observó escasos PMN intranasales para los biomodelos expuestos a 40 mg/m³ y 15 mg/m³. Mientras que, en la exposición a 6 mg/m³ se observó un comportamiento diferente, en menos del 50% de los biomodelos se evidencia abundante presencia de PMN (figura 26).

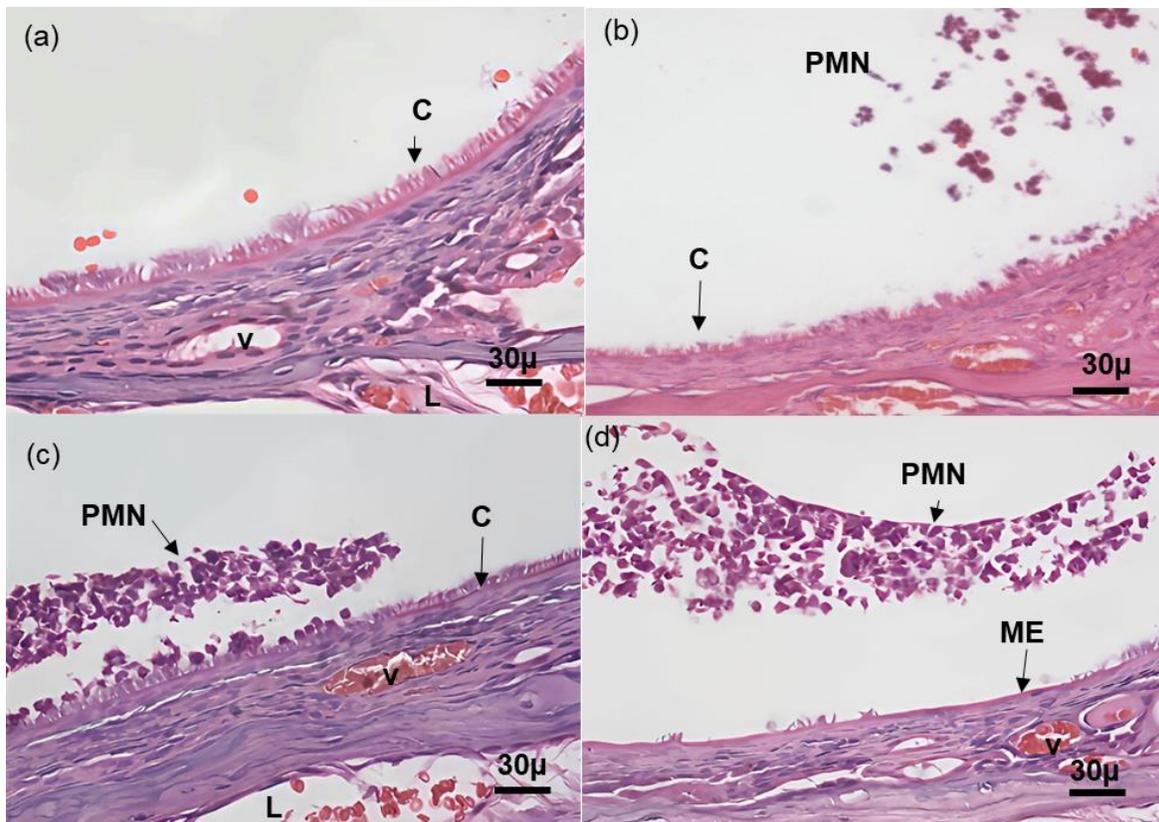


Figura 23. Evaluación histopatológica cualitativa y micrografías ópticas del epitelio nasal respiratorio de los biomodelos expuestos a: (a) 0 mg/m³; (b) 6 mg/m³; (c) 15 mg/m³ y (d) 40 mg/m³ de ZnO-NPs sintetizadas mediante ruta química (abcd- 40X). células ciliadas (C); metaplasia escamosa (ME); polimorfonucleares (PMN), vasos sanguíneos (V); lámina propia (L). Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia.

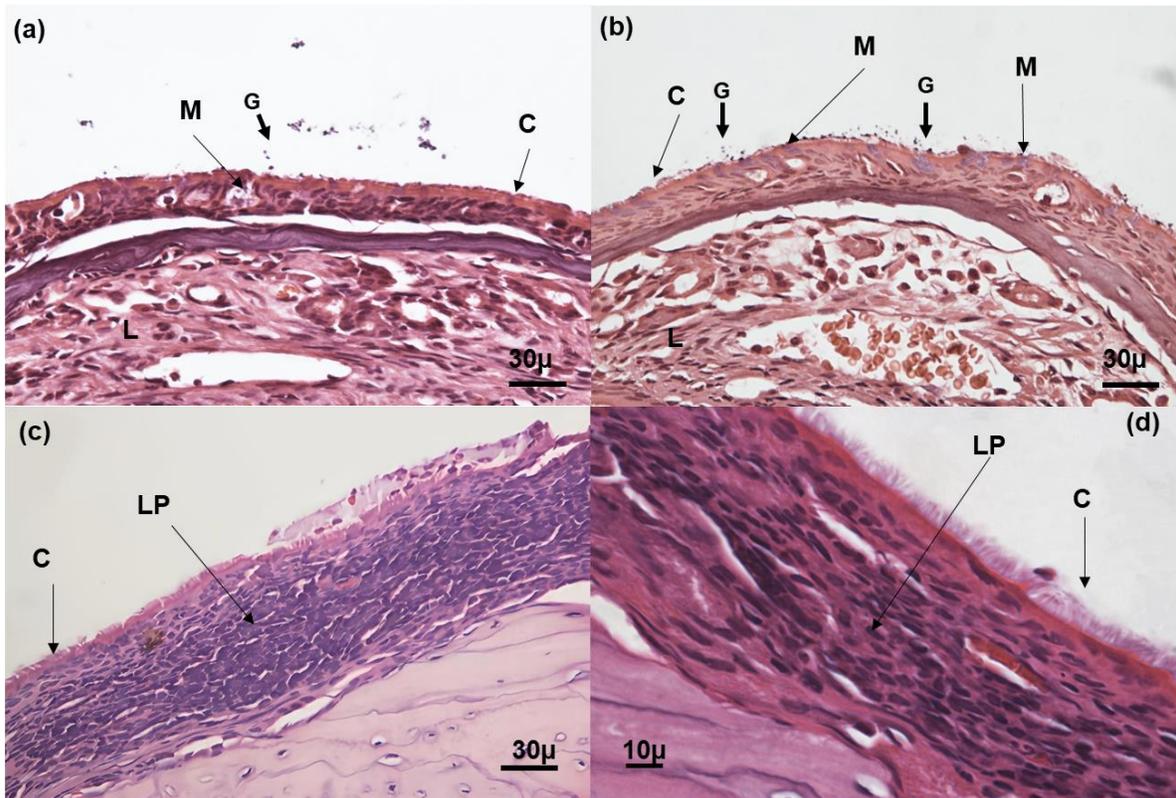


Figura 24. Evaluación histopatológica cualitativa y micrografías ópticas del NRE de los biomodelos expuestos a: (a) 0 mg/m³, (b) 40 mg/m³, (c) y (d) 6 mg/m³ ZnO-NPs sintetizadas mediante ruta química (abc- 40X; d-100X). Células ciliadas (C), Mastocitos (M); Degranulación de mastocitos (G); lámina propia (L). Linfocitos y plasmocitos (LP). Tinción con H-E. Fuente propia.

Otra alteración que se identificó fue la congestión de los vasos nasales o congestión vascular (CV). La inhalación de ZnO-NPs obtenidas por ruta química indujeron CV abundante y moderada en la exposición a 40 mg/m³ y 15 mg/m³, respectivamente. Sin embargo, la exposición a 6mg/m³ no presentó CV (figura 25). Para el caso de la exposición a NPs sintetizadas por una ruta verde, solo se evidenció escasa CV en la exposición a 40 mg/m³ (figura 26(c)).

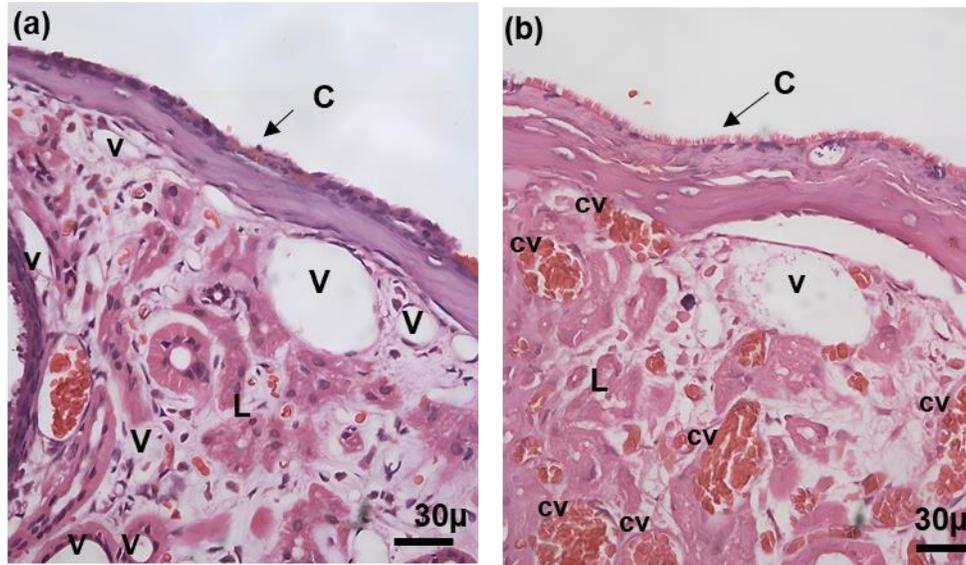


Figura 25. Micrografías ópticas del epitelio nasal respiratorio de los biomodelos expuestos a: (a) 6 mg/m^3 y (b) 40 mg/m^3 de ZnO-NPs sintetizadas mediante ruta química (ab- 40X). Se observa la presencia de vasos congestivos. células ciliadas (C); vasos sanguíneos (V); congestión vascular (CV); lámina propia (L). Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia.

Las histopatologías anteriormente descritas, fueron evaluadas y confirmadas empleando el análisis estadístico del test G. Según los resultados encontrados en las tablas 2, 3 y 4, se observaron diferencias significativas en las alteraciones de PMN, ME y CV con un p valor de <0.0001 , para los individuos expuestos a la inhalación de ZnO-NPs sintetizadas por ruta química en las tres concentraciones empleadas. Mientras que, en la exposición a las ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde, estas patologías no presentaron diferencias significativas, los valores de p fueron de 0.097, 0.104 y 0.972 para PMN, congestión vascular y metaplasia escamosa, respectivamente.

