

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

**LICENCIATURA EN INGENIERIA EN NANOTECNOLOGÍA**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**Síntesis y Simulación Molecular de un Nanosistema de Puntos  
Cuánticos de ZnO Funcionalizados con Teofilina y su Evaluación  
Hepatoprotectora.**

Para obtener el Título de

Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología

**P R E S E N T A**

**Oswaldo Ochoa Vera**

No de cuenta: 397356

Directores:

Dr. Aldo Christiaan Jardínez Vera

Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Apan, Hgo., 28 de Noviembre de 2024



MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO  
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DE LA U.A.E.H.  
PRESENTE.

Por este conducto le comunico que la Comisión Revisora asignada al trabajo de tesis del alumno de la Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología Osvaldo Ochoa Vera, con número de cuenta 397356, quien presenta el tema "Síntesis y Simulación Molecular de un Nanosistema de Puntos Cuánticos de ZnO Funcionalizados con Teofilina y su Evaluación Hepatoprotectora" después de revisar la tesis y constituida como Jurado, ha autorizado la impresión de tesis, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE : DR. MARIO ISIDORO ORTÍZ RAMÍREZ

SECRETARIO: DR. ALBERTO NAVARRETE PEÓN

PRIMER VOCAL: DR. TÓMAS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

SEGUNDO VOCAL: DR. ALDO CHRISTIAAN JARDÍNEZ VERA

TERCER VOCAL: DR. JOSÉ ALFREDO PESCADOR ROJAS

Sin otro particular, le reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE-  
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"  
Apan, Hgo., a 28 de Noviembre de 2024.

DR. JORGE ZUNO SILVA  
DIRECTOR DE LA ESCUELA SUPERIOR DE APAN



## **Agradecimientos**

A lo largo de este camino, he aprendido que los grandes logros no son producto del esfuerzo individual, sino del apoyo invaluable de las personas que nos rodean. Esta tesis es testimonio de esa realidad, y quiero expresar mi más sincera gratitud a quienes han sido parte de este viaje.

A mi asesor de tesis Aldo Christiaan Jardínez Vera, quien no solo confió en mi capacidad académica, sino también en mi resiliencia personal. Su fe en mí fue un motor constante para superar los retos más desafiantes. Me brindó no solo guía en el ámbito institucional, sino también apoyo en momentos difíciles de mi vida, demostrándome que la amistad y la mentoría pueden ir de la mano. Su tiempo, consejos y amistad marcaron profundamente esta etapa de mi formación.

A mi asesor de tesis Tómas Eduardo Fernández Martínez, cuyo compromiso, formalidad y humanidad lo convierten en una de las personas más brillantes que he conocido. Su paciencia y buen humor hicieron que cada aprendizaje fuera una experiencia enriquecedora. Gracias por confiar en mí, por tu generosidad al compartir tus conocimientos y por apoyarme a llevar este proyecto a buen lugar. Espero poder seguir siendo parte del bionegocio y desempeñarme de la mejor manera.

A mis compañeros del laboratorio Alicia Rodríguez Pasten y Jose Antonio Estefes Duarte, quienes siempre estuvieron ahí para guiarme en los momentos de duda. Gracias por nunca dejarme solo, incluso cuando el reloj marcaba altas horas de la noche. Su disposición para ayudarme fue un recordatorio constante de lo valioso que es el trabajo en equipo.

A mi amigo Alejandro Perez Chargoy, que en paz descanse. Aunque convivimos poco tiempo, dejaste una huella imborrable en mi vida. Abriste las puertas de tu casa y tu corazón en un momento de transición muy importante para mí. Gracias por ser servicial y empático, por brindarme apoyo sin pretender ocupar un lugar que no te correspondía. Tu generosidad me ayudó a avanzar en mi decisión de dejar todo atrás para perseguir este sueño.

A mis abuelos Osvaldo Vera Ramírez y Ernestina Miranda Martínez, quienes siempre estuvieron pendientes de mí. Su alegría por mis logros, sus consejos sabios y su apoyo incondicional para que nunca me faltara lo esencial fueron un refugio constante. Gracias por enseñarme el valor de la familia y por ser un pilar en este proceso.

A mi novia Fernanada Bermudez Ramírez, el mayor regalo que me ha dado la vida. Sin ti, este logro no habría sido posible. Tu amor fue mi refugio en los días más oscuros, tu motivación mi fuerza en los momentos más difíciles. Me ayudaste a organizarme, a economizar mi tiempo, a trabajar con más ganas y, lo más importante, me recordaste que siempre hay alguien que cree en mí incluso cuando yo no lo hago. Tu apoyo, incluso en los detalles más pequeños de esta tesis, me impulsó a dar lo mejor de mí. Esta etapa de mi vida te pertenece tanto como a mí, porque a cada paso, tú estuviste ahí.

A todos ustedes, gracias. Este logro no es solo mío, sino de cada uno que caminó conmigo en este trayecto.

## Dedicatorias

A lo largo de esta travesía, me he dado cuenta de que la vida está llena de maestros, no solo en las aulas, sino también en las personas que amamos y admiramos. Esta sección no es solo un espacio para mencionar nombres, sino un tributo a aquellos que, con su amor, sacrificio y ejemplo, me han guiado en el camino que me trajo hasta aquí.

A mi mamá Mayra R. Vera Miranda,  
la primera mujer que llenó mi vida de amor y que me enseñó, con cada gesto y sacrificio, el verdadero significado de la entrega incondicional. Hemos pasado juntos momentos que parecían insuperables, luchando codo a codo como si el mundo entero estuviera en contra, pero tu fortaleza siempre fue nuestra guía. A pesar de tu batalla contra diversas enfermedades, nunca dejas que el dolor apague tu risa, esa que, en los lugares donde te sientes cómoda, se convierte en la luz que todos necesitamos. Mamá, tú nunca pensaste en ti misma cuando se trataba de verme feliz; te esforzaste más allá de tus límites para darme la oportunidad de estudiar y de vivir con comodidad, aunque por dentro estuvieras sufriendo. Eres mi ejemplo más puro de tenacidad, de amor y de valentía. Todo lo que soy te lo debo a ti, y esta tesis no es solo un logro mío, sino también el reflejo de todo lo que tú me enseñaste. Con nada te pago todo lo que haces por mi, y lo orgulloso que me hace sentir el decir que soy tu hijo. Te amo.

A mi papá Mario Ochoa Torres,  
mi roca. Desde pequeño, la vida te puso en el camino de la independencia, obligándote a construir tus valores y tus sueños con tus propias manos, sin una figura paterna tan presente que te guiara. Y aun así, tu nunca me fallas. Tú fuiste todo lo que no tuviste: un padre presente, firme y lleno de amor. Me enseñaste que los problemas no son muros inquebrantables, sino obstáculos que podemos superar si mantenemos la calma. Me llamas “mi campeón” desde que era niño, y cada día intento honrar ese nombre, esforzándome por ser digno del orgullo que veo en tus

ojos. Papá, tú me mostraste con tu vida que, aunque el camino sea difícil, es posible alcanzar cualquier meta con esfuerzo y humildad. Eres la razón por la que nunca dejo de creer que los sueños se pueden lograr, y por eso, este logro también es tuyo.

# Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>12</b>
<b>Capítulo 1 Introducción .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Nanotecnología.....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Historia. ....	16
1.1.2 Etapas del desarrollo de la nanotecnología.....	16
1.1.3 Aplicaciones de la nanotecnología. ....	18
<b>1.2 Simulación molecular. ....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Métodos de simulación molecular de mecánica clásica.....	19
1.2.2 Métodos de simulación molecular de mecánica cuántica. ....	20
1.2.2.1 Métodos semiempíricos. ....	21
1.2.2.2 Método ab initio. ....	21
1.2.2.3 Teoría del Funcional Densidad (DFT). ....	21
<b>1.3 Óxido de zinc (ZnO).....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Propiedades del óxido de zinc. ....	27
1.3.2 Aplicaciones del óxido de zinc.....	27
<b>1.4 Puntos cuánticos. ....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Confinamiento Cuántico. ....	28
<b>1.5 Métodos de síntesis de nanoestructuras. ....</b>	<b>31</b>
1.5.1 Métodos biológicos.....	32
1.5.2 Métodos físicos. ....	33
1.5.3 Métodos químicos. ....	33
1.5.3.1 Método de precipitación. ....	34
<b>1.6 Caracterización de nanoestructuras. ....</b>	<b>35</b>
1.6.1 Espectroscopía UV-VIS.....	37
1.6.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) .....	39
1.6.3 Dispersión dinámica de luz (DLS). ....	40
<b>1.7 Funcionalización.....</b>	<b>41</b>
<b>1.8 Nanosistemas.....</b>	<b>42</b>
<b>1.9 Fármacos como especies de funcionalización.....</b>	<b>43</b>
1.9.1 Farmacocinética. ....	44
1.9.2 Farmacodinamia. ....	45

<b>1.10 Metilxantinas.</b>	<b>45</b>
1.10.1 Metabolismo.	46
<b>1.11 Teofilina.</b>	<b>47</b>
<b>1.12 Anatomía y fisiología hepática.</b>	<b>48</b>
1.12.1 Unidades secretoras hepáticas.	49
1.12.2 Sinusoide hepático.	50
1.12.3 Sistema Biliar.	50
1.12.4 Fisiología del hígado.	51
<b>1.13 Enfermedades hepáticas.</b>	<b>53</b>
1.13.1 Colestasis e ictericia.	53
1.13.2 Hepatitis.	53
1.13.3 Fibrosis.	54
1.13.4 Cirrosis.	54
<b>1.14 Modelos experimentales de daño hepático.</b>	<b>55</b>
<b>1.15 Mecanismo de acción de daño hepático agudo por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).</b>	<b>56</b>
<b>1.16 Marcadores de funcionalidad y daño hepático.</b>	<b>57</b>
1.16.1 Catalasa (CAT).	57
1.16.2 Proteínas.	58
1.16.3 Peroxidación Lipídica (PL).	58
1.16.4 Bilirrubinas.	58
1.16.5 Alanina Aminotransferasa (ALT).	58
1.16.6 Fosfatasa Alcalina (FA).	59
1.16.7 Gamma-Glutamil Transpeptidasa (GGTP).	59
1.16.8 Glucógeno Hepático.	60
<b>Capítulo 2 Antecedentes.</b>	<b>61</b>
<b>2.1 Efectos de los nanosistemas en el hígado.</b>	<b>62</b>
<b>2.2 Efecto de la teofilina en el hígado.</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 3 Justificación.</b>	<b>64</b>
<b>Capítulo 4 Objetivos</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Objetivo general.</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 5 Metodología</b>	<b>70</b>



<b>5.1 Método computacional.....</b>	<b>71</b>
5.1.1 Optimización de geometría. ....	71
5.1.2 Análisis de propiedades electrónicas individuales y cálculo de frecuencias.....	71
5.1.3 Estudio de interacciones intermoleculares.....	72
<b>5.2 Método experimental. ....</b>	<b>72</b>
5.2.1 Síntesis de puntos cuánticos de óxido de zinc.....	72
5.2.2 Funcionalización de ZnO QD´s – teofilina. ....	74
<b>5.3 Caracterización de material.....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.1 Caracterización de ZnO QD's.....</b>	<b>76</b>
5.3.1.1 Espectroscopía UV-Vis. ....	76
5.3.1.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier ....	76
5.3.1.3 Microscopía Electrónica de Barrido.....	77
5.3.1.4 Emisión espontánea bajo luz UV. ....	77
5.3.1.5 Cálculo de área superficial y composición atómica.....	77
<b>5.3.2 Caracterización del Nanosistema (ZnO-AC-Teofilina) .....</b>	<b>78</b>
5.3.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido con Espectroscopía de Dispersión de Energía (SEM-EDS). ....	78
5.3.2.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	78
5.3.2.3 Dispersión Dinámica de Luz (DLS). ....	78
<b>5.4 Evaluación farmacológica .....</b>	<b>79</b>
<b>5.5 Determinación de biomarcadores de funcionalidad.....</b>	<b>82</b>
<b>5.5.1 Determinaciones en plasma. ....</b>	<b>82</b>
5.5.1.1 Fosfatasa alcalina (FA) .....	82
5.5.1.2 Gamma glutamil-transpeptidasa (GGTP).....	83
5.5.1.3 Alanina-aminotransferasa (ALT). ....	84
5.5.1.4 Bilirrubinas totales (BT). ....	85
<b>5.5.2 Determinaciones en hígado.....</b>	<b>85</b>
5.5.2.1 Peroxidación lipídica (LP). ....	85
5.5.2.2 Proteínas.....	87
5.5.2.3 Glucógeno hepático (GH). ....	88
5.5.2.4 Catalasa (CAT). ....	89
<b>5.6 Pruebas estadísticas. ....</b>	<b>91</b>
<b>Capítulo 6 Resultados.....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 Simulación molecular resultados y discusión.....</b>	<b>93</b>
6.1.1 PM6.....	93
6.1.2 LSDA/6-31+G(d,p) .....	95
6.1.3 B3LYP/DGDZVP.....	102
<b>6.2 Síntesis de ZnO QD´s. ....</b>	<b>108</b>
6.2.1 UV-Vis .....	109

6.2.2 SEM .....	110
6.2.3 FT-IR .....	111
6.2.4 Emisión espontanea de luz.....	112
6.2.5 Cálculo de área superficial y composición atómica.....	113
<b>6.3 Síntesis de nanosistema.....</b>	<b>116</b>
<b>6.4 Biomarcadores de funcionalidad. ....</b>	<b>122</b>
6.4.1 Fosfatasa alcalina. ....	122
6.4.2 Gamma glutamil-transpeptidasa.....	123
6.4.3 Alanina-aminotransferasa.....	124
6.4.4 Bilirrubinas totales. ....	125
6.4.5 Peroxidación lipídica .....	126
6.4.6 Glucógeno hepático.....	127
6.4.7 Catalasa .....	128
<b>Capítulo 7 Discusión.....</b>	<b>130</b>
<b>7.1 Formación de compuestos para nanosistema en estudio teorico computacional. ....</b>	<b>131</b>
<b>7.2 Análisis de síntesis y caracterización de ZnO QD's.....</b>	<b>131</b>
7.2.1 Mecanismo de crecimiento y control de tamaño. ....	132
7.2.2 Espectroscopía UV-Vis y <i>band gap</i> . ....	133
7.2.3 Microscopía electrónica de barrido. ....	133
7.2.4 Cálculo de área superficial y composiscón atómica.....	133
7.2.5 Aplicaciones potenciales.....	135
<b>7.3 Análisis de síntesis y caracterización de nanosistema. ....</b>	<b>136</b>
7.3.1 Morfología y Estructura. ....	136
7.3.2 Composición Elemental.....	136
7.3.3 Tamaño y Distribución de Tamaño. ....	137
7.3.4 Interacciones Químicas. ....	137
<b>7.4 Evaluación de efecto hepatoprotector en daño inducido por TC en ratas....</b>	<b>138</b>
<b>7.4.1 Efectos Anticolestáticos. ....</b>	<b>138</b>
7.4.1.1 Fosfatasa alcalina (FA). ....	139
7.4.1.2 Gamma-glutamyl transferasa (GGTP).....	139
7.4.1.3 Bilirrubina total. ....	140
<b>7.4.2 Efectos Antioxidantes. ....</b>	<b>140</b>
7.4.2.1 Peroxidación lipídica (LP). ....	140
7.4.2.2 Catalasa (CAT). ....	141

<b>7.4.3 Efectos Antinecróticos.....</b>	<b>142</b>
7.4.3.1 Alanina aminotransferasa (ALT) .....	142
<b>7.4.4 Efectos sobre el Metabolismo Energético. ....</b>	<b>143</b>
7.4.4.1 Glucógeno hepático (GH).....	143
<b>7.4.5 Mecanismos de acción propuestos. ....</b>	<b>144</b>
<b>Capítulo 8 Conclusiones.....</b>	<b>145</b>
<b>Capítulo 9 Perspectivas y trabajos futuros .....</b>	<b>148</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>150</b>

## Resumen.

Las enfermedades hepáticas representan un problema de salud pública de gran magnitud, situándose entre las principales cinco causas de mortalidad en México según el Sistema Nacional de Información en Salud. Estas patologías tienen múltiples etiologías, entre ellas infecciones, consumo excesivo de alcohol, hígado graso, colestasis crónica y exposición a agentes tóxicos, incluidos medicamentos. La automedicación, una práctica común en personas aparentemente sanas, agrava este panorama al exponer a la población a mayores riesgos de daño hepático.