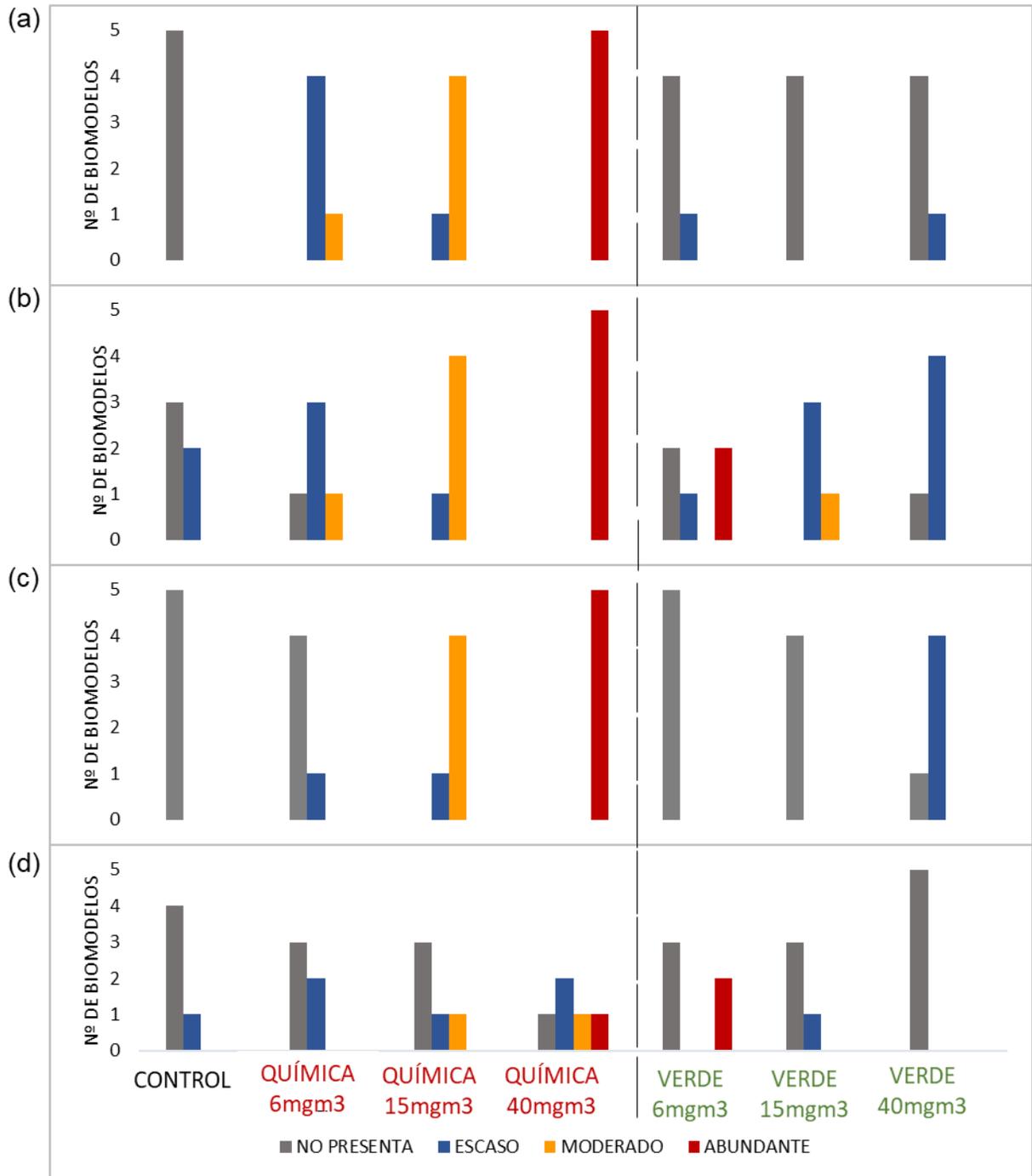


Figura 26. Gráfico de barras agrupado para comparar las lesiones histopatológicas provocadas por la exposición de *Mus musculus* a atmosferas que contenían ZnO-NPs por ruta química y verde: (a) metaplasia escamosa; (b) polimorfonucleares intranasales; (c) congestión vascular y (d) mastocitos en degranulación. Las alteraciones se categorizaron como escasa, moderada o abundante.

Tabla 2. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: polimorfonucleares en la luz de la cavidad nasal.

GRUPOS DE ESTUDIO	POLIMORFONUCLEARES				TOTAL	p
	NO PRESENTA	ESCASO	MODERADO	ABUNDANTE		
Control	3	2	0	0	5	< 0.0001*
Química 6 mg/m ³	1	3	1	0	5	
Química 15 mg/m ³	0	1	4	0	5	
Química 40 mg/m ³	0	0	0	5	5	
Verde 6 mg/m ³	2	1	0	2	5	0.0971
Verde 15 mg/m ³	0	3	1	0	4	
Verde 40 mg/m ³	1	4	0	0	5	
TOTAL	7	12	6	7	34	

* $p < 0,05$ significativamente diferente de los animales expuestos a 0 mg/m³ de ZnO-NPs (Test G)

Tabla 3. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: ausencia de cilios o metaplasia escamosa del NRE.

GRUPOS DE ESTUDIO	METAPLASIA ESCAMOSA				TOTAL	p
	NO PRESENTA	ESCASO	MODERADO	ABUNDANTE		
Control	5	0	0	0	5	< 0.0001*
Química 6 mg/m ³	0	4	1	0	5	
Química 15 mg/m ³	0	1	4	0	5	
Química 40 mg/m ³	0	0	0	5	5	
Verde 6 mg/m ³	4	1	0	0	5	0.9724
Verde 15 mg/m ³	4	0	0	0	4	
Verde 40 mg/m ³	4	1	0	0	5	
TOTAL	17	7	5	5	34	

* $p < 0,05$ significativamente diferente de los animales expuestos a 0 mg/m³ de ZnO-NPs (Test G)

Tabla 4. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: congestión de los vasos sanguíneos

GRUPOS DE ESTUDIO	CONGESTIÓN VASCULAR				TOTAL	p
	NO PRESENTA	ESCASO	MODERADO	ABUNDANTE		
Control	5	0	0	0	5	< 0.0001*
Química 6 mg/m ³	4	1	0	0	5	
Química 15 mg/m ³	0	1	4	0	5	
Química 40 mg/m ³	0	0	0	5	5	
Verde 6 mg/m ³	5	0	0	0	5	0.104
Verde 15 mg/m ³	4	0	0	0	4	
Verde 40 mg/m ³	1	4	0	0	5	
TOTAL	19	6	4	5	34	

* $p < 0,05$ significativamente diferente de los animales expuestos a 0 mg/m³ de ZnO-NPs (Test G)

Otra histopatología observada en el NRE fue la degranulación de mastocitos (M). En la exposición a ZnO-NPs obtenidas por la ruta química se evidenció que, en la exposición a 40 mg/m³ se presentó M (figura 24(b)). Sin embargo, en esta población, se observaron las cuatro categorías: no presenta (20%), escaso (40%), moderado (20%) y abundante (20% de la población), mientras que la exposición a 15 y 6 mg/m³ se presentaron las tres y dos últimas categorías, respectivamente (figura 26 (d)). Por otro lado, en la exposición a NPs obtenidas por la ruta verde solo en la exposición a 6 mg/m³ se observó abundante M en menos del 50% de la población (figura 26d)). La presencia de M en el NRE, presentó para el test G un *p* valor de 0.5098 y 0.4494 para la exposición de los individuos expuestos a ZnO-NPs sintetizadas por ruta química y ruta verde, respectivamente (tabla 5). Estos resultados indican que la alteración no fue significativa para las dos rutas de síntesis.

Tabla 5. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: mastocitos en degranulación.

GRUPOS DE ESTUDIO	MASTOCITOS				TOTAL	<i>p</i>
	NO PRESENTA	ESCASO	MODERADO	ABUNDANTE		
Control	4	1	0	0	5	0.5098
Química 6 mg/m ³	3	2	0	0	5	
Química 15 mg/m ³	3	1	1	0	5	
Química 40 mg/m ³	1	2	1	1	5	
Verde 6 mg/m ³	3	0	0	2	5	0.4494
Verde 15 mg/m ³	3	1	0	0	4	
Verde 40 mg/m ³	5	0	0	0	5	
TOTAL	22	7	2	3	34	

**p* < 0,05 significativamente diferente de los animales expuestos a 0 mg/m³ de ZnO-NPs (Test G)

Por otro lado, se evidenció la presencia de células del sistema inmune en el NRE y en la lámina propia en los *Mus musculus*, expuestos a la inhalación de ZnO-NPs obtenidas por ruta verde (figura 27 y 28) que no estaban presentes en las muestras de biomodelos expuestos a las atmósferas de ZnO-NPs sintetizadas por ruta química. Se observó un material basófilo grande circular (que podrían ser células

inflamatorias, pero no se logró identificar los núcleos) intranasales alrededor del epitelio en los biomodelos expuestos a 40 mg/m³, 15 mg/m³ y 6 mg/m³ de ZnO-NPs obtenidas por la ruta verde (figura 27(c)). Sin embargo, la presencia del material basófilo fue disminuyendo conforme a la reducción de las concentraciones empleadas (figura 28(a)). Según lo reportado por el test G, la presencia del material basófilo exhibió un *p* valor de 0.0016, siendo un cambio significativo comparado con los otros grupos de tratamiento y el control (tabla 6).

Adicionalmente, se contempló que en la exposición a 6 mg/m³ de ZnO-NPs obtenidas por ruta química y a 40 mg/m³ de ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde, las muestras biológicas compartieron la presencia de células inmunitarias, con el reclutamiento de células plasmáticas (plasmocitos) y acúmulos de linfocitos ubicados debajo del epitelio y en la lámina propia (ver figura 24 (c y d), 27(d) y 28), La presencia de esta patología resultó siendo un cambio significativo en la exposición de ZnO-NPs sintetizadas tanto por ruta verde como la ruta química, con valores de *p* de 0.0199 y 0.0171, respectivamente (tabla 7).

Tabla 6. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: presencia o ausencia de material basófilo circular.

GRUPOS DE ESTUDIO	BASÓFILOS		TOTAL	<i>P</i>
	PRESENTE	AUSENTE		
Control	0	5	5	1
Química 6 mg/m ³	0	5	5	
Química 15 mg/m ³	0	5	5	
Química 40 mg/m ³	0	5	5	
Verde 6 mg/m ³	1	4	5	0.0016*
Verde 15 mg/m ³	2	2	4	
Verde 40 mg/m ³	5	0	5	
TOTAL	8	26	34	

**p* < 0,05 significativamente diferente de los animales expuestos a 0 mg/m³ de ZnO-NPs (Test G)

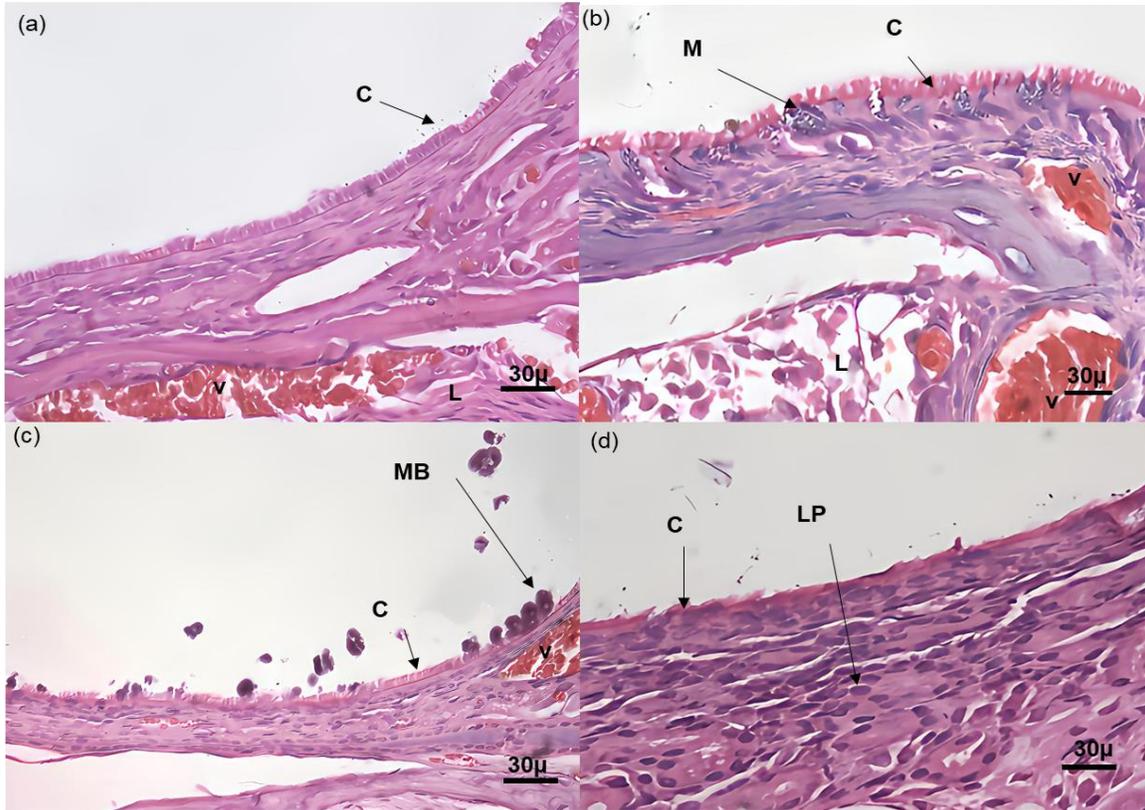


Figura 27. Evaluación histopatológica cualitativa y micrografías ópticas del epitelio nasal respiratorio correspondientes a los *Mus musculus* expuestos a: (a) 0 mg/m³; (b) 6 mg/m³; (c) 15 mg/m³ y (d) 40 mg/m³ de ZnO-NPs sintetizadas utilizando la ruta verde diseñada para este trabajo (abcd- 40X). [células ciliadas (C); lámina propia (L); vasos sanguíneos (V); material basófilo (MB); linfocitos y plasmocitos (LP); mastocitos (M)]. Tinción con hematoxilina-eosina. Fuente propia.

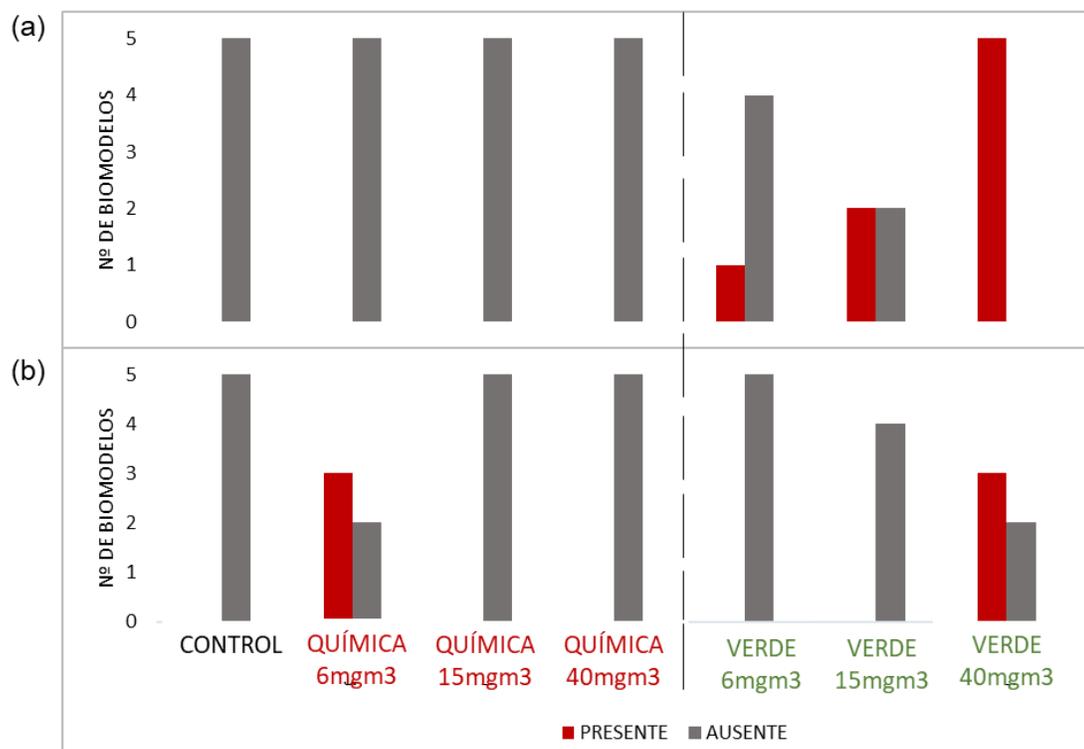


Figura 28. Gráfico de barras agrupado para comparar las lesiones histopatológicas provocadas por la exposición a atmósferas que contenían ZnO-NPs sintetizadas por ruta química y verde: (a) material basófilo y (b) plasmocitos y linfocitos. Las lesiones se categorizaron como presencia o ausencia.

Tabla 7. Efecto del método de síntesis y las concentraciones de ZnO-NPs sobre ratones expuestos a su inhalación: linfocitos y plasmocitos subyacentes al NRE.

GRUPOS DE ESTUDIO	LINFOCITOS Y PLASMOCITOS		TOTAL	P
	PRESENTE	AUSENTE		
Control	0	5	5	0.0171*
Química 6 mg/m ³	3	2	5	
Química 15 mg/m ³	0	5	5	
Química 40 mg/m ³	0	5	5	
Verde 6 mg/m ³	0	5	5	0.0199*
Verde 15 mg/m ³	0	4	4	
Verde 40 mg/m ³	3	2	5	
TOTAL	6	28	34	

* $p < 0,05$ significativamente diferente de los animales expuestos a 0 mg/m³ de ZnO-NPs (Test G)

8. DISCUSIÓN

Las lesiones en el NRE del *M. musculus*, inducidas por la exposición a atmósferas que contienen las ZnO-NPs obtenidas por ruta química y verde en el presente estudio, sugieren que la inhalación indujo reacciones inflamatorias y cambios morfológicos de forma dosis dependiente. Las reacciones inflamatorias son provocadas por el sistema inmune, la primera línea de defensa (inmunidad innata), provoca respuestas de inflamación agudas, en la cual se reconocen patrones moleculares conservados. Se activa por varias moléculas, enzimas y células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos. En esta etapa, las células inflamatorias como leucocitos PMN migran desde los vasos sanguíneos e infiltran la lámina propia y el NRE, para combatir las sustancias potencialmente nocivas a las que se ha expuesto el organismo (Ross, 2017). Esta respuesta fue inducida de manera significativa en las exposiciones de los individuos expuestos a las ZnO-NPs sintetizadas por ruta química (figura 23 y tabla 2). Sin embargo, se observó que la alteración inducida decrece a medida que la concentración de exposición disminuye, siendo abundante para exposición a 40 mg/m³ y escasa a 6 mg/m³ (figura 26(b)).

Es necesario recordar que la inmunidad innata es muy eficaz, sin embargo, no protege al organismo de todas las infecciones, por lo cual se activa en semanas la inmunidad adaptativa, induciendo respuestas de inflamación crónicas. En esta se reconocen patógenos a los cuales nunca se ha expuesto el organismo, actuando los leucocitos denominados linfocitos T o B, donde los últimos se diferencian en células plasmáticas o plasmocitos, productoras de anticuerpos que se unen al patógeno para activar el mecanismo de eliminación (Ariznavarreta et al., 2005). Las respuestas inflamatorias crónicas presentaron diferencias significativas para la exposición a ZnO-NPs sintetizadas por ambas rutas (tabla 7), sin embargo, resulta interesante notar que, la presencia de esta alteración sólo se evidenció para la

exposición a 6 mg/m³ (figura 24(c y d)) y 40 mg/m³ (figura 27(d)) de ZnO-NPs sintetizadas por ruta química y verde, respectivamente.

Otra respuesta inflamatoria identificada en el NRE, fue la degranulación de mastocitos (figura 24(b)). Los mastocitos son células residentes en el tejido conjuntivo (lamina propia). Estos poseen en su membrana plasmática varios receptores que se activan cuando el organismo entra en contacto con patógenos o agentes extraños, provocando la exocitosis de sus gránulos encontrados en su citoplasma (degranulación), lo que da inicio y regular la respuesta inflamatoria para eliminar el agente patógeno (Ariznavarreta et al., 2005). A pesar, de la importancia de los mastocitos, en las respuestas inflamatorias, no se presentó en este estudio una significancia, debido a que, en los biomodelos pertenecientes al grupo control, también se identificaron (tabla 5). Estos resultados, posiblemente fueron desencadenados por emplear una cámara de nebulización de cuerpo entero, en la cual, los biomodelos, fueron expuestos a mucha humedad, lo que provocó un cambio drástico en su microambiente y, en consecuencia, en la activación de células inflamatorias residentes.