El presente estudio tiene como objetivo la síntesis y simulación de un nanosistema de puntos cuánticos de óxido de zinc funcionalizados con teofilina para evaluar su efecto hepatoprotector en un modelo de daño hepático agudo inducido por tetracloruro de carbono en ratas Wistar.

La elección de los componentes del nanosistema responde a la necesidad de explorar nuevas alternativas terapéuticas para el daño hepático, un área con numerosas incógnitas y oportunidades de innovación. Aunque la teofilina es ampliamente conocida en la medicina, su aplicación específica en este contexto ha sido poco explorada, y los estudios previos presentan resultados contradictorios. Por otro lado, el ZnO ha demostrado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en múltiples investigaciones, lo que sustenta su selección como componente clave en este nanosistema.

La investigación se desarrolló en tres etapas: una computacional, que incluyó la simulación de interacciones entre ZnO, ácido cítrico y teofilina mediante teoría del funcional de la densidad con el funcional híbrido B3LYP y la base DGDZVP; una experimental, en la cual se sintetizaron los ZnO QD's mediante el método de precipitación y se funcionalizaron con teofilina, siendo caracterizados mediante FT-IR, UV-Vis, EDS, SEM y DLS; y una etapa in vivo, donde se evaluaron marcadores bioquímicos de funcionalidad hepática.

Los resultados computacionales confirmaron la estabilidad termodinámica del complejo ZnO-AC-Thp, destacando propiedades electrónicas que sugieren un equilibrio entre estabilidad y reactividad, adecuado para aplicaciones en procesos redox y sistemas biológicos. En la etapa experimental, se demostró la síntesis exitosa de ZnO QD's con control preciso de tamaño y propiedades ópticas, mientras que la funcionalización con Thp, empleando ácido cítrico como agente acoplante, resultó en un nanosistema homogéneo y estable. En los estudios in vivo, el nanosistema evidenció una acción multifactorial, combinando efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antinecróticos, posicionándose como una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

# **Capítulo 1**

## **Introducción**

## 1.1 Nanotecnología.

La nanotecnología se define a partir del prefijo "nano", derivado de la palabra griega "enano". En términos simples, "nano" denota la fracción de un metro equivalente a una mil millonésima parte o igual a  $1 \times 10^{-9}$  m<sup>1</sup>.

En consecuencia, la nanotecnología involucra el estudio, diseño, creación, manipulación, síntesis y aplicaciones de materiales aparatos y sistemas funcionales a través del aprovechamiento de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala<sup>2</sup>.

Naciones industrializadas como Estados Unidos, la Unión Europea, Japón, China, Corea y Taiwán han establecido programas nacionales dedicados a la nanotecnología, coordinando esfuerzos para satisfacer necesidades específicas mediante la creación de nanoproductos. En contraste, algunos países en desarrollo como Brasil, Chile, Costa Rica, India, Malasia, Bangladesh y Sudáfrica están asignando recursos significativos a la investigación y desarrollo de nanotecnologías. En el caso de México, se están llevando a cabo iniciativas para la creación de un programa nacional de nanotecnología, además de contar con grupos de trabajo y redes de investigación enfocadas en áreas como nanomateriales, nanotubos, nanopartículas, nanocatalizadores e ingeniería molecular<sup>3</sup>.

De esta manera, la nanociencia y la nanotecnología han surgido como una disciplina científica interdisciplinaria que ha fusionado la ingeniería con la biología, la química y la física. Esto se debe a las aplicaciones potenciales en diversos campos, como la electrónica, la cerámica, la catálisis, el almacenamiento de datos magnéticos, componentes estructurales, alimentos, cosméticos, así como en el ámbito biológico y médico<sup>4</sup>.

### **1.1.1 Historia.**

La comunidad científica atribuye los primeros indicios de la nanotecnología al físico y premio Nobel Richard Feynman, quien abordó las propiedades de los nanomateriales a escala nanométrica en su conferencia del 29 de diciembre de 1959 ("There's plenty of room at the Bottom")<sup>1</sup>. Aunque fue Feynman quien esbozó por primero estos conceptos, el término "nanotecnología" fue formalmente definido en 1974 por el profesor Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencias de Tokio en su artículo "On basic concept of nano-technology"<sup>3</sup>.

La nanotecnología ganó amplia aceptación en 1986 con la publicación de "Engines of creation: The coming era of nanotechnology and nanosystems". En este trabajo, se introdujo el concepto de los *clusters* y se presentó la invención del microscopio de efecto túnel (STM, por sus siglas en inglés), que posibilitó el descubrimiento del fullereno en 1986 y de los nanotubos de carbono,<sup>5</sup> al mismo tiempo, se exploraron la síntesis y las propiedades de los semiconductores nanocristalinos, lo que propició un avance rápido en la comprensión de los puntos cuánticos (QD's) y las nanopartículas (NP's) de óxidos metálicos.

### **1.1.2 Etapas del desarrollo de la nanotecnología.**

#### *I. Nanoestructuras pasivas.*

Las nanoestructuras pasivas representan la primera generación de nanotecnología, marcando el período inicial en el que se descubrió y comenzó a aplicarse esta disciplina en el mercado. Este tipo de nanotecnología posibilita la incorporación de materiales y propiedades adicionales a un producto. Un ejemplo destacado son los recubrimientos impermeables, por ejemplo, en la construcción, donde el uso de nanotubos de carbono se aprovecha para mejorar otras características en el producto<sup>6</sup>.



II. *Nanoestructuras activas.*

Estas nanoestructuras poseen la habilidad de alterar completamente las características de un objeto mediante su bioactividad, que posibilita la entrega precisa de un fármaco en una célula o un órgano específicos. Este proceso puede lograrse al revestir la nanopartícula con una proteína particular y formar un nanosistema<sup>7</sup>.

III. *Sistemas de nanosistemas.*

La tercera generación de nanotecnología aún no ha sido alcanzada. Fundamentalmente, representa el ámbito nanotecnológico al que la mayoría de las personas suele referirse cuando se aborda este tema. En la nanotecnología de tercera generación, observamos la colaboración de diversas nanomáquinas<sup>7</sup>. Este nivel se fundamenta en el autoensamblaje eficiente y efectivo de moléculas o nanosistemas a una escala más amplia.

IV. *Nanosistemas moleculares.*

La cuarta generación representa la perfección de esta tecnología. En este nivel, se logra un control total sobre las moléculas que constituyen las nanomáquinas<sup>7</sup>. En otras palabras, mientras que una nanomáquina de tercera generación puede tener diversos componentes compuestos por moléculas específicas, una nanomáquina de cuarta generación está construida con diferentes moléculas que poseen estructuras particulares; cada molécula tiene una estructura y una función definidas. En términos más concretos, se estaría hablando de la posibilidad de construir estas nanomáquinas a nivel molecular, utilizando átomos específicos en su construcción.

### **1.1.3 Aplicaciones de la nanotecnología.**

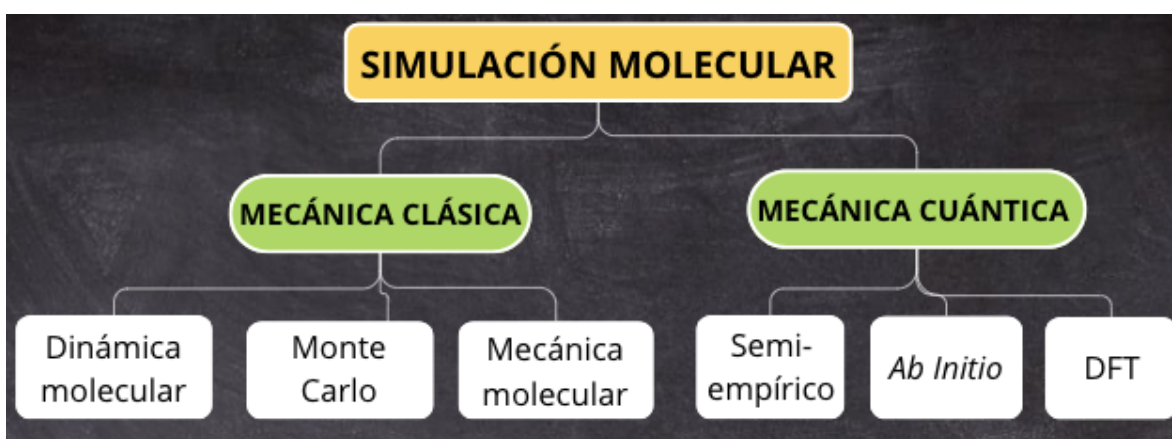
Los materiales nanoestructurados se han incorporado de manera activa en diversas aplicaciones, tales como pelotas de tenis con el propósito de modular el número de giros asociados; en los neumáticos de alto rendimiento mediante la inclusión de nanopartículas; en la confección de telas dotadas de propiedades anti-manchas o antiarrugas mediante el uso de nanofibras; en la formulación de productos cosméticos, fármacos, y terapias novedosas, haciendo uso de nanosistemas; en la creación de filtros y membranas de agua nanoestructuradas, así como en soluciones medioambientales; en la optimización de procesos productivos mediante la incorporación de materiales más robustos o eficientes, tanto en contextos industriales como agroindustriales; y en la concepción de nuevos materiales con aplicaciones que abarcan desde la electrónica, la aeronáutica, y prácticamente toda la industria del transporte, hasta su implementación en armamentos más sofisticados, como explosivos y tecnologías balísticas, entre otros. Asimismo, se están empleando nanodispositivos integrados en nanoestructuras más amplias para aplicaciones en campos como la nanomedicina, nanorobótica, y nanobiosensores<sup>4</sup>.

### **1.2 Simulación molecular.**

Las simulaciones computacionales se han convertido en una herramienta clave en múltiples disciplinas para llevar a cabo estudios *in silico* de fenómenos naturales y procesos que ocurren a diferentes escalas, desde la subatómica hasta la cósmica.<sup>8</sup> Estos estudios funcionan como un vínculo entre los modelos teóricos y los experimentales, ya que a través de modelos matemáticos y software especializado es posible realizar experimentos virtuales con flexibilidad para definir las condiciones y parámetros del sistema, permitiendo también el cálculo de diversas propiedades<sup>9</sup>. Todo esto se realiza sin incurrir en los altos costos que implicarían los experimentos físicos, limitándose únicamente a la capacidad computacional

disponible y a la precisión del modelo matemático empleado para representar el sistema real.

Existen numerosos métodos de simulación molecular, algunos de ellos basados en la mecánica cuántica, como Teoría Funcional de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés) y otros en la mecánica clásica, y la elección del enfoque depende del tipo de problema que se quiera abordar<sup>9</sup>. Las ramas de la simulación molecular se muestran en la Figura 1.



**Figura 1.** Ramas de simulación molecular<sup>9</sup>.

### 1.2.1 Métodos de simulación molecular de mecánica clásica.

La mecánica molecular se basa en las leyes de la física clásica aplicadas a los núcleos atómicos, excluyendo explícitamente el tratamiento directo de los electrones. Este enfoque emplea un modelo matemático en el que las moléculas se representan como un conjunto de átomos conectados por enlaces químicos. Dichos enlaces están descritos por parámetros que definen fuerzas de tensión, flexión, y las interacciones entre átomos no enlazados<sup>10</sup>.

El método se fundamenta en la construcción de una expresión matemática que describe la energía potencial de la molécula, la cual depende exclusivamente de las posiciones relativas de sus átomos. Esta expresión, conocida como campo de

fuerza, se desarrolla a partir de funciones matemáticas parametrizadas con valores obtenidos mediante cálculos *ab initio* o datos experimentales, como los derivados de estudios espectroscópicos<sup>11</sup>.

La energía total de un sistema molecular en este enfoque se descompone generalmente en cinco componentes principales<sup>10</sup>:

- **Energía de enlace:** Depende de la distancia entre átomos enlazados.
- **Energía angular:** Relacionada con el ángulo formado por tres átomos consecutivos.
- **Energía de torsión:** Describe las rotaciones alrededor de enlaces simples.
- **Interacciones electrostáticas:** Asociadas a las cargas parciales de los átomos.
- **Interacciones de Van der Waals:** Incluyen fuerzas de dispersión y repulsión.

El campo de fuerza actúa como una herramienta matemática que permite describir y predecir las fuerzas y energías involucradas en las interacciones del sistema molecular. Este enfoque es esencial para modelar sistemas moleculares grandes de forma eficiente, ya que simplifica considerablemente los cálculos al no considerar directamente la función de onda o la densidad electrónica total.

Los métodos que implementan esta aproximación se dividen en tres categorías principales: Monte Carlo, dinámica molecular y mecánica molecular<sup>9</sup>.

### **1.2.2 Métodos de simulación molecular de mecánica cuántica.**

Los métodos de simulación molecular basados en mecánica cuántica suelen ser más costosos en términos de cálculo y requieren mayor capacidad de memoria computacional, por lo que su aplicación está restringida a sistemas con pocos átomos. Sin embargo, ofrecen una descripción fisicoquímica del sistema más precisa al incluir el comportamiento de todos los electrones en los modelos<sup>12</sup>.

### **1.2.2.1 Métodos semiempíricos.**

Este enfoque, también conocido como método de primeros principios, se basa exclusivamente en constantes físicas fundamentales, como las masas y cargas de electrones y núcleos atómicos, para resolver la ecuación de Schrödinger y obtener funciones de onda que describen los electrones en las órbitas moleculares. Estos métodos proporcionan los resultados más precisos, ya que permiten calcular tanto estados de transición como de excitación, aunque exigen un alto costo computacional<sup>12</sup>.

### **1.2.2.2 Método *ab initio*.**

Estos métodos se caracterizan por usar parámetros obtenidos de experimentos o de cálculos *ab initio* para resolver la ecuación de Schrödinger y generar funciones de onda de orbitales moleculares<sup>13</sup>. Si bien son menos precisos que los métodos *ab initio* debido a simplificaciones como el uso de electrones de valencia o hamiltonianos simplificados, son más eficientes en términos computacionales y también permiten calcular estados de transición y excitación<sup>14</sup>.

### **1.2.2.3 Teoría del Funcional Densidad (DFT).**

En lugar de calcular la función de onda molecular, DFT se enfoca en determinar una función de densidad electrónica, que describe cómo se distribuyen los electrones en una molécula. A partir de esta densidad, se pueden calcular energías electrónicas moleculares y otras propiedades del sistema<sup>13</sup>. Los métodos DFT ofrecen un nivel de precisión similar al de los métodos *ab initio*, pero con una demanda computacional significativamente menor<sup>12</sup>. La precisión de los cálculos DFT depende de la elección adecuada del funcional, que describe las interacciones

electrónicas<sup>12</sup>, y de la base, que define el conjunto de funciones utilizadas para describir las órbitas moleculares<sup>15</sup>.

#### **1.2.2.3.1 Bases.**

Una base en DFT es un conjunto de funciones matemáticas que se combinan linealmente para construir la densidad electrónica. Estas funciones, típicamente centradas en los núcleos atómicos, sirven como bloques constructivos para representar la distribución espacial de los electrones y se utilizan para representar la función de onda electrónica en el método Hartree-Fock<sup>15</sup>. La elección de la base depende del tamaño del sistema, la precisión requerida y los recursos computacionales disponibles<sup>9</sup>.

#### **1.2.2.3.2 Funcionales.**

Un funcional en DFT es una expresión matemática que relaciona la densidad electrónica con la energía total del sistema. Su propósito es describir las complejas interacciones electrón-electrón y electrón-núcleo de manera aproximada<sup>15</sup>. Tanto la base como el funcional son elementos fundamentales en los cálculos DFT. La base determina la calidad de la representación de la densidad electrónica, mientras que el funcional determina la precisión con la que se calcula la energía del sistema a partir de esa densidad<sup>15</sup>.