Por otro lado, los cambios morfológicos relacionados con metaplasia escamosa (figura 23 (d)) presentaron alta significancia sólo en la exposición a ZnO-NPs sintetizadas por ruta química (tabla 2). Además, se observó que a medida que la concentración de exposición disminuía (40, 15 y 6 mg/m³), la presencia de esta lesión en el tejido se notaba escasa (figura 24 (a)). Este cambio histológico contempla el reemplazo del epitelio respiratorio sensible por epitelio escamoso que soporta mejor las condiciones ambientales hostiles, en este caso, sería más resistente a la lesión ocasionada por las NPs inhaladas. La metaplasia escamosa se puede identificar por la “desorganización del epitelio respiratorio normal, con polaridad alterada de las células más superficiales hacia una orientación horizontal con respecto a la lámina basal (Monticello et al., 1990).

Siguiendo la línea de razonamiento, entre las lesiones relacionadas con la exposición a sustancias químicas o compuestos tóxicos, se encontraría involucrada la red compleja de vasos sanguíneos de la cavidad nasal (Treuting et al., 2017). Los vasos sanguíneos se hallaron congestivos, de forma significativa, para la exposición a las ZnO-NPs obtenidas por ruta química, siendo abundante la exposición de los biomodelos a la concentración de 40 mg/m³ y ausente para la de 6 mg/m³ (figura 25). La congestión de sangre en los vasos sanguíneos puede cambiar el grosor de la mucosa y ocasiona modificaciones en el flujo de aire y la resistencia nasal (Monticello et al., 1990).

Indudablemente, los cambios morfológicos y respuestas inflamatorias halladas en el NRE de los *M. musculus*, se encuentran influenciadas por las características fisicoquímicas que presentaron las NPs sintetizadas, debido a que, el tamaño, la forma, grado de aglomeración, composición elemental y la estructura cristalina son las que determinan su bioactividad en los organismos, como ya lo han reportado diversas revisiones (Luyts et al., 2013; Nagar et al., 2022; Odaudu & Akinsiku, 2022; Powers et al., 2006; Rivera Gil et al., 2010). En este estudio las ZnO-NPs sintetizadas por ruta química, presentaron morfología esférica con un tamaño de ~50 nm y de cristalito ~41 nm, obteniendo así monocristales, con estructura tipo wurtzita y tendencia a formar aglomerados. Mientras que, las ZnO-NPs obtenidas por ruta verde empleando extracto de *Allium sativum* como solvente, presentaron morfología laminar (~60 nm x ~10 nm), estructura amorfa y alta tendencia a formar aglomerados.

Con base a lo anterior, estudios reportan que las ZnO-NPs de menor tamaño tenían mayor capacidad de penetración en los tejidos y células, lo que puede llevar a un mayor daño celular y generar respuestas inflamatorias y oxidativas más significativas (Ajdary et al., 2018). Por otro lado, se ha observado que las nanopartículas de forma varilla (aguja), “tienen un área de contacto más grande con los receptores de la membrana celular, que las nanopartículas esféricas”, lo que

facilita su interacción y absorción en las células, lo que lleva a una mayor toxicidad (Hsiao & Huang, 2011; Roy et al., 2015). Sin embargo, la aglomeración influye de manera significativa en la bioactividad de las NPs, algunas investigaciones sugieren que los aglomerados más grandes tienen a tener menor toxicidad que las nanopartículas individuales, ya que será más difícil interactuar con las células y tejidos (Odaudu & Akinsiku, 2022).

A pesar de lo reportado por otras investigaciones, sobre la relación que existe entre las características fisicoquímicas de las NPs con su actividad en los sistemas biológicos. En esta investigación se evidenció la influencia la ruta de síntesis y la concentración de las ZnO-NPs en estudios de toxicidad, donde, se deben tener presente en conjunto las características fisicoquímicas de las NPs y no de manera individual. Es por ello, que las ZnO-NPs obtenidas por ruta química presentaban morfología esférica, presentó una mayor toxicidad en comparación con las ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde con morfología laminar, debido a que, el alto grado de aglomeración de las últimas quizá no permitió la interacción directa con las células del NRE.

Es interesante notar que, solo en la exposición a ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde, se evidencio la presencia de material basófilo de color morado (figura 27 (c)). En este material, no se logró identificar los núcleos por lo cual no correspondería a células del sistema inmune. Sin embargo, posiblemente, el material basófilo podría estar relacionado con las mismas ZnO-NPs, esto debido a que las NPs, dada su naturaleza, tienden a formar aglomerados del orden de las micras, tal como lo indican los resultados la MET y MEB (figuras 16 y 17). No obstante, es necesario realizar un estudio con MEB y mapping EDS de las muestras biológicas, para determinar la distribución de los elementos constituyentes en la muestra y las concentraciones de los elementos de interés.

La presente investigación es, hasta lo que reporta actualmente la literatura, una de las primeras en describir las lesiones en el NRE de los biomodelos *M. musculus* expuestos a atmósferas que contienen ZnO-NPs sintetizadas por ruta química (complejo polimérico- Pechinni) y por ruta verde (extracto de ajo como solvente). Específicamente, las histopatologías descritas en los resultados de este trabajo, como la metaplasia escamosa, congestión vascular y las reacciones inflamatorias (PMN, mastocitos y linfocitos) en el NRE, son respuestas frecuentes en roedores expuestos a ciertas sustancias o gases irritantes, y se encuentra documentada en varios estudios (Harkema et al., 2006). Por ejemplo, la exposición repetida a formaldehído indujo alteraciones en el NRE del biomodelo generando pérdida de las células mucosas y los cilios (metaplasia escamosa), hiperplasia o proliferación celular de las células mucosas, infiltrados neutrófilos focales y congestión vascular (Chang et al., 1983; Monticello et al., 1990). Otras sustancias que, según la literatura, provocan cambios en hiperplásicos, metaplásicos y entrada e inflamación aguda, con el ingreso de neutrófilos a la lámina propia o la zona intranasal, son el ozono (H. Y. Cho et al., 1999; Harkema et al., 1999; Harkema & Wagner, 2019), el cloro gaseoso (Jiang et al., 1983; Wolf. K et al., 1995) y etileno (Brandenberger et al., 2015).

En los estudios de inhalación mencionados anteriormente, reportan que, cuando la sustancia tóxica es eliminada del medio de exposición al que se encuentra el biomodelo, el NRE no presenta atipias (metaplasia escamosa, hiperplasia, congestión vascular y/o reacciones inflamatorias), lo que ocurre después de un tiempo de recuperación de varias semanas (Harkema et al., 2006) . Por lo tanto, estos se consideran efectos histopatológicos reversibles, que frecuentemente sufre NRE cuando es expuesto a una sustancia o agente tóxico. Así mismo, estas respuestas del sistema inmune son un mecanismo importante, donde se comprueba que el organismo está combatiendo adecuadamente el agente externo. Además, el sistema inmune también participa en los procesos de reparación través de la inflamación. La inflamación es una respuesta natural del cuerpo ante una lesión o

una infección, donde se liberan sustancias químicas que causan vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Esto permite que los nutrientes y las células del sistema inmune lleguen al sitio de la lesión más rápidamente para promover la reparación y combatir posibles infecciones (Silva et al., 2018).

Aunque no es fácil localizar información específica sobre la evaluación del efecto tóxico de las ZnO-NPs considerando la cavidad nasal, se encuentran reportes de investigaciones que han evaluado la toxicidad pulmonar por inhalación de ZnO-NPs sintetizadas por métodos químicos. Los resultados indican que se pueden generar cambios histopatológicos en el tejido pulmonar, tales como hiperplasia de células caliciformes, inflamación eosinofílica y fibrosis (W.-S. Cho et al., 2011), proliferación celular, leucocitos PMN, macrófagos espumosos y linfocitos (Huang et al., 2019; Vysloužil et al., 2020). Estas investigaciones destacan que la interacción de las ZnO-NPs con el tejido pulmonar ocurriría a través de la endocitosis, donde el ZnO podría disolverse y disociarse en Zn^{2+} (W.-S. Cho et al., 2011), provocando alteración en la homeóstasis del Zn, producir especies reactivas de oxígeno, formar complejos con proteínas y probablemente, alterar su función (Kao et al., 2012; Liu et al., 2016; Wang et al., 2016). Además, estas respuestas están consideradas en la fiebre por vapores de metal, la cual ocasiona alteración en citocinas proinflamatorias y reclutamiento de leucocitos PMN, los cuales desaparecen unos pocos días después de la exposición al humo del ZnO (Wani et al., 2017).

Por lo tanto, los resultados de esta investigación sugieren que, tener una cantidad relativamente pura de ZnO (ruta química) nanoparticulado, provoca cambios histopatológicos graves a concentraciones bajas, en comparación con la acción de NPs recubiertas con biomoléculas de ajo (ruta verde), donde la presencia de material orgánico fue evidente y su efecto crónico se produjo para concentraciones altas. Posiblemente, en la exposición a ZnO-NPs obtenidas por ruta química, se encuentra involucrada la generación de Zn^{+2} (figura 13(a)), el cual provoca una mayor expresión de citocinas proinflamatorias como como TNF- α , MIP-2, molécula

de adhesión celular intracelular-1 (ICAM-1), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-6 (IL-6), lo que lleva al reclutamiento de células inmunitarias al sitio de lesión (figura 22)(Roy et al., 2015; Suzuki et al., 2021). Por el contrario, las ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde (figura 13(b)), presentaron grupos funcionales relacionados con los compuestos azufrados del ajo, como la alicina, la cual presenta propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Estas biomoléculas pueden ayudar a fortalecer el sistema inmunológico al combatir patógenos o sustancias extrañas (Okoro et al., 2023).

Por lo tanto, este estudio ha puesto en evidencia la importancia de las características fisicoquímicas en los estudios de toxicidad. También, mostró la diferencia en la sensibilidad de los biomodelos *M. musculus* a la inhalación de ZnO-NPs, dependiendo del método de síntesis y la concentración. Específicamente, en este trabajo, el biomodelo fue más sensible a bajas concentraciones de ZnO-NPs, cuando estas fueron sintetizadas por el método Pechini (ruta química), y a altas concentraciones, cuando las ZnO-NPs fueron sintetizadas utilizando la ruta verde diseñada.

En las investigaciones realizadas sobre el efecto de la inhalación de ZnO-NPs se han considerado el tiempo y concentración de exposición. Adamcakova et al. (2014), mostraron que la inhalación de ZnO-NPs, en una concentración de 3.5 mg/m³ indujo un aumento significativo en el número de macrófagos totales y Zn en los pulmones, pero causó inflamación pulmonar mínima, citotoxicidad o cambios. Resultados diferentes fueron reportados por Huang et al. (2019) donde la inhalación de ZnO-NP indujo infiltración de linfocitos e histiocitos espumosos en el espacio alveolar alrededor del bronquiolo terminal, un aumento en el recuento de neutrófilos y eosinófilos en el fluido del líquido bronco alveolar, por lo que concluyeron que la inhalación de ZnO-NPs induciría inflamación en las vías respiratorias. Esto resalta la necesidad de realizar estudios enfocados sobre la toxicidad de NPs, ya que aún este tema se encuentra en exploración.

Un estudio similar realizado Gao et al. (2013), donde expusieron a 40 mg/mL de ZnO-NPs por instilación intratraqueal a modelos murinos. Evaluaron en el epitelio olfatorio (EO) diferentes cambios histológicos y mostraron como las NPs indujeron respuestas inflamatorias con infiltrado de células inmunológicas en la lámina propia del EO, además, la exposición exhibió la dilatación de los vasos sanguíneo sin congestión vascular. A pesar de, no ser el mismo método de exposición por inhalación, nuestros resultados indican que las ZnO-NPs sintetizadas por ruta química indujeron de igual manera respuestas inflamatorias, sin embargo, los vasos nasales se encontraban congestivos. Además, concluyeron que pasado 7 días el epitelio retornó a las condiciones iniciales.

Otros estudios como el realizado por Cho et al., (2011), consideraron que las ZnO-NPs tienen la capacidad de aglomerarse y esto debe influir en la toxicidad. Observaron que los “grandes aglomerados mal dispersos desencadenan reacciones inflamatorias menores en comparación con ZnO-NPS bien dispersas”. Por lo tanto, plantean la hipótesis de que cuando las ZnO-NPs están bien dispersas, las reacciones inflamatorias inducidas en el tejido pueden ser de mayor proporción (Vysloužil et al., 2020). Esta hipótesis podría justificar algunos de los resultados encontrados en nuestra investigación; así, por ejemplo, que la concentración baja (6 mg/m^3) de ZnO-NPs sintetizadas por ruta química indujo reacciones inflamatorias crónicas. Este comportamiento sería más evidente para esta concentración porque las nanopartículas posiblemente estarían más dispersas en el momento de la inhalación, lo que ocasionaría una mayor absorción en el NRE. Sin embargo, se debe realizar un estudio más riguroso para comprobar esta hipótesis.

Las características fisicoquímicas de las NPs sintetizadas deben determinar, en gran medida, su toxicidad. Por lo tanto, se debe tener en cuenta que, en la síntesis por ruta verde empleando el extracto acuoso del ajo como solvente, las biomoléculas del ajo estarían recubriendo el compuesto de ZnO. Existen reportes que indican la actividad inmunomoduladora que presentan los compuestos

organosulfurados (la alicina) del ajo, los cuales estimularían la proliferación de linfocitos y fagocitosis de macrófagos, aumentarían de la expresión de TNF- α y NF- κ B y de las interleucinas IL-1 β e IL-6 (mediadores de respuesta inflamatoria) (González Maza et al., 2014; Guillamon, 2018; Ramírez-Concepción et al., 2016). Este condicionamiento permitiría justificar la presencia de linfocitos y plasmocitos en el NRE, después de la exposición del biomodelo a la atmósfera con 40 mg/m³ de nanopartículas obtenidas usando la ruta verde (figura 27(d)). Probablemente, este comportamiento, se podría relacionar con la presencia de los compuestos bioactivos del ajo en el material sintetizado que aumentarían la proliferación de linfocitos, los cuales se pudieron diferenciar en las células plasmáticas relacionadas con el efecto crónico que se evidencio en el tejido. Sin embargo, la exposición a menores concentraciones, 15 y 6 mg/m³, no indujeron este efecto.

Con los resultados reportados en la literatura sobre los efectos de la inhalación de las ZnO-NPs en el pulmón, las propiedades de los biocompuestos de ajo y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación, específicamente la diferencia entre las reacciones inflamatorias en el NRE inducidas por el método de síntesis. Es probable que, en la exposición a ZnO-NPs obtenidas por ruta química, estén involucrados los procesos de disolución y disociación del ZnO, donde el Zn²⁺ propiciaría el reclutamiento de PMN, metaplasia escamosa y congestión vascular. Por otro lado, la exposición a ZnO-NPs obtenidas por ruta verde, la respuesta inflamatoria estaría determinada por los compuestos orgánicos presentes en el material sintetizado, concretamente la actividad inmunomoduladora asociada a las biomoléculas activas del ajo. Es necesario destacar que, para determinar los compuestos que ocasionarían los cambios histopatológicos y las respuestas inflamatorias, se deben realizar estudios enzimáticos e inmunohistoquímicos con el objetivo de determinar, en futuras investigaciones, los mecanismos de acción y el direccionamiento de las ZnO-NPs en el tejido de estudio.

Los estudios enzimáticos, podría ser el empleo de peroxidasa de rábano picante (HRP) para detectar anticuerpos primarios que se unen a marcadores inflamatorios, como interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o células infiltrantes (como eosinófilos o neutrófilos). Además, las metaloproteinasas (MMP), elastasas o tripsinas pueden estar involucradas en la degradación y remodelación del tejido epitelial nasal durante procesos inflamatorio y con la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa, se puede determinar el grado de estrés oxidativo en el tejido nasal respiratorio (Medina et al., 2015; Suzuki et al., 2021).

La tinción con inmunohistoquímica que se puede realizar es la tinción con anticuerpos específicos contra proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria, como el CD68 (marcador de macrófagos), CD3 (marcador de células T), CD20 (marcador de células B) y CD21 (marcador de células dendríticas foliculares). Estos anticuerpos pueden ayudar a identificar la presencia y distribución de diferentes tipos celulares y evaluar la respuesta inmune en el epitelio nasal (Jorge Buys et al., 2007; Pawelczyk et al., 2008).

9. CONCLUSIONES

- Las metodologías de síntesis empleadas fueron óptimas para obtener ZnO-NPs por ruta química y ruta verde, de manera controlada y reproducible. Las técnicas de caracterización utilizadas en las dos síntesis de ZnO-NPs, mostraron que existen diferencias importantes entre ellas, respecto a sus características fisicoquímicas.
- Los ensayos para evaluar las lesiones en el NRE de biomodelo *M. musculus* inducidas por su exposición a atmósferas que contenían ZnO-NPs obtenidas tanto por ruta química como verde, mostraron que la inhalación indujo reacciones inflamatorias y cambios morfológicos, reversibles. Específicamente, en los tratamientos a altas concentraciones de ZnO-NPs obtenidas por ruta química se produjeron reacciones inflamatorias agudas, con el reclutamiento de PMN en la cavidad nasal.
- El efecto de las ZnO-NPs sobre el NRE dependió de las características fisicoquímicas que estas presentaron y de las concentraciones de exposición que se emplearon en los ensayos. Se observó que la acción de las ZnO-NPs sintetizadas por ruta química y verde generaron cambios histopatológicos en el NRE, donde los más severos propiciaron reacciones inflamatorias crónicas a las concentraciones de 6 y 40 mg/m³, respectivamente.
- Las rutas de síntesis empleadas, para obtener las ZnO-NPs evaluadas, permitieron verificar la importancia que tienen las características fisicoquímicas de las nanopartículas en los estudios de toxicidad. En este trabajo se determinó que posiblemente los cambios histopatológicos ocasionados en los tratamientos de exposición de los *M. musculus* a ZnO-NPs sintetizadas por ruta verde, se podrían justificar, por los biocompuestos de *A. sativum*, como la alicina, debido a su acción inmunomoduladora.

- Los resultados obtenidos en este estudio se pueden tomar como referentes importantes para futuros trabajos, debido a que este se constituye en un estudio pionero en la línea de investigación sobre toxicidad de ZnO-NPs, específicamente sobre los efectos tóxicos en la cavidad nasal.

10. RECOMENDACIONES

- Establecer unas condiciones de control de temperatura e individualizar la nebulización para evitar la alta humedad en los biomodelos *Mus musculus*.
- Realizar tinciones específicas para la identificación de células caliciformes y mastocitos. Por ejemplo, la tinción de alcian blue para las mucinas y la tinción de toluidina blue o de metacromasia de Giemsa para los mastocitos.
- Realizar investigaciones posteriores en las cuales se puedan evidenciar los mecanismos de acción de la inflamación, como análisis inmunohistoquímicos y enzimáticos. Por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos contra proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria, como el CD68 (marcador de macrófagos), CD3 (marcador de células T), CD20 (marcador de células B) y CD21 (marcador de células dendríticas foliculares).
- Incluir la microscopia electrónica de alta resolución, en la cual, se lograría identificar de manera eficiente las diferentes células del sistema inmune.
- También se recomienda realizar estudios utilizando biomarcadores, que muestren de forma anticipada los posibles daños, o alteraciones en el sistema respiratorio. Por ejemplo, se puede emplear la fosfatasa alcalina para detectar anticuerpos primarios que se unen a marcadores inflamatorios como a la proteína interleucina- 8 (IL-8), debido a que, es una citoquina quimiotáctica para la atracción de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adamcakova, A., Stebounova, L. V, Kim, J. S., Vorrink, S. U., Ault, A. P., Shaughnessy, P. T. O., Grassian, V. H., & Thorne, P. S. (2014). Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle And Fibre Toxicology*, 11(15), 1–15.
- Agarwal, H., Venkat Kumar, S., & Rajeshkumar, S. (2017). A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.03.002>
- Ahmad, T., Pandey, V., Husain, M. S., Adiba, & Munjal, S. (2021). Structural and spectroscopic analysis of pure phase hexagonal wurtzite ZnO nanoparticles synthesized by sol-gel. *Materials Today: Proceedings*, 49, 1694–1697. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.07.456>
- Ajdary, M., Moosavi, M. A., Rahmati, M., Falahati, M., Mahboubi, M., Mandegary, A., Jangjoo, S., Mohammadinejad, R., & Varma, R. S. (2018). Health concerns of various nanoparticles: A review of their in vitro and in vivo toxicity. In *Nanomaterials* (Vol. 8, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano8090634>
- Alim, K. A., Fonoberov, V. A., Shamsa, M., & Balandin, A. A. (2005). Micro-Raman investigation of optical phonons in ZnO nanocrystals. *Journal of Applied Physics*, 97(12). <https://doi.org/10.1063/1.1944222>
- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 12(7), 2313–2333. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
- Arciniegas-Grijalba, P., Patiño Portela, M., Mosquera Sanchez, L. P., Guerrero Vargas, J. A., & Rodríguez Páez, J. E. (2017). ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) and their antifungal activity against coffee fungus *Erythricium salmonicolor*. *Appl Nanosci*, 7, 225–241. <https://doi.org/10.1007/s13204-017-0561-3>
- Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Escrich Escriche, E., Gil-Loyzaga, P., Lahera Juliá, V., Mora Terual, F., Romano Pardo, M., & Tamargo Menéndez. (2005). *Fisiología humana* (Tercera Edició). Mc Graw Hill.