#### **1.2.2.3.3 Relación entre Bases y Funcionales.**

La elección adecuada de la base y el funcional es crucial para obtener resultados precisos y confiables. Una analogía útil es comparar la DFT con la construcción de un edificio: la base es como la estructura del inmueble, mientras que el funcional son los materiales de construcción. Ambos son necesarios para construir un edificio

sólido y funcional. Algunos autores se basan en el uso de la analogía de la escalera de Jacob para seleccionar el funcional que más se adecue a sus necesidades<sup>16</sup>.

- Ejemplos de bases: STO-3G, 3-21G, 6-31G, cc-pVDZ, cc-pVTZ, etc<sup>15</sup>.
- Ejemplos de funcionales: SVWN, B3LYP, PBE,  $\omega$ B97XD, M06-2X, etc<sup>15</sup>.

#### 1.2.2.3.4 Analogía de escalera de Jacob.

En los cálculos basados en DFT, es posible mejorar de manera estructurada y gradual la precisión de los resultados al trabajar con métodos de función de onda, comenzando desde el nivel básico mediante la inclusión de excitaciones y la expansión de la base<sup>17</sup>. Este enfoque fue propuesto por John P. Perdew y Schmidt en 2001<sup>16</sup>, quienes idearon un modelo conocido como la "escalera de Jacob". Esta estructura jerárquica permite, en teoría, optimizar sistemáticamente las predicciones obtenidas mediante DFT. Los distintos niveles de esta escalera se describen a continuación:

- I. **Primer nivel (Funcionales locales):** La Aproximación de Densidad Local (LDA, por sus siglas en inglés) supone que las interacciones de intercambio y correlación se comportan como en un gas de electrones uniforme. Este nivel es el más sencillo y rápido en términos computacionales, pero su precisión es limitada, especialmente para sistemas no homogéneos. Los funcionales locales dependen exclusivamente de la densidad electrónica local  $\rho(r)$ <sup>18</sup>. Algunos ejemplos son SVWN (Slater + Vosko-Wilk-Nusair), Dirac-Slater<sup>19</sup>.
- II. **Segundo nivel (Gradientes generalizados):** Los Funcionales de Aproximación de Gradiente Generalizado (GGA, por sus siglas en inglés) incorporan información adicional al considerar tanto la densidad local  $\rho(r)$  como el gradiente de la densidad  $\nabla\rho(r)$ . Esto permite describir sistemas moleculares y materiales con mayor precisión que los funcionales LDA, ya

que incluyen efectos no homogéneos<sup>20</sup>. Algunos ejemplos son BLYP (Becke-Lee-Yang-Parr), PBE (Perdew-Burke-Ernzerhof)<sup>21</sup>.

- III. **Tercer nivel (Meta-GGA):** Los funcionales Meta-GGA van un paso más allá al incorporar, además de la densidad y su gradiente, términos relacionados con la energía cinética de los electrones, representada por  $\tau=|\nabla\psi|^2$ . Esto mejora la precisión en ciertos sistemas, especialmente en aquellos con enlaces débiles o estructuras más complejas<sup>22</sup>. Algunos ejemplos son TPSS (Tao-Perdew-Staroverov-Scuseria), SCAN (Strongly Constrained and Appropriately Normed)<sup>23</sup>.
- IV. **Cuarto nivel (Funcionales híbridos):** Los funcionales híbridos combinan componentes de intercambio exacto (calculados al estilo Hartree-Fock) con aproximaciones de intercambio-corrección GGA o Meta-GGA. Esto mejora significativamente la precisión para propiedades electrónicas y energéticas, aunque incrementa el costo computacional<sup>24</sup>. Algunos ejemplos son B3LYP (Becke-3-Parameter-Lee-Yang-Parr), PBE0 (o PBE1PBE)<sup>23</sup>.
- V. **Quinto nivel (Funcionales de correlación de largo alcance):** En este nivel, se abordan interacciones electrónicas de largo alcance, como las fuerzas de dispersión (van der Waals) y la correlación no local. Estos funcionales son ideales para sistemas complejos, como materiales porosos o interacciones biomoleculares, aunque presentan un alto costo computacional<sup>25</sup>. Algunos ejemplos son vdW-DF (van der Waals Density Functional),  $\omega$ B97X-D, rVV10<sup>26</sup>.

A medida que se avanza en esta "escalera", los resultados obtenidos mediante DFT mejoran en precisión, aunque también aumentan los requerimientos computacionales, debido a que las máquinas se ven limitadas conforme aumenta el número de átomos, ya que se complica el número de integrales que se deben resolver para describir el sistema con exactitud. Esto implica que el tiempo y los

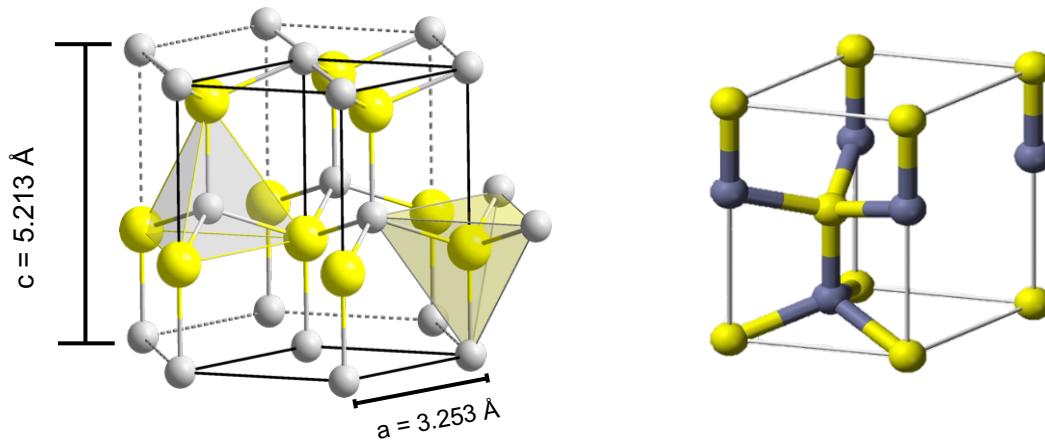


recursos computacionales necesarios crecen exponencialmente, especialmente en sistemas grandes o con geometrías complejas<sup>27</sup>.

### 1.3 Óxido de zinc (ZnO).

Algunos materiales semiconductores pertenecen al grupo II-VI, como es el caso del óxido de zinc, el cual exhibe un ancho de banda directo de 3.37 eV<sup>28</sup> y se encuentra naturalmente en la forma del mineral conocido como zincita. Su cristalización ocurre en tres estructuras distintas: wurtzita, blenda de zinc y sal de roca, las cuales surgen bajo condiciones diversas de crecimiento<sup>29</sup>.

La estructura cristalina más estable del ZnO es hexagonal tipo wurtzita<sup>30</sup>, esto debido a que la marcada diferencia de electronegatividades entre el zinc y el oxígeno conduce a un enlace con un alto grado de ionicidad, generando una repulsión estable entre las nubes de carga. Los parámetros de red para este material, a condiciones normales de presión y temperatura, son  $a = 3.253 \text{ \AA}$  y  $c = 5.213 \text{ \AA}$ <sup>29</sup>, como se muestran en la Figura 2.



**Figura 2.** A) Estructura cristalina de ZnO tipo wurzita que muestra la coordinación tetraédrica, las esferas de color amarillo representan los O y las blancas el Zn. B) Celda unitaria de la estructura tipo wurzita, las esferas amarillas representan al Zn y las grises los O.<sup>31</sup>

El óxido de zinc presenta un interés tecnológico significativo en el contexto de estructuras de baja dimensionalidad, debido a que, dependiendo del tipo de síntesis a utilizar, este tiene la capacidad de formar diversas nanoestructuras como nanopartículas, nanohilos, nanotubos, nanoalambres, o nanoestrellas<sup>32</sup>.

En el área biofarmacéutica el zinc es un mineral esencial para el organismo, se encuentra presente en varias regiones vitales del cuerpo, incluyendo el cerebro, músculos y huesos<sup>33</sup>. Cumple una serie de funciones críticas como la activación de enzimas involucradas en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Además, ejerce roles antioxidantes, contribuyendo a procesos biológicos naturales como la digestión, coagulación sanguínea, y metabolismo óseo<sup>34</sup>. Es importante destacar que su deficiencia puede desencadenar la liberación de vitamina A almacenada en el hígado. Bajo condiciones fisiológicas, pH = 7.4, el zinc no exhibe toxicidad<sup>35</sup>.

### **1.3.1 Propiedades del óxido de zinc.**

En su forma cristalina, el óxido de zinc exhibe un fenómeno termocrómico, siendo capaz de cambiar su color de blanco a amarillo o rojo en respuesta a cambios en la temperatura. Esta alteración cromática se origina por una ligera pérdida de oxígeno a elevadas temperaturas<sup>28</sup>.

El ZnO puede reaccionar tanto con ácidos como con bases, dando lugar a la formación del catión  $Zn^{2+}$  y agua en el medio ácido y el anión  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  en medio básico lo que le brinda propiedades anfóteras<sup>36</sup>.

Este compuesto destaca por su capacidad para retener la luz, su baja resistividad, su no toxicidad y su abundancia natural. Estas características singulares convierten al óxido de zinc en un material de importancia en el ámbito optoelectrónico, especialmente por sus efectos notables de confinamiento cuántico bajo condiciones experimentales apropiadas<sup>29</sup>.

### **1.3.2 Aplicaciones del óxido de zinc.**

El óxido de zinc (ZnO) se ha convertido en un recurso fundamental en una variedad de campos, desempeñando roles clave como catalizador, sensor de gas, material farmacéutico, recubrimiento antirreflejo, electrodo transparente para celdas solares, y fotodetector, entre otros<sup>37</sup>. La versatilidad del ZnO se ve respaldada por su reconocida seguridad biológica; las nanopartículas de ZnO son ampliamente consideradas como no tóxicas, bioseguras, y biocompatibles<sup>34</sup>, lo que las hace adecuadas para aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, y médica. En particular, su capacidad antiséptica y antimicrobiana ha impulsado su inclusión en tratamientos dermatológicos, como la adición a productos de cuidado personal como pasta de dientes, cosméticos, y protectores solares<sup>32</sup>.

## **1.4 Puntos cuánticos.**

Los puntos cuánticos (QD's, por sus siglas en inglés) fueron descritos por primera vez en 1981 por Alexei Ekimov en una matriz de vidrio<sup>38</sup>. Estos materiales también son conocidos como nanocristales o átomos artificiales<sup>39</sup>. Los nanocristales consisten en una organización de cientos o miles de átomos dentro de una estructura cristalina que suele ser esférica y de dimensiones extremadamente pequeñas, en la escala de los nanómetros. Su atributo más notable es que los electrones se encuentran restringidos en todas las direcciones, lo que lleva a un tamaño que tiende a ser comparable o incluso más reducido que el radio de excitación de Bohr, típicamente alrededor de los 10 nm para semiconductores, lo que provoca un confinamiento<sup>40</sup>.

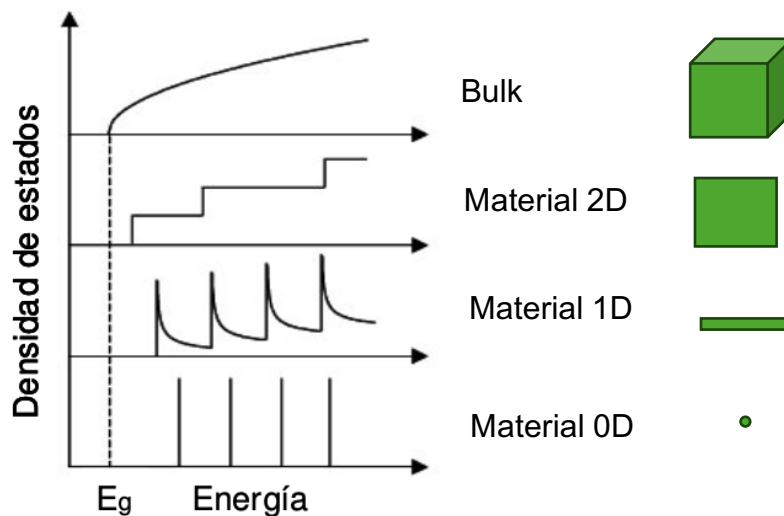
Una de las características fundamentales de los QD's es su naturaleza de materiales semiconductores, compuestos por elementos que pertenecen a los grupos II-VI, III-V o IV-VI de la tabla periódica<sup>41</sup>. Los QD's de ZnO, ZnS, ZnSe, CdSe, y CdS son ampliamente utilizados y resultan particularmente interesantes debido a su amplio espectro de absorción en la región visible, alto coeficiente de extinción y emisión multicolor intensa. Estos materiales son reconocidos por exhibir las mejores características luminiscentes<sup>41</sup>. En el campo de la nanomedicina, dependiendo de su futura aplicación, son tratados con determinados componentes químicos, se obtienen los radicales necesarios que sobresalen de este conjunto para unir los QD's a diferentes moléculas dianas<sup>39</sup>.

### **1.4.1 Confinamiento Cuántico.**

La disminución en tamaño del material a niveles nanométricos ocasiona que los electrones de las partículas se encuentren limitados en su movimiento dentro de una región extremadamente reducida del espacio; este fenómeno es denominado confinamiento cuántico<sup>42</sup>.

La intensidad del confinamiento en cada material variará según cuántas dimensiones sean reducidas. Por ejemplo, en materiales de gran tamaño ("bulk"), donde todas sus dimensiones superan la escala micrométrica, no hay restricciones

en el movimiento de los electrones, por lo tanto, estos materiales no exhiben confinamiento cuántico<sup>43</sup>. No obstante, al reducir una dimensión del material a una escala nanométrica y limitar el movimiento de los electrones a solo dos dimensiones, se genera lo que se denomina nanoestructura 2D, como el grafeno. Por otro lado, la reducción en dos dimensiones y en tres da lugar a la formación de nanoestructuras 1D, como nanohilos, y nanoestructuras 0D donde encontramos a los puntos cuánticos<sup>42</sup>. Esta disminución de dimensiones ocasiona alteraciones en la estructura electrónica de los materiales, y esto puede ser explicado utilizando el concepto de densidad de estados. La densidad de estados electrónicos en un sistema físico representa la cantidad de estados de energía disponibles por unidad de energía<sup>44</sup>, como se muestra en la Figura 3.

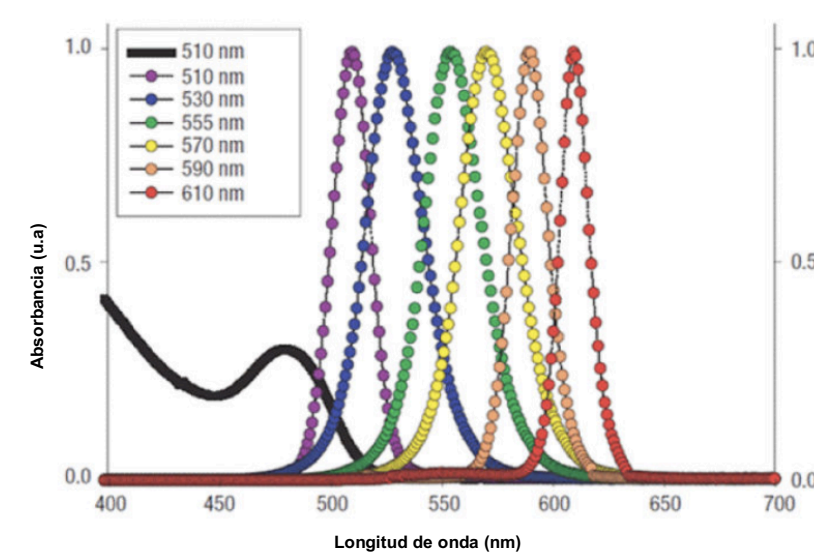


**Figura 3.** Representación esquemática de una densidad de estados para nanoestructuras 0D, 1D, 2D, 3D.

En los materiales semiconductores, el nivel inferior de la banda de valencia (BV) se encuentra prácticamente lleno de electrones, mientras que el nivel superior de la banda de conducción (BC) permanece mayormente vacío. Esto permite que los electrones realicen saltos de la banda de valencia a la banda de conducción a través de la región de energía prohibida, también conocida como *band-gap*<sup>42</sup>. Como

resultado, los electrones excitados y los huecos cargados positivamente, que son bandas con cargas opuestas, se unen mediante fuerzas electrostáticas de Coulomb, formando una cuasipartícula eléctricamente neutra conocida como excitón<sup>41</sup>.

A medida que vamos reduciendo el tamaño este fenómeno de confinamiento se vuelve aún más intrigante debido a que el *band gap* aumenta, con lo que se exhibe que la frecuencia de emisión del QD's está en función de dicho intervalo de banda<sup>40</sup> y esto es lo que provoca que el electrón excitado regrese a su estado fundamental y se recombine con el hueco se presente la fotoluminiscencia del QD's<sup>45</sup>. Por lo tanto, las partículas con diámetros más pequeños son más energéticas, ya que emiten luz de longitud de onda más corta, mientras que aquellas con diámetros mayores emiten luz de longitud de onda más larga<sup>41</sup>. Es por esto por lo que al relacionar los QD's con espectros de absorción de color dentro de la región de luz visible los de menor tamaño absorben luz azul y conforme incrementa de tamaño se va corriendo hacia la luz roja, como se observa en la Figura 4<sup>45</sup>.



**Figura 4.** Espectro de absorción y emisión de seis diferentes QD's en excitación con luz UV de 365nm<sup>45</sup>.

## 1.5 Métodos de síntesis de nanoestructuras.

En la síntesis de nanoestructuras los métodos utilizados son los *Top-Down* y *Bottom-Up*<sup>46</sup>. Los métodos *Top-Down* implican cortar o dividir físicamente materiales en “*bulk*” a tamaño nanométrico<sup>47</sup>, y los métodos *Bottom-Up* utilizan átomos y moléculas para construir nanoestructuras mediante síntesis química o biológica<sup>48</sup>. Ejemplos de estas técnicas se ejemplifican en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Comparación de ventajas y desventajas de los métodos de síntesis de nanoestructuras.

Método de Síntesis	Técnica de Síntesis	Desventajas	Ventajas
Biológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracto de plantas</li> <li>• Microorganismos</li> <li>• ADN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja escalabilidad</li> <li>• Mecanismos no bien establecidos</li> <li>• Baja estabilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amigables al medio ambiente</li> <li>• No requiere altas temperaturas</li> <li>• Muy bajos costo</li> </ul>
Físicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaporación Térmica</li> <li>• Deposición física de vapor</li> <li>• Plasma de arco</li> <li>• Ablación Laser</li> <li>• Irradiación de Ultrasonido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperaturas altas</li> <li>• Equipos costosos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control preciso del tamaño y forma</li> <li>• Escalabilidad</li> </ul>

Químicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sol-gel</li> <li>• Precipitación</li> <li>• Hidrotermal</li> <li>• Solvotermal</li> <li>• Deposición química en fase de vapor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacciones no deseadas</li> <li>• Tiempos de reacción largos</li> <li>• Purificación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condiciones suaves</li> <li>• Costos Bajos de equipos</li> <li>• Baja energía requerida</li> </ul>
----------	---	--	---

### 1.5.1 Métodos biológicos.

Los métodos biológicos son amigables con el medio ambiente, por lo que, constituyen una alternativa prometedora a los métodos de síntesis físicos y químicos<sup>49</sup>. Para la síntesis biológica de NP's de ZnO se han estudiado ampliamente microorganismos (bacterias, hongos, levaduras, algas y fagos), ADN, proteínas y extractos de plantas<sup>50</sup>. Sin embargo, los mecanismos de producción de NP's de ZnO mediante síntesis biológica aún no se han profundizado como sujeto de estudio alternativo.

Las NP's de óxido de zinc pueden ser sintetizadas en microorganismos adecuados utilizando varias enzimas y vías bioquímicas. Se han utilizado bacterias como *Bacillus megaterium* NCIM2326<sup>51</sup> y *Halomonas elongata* IBRC-M 10214<sup>52</sup> para sintetizar NP's de ZnO como agentes antimicrobianos. Las NP's de ZnO sintetizadas a partir de hongos tienen formas esféricas o cuasi-esféricas y se han utilizado para aplicaciones antimicrobianas y síntesis de pirazolona esteroide<sup>53</sup>. También se han utilizado sistemas de algas como *Sargassum muticum*<sup>54</sup> para sintetizar nanoestructuras de ZnO como nanorrodillos o nanoflores. Un sistema dirigido por fagos del bacteriófago M13 que muestra péptidos conjugados con ZnO en la proteína de cubierta pIII o pVIII produjo NP's de ZnO fotoluminiscentes<sup>55</sup>.

El ADN, los aminoácidos, y las proteínas también pueden ser utilizados para la síntesis de NP's de ZnO<sup>46, 56</sup>. Se ha utilizado ADN para guiar la síntesis de cadenas



de NP's de ZnO y controlar su crecimiento<sup>57</sup>. El aminoácido L-alanina se ha utilizado para la síntesis de NP's de ZnO<sup>58</sup>. Los extractos de plantas son atractivos para su uso en la síntesis biológica de NP's de óxidos metálicos debido a la presencia de componentes como flavonoides, terpenoides, y polisacáridos<sup>46</sup>. Algunos autores sintetizaron NP's de ZnO y nanocompuestos de ZnO-Ag utilizando el extracto de hojas de *Calotropis procera*<sup>59</sup> y extracto de flores de *Matricaria chamomilla*<sup>60</sup>. Las NP's de óxido de zinc sintetizadas a partir de extractos de plantas se han aplicado en la fotodegradación de pigmentos, aplicaciones antimicrobianas, y fotocatalisis solar<sup>61</sup>.

### **1.5.2 Métodos físicos.**

En los métodos físicos podemos encontrar plasma de arco, evaporación térmica, deposición física de vapor, irradiación por ultrasonido, y ablación láser<sup>62</sup>. La simplicidad tecnológica de estos procesos los hace ideales para llevar a cabo procesos industriales a altas tasas de producción<sup>63</sup>. El método de plasma de arco está basado en la síntesis de descarga de arco eléctrico, es uno de los métodos físicos más utilizados para convertir materiales en *bulk* a nanomateriales mediante condensación y evaporación<sup>64</sup>. Ejemplos de estos métodos pueden ser la reacción de polvo de Zn con oxígeno gaseoso para producir nanovarillas de ZnO<sup>63</sup>, el uso de evaporación térmica para sintetizar películas delgadas de ZnO y varillas de ZnO nano/microscópicas mediante deposición en sustratos<sup>65</sup>, la síntesis sonoquímica de NP's de ZnO basadas en histidina como un agente de recubrimiento con *band gap* ajustable<sup>66</sup> o ablación láser usando un láser de Nd: YAG para preparar una suspensión coloidal de NP's de ZnO<sup>67</sup>.

### **1.5.3 Métodos químicos.**

En los métodos químicos podemos encontrar microemulsiones, sol-gel, precipitación, hidrotermal, solvotermal, y deposición química en fase vapor<sup>46</sup>. La síntesis química húmeda, es el método más utilizado para producir NP's a escala

industrial, y a menudo se utilizan recubrimientos o estabilizadores para controlar el tamaño de las partículas y prevenir la aglomeración<sup>46</sup>. La trietilamina, el ácido oleico, la tioglicerina, y el polietilenglicol son algunos de los agentes de recubrimiento o estabilizadores más usados<sup>68</sup>. En una microemulsión, los estabilizadores se utilizan para generar gotas fluidas termodinámicamente estables a partir de fases acuosas y de hidrocarburos inmiscibles. Ejemplos de estos métodos pueden ser la síntesis de NP's de ZnO basado en microemulsiones usando trietilamina para controlar el tamaño y la forma de las NP's de ZnO<sup>69</sup>. Una síntesis sol-gel para generar nanocristales de ZnO con dodecilamina como agente de recubrimiento en la superficie de las NP's de ZnO<sup>70</sup>. Precipitación de nanocristales de ZnO mediante técnicas hidrotermales y solvotermales, que implican la síntesis de materiales en condiciones de calentamiento acuosas y no acuosas, respectivamente<sup>71</sup>. Incluyendo la esterificación catalizada por ácido de acetato de zinc en una mezcla de 1-pentanol y m-xileno<sup>72</sup>. Los parámetros de las técnicas hidrotermales y solvotermales utilizadas para la síntesis influyen en la estructura, morfología, composición y ensamblaje de las NP's de ZnO resultantes<sup>73</sup>.

### **1.5.3.1 Método de precipitación.**

El método de precipitación, que pertenece a los métodos químicos, ha sido utilizado con éxito para diseñar diversas nanoestructuras de ZnO. La síntesis con este método implica una reacción de sales de zinc, como puede ser  $Zn(NO_3)_2$ ,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  o  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ <sup>74</sup> con soluciones básicas como LiOH,  $NH_4OH$  y NaOH<sup>75</sup>. El proceso de síntesis comienza con una reacción de los iones de zinc e hidroxilo, seguido del proceso de floculación. La formación de una suspensión coloidal estable de nanopartículas de ZnO generalmente se realiza en una solución alcohólica, dado que el  $Zn(OH)_2$  es más propenso a formarse<sup>76</sup>. Sin embargo, si las partículas son lo suficientemente grandes, entonces su comportamiento dinámico en suspensión cambia en función del tiempo, controlado por la fuerza de la gravedad produciendo un fenómeno de sedimentación, si son lo suficientemente pequeñas como para ser coloides, entonces su movimiento errático en suspensión puede

atribuirse al bombardeo colectivo de un gran número de moléculas térmicamente móviles en una suspensión líquida<sup>77</sup>. Debido a su gran superficie, las dispersiones de NP's son termodinámicamente metaestables, lo que muestra una contribución positiva a la energía libre del sistema. Si la energía de activación no es lo suficientemente alta, se producirá la difusión de las NP's y estas presentarán un aumento de tamaño mediante el proceso de maduración de Oswald Ripening. Por lo tanto, las NP's altamente dispersas sólo se estabilizan cinéticamente y no pueden producirse en condiciones superiores a un cierto umbral<sup>77</sup>.

Es posible obtener diferentes morfologías de NP's de ZnO controlando varios parámetros del proceso de precipitación, tales como: concentración de la solución, el valor de pH, el medio de lavado o la temperatura de calcinación<sup>78</sup>. Existen estudios que respaldan el uso de sulfato de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y NaOH como precursores para crear nanoestructuras de ZnO mediante este método. Los resultados de las pruebas analíticas utilizando difracción de rayos X (XRD por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía UV-VIS indicaron que la morfología de las NP's sintetizadas cambia con la temperatura de calcinación. A 300 °C y 500 °C, las muestras eran nanoflores, pero cuando aumentó la temperatura a 700 °C se convirtieron en partículas esféricas<sup>79</sup>. En el trabajo realizado por Pourrahi y colaboradores presentaron resultados del uso de varios precursores de ZnO como nitrato de zinc, cloruro, sulfato, y acetato. Las condiciones de reacción fueron las mismas en todos los casos. Las partículas más pequeñas con un tamaño promedio de 25 nm se obtuvieron del precursor de acetato y según los resultados de ese estudio, se puede concluir que el éxito de la síntesis de precipitación depende de la selección adecuada del precursor de NP's de zinc<sup>80</sup>.

## **1.6 Caracterización de nanoestructuras.**

La importancia de las técnicas de caracterización en nanoestructuras, con un enfoque en nanomedicina, radica en la necesidad de adecuar la formulación a una aplicación terapéutica específica. El tamaño, la distribución de tamaños, la

morfología, las propiedades de superficie, el contenido del principio activo y el perfil de liberación del fármaco son los principales parámetros que deben ser caracterizados una vez obtenidas las nanoestructuras<sup>81</sup>. Ejemplo de las técnicas de caracterización más utilizadas se menciona en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Tabla representativa de algunos de los métodos de caracterización de nanoestructuras más empleados.

Método	Información que proporciona	Ventajas	Desventajas	Referencias
<b>Espectroscopia UV-Vis</b>	Composición química, tamaño y forma de las nanopartículas.	Rápido, económico, no destructivo.	Sensibilidad baja, información limitada sobre la estructura interna.	[82,83]
<b>Espectroscopia de infrarrojos (FTIR)</b>	Grupos funcionales presentes en la superficie de las nanopartículas.	Sensible a la estructura química, no destructivo.	Requiere una muestra relativamente grande.	[84,85]
<b>Difracción de Rayos X (XRD)</b>	Estructura cristalina, tamaño y forma de las nanopartículas.	Resolución alta, información sobre la estructura interna.	Requiere una muestra cristalina, puede ser destructivo.	[29,86]
<b>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</b>	Morfología, tamaño y distribución de las nanopartículas.	Resolución alta, información sobre la superficie.	Requiere un alto vacío, puede ser destructivo.	[87,88]
<b>Microscopía electrónica de</b>	Morfología, tamaño, estructura interna	Resolución alta, información	Requiere una muestra delgada,	[8,89]

<b>transmisión (TEM)</b>	y composición química de las nanopartículas.	detallada sobre la estructura atómica.	puede ser destructivo.	
<b>Microscopía de fuerza atómica (AFM)</b>	Topografía de la superficie, propiedades mecánicas de las nanopartículas.	Resolución alta, no destructivo.	Requiere una superficie plana, puede ser lento.	[90,91]
<b>Resonancia magnética nuclear (RMN)</b>	Estructura molecular, composición química, y propiedades dinámicas de las nanopartículas.	Sensible a la estructura química, no destructivo.	Requiere una cantidad relativamente grande de muestra.	[92,93]
<b>Dispersión dinámica de la luz (DLS)</b>	Tamaño y distribución del tamaño de las nanopartículas en suspensión.	Rápido, no destructivo, información sobre la distribución del tamaño.	Baja sensibilidad para partículas pequeñas, información limitada sobre la forma de las partículas.	[94,95]

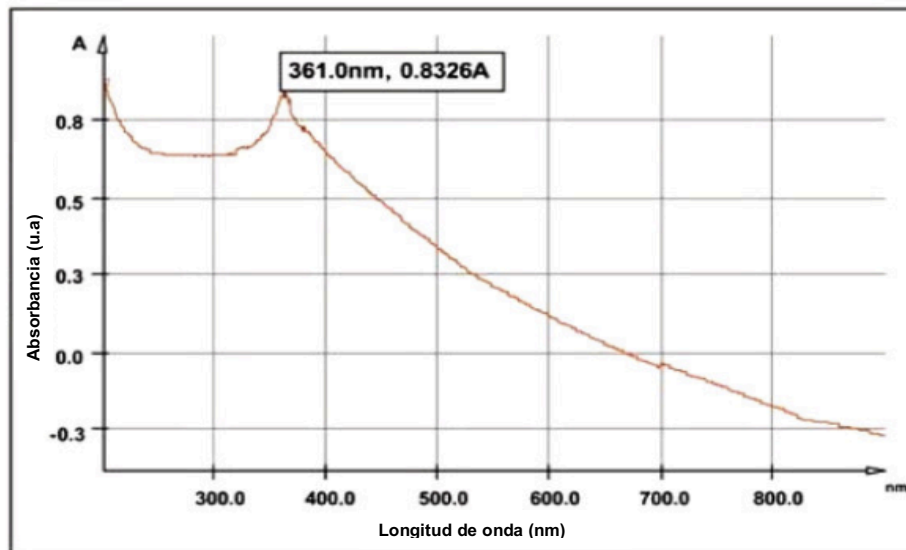
### 1.6.1 Espectroscopía UV-VIS

Esta espectroscopía mide la absorción en la región ultravioleta (UV) y visible. Se basa en la ley de Beer-Lambert-Bouguer de transmisión en que la absorción es proporcional a la concentración del analito y a la longitud del camino óptico recorrido por la luz a través de la muestra<sup>41</sup>. La región UV comprende longitudes de onda que van desde 195 a 400 nm, caracterizándose por su energía elevada. Esta área es de suma importancia en el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos orgánicos, ya que aquellos que presentan enlaces dobles, triples, peptídicos, sistemas

aromáticos, grupos carbonilo, y otros heteroátomos aislados, exhiben picos de absorción dentro del espectro UV. Factores diversos como el pH, la concentración de sal y los disolventes pueden modificar la carga molecular, induciendo variaciones en el perfil del espectro UV<sup>82</sup>.