- AVMA. (2020). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition** (Copyright, Ed.; 2020.0.1). American Veterinary Medical Association.
- Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., & Abdollahi, M. (2016). Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedica*, 20(January), 1–11. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.001>
- Bandeira, M., Giovanela, M., Roesch-Ely, M., Devine, D. M., & da Silva Crespo, J. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15(June 2019), 100223. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>
- Benitez-Salazar, M. I., Niño-Castaño, V. E., Dueñas-Cuellar, R. A., Caldas-Arias, L., Fernández, I., & Rodríguez-Páez, J. E. (2021). 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*, 9(6). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106544>
- Brandenberger, C., Hotchkiss, J. A., Krieger, S. M., Pottenger, L. H., & Harkema, J. R. (2015). Inhalation exposure to ethylene induces eosinophilic rhinitis and nasal epithelial remodeling in Fischer 344 rats. *Chemico-Biological Interactions*, 241, 66-75A. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.001>
- Castañeda Manquillo, A. M. (2022). *Efecto de las condiciones de síntesis de nanopartículas de óxido de cinc sobre la calidad espermática en Mus musculus* [Tesis]. Universidad del Cauca.
- Chamanza, R., & Wright, J. A. (2015). A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *Journal of Comparative Pathology*, 153(4), 287–314. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.08.009>
- Chand Mali, S., Raj, S., & Trivedi, R. (2020). Nanotechnology a novel approach to enhance crop productivity. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24(August), 100821. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100821>
- Chandekar, K. v., Shkir, M., Khan, A., Al-Shehri, B. M., Hamdy, M. S., AlFaify, S., El-Toni, M. A., Aldalbahi, A., Ansari, A. A., & Ghaithan, H. (2020). A facile one-pot flash combustion synthesis of La@ZnO nanoparticles and their characterizations for optoelectronic and photocatalysis applications. *Journal of*

- Chang, J. C. F., Gross, E. A., Swenberg, J. A., & Barrow, C. S. (1983). *Nasal Cavity Deposition, Histopathology, and Cell Proliferation after Single or Repeated Formaldehyde Exposures in B6C3F1 Mice and F-344 Rats*.
- Chávez-Magdaleno, M. E., González-Estrada, R. R., Ramos-Guerrero, A., Plascencia-Jatomea, M., & Gutiérrez-Martínez, P. (2018). Effect of pepper tree (*Schinus molle*) essential oil-loaded chitosan bio-nanocomposites on postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* and quality evaluations in avocado (*Persea americana*) cv. Hass. *Food Science and Biotechnology*, 27(6), 1871–1875. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0410-5>
- Chen, C., Liu, C. H., Cai, J., Zhang, W., Qi, W. L., Wang, Z., Liu, Z. Bin, & Yang, Y. (2018). Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Food Control*, 86, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.015>
- Cho, H. Y., Hotchkiss, J. A., & Harkema, J. R. (1999). *Inflammatory and Epithelial Responses during the Development of Ozone-Induced Mucous Cell Metaplasia in the Nasal Epithelium of Rats*. <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
- Cho, W.-S., Duffin, R., Howie, S. E. M., Scotton, C. J., Wallace, W. A. H., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I. L., & Donaldson, K. (2011). Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺dissolution inside lysosomes. *Particle and Fibre Toxicology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-27>
- Chuang, H., Juan, H., Chang, C., Yan, Y., Yuan, T., Wang, J., Chen, H., Hwang, Y., Lee, C., & Cheng, T. (2014). Cardiopulmonary toxicity of pulmonary exposure to occupationally relevant zinc oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(January 2013), 593–604. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.809809>
- Congreso de Colombia, B. (1989). *Ley 84 de 1989 Nivel Nacional* (pp. 1–16). Diario Oficial 39120. <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=8242>
- Connolly, M., Fernández, M., Conde, E., Torrent, F., Navas, J. M., & Fernández-Cruz, M. L. (2016). Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to rainbow trout. *Science of the Total Environment*, 551–552, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.186>

- Cortina Campuzano, C., Feijóo, Fonnegra, María, L., Pineda Manzur, K., Muñoz Palacio, M., Fonnegra Rendón, J., & Zapata Díaz, J. P. (2017). Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola: revisión de tema. *Revista CES Salud Pública*, 8(1), 121–133.
- Cuscó, R., Alarcón-Lladó, E., Ibáñez, J., Artús, L., Jiménez, J., Wang, B., & Callahan, M. J. (2007). Temperature dependence of Raman scattering in ZnO. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, 75(16). <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.75.165202>
- Figuroa-López, K. J., Vargas, O. L. T., Prías-Barragán, J. J., & Ariza-Calderón, H. (2015). Optical and structural characterization of *Allium sativum* L. Nanoparticles impregnated in beef tenderloin. *Acta Agronomica*, 64(1), 54–60. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n1.43651>
- Gao, L., Yang, S. T., Li, S., Meng, Y., Wang, H., & Lei, H. (2013). Acute toxicity of zinc oxide nanoparticles to the rat olfactory system after intranasal instillation. *Journal of Applied Toxicology*, 33(10), 1079–1088. <https://doi.org/10.1002/jat.2842>
- González Maza, M., Guerra Ibañez, G., Maza Hernández, J. C., & Cruz Dopico, A. (2014). Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo. *Revista Cubana de Medicina Física y Rehabilitación*, 6(1), 61–71.
- Guerrero, V. H., Rivas, J., Rosas, N., & Valdivieso, C. (2013). Obtención de nanopartículas de óxidos de cinc y circonio por el método de Pechini. *VIII Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE* .
- Guillamon, E. (2018). Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 59(3). <https://doi.org/10.30827/ars.v59i3.7479>
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., & Kleinsasser, N. (2011). Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.003>
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Zapp, A., Radeloff, K., Ginzkey, C., Gehrke, T., Ickrath, P., & Kleinsasser, N. (2017). Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in nasal mucosa cells are antagonized by titanium dioxide

nanoparticles. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 816–817, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.02.005>

Harkema, J. R., Carey, S. A., & Wagner, J. G. (2006). The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function, and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium. *Toxicologic Pathology*, 34(3), 252–269. <https://doi.org/10.1080/01926230600713475>

Harkema, J. R., Hotchkiss, J. A., Barr, E. B., Bennett, C. B., Gallup, M., Kwon Lee, J., Basbaum, C., Hotchkiss, J. A., Barr, E. B., Bennett, C. B., Gallup, M., Lee, J. K., & Basbaum, C. (1999). Long-lasting effects of chronic ozone exposure on rat nasal epithelium. In *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* (Vol. 20). <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>

Harkema, J. R., Plopper, C. G., Hyde, D. M., George, J. A. S., Wilson, D. W., & Dungworth, D. L. (1987). Response of the Macaque Nasal Epithelium to Ambient Levels of Ozone A Morphologic and Morphometric Study of the Transitional and Respiratory Epithelium. In *American Journal of Pathology* (Vol. 128, Issue 1).

Harkema, J. R., & Wagner, J. G. (2019). Innate Lymphoid Cell–Dependent Airway Epithelial and Inflammatory Responses to Inhaled Ozone: A New Paradigm in Pathogenesis. *Toxicologic Pathology*, 47(8), 993–1003. <https://doi.org/10.1177/0192623319873872>

Hsiao, I. L., & Huang, Y. J. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Science of the Total Environment*, 409(7), 1219–1228. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.033>

Huang, K. L., Chang, H. L., Tsai, F. M., Lee, Y. H., Wang, C. H., & Cheng, T. J. (2019). The effect of the inhalation of and topical exposure to zinc oxide nanoparticles on airway inflammation in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 384(17). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114787>

Huang, K. L., Lee, Y. H., Chen, H. I., Liao, H. S., Chiang, B. L., & Cheng, T. J. (2015). Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 297, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.023>

Huo, L., Chen, R., Zhao, L., Shi, X., Bai, R., Long, D., Chen, F., Zhao, Y., Chang, Y. Z., & Chen, C. (2015). Silver nanoparticles activate endoplasmic reticulum

stress signaling pathway in cell and mouse models: The role in toxicity evaluation. *Biomaterials*, 61, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.029>

Hussain, Z., Thu, H. E., Haider, M., Khan, S., Sohail, M., Hussain, F., Khan, F. M., Farooq, M. A., & Shuid, A. N. (2020). A review of imperative concerns against clinical translation of nanomaterials: Unwanted biological interactions of nanomaterials cause serious nanotoxicity. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 59). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101867>

Jamdagni, P., Khatri, P., & Rana, J. S. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.10.002>

Javeriana, U. (2021). *Procedimiento Operativo Estándar. Eutanasia y Necropsia de Animales de Laboratorio*. British Small Animal Veterinary Association.

Jiang, X. Z., Buckley, L. A., & Morgan, K. T. (1983). Pathology of Toxic Responses to the RD50 Concentration of Chlorine Gas in the Nasal Passages of Rats and Mice. In *TOXK'OLOGYPHARMACOLOGY* (Vol. 71).