Por lo general, un espectrofotómetro de luz UV-VIS consta de varios componentes esenciales: una fuente de luz que emite en el rango UV-visible, lentes para enfocar la luz, un monocromador para seleccionar longitudes de onda específicas, celdas de muestra donde se coloca el material a analizar, un detector sensible a la radiación absorbida por la muestra, un amplificador para aumentar la señal detectada y un registrador para visualizar y analizar los datos obtenidos<sup>83</sup>. Los coloides metálicos por lo general presentan una banda de absorción en ultravioleta-visible debido a la excitación de resonancia de plasmón de la superficie. Por lo tanto, el método de espectroscopia UV-VIS es conveniente en la caracterización de NP's coloidales<sup>30</sup>.

El espectro ultravioleta está formado por una gráfica de la longitud de onda en función de la intensidad de absorción, como se muestra en la Figura 5, donde Yadav y colaboradores<sup>96</sup> prepararon NP's de ZnO para utilizarlos sobre tejido de algodón. En el UV-VIS se muestra una absorción en 361 nm.

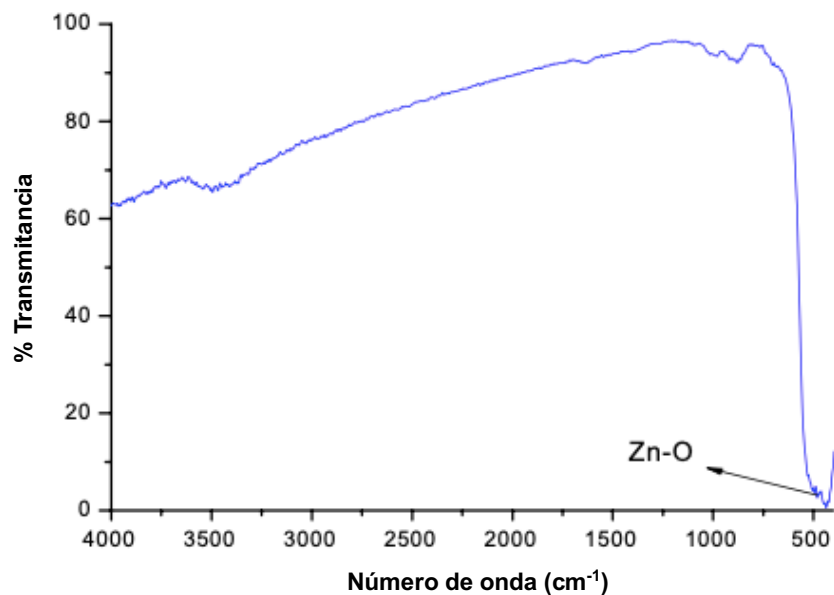


**Figura 5.** Espectro de absorción UV-VIS de una solución de NP's de ZnO <sup>96</sup>.

### 1.6.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja (IR) se enfoca en los movimientos y vibraciones de torsión, flexión, rotación, y estiramiento que experimentan las moléculas. Estos movimientos provocan la absorción de radiación infrarroja específica por parte de las moléculas, lo que genera bandas de absorción en el espectro infrarrojo<sup>84</sup>. Esta técnica se emplea ampliamente en la identificación cualitativa de compuestos orgánicos y en la deducción de su estructura molecular a partir de los grupos funcionales presentes. Además, permite la detección de impurezas, así como la localización y la identificación de sustancias puras<sup>85</sup>.

El espectro IR abarca una parte del espectro electromagnético que va desde los 12800 hasta los 10  $\text{cm}^{-1}$ , dividido en tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano. Dentro de estas regiones, se distinguen dos subregiones: la región de grupo funcional, que va desde los 4000  $\text{cm}^{-1}$  hasta los 1300  $\text{cm}^{-1}$ , y la región de huellas dactilares, que se extiende desde los 1300  $\text{cm}^{-1}$  hasta los 670  $\text{cm}^{-1}$  <sup>97</sup>.

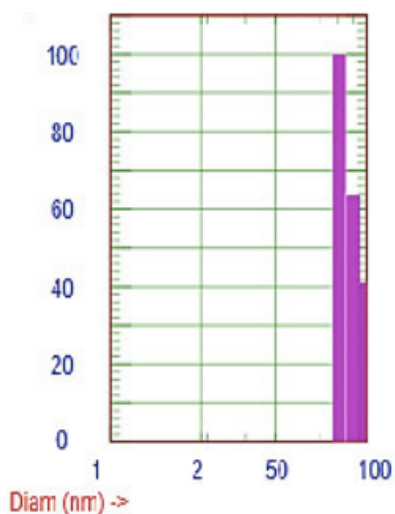


**Figura 6.** Espectro FT-IR de NP's de ZnO <sup>29</sup>.

### 1.6.3 Dispersión dinámica de luz (DLS).

DLS implica enviar un haz de luz láser a través de la solución de muestra y monitorizar los fotones dispersos en ángulos específicos durante intervalos de tiempo cortos<sup>94</sup>. Es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y la distribución de tamaño de moléculas y partículas, típicamente en la región submicrométrica. Las aplicaciones típicas de la DLS son la caracterización de partículas, emulsiones, o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido<sup>95</sup>. En la Figura 7 se muestra una distribución de tamaños mediante DLS donde la medida del tamaño promedio de las NP's es alrededor de 89 nm<sup>29</sup>.





**Figura 7.** Histograma de distribución de volumen obtenidas por DLS<sup>29</sup>.

## 1.7 Funcionalización.

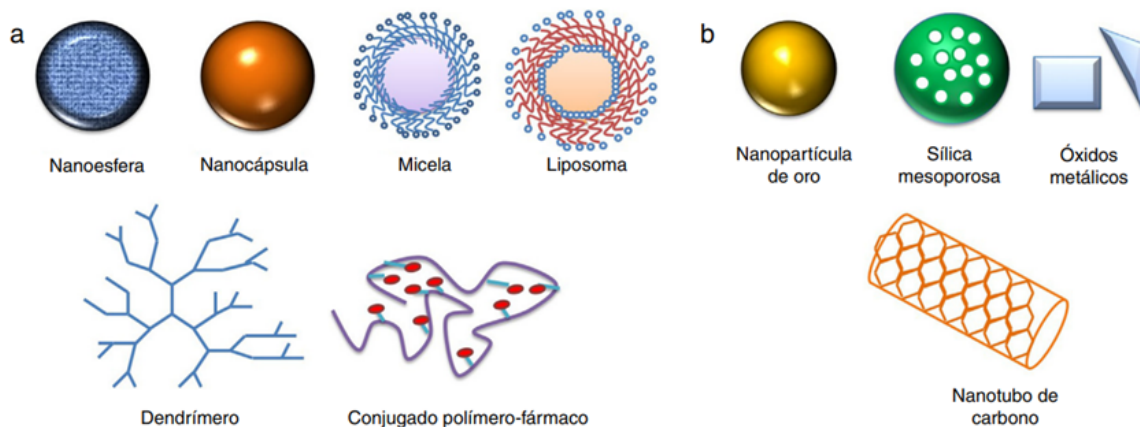
La funcionalización es un proceso esencial mediante el cual se modifican las moléculas para introducir nuevos grupos funcionales (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>). Este proceso permite ajustar y mejorar las propiedades de las moléculas o materiales para aplicaciones específicas<sup>98</sup>. En la nanomedicina, la funcionalización de la superficie de una nanoestructura permite generar una estrategia de transporte de medicamentos en un sitio específico, aumentar la biodisponibilidad del nanosistema, y mejora la capacidad de retención de este, pero también permite la conjugación a medicamentos al aumentar la cantidad de interacciones entre la superficie del nanosistema y el medicamento en cuestión<sup>99</sup>. Este proceso puede llevarse a cabo mediante polímeros, ácidos orgánicos de carga positiva o negativa, o mediante la conjugación química en la superficie de las NP's<sup>100</sup>.

## 1.8 Nanosistemas.

La convergencia de la nanotecnología y la medicina ha generado un notable impacto en el abordaje terapéutico de enfermedades como el cáncer, la diabetes, el Alzheimer, el Parkinson, así como trastornos cardiovasculares, inflamatorios e infecciosos<sup>2</sup>. Los sistemas de liberación más prometedores, denominados nanosistemas medicinales, han sido diseñados con el propósito de alterar la ruta de administración en para el beneficio del paciente, mejorar la biodisponibilidad, modular el perfil de liberación, o reformular una presentación para una nueva línea de productos<sup>101</sup>. Asimismo, la utilización de nanopartículas contribuye a reducir la degradación del principio activo, prolongar su vida media en el órgano diana y reducir su toxicidad<sup>102</sup>.

En el ámbito de la nanomedicina, se postula que el diseño de los sistemas de liberación debe orientarse hacia la identificación de un sitio blanco, ya sea un órgano, célula, compartimento celular, u orgánulo, con el fin de dirigir selectivamente una carga terapéutica. Este direccionamiento se logra mediante un control que responde a estímulos internos, como el pH, la presencia de enzimas o el cambio en el potencial redox, o bien a estímulos externos, como la luz, variaciones de temperatura, o campos magnéticos<sup>103</sup>. Los nanosistemas de liberación más sofisticados pueden ser visualizados mediante técnicas de imagen y emplearse para diagnosticar el estadio de una enfermedad específica; estos sistemas se conocen como plataformas multifuncionales<sup>104</sup>.

En la actualidad, existe una diversidad de nanosistemas, los cuales pueden clasificarse en dos categorías principales de nanoestructuras: orgánicas e inorgánicas, como se ilustra en la Figura 8.



**Figura 8.** Representación de nanoestructuras a) orgánicas, (b) inorgánicas para el transporte y liberación de fármacos<sup>104</sup>.

## 1.9 Fármacos como especies de funcionalización

Un fármaco es cualquier compuesto químico, ya sea natural, sintético, o semi-sintético, que al interactuar con un ser vivo genera una respuesta biológica observable dirigida a aliviar o curar o tratar una afección o enfermedad. Estos pueden ser absorbidos por el cuerpo, transformados en otras sustancias, almacenados en diferentes órganos o excretados a través de la orina o las heces<sup>99</sup>. Por ello, los fármacos presentes en los medicamentos son beneficiosos para la salud, ya que combaten enfermedades o alivian síntomas. Sin embargo, también pueden tener efectos secundarios no deseados. Para que una sustancia sea considerada un fármaco, no basta con que tenga efectos biológicos, sino que, debe ser administrada de forma exógena a un ser vivo con fines médicos<sup>100</sup>.

### 1.9.1 Farmacocinética.

La farmacocinética se dedica a investigar los mecanismos que intervienen en el viaje del fármaco a través del organismo vivo. Abarca desde la liberación del principio activo hasta su excreción, comprendiendo los diversos procesos en orden como: liberación, absorción, distribución, biotransformación, y excreción<sup>105</sup>. Es decir, estudia los procesos a los que es sometido el fármaco, por acción del organismo vivo.

**Tabla 3.** Descripción de las funciones de los procesos farmacocinéticos.

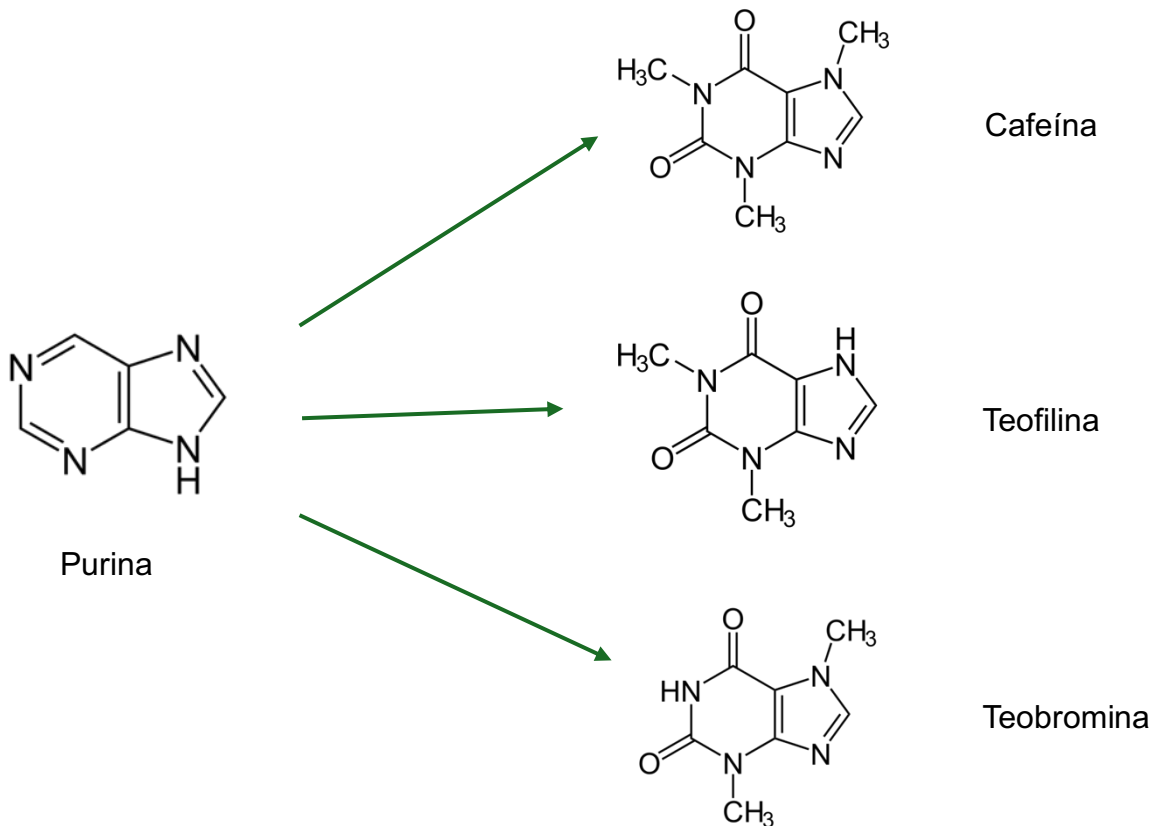
<b>Proceso</b>	<b>Función</b>
<b>Liberación</b>	Se refiere al proceso mediante el cual el fármaco se libera de la forma farmacéutica y se disuelve en el medio donde ejercerá su acción farmacológica <sup>106</sup> .
<b>Absorción</b>	Es el proceso por el cual el fármaco atraviesa las barreras biológicas para ingresar a la circulación sistémica desde el lugar de administración. Esto generalmente ocurre a través del tracto gastrointestinal, aunque también puede ocurrir por vías como la piel o los pulmones <sup>107</sup> .
<b>Distribución</b>	Se refiere a la dispersión del fármaco por todo el cuerpo una vez que ha ingresado a la circulación sistémica <sup>108</sup> . Durante la distribución, el fármaco se transporta a través del torrente sanguíneo y se distribuye a los diferentes tejidos y órganos del cuerpo, donde puede ejercer su acción farmacológica <sup>106</sup> .
<b>Biotransformación o Metabolismo</b>	Es el proceso mediante el cual el fármaco es modificado químicamente en el cuerpo, generalmente en el hígado, para convertirse en metabolitos que son más solubles en agua y más fácilmente excretados del organismo. La biotransformación puede cambiar la actividad farmacológica del fármaco y su duración <sup>109</sup> .
<b>Excreción</b>	Es el paso final que corresponde a un fármaco después de haber sido ingerido habiendo pasado este por los diferentes procesos metabólicos correspondientes, ya sea cumpliendo su función o no <sup>110</sup> . En este punto se eliminará tanto la sustancia en sí como los metabolitos que haya producido, yendo de la sangre y los tejidos hacia el exterior del organismo. Las principales rutas de eliminación incluyen los riñones, los pulmones y el sistema hepatobiliar <sup>100</sup> .

### **1.9.2 Farmacodinamia.**

La farmacodinamia estudia los mecanismos de acción, los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos en diversos tejidos, órganos, y sistemas de los organismos vivos. El conocimiento que nos brinda esta ciencia proporciona la base terapéutica para el tratamiento de cada fármaco y proporcionar información utilizada en el desarrollo de nuevos fármacos<sup>111</sup>, ya que existen diversos factores como los fisiológicos, patológicos, y/o iatrogénicos que pueden influir en la variabilidad de la respuesta de pacientes a los fármacos<sup>112</sup>.

### **1.10 Metilxantinas.**

Las xantinas constituyen un grupo de compuestos que pertenecen a la familia de las purinas, la cual engloba sustancias endógenas como la guanina, adenina, hipoxantina, y el ácido úrico, todas ellas caracterizadas por poseer una base nitrogenada heterocíclica<sup>113</sup>. Los derivados N-metilados de las xantinas, conocidos como metilxantinas, representan metabolitos secundarios presentes en organismos vegetales<sup>114</sup>. La metilxantina se reconoce primordialmente como un alcaloide con propiedades estimulantes, siendo un componente común en la mayoría de las bebidas, lo que la posiciona como el estimulante más ampliamente consumido por la población humana. Las tres metilxantinas predominantes son la cafeína (1,3,7 trimetilxantina), la teobromina (3,7 dimetilxantina), y la teofilina (1,3 dimetilxantina), presentes de manera natural en diversos alimentos<sup>115</sup>. Las estructuras de estas tres metilxantinas se muestran en la Figura 9.



**Figura. 9.** Estructura de la purina y sus derivadas metilxantinas.

### 1.10.1 Metabolismo.

En el inicio del metabolismo de las metilxantinas, tanto en humanos como en animales, se absorben de forma rápida y completa en el tracto gastrointestinal, con una notable eficacia de absorción, especialmente en el intestino delgado<sup>116</sup>, tras la absorción, las metilxantinas experimentan metabolización hepática, transformándose en otras metilxantinas con menor grado de metilación y en ácido metilúrico a través de procesos de oxidación<sup>117</sup>. Estudios han demostrado que el género, el ciclo menstrual<sup>118</sup>, el estado de embarazo, el ejercicio físico<sup>119</sup>, entre otros factores, no parecen influir en la biodisponibilidad de las metilxantinas.

La excreción de las metilxantinas y sus productos metabólicos ocurre principalmente a través de la orina. La monometilxantina y el ácido metilúrico son productos derivados de la transformación metabólica de la trimetilxantina y la dimetilxantina, respectivamente. La baja concentración de estos derivados en el plasma sanguíneo en comparación con su elevada concentración en la orina indica un metabolismo rápido en el cuerpo humano<sup>115</sup>.

### 1.11 Teofilina.

La teofilina es un fármaco perteneciente a la familia de las metilxantinas, Se encuentra naturalmente en el té negro, en el té verde, y en la yerba mate<sup>120</sup>. Esta metilxantina cuenta con acciones farmacológicas diversas como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Acciones farmacológicas de la teofilina.

<b>Principales acciones farmacológicas de la teofilina</b>	
<b>1</b>	Relajación de la musculatura lisa <sup>121</sup> .
<b>2</b>	Disminución de liberación de mediadores de inflamación <sup>31</sup> .
<b>3</b>	Estimulación del centro respiratorio <sup>86</sup> .
<b>4</b>	Disminución de permeabilidad vascular <sup>8</sup> .
<b>5</b>	Estimulación de secreción gástrica por el aumento de secreción de gastrina <sup>89</sup> .
<b>6</b>	Aumento de lipólisis y liberación de ácidos grasos <sup>87</sup> .
<b>7</b>	Inhibición en la contracción uterina <sup>88</sup> .

En su farmacocinética, la absorción se presenta de forma rápida por vía oral<sup>121</sup>, donde la mayor parte de la absorción se produce a nivel gastrointestinal en el intestino delgado<sup>92</sup>. La velocidad de absorción de la teofilina cambia en función de la alimentación, el pH gastrointestinal, ritmo cardiaco, y la duración del tránsito intestinal<sup>93</sup>. Una vez absorbida presenta una distribución multicompartimental, con

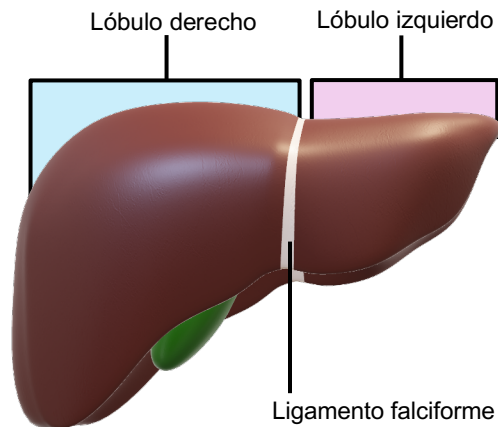
el 60% de unión a proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina<sup>122</sup>. En adultos, alrededor del 90% de la teofilina se metaboliza en el hígado a través de las enzimas CYPs (citocromo P450), mientras que la fracción no metabolizada se elimina a través de los riñones para pasar a la orina<sup>123</sup>.

La farmacodinamia de este medicamento aún no está totalmente aclarada, sin embargo, dentro de sus mecanismos de acción más estudiados está el antagonismo de la adenosina a nivel de receptores  $A_1$  y  $A_2$ <sup>124</sup>, la inhibición de la fosfodiesterasa(PDE)-4, causando el aumento del AMP<sub>c</sub><sup>125</sup> y relajación del músculo liso<sup>126</sup>, la estimulación de liberación de catecolaminas la cual provoca una liberación de adrenalina uniéndose a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos<sup>127</sup>, y los efectos antiinflamatorios relacionados a la inhibición de prostaglandinas<sup>122</sup>.

## **1.12 Anatomía y fisiología hepática.**

El hígado es uno de los órganos de mayor tamaño en el cuerpo humano y se localiza en la región superior derecha del abdomen. Su peso habitual oscila alrededor de 1.4 kg para mujeres y 1.8 kg para hombres<sup>128</sup>. El hígado recibe sangre de dos fuentes principales, de las cuales el 80% proviene de la vena porta, la cual se origina en el bazo y el intestino, mientras que el 20% restante es sangre oxigenada proveniente de la arteria hepática<sup>129</sup>. A nivel externo, el hígado se divide en dos partes por el ligamento falciforme, creando un lóbulo derecho más grande y un lóbulo izquierdo más pequeño<sup>130</sup>, como se muestra en la Figura 10.

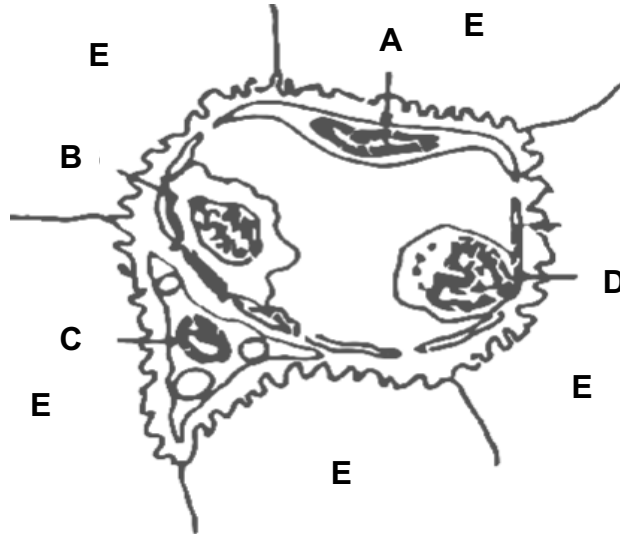




**Figura. 10.** Anatomía morfológica del hígado.

### 1.12.1 Unidades secretoras hepáticas.

El 80% de las células que constituyen al hígado son hepatocitos, que aparecen como células poliédricas de 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente<sup>131</sup>. En su composición presentan grupos con núcleos grandes y redondos con variaciones de tamaño pequeñas en posición central, su citoplasma es granular por lo que presenta un aspecto muy variable debido a que presenta funciones diferentes como almacenamiento del glucógeno y grasas<sup>132</sup>. También se constituye de células de Kupffer que pertenecen al sistema de macrófagos que se encarga de liberar la sangre de partículas extrañas, así como eliminar las células viejas y defectuosas<sup>133</sup>, células estelares que almacenan vitamina A<sup>134</sup>, y células *Natural Killers* o células de Pit, éstas intervienen en la destrucción de células tumorales y de hepatocitos infectados por virus<sup>135</sup>. Las células presentes en el sinusoide hepático se muestran en la Figura 11.



**Figura. 11.** Células del sinusoides hepático. A) Célula endotelial; B) célula de Kupffer; C) célula de Ito o estelar; D) célula pit o natural killer; E) hepatocito<sup>136</sup>.

### 1.12.2 Sinusoides hepático.

Los sinusoides son canales vasculares por donde circula la sangre y están recubiertos principalmente por dos tipos celulares: células de tipo endotelial y células Kupffer, estas últimas son mucho mayores y se encuentran interpuestas entre las anteriores. Entre las células del revestimiento vascular y los hepatocitos existe un espacio conocido como “espacio de Disse” que contiene plasma sanguíneo y que, en la periferia del lobulillo, contacta con los capilares linfáticos del espacio porta<sup>137</sup>.

### 1.12.3 Sistema Biliar.

El hígado forma una parte fundamental para la síntesis de bilis, la cual es un fluido esencial para la emulsificación de lípidos en medios acuosos facilitando el transporte de sustancias dentro y fuera del cuerpo. Esta es producida por los hepatocitos y se constituye de diferentes componentes tal es el caso del agua,

electrolitos como sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), bilirrubinas, sales de ácidos biliares, colesterol, entre otros<sup>138</sup>.

El lugar donde se almacena la bilis producida es la vesícula biliar, un órgano en forma de pera que se encuentra en la parte ventral del hígado y está compuesto principalmente por tejido muscular elástico<sup>138</sup>. Posteriormente de su almacenamiento, la bilis es liberada de la vesícula biliar y viaja a través de los conductos biliares extrahepáticos hasta llegar al duodeno. Aquí los ácidos biliares son reabsorbidos y recirculan de nuevo al hígado para su reutilización en el proceso de formación de bilis por parte de los hepatocitos. Este ciclo continuo asegura un suministro constante de bilis para la digestión y absorción adecuada de grasas y nutrimentos<sup>139</sup>.

#### **1.12.4 Fisiología del hígado.**

Desempeña la función de formación y excreción de bilis, caracterizándose como una glándula mixta<sup>130</sup>. Por otro lado, también lleva a cabo el metabolismo de los nutrimentos y vitaminas, neutraliza o inactiva compuestos tóxicos, sintetiza proteínas plasmáticas y brinda protección al organismo contra la exposición a antígenos externos, entre otras funciones diversas, por lo que también se puede conceptualizar como un filtro<sup>133</sup>. Para que se logre un desempeño hepático adecuado es necesario que exista una buena circulación sanguínea, la cual tiene dos orígenes: uno procedente del tubo digestivo y a través de la vena porta, y otro que llega de la aorta abdominal mediante la arteria hepática. Una vez en el hígado se vacían en la vena cava inferior a través de las venas centrolobulillares pasando por los sinusoides<sup>136</sup>.

El papel del hígado en el metabolismo es crucial para el desarrollo de las demás funciones del cuerpo, ya que realiza la biotransformación de grasas, proteínas e hidratos de carbono como se muestra en la Figura 12.

## FUNCIONES DEL HÍGADO EN EL METABOLISMO



**Figura 12.** Procesos metabólicos de las grasas, proteínas e hidratos de carbono en el hígado<sup>140</sup>.

Los hepatocitos tienen un papel fundamental en el metabolismo de los nutrientes y, por lo tanto, en el balance de la energía. También, son responsables de la desintoxicación de compuestos externos, especialmente fármacos. Contienen un grupo heterogéneo de proteínas conocidas como citocromo P-450 que catalizan la oxidación y reducción en la primera etapa de la transformación de fármacos. Luego de completar esta fase, los metabolitos (productos de degradación), son conjugados por el hepatocito haciéndolos solubles en agua para que puedan ser excretados en la bilis o en la orina<sup>137</sup>. Por ello, el organismo no puede desempeñar sus funciones metabólicas sin un hígado saludable, como sucede durante la falla hepática aguda o en afecciones crónicas cuyas consecuencias son mortales.

## **1.13 Enfermedades hepáticas.**

Factores como: patógenos, fármacos, o sustancias químicas ambientales en gran cantidad pueden dañar al hígado. Cuando existen alteraciones en las funciones del hígado se manifiestan reacciones químicas y fisiológicas en respuesta. Los trastornos inflamatorios dominan la práctica clínica de la hepatología<sup>141</sup>.

El daño hepático agudo inducido por tetracloruro de carbono (TC) es un modelo que nos ayuda a estudiar las hepatopatías como hepatitis tóxica, hígado graso no alcohólico (EHGNA), esteatohepatitis, entre otras<sup>142</sup>.

### **1.13.1 Colestasis e ictericia.**

La colestasis es la retención sistémica de componentes biliares, tales como, bilirrubina, sales biliares y colesterol; es decir, hay una disminución en la secreción de bilis. Cuando esto ocurre, los componentes de la bilis entran a sangre y por lo tanto el síntoma principal de colestasis es el aumento de ácidos biliares en suero, además, incrementa la concentración de bilirrubinas y el nivel de enzimas indicadoras de colestasis<sup>143</sup>. El cuadro clínico se manifiesta con el desarrollo de heces pálidas, puede existir dolor abdominal con presencia de vómito y cuando la concentración de bilirrubinas aumenta a más de 2 - 2.5 mg/dL causa dicha retención, por lo que se presenta ictericia, que es la pigmentación amarillenta de los tejidos, prurito, la retención de colesterol, y fosfolípidos que producen hiperlipidemia<sup>144</sup>.

### **1.13.2 Hepatitis.**

Son reacciones inflamatorias hepáticas producidas por enfermedades autoinmunitarias, reacciones a medicamentos o toxinas, debido a patologías infecciosas como el paludismo, mononucleosis, salmonelosis y amibiasis; por virus

que tienen afinidad por el hígado causándole inflamación como los virus de la hepatitis A (HAV), la hepatitis B (HBV), y la hepatitis E (HEV)<sup>145</sup>.

### **1.13.3 Fibrosis.**

La fibrosis es el aumento de colágeno en la matriz extracelular del hígado. Es el resultado de un daño continuo al hígado, como la hepatitis viral, el abuso de alcohol, fármacos, enfermedades metabólicas que implican una sobrecarga de hierro o de cobre. La etapa final de la fibrosis es la cirrosis la cual se caracteriza por aumento de la deposición y la composición alterada de la matriz extracelular y la aparición de nódulos o tejido cicatrizado, acompañado por una insuficiencia hepática e hipertensión portal<sup>146</sup>.