Jorge Buys, D. L., Lara Torres, C. O., & Ortiz Hidalgo, C. (2007). Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología, Revista Latinoamericana*, 126–140. www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

Kao, Y. Y., Chiung, Y. M., Chen, Y. C., Cheng, T. J., & Liu, P. S. (2012). Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicological Sciences*, 125(2), 462–472. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr319>

Khare, P., Sonane, M., Nagar, Y., Moin, N., Ali, S., Gupta, K. C., & Satish, A. (2015). Size dependent toxicity of zinc oxide nano-particles in soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nanotoxicology*, 9(4), 423–432. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940403>

Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., & Pérez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 31, Issue 4, pp. 240–248). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003>

- Khudiar, S. S., Mutlak, F. A. H., & Nayef, U. M. (2021). Synthesis of ZnO nanostructures by hydrothermal method deposited on porous silicon for photo-conversion application. *Optik*, 247. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2021.167903>
- Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., & Buszewski, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>
- Kumar, R., Kumar, M., & Luthra, G. (2023). Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.12.172>
- Laurent, S., Saei, A. A., Behzadi, S., Panahifar, A., & Mahmoudi, M. (2014). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: Opportunities and challenges. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 11, Issue 9, pp. 1449–1470). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.924501>
- Li, C., Zhang, H., Gong, X., Li, Q., & Zhao, X. (2019). Synthesis, characterization, and cytotoxicity assessment of N-acetyl-L-cysteine capped ZnO nanoparticles as camptothecin delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174(November 2018), 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.043>
- Liu, J., Feng, X., Wei, L., Chen, L., Song, B., & Shao, L. (2016). The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 46, Issue 4, pp. 348–384). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137864>
- Lopez-Lima, D., Mtz-Enriquez, A. I., Carrión, G., Basurto-Cereceda, S., & Pariona, N. (2020). The bifunctional role of copper nanoparticles in tomato: Effective treatment for Fusarium wilt and plant growth promoter. *Scientia Horticulturae*, 277(September 2020). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109810>
- Luna, L. G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (3rd Edition). McGraw-Hill.
- Luyts, K., Napierska, D., Nemery, B., & Hoet, P. H. M. (2013). How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: Complex and unresolved interrelations. In *Environmental Sciences: Processes and Impacts* (Vol. 15, Issue 1, pp. 23–38). <https://doi.org/10.1039/c2em30237c>

- Luyts, K., Van Den Broucke, S., Hemmeryckx, B., Poels, K., Scheers, H., Casas, L., Vanoirbeek, J., Nemery, B., & Hoet, P. H. M. (2018). Nanoparticles in the lungs of old mice: Pulmonary inflammation and oxidative stress without procoagulant effects. *Science of the Total Environment*, *644*, 907–915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.301>
- Medina, E. C., Villanueva De La Torre, H., Salguero Villadiego, M., & Salguero Villadiego, M. (2015). Estudio histopatológico de la evolución temporal de las lesiones. In *Cuad Med Forense* (Vol. 21, Issue 4).
- Mendoza, G., & Rodríguez-López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*, 161–186. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=11502906>
- Meriga, B., Mopuri, R., & MuraliKrishna, T. (2012). Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *5*(5), 391–395. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60065-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60065-0)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.006>
- Mishra, S., Singh, B. R., Singh, A., Keswani, C., Naqvi, A. H., & Singh, H. B. (2014). Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PLoS ONE*, *9*(5), e97881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097881>
- Moezzi, A., McDonagh, A. M., & Cortie, M. B. (2012). Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications. *Chemical Engineering Journal*, *185–186*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.076>
- Monsé, C., Hagemeyer, O., Raulf, M., Jettkant, B., van Kampen, V., Kendzia, B., Gering, V., Kappert, G., Weiss, T., Ulrich, N., Marek, E. M., Bünger, J., Brüning, T., & Merget, R. (2018). Concentration-dependent systemic response after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0246-4>
- Monsé, C., Raulf, M., Hagemeyer, O., Van Kampen, V., Kendzia, B., Gering, V., Marek, E. M., Jettkant, B., Bünger, J., Merget, R., & Brüning, T. (2019). Airway inflammation after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human

volunteers. *BMC Pulmonary Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12890-019-1026-0>

Monsé, C., Raulf, M., Jettkant, B., van Kampen, V., Kendzia, B., Schürmeyer, L., Seifert, C. E., Marek, E. M., Westphal, G., Rosenkranz, N., Merget, R., Brüning, T., & Bünger, J. (2021). Health effects after inhalation of micro- and nano-sized zinc oxide particles in human volunteers. *Archives of Toxicology*, 95(1), 53–65. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02923-y>

Monticello, T. M., Morgan, K. T., & Uraht, L. (1990). Nonneoplastic nasal lesions in rats and mice. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 85).

Morimoto, Y., Horie, M., Kobayashi, N., Shinohara, N., & Shimada, M. (2013). Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 770–781. <https://doi.org/10.1021/ar200311b>

Morimoto, Y., Izumi, H., Yoshiura, Y., Tomonaga, T., Oyabu, T., Myojo, T., Kawai, K., Yatera, K., Shimada, M., Kubo, M., Yamamoto, K., Kitajima, S., Kuroda, E., Kawaguchi, K., & Sasaki, T. (2016). Evaluation of pulmonary toxicity of zinc oxide nanoparticles following inhalation and intratracheal instillation. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081241>

Mosquera Sánchez, L. P., Arciniegas Grijalba, P. A., Patiño Portela, M. C., Guerra Sierra, B. E., Muñoz Florez, J. E., & Rodríguez Páez, J. E. (2020). Antifungal effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on *Colletotrichum* sp., causal agent of anthracnose in coffee crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101579>

Musa, I., Qamhieh, N., & Mahmoud, S. T. (2017). Synthesis and length dependent photoluminescence property of zinc oxide nanorods. *Results in Physics*, 7, 3552–3556. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.09.035>

Nagar, V., Singh, T., Tiwari, Y., Aseri, V., Pandit, P. P., Chopade, R. L., Pandey, K., Lodha, P., & Awasthi, G. (2022). ZnO Nanoparticles: Exposure, toxicity mechanism and assessment. *Materials Today: Proceedings*, 69, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.001>

Nemmar, A., Yuvaraju, S., Yasin, J., Al Dhaheri, R., A Fahim, M., & H Ali, B. (2015). In vitro platelet aggregation and oxidative stress caused by amorphous silica nanoparticles. *Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 1, 27–33.

- New Jersey/ Departamento en Salud y Servicios para Personas Mayores. (2007). *Hoja informativa sobre sustancias peligrosas - Oxido de Zinc* (pp. 1–6).
- Obeizi, Z., Benbouzid, H., Ouchenane, S., Yilmaz, D., Culha, M., & Bououdina, M. (2020). Biosynthesis of Zinc oxide nanoparticles from essential oil of *Eucalyptus globulus* with antimicrobial and anti-biofilm activities. *Materials Today Communications*, 25(August). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101553>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Odaudu, O. R., & Akinsiku, A. A. (2022). Toxicity and Cytotoxicity Effects of Selected Nanoparticles: A Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1054(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1054/1/012007>
- Okoro, B. C., Dokunmu, T. M., Okafor, E., Sokoya, I. A., Israel, E. N., Olusegun, D. O., Bella-Omunagbe, M., Ebubechi, U. M., Ugbogu, E. A., & Iweala, E. E. J. (2023). The ethnobotanical, bioactive compounds, pharmacological activities and toxicological evaluation of garlic (*Allium sativum*): A review. In *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* (Vol. 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100273>
- Otis, G., Ejgenberg, M., & Mastai, Y. (2021). Solvent-free mechanochemical synthesis of zno nanoparticles by high-energy ball milling of ϵ -zn(OH)₂ crystals. *Nanomaterials*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nano11010238>
- Patiño-Portela, M. C., Sánchez-Mosquera, L. P., Guerra Sierra, B. E., Muñoz-Florez, J. E., Eraso-Castillo, L. A., & Rodríguez-Páez, J. E. (2021). Effect of method of synthesis on antifungal ability of ZnO nanoparticles: Chemical route vs green route. *Advances in Nano Research*, 10(2), 0–000. <https://doi.org/10.12989/anr.2020.10.2.000>
- Patrón-Romero, L., Luque, P. A., Soto-Robles, C. A., Nava, O., Vilchis-Nestor, A. R., Barajas-Carrillo, V. W., Martínez-Ramírez, C. E., Chávez Méndez, J. R., Alvelais Palacios, J. A., Leal Ávila, M., & Almanza-Reyes, H. (2020). Synthesis, characterization and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles by green synthesis method. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60(June). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101925>
- Pawelczyk, E., Arbab, A. S., Chaudhry, A., Balakumaran, A., Robey, P. G., & Frank, J. A. (2008). *In Vitro Model of Bromodeoxyuridine or Iron Oxide Nanoparticle*

Uptake by Activated Macrophages from Labeled Stem Cells: Implications for Cellular Therapy. 26, 1366–1375. <https://doi.org/10.1634/stem>

- Perfetti, J. J., Balcazar, Á., Hernández, A., & Leibovich, J. (2013). Vinculación de los pequeños productores al desarrollo de la agricultura. In *Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia*. <https://www.repository.fedesarrollo.org.co/handle/11445/61>
- Pillai, A. M., Sivasankarapillai, V. S., Rahdar, A., Joseph, J., Sadeghfard, F., Anuf A, R., Rajesh, K., & Kyzas, G. Z. (2020). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles with antibacterial and antifungal activity. *Journal of Molecular Structure*, 1211, 128107. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128107>
- Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Nowicki, J. (2020). Allium sativum. In J. E. Pizzorno & M. Murray (Eds.), *Textbook of Natural Medicine* (Fifth Edit, Vol. 53, Issue 9, pp. 411–413). *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Polanco, A., Riba Lopez, M. I., DelValls Casillas, T. A., Araujo León, J. A., Mahjoud, O., & Kumar Prusty, A. (2016). Monitoring of organochlorine pesticides in blood of women with uterine cervix cancer *. *Environmental Pollution Journal*, 853–862. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.068>
- Powers, K. W., Brown, S. C., Krishna, V. B., Wasdo, S. C., Moudgil, B. M., & Roberts, S. M. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological Sciences*, 90(2), 296–303. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj099>
- Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Effects of pesticides on health and the environment. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387.
- Pulit-Prociak, J., Chwastowski, J., Kucharski, A., & Banach, M. (2016). Functionalization of textiles with silver and zinc oxide nanoparticles. *Applied Surface Science*, 385, 543–553. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.05.167>
- Quintili, M. (2012). Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Centro de Estudios En Diseño y Comunicación*, 125–155.
- Rajput, V. D., Minkina, T. M., Behal, A., Sushkova, S. N., Mandzhieva, S., Singh, R., Gorovtsov, A., Tsitsuashvili, V. S., Purvis, W. O., Ghazaryan, K. A., & Movsesyan, H. S. (2018). Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants,

animals and soil organisms: A review. In *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* (Vol. 9, pp. 76–84). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.12.006>

Ramírez-Concepción, H. R., Castro-Velasco, L. N., & Martínez-Santiago, E. (2016). Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium Sativum*). *Salud y Administracion*, 3(8), 39–47.