### **1.13.4 Cirrosis.**

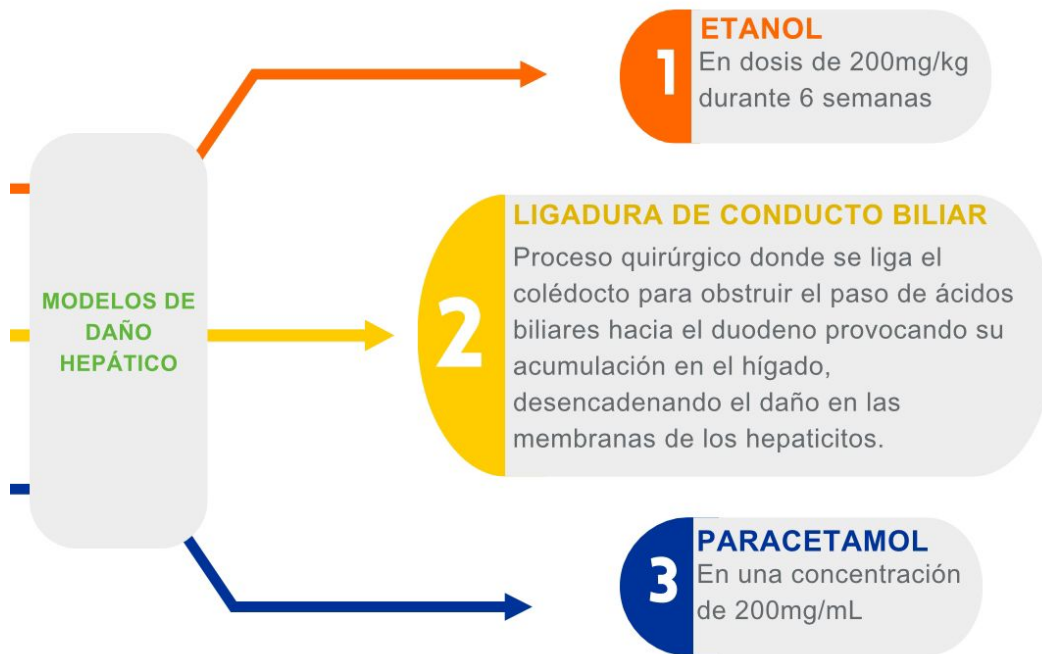
El término cirrosis representa la etapa final de muchas hepatopatías crónicas diferentes en donde gran parte del tejido hepático funcional ha sido reemplazado por tejido fibroso, por diferentes orígenes y con distinto curso. La cirrosis indica una alteración en la circulación hepática y en su arquitectura. La circulación hepática se ve afectada, debido a que el tejido fibroso forma bandas constrictoras que interrumpen el flujo en los canales vasculares y las vías biliares hepáticas, lo que predispone a la hipertensión portal llevando a una insuficiencia hepática<sup>147</sup>. Esta enfermedad se asocia más comúnmente con el alcoholismo, pero existen causas diferentes, como la hepatitis viral, reacciones a fármacos entre ellos se encuentran el paracetamol, la isoniazida, la fenitoína, entre otros, y sustancias químicas como el tetracloruro de carbono y por obstrucción biliar debida a tumores, abscesos, y cálculos biliares<sup>143</sup>.

La sintomatología aparece cuando la enfermedad está muy avanzada; se manifiesta con un dolor a nivel abdominal, debilidad, anorexia, desnutrición, alteración en el

proceso de coagulación, hemorragias digestivas, fibrosis, ascitis, ictericia, hepatomegalia, y esplenomegalia. A nivel cardiorrespiratorio a menudo se presenta disnea y taquicardia. Las alteraciones renales tienen un papel importante, cuando hay desarrollo de ascitis, ya que existe retención de sodio y alteraciones en la eliminación de agua<sup>143,147</sup>.

### 1.14 Modelos experimentales de daño hepático.

Para estudiar los diversos aspectos del daño hepático causado por diferentes hepatopatías y caracterizar los efectos de sustancias con potencial terapéutico para enfermedades hepáticas, se han empleado múltiples modelos experimentales diversos en animales. Ejemplos de estos modelos, mostrados en la Figura 13, utilizan agentes hepatotóxicos químicos o quirúrgicos para inductor el daño en ratas.



**Figura 13.** Modelos de daño hepático, 1) etanol<sup>148</sup>, 2) ligadura de conducto biliar<sup>149</sup>, 3) paracetamol<sup>150</sup>.

El modelo de daño hepático por la ligadura del conducto biliar, es un proceso quirúrgico de la ligadura del colédoco, para obstruir el paso de los ácidos biliares hacia el duodeno provocando así la acumulación de ácidos biliares en el hígado, con lo que se desencadena el daño en las membranas de los hepatocitos. Esta técnica, aplicada en ratas, es una herramienta útil para comprender lo que sucede en el daño hepático agudo y crónico por colestasis y cirrosis en humanos<sup>149</sup>.

El modelo de daño hepático con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) es uno de los más usados y estudiados, cuyo mecanismo principal es la peroxidación lipídica por radicales libres derivados del CCl<sub>4</sub> para inducir el daño. A pesar de que la intoxicación por CCl<sub>4</sub> es difícil de encontrar en el marco clínico, este compuesto provee un modelo útil de hepatotoxicidad, ya que comparte características bioquímicas e histológicas con la hepatitis humana<sup>145</sup>. La mayoría de los modelos con CCl<sub>4</sub>, utiliza la vía de administración oral con dosis altas, debido a que se desea un efecto rápido, pues se obliga a la absorción directa por el tracto gastrointestinal hacia el hígado, donde debe ser metabolizado para ejercer su efecto hepatotóxico; mientras que, en los modelos de daño hepático crónico por CCl<sub>4</sub> se utilizan dosis de alrededor de diez veces menor que en la aguda, pero se administra 3 veces a la semana por una administración vía intraperitoneal, por lo cual la absorción y el efecto de daño será más lento<sup>151</sup>.

### **1.15 Mecanismo de acción de daño hepático agudo por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).**

Después de la administración intragástrica del CCl<sub>4</sub>, éste se concentra en el hígado y alcanza un nivel máximo de 1 mg/g de hígado de una a dos horas luego de su ingestión<sup>152</sup>. La evidencia histológica más temprana de daño tisular ocurre de 5 a 6 horas después de la administración, cuando la necrosis comienza. Alrededor de las 12 horas post-administración, la necrosis en la zona central es evidente y para las 24 horas una necrosis masiva esta presente<sup>153,154</sup>

El metabolismo del CCl<sub>4</sub> normalmente es promovido por el citocromo P-450 (CYP), específicamente por la isoenzima CYP2E1 involucra una deshalogenación



homolítica del enlace C-Cl, que genera un metabolito activo, el radical libre triclorometilo ( $\cdot\text{CCl}_3$ ), que al reaccionar, comúnmente al instante con oxígeno, produce un radical libre más reactivo, el peróxido de triclorometilo ( $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ )<sup>155</sup>, y como puede unirse a macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos), altera procesos celulares cruciales tales como el metabolismo de lípidos iniciando el proceso de lipoperoxidación, que potencialmente resulta en esteatosis y posteriormente en hígado graso<sup>156</sup>, debido a que los hepatocitos intoxicados tienen una síntesis de proteínas deficiente, acumulan lípidos por infiltración y disminuyen la actividad enzimática microsomal como la de la glucosa-6-fosfatasa y el CYP<sup>157</sup>, lo cual implica un estrés oxidativo.

## **1.16 Marcadores de funcionalidad y daño hepático.**

Existen estudios diagnósticos diversos que evalúan la actividad funcional del hígado y sus respuestas al daño. Estas pruebas, que incluyen la evaluación de las actividades enzimáticas en plasma, son útiles para confirmar las hepatopatías y detectar la presencia de daño hepático<sup>143</sup>.

### **1.16.1 Catalasa (CAT).**

La catalasa es una enzima que intervienen en la protección y en el mantenimiento del balance oxidante/antioxidante, catalizando la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido; CAT resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, siendo prácticamente nula en el tejido nervioso. Se encuentra ligada a la peroxidación lipídica, por lo tanto, es un indicador de estrés oxidativo<sup>158</sup>.

### **1.16.2 Proteínas.**

Las proteínas sintetizadas por el hígado, como la albúmina, reflejan la capacidad biosintética del hígado. En estudios de peroxidación lipídica, medir las proteínas permite normalizar los resultados y calcular de manera más precisa el grado de daño oxidativo en relación con la funcionalidad hepática. Esto es porque las concentraciones de marcadores de peroxidación lipídica (como el MDA) pueden ser comparadas de manera más precisa cuando se expresan en términos de concentración de proteínas<sup>143</sup>.

### **1.16.3 Peroxidación Lipídica (PL).**

La PL es un proceso en el cual los ácidos grasos que se encuentran alrededor de la membrana lipídica se dañan por el exceso de radicales libres, y esto forma subproductos como el malondialdehído (MDA)<sup>157</sup>. La peroxidación lipídica es la responsable de que se efectúe la inactivación de enzimas de la modificación oxidativa de moléculas como lipoproteínas, por lo que es un parámetro que indica el daño en el hepatocito por estrés oxidativo<sup>132</sup>.

### **1.16.4 Bilirrubinas.**

Cuando los glóbulos rojos envejecen o se dañan son fagocitados en el bazo, hígado y médula ósea por macrófagos y esta es descompuesta en hemo y globina. La hemo después es oxidada para ser convertida en biliverdina y el proceso de reducción de esta última genera la bilirrubina no conjugada<sup>159</sup> la cual es poco soluble, por lo cual esta es llevada al hígado, unida a albúmina, para una vez en el hígado poder ser tomada del plasma y conjugada con ácido glucurónico convirtiéndola en bilirrubina directa y así, es más soluble, lo que permite su excreción por la bilis<sup>160</sup>.

### **1.16.5 Alanina Aminotransferasa (ALT).**

Es el indicador más frecuente de enfermedad hepática debido a que es una prueba sensible y específica. La ALT es una enzima que cataliza la reacción de transferencia del grupo amino de la alanina al ácido alfaoxoglutámico, produciendo piruvato y glutamato<sup>161</sup>. ALT al llevar a cabo su reacción de transaminación regula procesos como la producción de algunos aminoácidos, partiendo del piruvato para el ciclo de Krebs (ácido cítrico) (ciclo catabólico y anabólico para producir energía) y el glutamato para el ciclo de la urea (principal proceso para eliminar el exceso nitrógeno del cuerpo)<sup>162</sup>.

#### **1.16.6 Fosfatasa Alcalina (FA).**

La FA es una enzima que cataliza la reacción de hidrólisis de ésteres de fosfato inorgánicos a un pH alcalino óptimo, dando por resultado fosfato inorgánico y un radical orgánico<sup>161</sup>. El aumento de FA es indicador de disminución de procesamiento metabólico del hígado, lo que promueve una mayor producción de compuestos tóxicos generando obstrucción biliar, donde la FA se libera de las células que recubren los conductos biliares (colangiocitos). Esto para intentar desfosforilar algunos compuestos tóxicos e intentar facilitar su solubilización para la eliminación por bilis, o en algunos casos su incremento solo es debido al daño celular que existe y como está presente en la membrana celular de los hepatocitos se libera con facilidad hacia la sangre por la incapacidad de ser por bilis<sup>143</sup>.

#### **1.16.7 Gamma-Glutamil Transpeptidasa (GGTP).**

La GGTP cataliza la transferencia de grupos  $\gamma$ -glutamil y peptidos a aminoácidos y otros péptidos receptores de estos grupos. La GGTP está presente en la membrana de los hepatocitos y los colangiocitos. Cuando existe obstrucción biliar GGTP se libera de los colangiocitos y va al torrente sanguíneo o bien, cuando existe un alto estrés oxidativo el hígado tiene la necesidad de producir más glutatión, un antioxidante crucial, con lo cual los hepatocitos aumentan su necesidad de producir

GGTP para el correcto metabolismo del glutatión; de hecho, se considera el marcador más sensible de colestasis<sup>143,161</sup>

### **1.16.8 Glucógeno Hepático.**

La glucosa es una molécula importante para los procesos metabólicos del organismo, debido a que la glucosa es prácticamente el único combustible utilizado para suministrar al cerebro y en la actividad muscular<sup>163</sup>. Por lo tanto, la glucosa se almacena en forma de glucógeno en el hígado como una reserva importante de energía, de modo que cuando la concentración sérica de glucosa disminuye, se libera por un proceso conocido como glucogenólisis regulando de esta manera la glicemia y la cantidad de glucógeno en el hígado. Cuando el almacenamiento de glucógeno se ve afectado, se pueden presentar diversas alteraciones metabólicas, por lo que su determinación en hígado también se puede considerar como una medida de su capacidad biosintética o funcionalidad, así como de estrés por daño, ya que la cantidad de glucógeno desciende rápidamente<sup>130</sup>.

# **Capítulo 2**

## **Antecedentes**

## 2.1 Efectos de los nanosistemas en el hígado.

El uso de nanopartículas en el área de biomedicina ha cobrado un interés significativo debido a sus propiedades únicas y su potencial en aplicaciones terapéuticas de distintas enfermedades. Por ejemplo, entre estas NP's, encontramos las de óxidos metálicos, metálicas, lipídicas, entre otras. Los modelos del uso de NP's lipídicas como vehículos de liberación de fármacos han sido muy estudiados debido a su capacidad de mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de las NP's, además de permitir una liberación controlada <sup>164</sup>. Por su lado, también NP's de Au, Ag y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> se han examinado para evaluar su efecto terapéutico en algunos tipos de cáncer, siendo partes fundamentales en hipertermia y fototerapia.

Las NP's de ZnO son los óxidos metálicos más utilizados debido a su bajo costo de producción y amplio rango de aplicación. En la nanomedicina son útiles debido a que, por su tamaño pequeño, pueden ser fácilmente absorbidas por el cuerpo humano, incluyendo diversas aplicaciones como actividades antibacterianas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antienvjecimiento, cicatrización de heridas, y bioimagen<sup>164</sup>.

Algunas NP's de ZnO han sido evaluadas para el tratamiento de padecimientos hepáticos, como en el que determinaron sus efectos protectores con una concentración de 50 mg/kg ante el daño inducido con dimetilnitrosamina en rata, donde redujeron la peroxidación lipídica, el estrés oxidativo, y la fibrosis del hígado junto con la supresión de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-12<sup>165</sup>. En el hepatocarcinoma también se han realizado estudios con NP's de ZnO, como en el que se indujo este daño mediante dietilnitrosamina y CCl<sub>4</sub>. Nuevamente la administración de NP's de ZnO disminuyó el estrés oxidativo y redujo los parámetros bioquímicos ALT y GGTP<sup>165</sup>.

## **2.2 Efecto de la teofilina en el hígado.**

La utilización de metilxantinas como agentes terapéuticos se remonta a tiempos antiguos, comenzando con la preparación de té y, actualmente, continúa con el desarrollo de tratamientos para enfermedades diversas basados en esta familia de moléculas. En el ámbito de los hepatoprotectores, la cafeína es la metilxantina más conocida y empleada debido a su abundancia en agentes naturales<sup>166</sup>. No obstante, la teofilina, tradicionalmente reconocida por sus efectos beneficiosos en enfermedades respiratorias gracias a sus propiedades broncodilatadoras y relajantes del músculo liso, ha mostrado en estudios limitados una actividad hepatoprotectora significativa, como es el caso en el estudio donde redujo efectivamente la inflamación de los tejidos hepáticos y alivió el daño hepático al disminuir los niveles de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  en los tejidos hepáticos de ratas con lesión hepática inmunitaria<sup>167</sup>.

# **Capítulo 3**

## **Justificación**



Las enfermedades hepáticas ocupan el 4to lugar entre las causas principales de mortalidad nacional y mundial. En África y Asia son especialmente provocadas por virus, así como en Europa y América por el consumo de alcohol<sup>168</sup>; también, ocupan el 2do lugar entre las causas de muerte principales en edad productiva, es decir, entre 25 y 64 años. Debido a esto es importante realizar investigación acerca de nuevos tratamientos con funciones hepatoprotectoras. Además, existen muy pocos tratamientos realmente efectivos para controlar el daño hepático, aunado a que el tratamiento puede ser muy costoso a largo plazo e incluso el trasplante de hígado es difícil de costear y conseguir<sup>151</sup>.

El uso de NP's en la medicina ha crecido exponencialmente en los últimos años debido a sus propiedades versátiles, así como su potencial en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Actualmente un porcentaje alto de investigaciones en nanomedicina se centra en la mejora de la estabilidad, biodisponibilidad y liberación controlada de fármacos. En muchos países, tanto desarrollados como en vías de desarrollo, la incorporación de nanopartículas en la investigación biomédica está siendo cada vez más competitiva, reflejando la promesa que estos materiales tienen capacidad para revolucionar el tratamiento de enfermedades. A pesar de su potencial, una gran cantidad de nanopartículas diseñadas y sintetizadas aún requieren estudios exhaustivos para validar científicamente sus efectos y seguridad, subrayando la importancia de continuar con la investigación y desarrollo en este campo emergente.