Rana, A., Yadav, K., & Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles : Mechanism , application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*, 272, 122880. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122880>

Renne, R. A., Gideon, K. M., Harbo, S. J., Staska, L. M., & Grumbein, S. L. (2007). Upper Respiratory Tract Lesions in Inhalation Toxicology. *Toxicologic Pathology*, 35(1), 163–169. <https://doi.org/10.1080/01926230601052667>

Republica de Colombia, M. de S. (1993). *RESOLUCIÓN N° 008430 DE 1993*.

Rivera Gil, P., Oberdörster, G., Elder, A., Puentes, V., & Parak, W. J. (2010). Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: The present and the future. *ACS Nano*, 4(10), 5227–5231. <https://doi.org/10.1021/nn1025687>

Robinson, J. T., Tabakman, S. M., Liang, Y., Wang, H., Sanchez Casalongue, H., Vinh, D., & Dai, H. (2011). Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 133(17), 6825–6831. <https://doi.org/10.1021/ja2010175>

Rodríguez Paéz, J. E., Caballero, A. C., Villegas, M. ., Moure, C., Durán, P., & Fernández, J. F. (2001). Controlled precipitation methods: formation mechanism of ZnO nanoparticles. *Elsevier Science*, 925–930. www.elsevier.com/locate/jeurceramsoc

Romaña, D. L. de, Carlos Castillo, D., & Diazgranados, D. (2010). El zinc en la salud humana - II. *Revista Chilena de Nutricion*, 37(2), 240–247.

Romero- Rosas, R., & Cobarrubias-Gómez, A. (2020). El papel del zinc en la salud humana. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 58(4), 477–485. <https://doi.org/10.24875/RMIMSS.M20000073>

- Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., de Lucca, M., Ruano, A., García-Barceló, M., Rivera-Cervantes, M., García-Rodríguez, J., & Sánchez-Mateos, S. (2016). The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation. In *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* (Vol. 33, Issue 2, pp. 288–299). Instituto Nacional de Salud. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2169>
- Ross, M. H. (2017). Tejido Epitelial, Tejido Conectivo & Sistema Respiratorio. In *Histología Tecto y Atlas* (Septima Ed, p. 814). Wolters Kluwe.
- Roy, R., Das, M., & Dwivedi, P. D. (2015). Toxicological mode of action of ZnO nanoparticles: Impact on immune cells. In *Molecular Immunology* (Vol. 63, Issue 2, pp. 184–192). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.08.001>
- Ruberte, J., Carretero, A., & Navarro, M. (2017). Respiratory apparatus. In *Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging* (Primera Ed, pp. 1–585). Medica Panamericana, SA.
- Saeedi, M., Eslamifar, M., Khezri, K., & Maleki, S. (2019). Biomedicine & Pharmacotherapy Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111(August 2018), 666–675. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.133>
- Salas, G., Rosas, N., Galeas, S., Guerrero, V., & Debut, A. (2016). Síntesis de Nanopartículas de ZnO por el Método de Pechini. *Revista Politécnica*, 38(1), 43–47.
- Salata, O. V. (2004). *Applications of nanoparticles in biology and medicine*. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
- Salazar, L., & Moreno, F. (2016). Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Salutem Scientia Spiritus*, 2(2), 12–23.
- Santana Báez, S., Mendoza Martín, M., Quevedo Villegas, M. C., & Gutiérrez Disla, E. J. (2018). Revisión Sistemática sobre los efectos tóxicos de las nanopartículas metálicas en la salud de los trabajadores. *Medicina y Seguridad Del Trabajo*, 64(252), 295–311.
- SANTOS Dos Santos, A. D. A. (2007). *BIOESTAT-aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas*. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/263608962>

- Selmaní, A., Kovačević, D., & Bohinc, K. (2022). Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 303). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>
- Serena, P. A., & Correia, A. (2003). Nanotecnología: el motor de la próxima revolución tecnológica. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, , 9, 32–42.
- Shekhar, S., Gautam, S., Sharma, B., Sharma, S., Das, P. P., & Chaudhary, V. (2021). Deciphering the pathways for evaluation of nanotoxicity: Stumbling block in nanotechnology. In *Cleaner Engineering and Technology* (Vol. 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100311>
- Shobha, N., Nanda, N., Giresha, A. S., Manjappa, P., Sophiya, P., Dharmappa, K. K., & Nagabhushana, B. M. (2019). Synthesis and characterization of Zinc oxide nanoparticles utilizing seed source of *Ricinus communis* and study of its antioxidant, antifungal and anticancer activity. *Materials Science and Engineering C*, 97(June 2018), 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.023>
- Silva, A., Diopa, J., Gomes, C., Teiceira, M., Santos, D. J., Dos, M., Pires, A., & Andreani, T. (2018). Chapter 6. New strategies for the treatment of autoimmune diseases using nanotechnologies. In Elsevier (Ed.), *Nanotecnologías emergentes en inmunología El diseño, las aplicaciones y la toxicología de los nanofármacos y las nanovacunas* (pp. 135–163). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40016-9.00006-3>
- Singh, D., Singh, S., Sahu, J., Srivastava, S., & Singh, M. R. (2016). Ceramic nanoparticles: Recompense, cellular uptake and toxicity concerns. In *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 401–409). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.955106>
- Singh, M., Vadher, D., Dixit, V., & Jariwala, C. (2021). Synthesis, optimization and characterization of zinc oxide nanoparticles prepared by sol-gel technique. *Materials Today: Proceedings*, 48, 690–692. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.145>
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

- Sonia, S. S., Linda Jeeva Kumari, L. J. K. H., Ruckmani, R. K., & Sivakumar, S. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant potentials of biosynthesized colloidal zinc oxide nanoparticles for a fortified cold cream formulation: A potent nanocosmeceutical application. *Materials Science and Engineering C*, 79(May), 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.059>
- Srivastav, A. K., Kumar, M., Ansari, N. G., Jain, A. K., Shankar, J., Arjaria, N., Jagdale, P., & Singh, D. (2016). A comprehensive toxicity study of zinc oxide nanoparticles versus their bulk in Wistar rats. *Human and Experimental Toxicology*, 35(12), 1286–1304. <https://doi.org/10.1177/0960327116629530>
- Sruthi, S., Ashtami, J., & Mohanan, P. V. (2018). Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles. In *Materials Today Chemistry* (Vol. 10, pp. 175–186). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.09.008>
- Suzuki, M., Suzuki, T., Watanabe, M., Hatakeyama, S., Kimura, S., Nakazono, A., Honma, A., Nakamaru, Y., Vreugde, S., & Homma, A. (2021). Role of intracellular zinc in molecular and cellular function in allergic inflammatory diseases. In *Allergology International* (Vol. 70, Issue 2, pp. 190–200). Japanese Society of Allergology. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.09.007>
- Tang, H. Q., Xu, M., Rong, Q., Jin, R. W., Liu, Q. J., & Li, Y. L. (2016). The effect of ZnO nanoparticles on liver function in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4275–4285. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109031>
- Teck. (2018). Metal Zinc Hojas De Datos De Seguridad. In *Teck Resources Limited* (pp. 1–7). <http://www.teck.com/media/Zinc-Metal-Spanish-SDS.pdf>
- Treuting, P., Dintzis, S., & Montine, K. (2017). Sistema Respiratorio- Cavidades Nasales. In T. Broderick (Ed.), *Comparative Anatomy and Histology a Mouse, Rat, and Human Atlas* (Segunda Ed, pp. 85–94). Mica Haley. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802900-8.00019-1>
- Vásquez López, J. A. (2007). Pautas básicas para el manejo de animales de experimentación en investigación biomédica. *ResearchGate, Departamento de Morfología, Facultad de Ciencias de la Salud*.
- Vera, G. P., Farias, C. L., & Castañeda, F. A. (2017). Síntesis de nanopartículas metálicas por rutas verdes. *Journal of BioProcess and Chemical Technology*, 9(18), 15–20.

- Vishnupriya, B., Nandhini, G. R. E., & Anbarasi, G. (2020). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hylocereus undatus* fruit peel extract against clinical pathogens. *Materials Today: Proceedings*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.474>
- Vysloužil, J., Kulich, P., Zeman, T., Vaculovič, T., Tvrdoňová, M., Mikuška, P., Večeřa, Z., Stráská, J., Moravec, P., Balcar, V. J., & Šerý, O. (2020). Subchronic continuous inhalation exposure to zinc oxide nanoparticles induces pulmonary cell response in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 61(September 2019), 0–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126511>
- Wang, C., Lu, J., Zhou, L., Li, J., Xu, J., Li, W., Zhang, L., Zhong, X., & Wang, T. (2016a). Effects of long-term exposure to zinc oxide nanoparticles on development, zinc metabolism and biodistribution of minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in mice. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164434>
- Wang, C., Lu, J., Zhou, L., Li, J., Xu, J., Li, W., Zhang, L., Zhong, X., & Wang, T. (2016b). Effects of long-term exposure to zinc oxide nanoparticles on development, zinc metabolism and biodistribution of minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in mice. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164434>
- Wani, A. L., Parveen, N., Ansari, M. O., Ahmad, Md. F., Jameel, S., & Shadab, G. G. H. A. (2017). Zinc: An element of extensive medical importance. *Current Medicine Research and Practice*, 7(3), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.cmrp.2017.02.006>
- Wolf, K. D. C., Morgan, K. T., Gross, C. E. A., Barrow, C., Moss, O. R., James, R. Q., & Popp, J. A. (1995). Two-Year Inhalation Exposure of Female and Male B5C3F1 Mice and F344 Rast to Chlorine Gas Induce Lesions Confined to the Nose. *Fundamental and Applied Toxicology*, 24, 111–131.
- Younes, N. R. Ben, Amara, S., Mrad, I., Ben-Slama, I., Jeljeli, M., Omri, K., El Ghouli, J., El Mir, L., Rhouma, K. Ben, Abdelmelek, H., & Sakly, M. (2015). Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8728–8737. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4002-5>
- Zhang, H., Liang, Z., Zhang, J., Wang, W. ping, Zhang, H., & Lu, Q. (2020). Zinc oxide nanoparticle synthesized from *Euphorbia fischeriana* root inhibits the cancer cell growth through modulation of apoptotic signaling pathways in lung cancer cells. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(7), 6174–6183. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.05.020>