Por otro lado, el ZnO, que es una sal metálica presente en forma de zincita en la naturaleza, se ha convertido en un tema de estudio frecuente debido a sus variadas propiedades biocompatibles, antibacterianas, antifúngicas<sup>37</sup>, y angiogénicas<sup>169</sup>. Sus nanopartículas se han investigado como una alternativa para combatir el Alzheimer<sup>32</sup>, diabetes, problemas cardiacos<sup>34</sup>, y como hepatoprotector<sup>33</sup>. En específico, el ion  $Zn^{2+}$ , que resultaría de la disociación del ZnO, está involucrado en el metabolismo de lípidos, ayudando a controlar la síntesis y degradación de los ácidos grasos<sup>170</sup>, lo cual es un factor importante al tratar daño hepático agudo, así

como sus efectos inmunomoduladores y antifibróticos ya reportados en la cirrosis<sup>171</sup>. Por otro lado, la familia de las metilxantinas no solo ha mostrado efectos benéficos al tratar el asma y otras afecciones respiratorias, sino también en algunos estudios realizados enfocados en hepatopatías<sup>172</sup>; la teofilina pertenece a esa familia y, aunque poco estudiada, muestra resultados prometedores en tratar afecciones relacionadas al daño hepático, debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, las cuales son capaces de reducir significativamente la acumulación de grasa en el hígado, así como reducir la sensibilidad a la insulina<sup>173</sup>. Sin embargo, la mayoría de los estudios han evaluado los efectos biológicos del ZnO y teofilina por separado, dejando de lado aquellos posibles beneficios de la interacción de estos dos.

Es una prioridad encontrar tratamientos adecuados para mejorar e idealmente revertir enfermedades hepáticas, de ahí la importancia del estudio de los nanosistemas con el fin de obtener una alternativa terapéutica más para estas enfermedades. Es por esto que en este trabajo se estudió la sinergia de ZnO QD's y teofilina mediante la evaluación hepatoprotectora del nanosistema en modelos de daño agudo experimental inducido por CCl<sub>4</sub> en rata.

# Capítulo 4

## Objetivos

## **4.1 Objetivo general.**

Sintetizar y simular un nanosistema de puntos cuánticos de ZnO funcionalizado con teofilina para evaluar su efecto hepatoprotector en un modelo experimental de daño agudo en ratas mediante la detección de biomarcadores de funcionalidad.

## **4.2 Objetivos específicos.**

- Realizar un estudio teórico computacional de simulación molecular para investigar el acoplamiento del nanosistema de puntos cuánticos de ZnO funcionalizado con teofilina.
- Sintetizar puntos cuánticos de óxido de zinc mediante el método de precipitación química para preparar el sustrato base del nanosistema.
- Funcionalizar los puntos cuánticos de ZnO con teofilina utilizando técnicas químicas adecuadas para garantizar una unión estable y efectiva que forme el nanosistema.
- Caracterizar el nanosistema funcionalizado mediante técnicas analíticas como espectroscopía de absorción UV-visible, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión dinámica de luz (DLS) para confirmar la integración de la teofilina y evaluar la morfología y propiedades ópticas del nanosistema.
- Evaluar el efecto del nanosistema ZnO-teofilina en el modelo de daño agudo por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en ratas Wistar macho, mediante la determinación de biomarcadores de funcionalidad para probar su actividad hepatoprotectora.

- Contrastar los efectos hepatoprotectores individuales del nanosistema ZnO-teofilina, ZnO, y teofilina, mediante la cuantificación y comparación estadística de los niveles de marcadores, con el fin de evidenciar la posible actividad sinérgica.

# **Capítulo 5**

## **Metodología**

## **5.1 Método computacional.**

La elección de la base y el funcional en los cálculos DFT es crucial, ya que determina la precisión con la que se representan los orbitales atómicos y, por ende, la calidad de los resultados<sup>9</sup>. En este estudio, se empleó la escalera de Jacob para optimizar la relación entre precisión y costo computacional. Para el cálculo de energías, frecuencias, y optimización de las moléculas se utilizó el programa Gaussian 16 y como visualizador GaussView.

### **5.1.1 Optimización de geometría.**

Se utilizó el método semiempírico PM6 para obtener una estructura inicial de los complejos. Este método, aunque menos preciso que DFT, es adecuado para obtener una primera aproximación de la estructura geométrica de las moléculas de forma rápida y eficiente. Esto permite explorar un gran espacio conformacional y descartar estructuras no favorables<sup>12</sup>.

### **5.1.2 Análisis de propiedades electrónicas individuales y cálculo de frecuencias.**

Se emplearon los funcionales de aproximación de densidad local (LDA) con la base 6-31+G(d,p). Esta base es una de doble zeta que incluye funciones de polarización (d) en los átomos pesados y funciones difusas. La combinación de LSDA y 6-31+G(d,p) es adecuada para analizar solo las propiedades electrónicas de las moléculas de ZnO ácido cítrico y teofilina por separado, así como cargas atómicas y potenciales electrostáticos. La base 6-31+G(d,p) proporciona una descripción precisa de la densidad electrónica alrededor de los átomos, lo que es esencial para estos cálculos. Posteriormente, se realizaron cálculos de frecuencia en el mismo nivel de teoría para confirmar que las estructuras obtenidas correspondían a

mínimos locales, para así poder ser tomadas como punto de partida para los cálculos por DFT.

### **5.1.3 Estudio de interacciones intermoleculares.**

Para analizar las interacciones entre  $(\text{ZnO})_{12}$ -AC y AC-Thp, se utilizó el funcional híbrido B3LYP con la base DGDZVP. El funcional B3LYP es ampliamente utilizado para describir interacciones de dispersión y enlaces de hidrógeno, que son cruciales en sistemas biológicos<sup>23</sup>. La base DGDZVP, al igual que la 6-31+G(d,p), incluye funciones de polarización, pero está especialmente diseñada para describir elementos más pesados como el zinc, además de brindar una descripción más precisa de la densidad electrónica en regiones de baja densidad, como las involucradas en las interacciones débiles. La elección de las bases y funcionales en este estudio se basó en un compromiso entre precisión y eficiencia computacional. La estrategia escalonada empleada permite obtener resultados confiables y una comprensión detallada de las propiedades electrónicas y estructurales del sistema<sup>9</sup>.

## **5.2 Método experimental.**

### **5.2.1 Síntesis de puntos cuánticos de óxido de zinc.**

La síntesis de los puntos cuánticos de óxido de zinc (ZnO) se llevó a cabo mediante el método de precipitación<sup>75</sup>, empleando dos soluciones etanólicas: una de acetato de zinc dihidratado, que actúa como fuente de iones  $\text{Zn}^{2+}$ , y otra de hidróxido de litio monohidratado, que actúa como agente reductor para facilitar la formación de nanopartículas de  $\text{ZnO}$ <sup>76</sup>. Durante el proceso, se controlaron factores críticos, como la temperatura, presión, tiempo de reacción y agitación, para optimizar la cristalización y el tamaño de partícula. A continuación, se detallan las etapas del procedimiento:



- I. **Preparación de solución de acetato de zinc:** Se preparó una solución de 0.05 M de acetato de zinc dihidratado en etanol, la cual se sometió a agitación continua a temperatura ambiente durante 90 minutos, garantizando la disolución completa y la dispersión homogénea de los iones  $\text{Zn}^{2+}$  en el medio.
- II. **Preparación de solución de hidróxido de litio:** Se preparó una segunda solución de 0.13 M de hidróxido de litio monohidratado en etanol y se agitó hasta su completa disolución, permitiendo la generación de iones  $\text{OH}^-$  para la posterior reacción con  $\text{Zn}^{2+}$ .
- III. **Mezcla de soluciones:** La solución de hidróxido de litio se añadió lentamente a la solución de acetato de zinc bajo agitación constante para evitar la formación de grandes aglomerados. Posteriormente, la mezcla se agitó durante 120 minutos, permitiendo la nucleación y el crecimiento de nanopartículas de ZnO en la solución.
- IV. **Calentamiento:** La mezcla resultante se sometió a un calentamiento controlado, incrementando la temperatura gradualmente mediante una rampa hasta alcanzar los 70 °C. Este paso favorece la cristalización del ZnO y optimiza las características ópticas y estructurales del material.
- V. **Centrifugación y recolección del precipitado:** La solución fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos para separar el precipitado sólido de ZnO de la fase líquida. El precipitado se recolectó cuidadosamente para evitar la pérdida de material.
- VI. **Secado:** Finalmente, el precipitado se sometió a secado en un horno a 70 °C durante 4 horas para eliminar cualquier resto de disolvente y completar la formación de los puntos cuánticos de ZnO.

### 5.2.2 Funcionalización de ZnO QD's – teofilina.

El proceso de funcionalización de los puntos cuánticos de óxido de zinc (ZnO QD's) con teofilina se realiza en dos etapas. La primera consiste en el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas de ZnO con ácido cítrico. Este paso es esencial, ya que el ácido cítrico actúa como un agente de enlace entre la superficie inorgánica de ZnO y la molécula de teofilina. Debido a sus grupos funcionales carboxílicos, el ácido cítrico se adhiere a la superficie del ZnO, proporcionando sitios de anclaje adicionales y mejorando la estabilidad del nanosistema. Esto facilita una interacción más eficaz entre el ZnO y la teofilina en la siguiente etapa, promoviendo la formación de puentes de hidrógeno y otras interacciones supramoleculares logrando un mejor acoplamiento<sup>99,100</sup>.

A continuación, se describe el procedimiento:

#### **Etapa 1: Recubrimiento con Ácido Cítrico.**

- I. **Preparación de dispersión de ZnO QD's:** Se agregaron 0.10 g de ZnO QD's a 10 ml de una mezcla de agua y etanol en proporción 8:2. Esta mezcla de solventes ayuda a mantener una buena dispersión de las partículas y facilita la interacción con el ácido cítrico.
- II. **Preparación de solución de ácido cítrico:** Se disolvieron 0.01 g de ácido cítrico en 10 ml de la misma mezcla de agua y etanol (8:2). Este paso garantiza una concentración adecuada para lograr el recubrimiento superficial.
- III. **Agitación:** Ambas soluciones se mezclaron y se dejaron en agitación continua durante 60 minutos, lo que asegura una interacción homogénea entre el ácido cítrico y la superficie de los ZnO QD's.

- IV. **Ajuste de pH:** Se ajustó el pH de la mezcla a un valor cercano a 6-7, condición que favorece la ionización de los grupos carboxílicos del ácido cítrico y facilita su anclaje a la superficie de ZnO.
- V. **Centrifugación y recolección:** La mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos para separar los ZnO QD's recubiertos de la fase líquida.
- VI. **Secado:** Finalmente, el precipitado recubierto se secó en un horno a 40 °C durante 1 hora, obteniendo el producto ZnO-AC (ZnO recubierto con ácido cítrico).

## **Etapas 2: Funcionalización con Teofilina y Formación de un co-cristal.**

Para llevar a cabo la funcionalización con teofilina, se establece una relación equimolar (1:1) entre ZnO-AC y la teofilina. Esta relación equimolar es importante para asegurar una cobertura uniforme y maximizar la interacción entre ambos compuestos, promoviendo así la formación de un co-cristal estable entre el ZnO-AC y la teofilina, que es fundamental para aplicaciones biológicas y farmacéuticas<sup>174</sup>.

- I. **Cálculo de relación molar:** Dado que la masa molar del complejo ZnO-AC es de 273.5 g/mol y la de la teofilina es de 180.17 g/mol, se dispone de 0.07 g del complejo, se calculan los moles correspondientes para cada componente y se igualan sus cantidades.

Moles del ZnO-AC =  $0.07 \text{ g} / 273.5 \text{ g/mol} = 0.0002557 \text{ mol}$ .

Moles de teofilina requeridos (para relación 1:1) = 0.0002557 mol.

Masa de teofilina necesaria =  $0.0002557 \text{ mol} \times 180.17 \text{ g/mol} \approx 0.0461 \text{ g}$ .

En este caso, se necesitó aproximadamente 0.0461 g de teofilina para lograr la relación equimolar de 1:1.

- II. **Mezclado y molienda:** Ambos componentes, ZnO-AC y teofilina, se trituraron en un mortero durante 30 minutos en un ambiente húmedo (añadiendo 1 o 2 gotas de agua a la mezcla, de un volumen total de 150 g). Este proceso asegura una mezcla íntima y homogénea, favoreciendo la interacción entre el ZnO-AC con la teofilina, y la formación de un co-cristal estable, mejorando las propiedades finales del nanosistema para aplicaciones biológicas.

### **5.3 Caracterización de material.**

Para evaluar las propiedades estructurales, ópticas y funcionales de los puntos cuánticos de óxido de zinc (ZnO QD's) y del complejo funcionalizado ZnO-AC-Teofilina (nanosistema), se llevó a cabo una serie de caracterizaciones específicas para cada uno. Las técnicas empleadas permitieron obtener información sobre la composición, tamaño de partícula, estabilidad, y las interacciones moleculares presentes en cada sistema, aspectos clave para determinar su potencial en aplicaciones biomédicas.

#### **5.3.1 Caracterización de ZnO QD's.**

##### **5.3.1.1 Espectroscopía UV-Vis.**

Se realizó un análisis espectroscópico UV-Vis para determinar la banda de absorción característica de los ZnO QD's. Los puntos cuánticos de ZnO suelen mostrar una fuerte absorción en la región ultravioleta, lo cual es indicativo de su tamaño y propiedades electrónicas.

##### **5.3.1.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.**

El análisis FT-IR se empleó para identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de los ZnO QD's y confirmar la presencia de enlaces característicos del

Zn-O. Esta caracterización permite también verificar la pureza del material y descartar impurezas orgánicas derivadas del proceso de síntesis.

#### **5.3.1.3 Microscopía Electrónica de Barrido.**

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para obtener imágenes de la morfología y distribución de tamaño de los ZnO QD's. Esta técnica es fundamental para visualizar la estructura de las partículas y verificar su distribución y homogeneidad.

#### **5.3.1.4 Emisión espontánea bajo luz UV.**

Se evaluó la respuesta de los ZnO QD's a la excitación bajo luz ultravioleta. La emisión espontánea de luz en este rango es característica de las nanopartículas de ZnO y se asocia a defectos superficiales y a su estructura cristalina, lo cual es un indicador de su tamaño.

#### **5.3.1.5 Cálculo de área superficial y composición atómica.**

Se determinó el área superficial y la composición atómica de los ZnO QD's, a partir de los resultados obtenidos en el análisis UV-Vis y se tomó como referencia el estudio de Mingyang Chen et al. (2016)<sup>175</sup>. En dicho estudio se menciona que el *band gap* de partículas esféricas de ZnO con diámetros mayores a 0.5 nm es una función lineal del inverso del diámetro de la partícula, lo cual permite estimar el tamaño aproximado de los QD's en este trabajo. Considerando que los QD's presentan una estructura cristalina tipo wurtzita, correspondiente a una red hexagonal compacta (hcp)<sup>177</sup> empleando la densidad de 5.606 g/cm<sup>3</sup><sup>176</sup>, la masa molar de 81.68 g/mol<sup>176</sup> del ZnO, y que presentan una morfología esférica se calculó el área superficial, el número de moles por cada QD y la cantidad de átomos

presentes en cada partícula. Esta información resulta relevante para realizar comparaciones con el número mágico de clústeres de  $(\text{ZnO})_{12}$ <sup>177</sup> propuesto en el apartado de simulación computacional, permitiendo una correlación entre los resultados experimentales y los modelos teóricos.

### **5.3.2 Caracterización del Nanosistema (ZnO-AC-Teofilina)**

#### **5.3.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido con Espectroscopía de Dispersión de Energía (SEM-EDS).**

El SEM-EDS se empleó para visualizar la morfología del nanosistema y realizar un análisis elemental cualitativo y semicuantitativo. La detección de elementos como Zn, O, C y N nos aporta información sobre la distribución de estos en el sistema, así como la parcial detección de la pureza de la muestra.

#### **5.3.2.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).**

En el nanosistema, el análisis FT-IR permitió identificar las interacciones entre ZnO, ácido cítrico y teofilina. Los cambios en los picos de absorción fueron observados para generar una asociados a los grupos funcionales de ácido cítrico y teofilina indicando la formación de un enlace entre el ZnO y la teofilina.

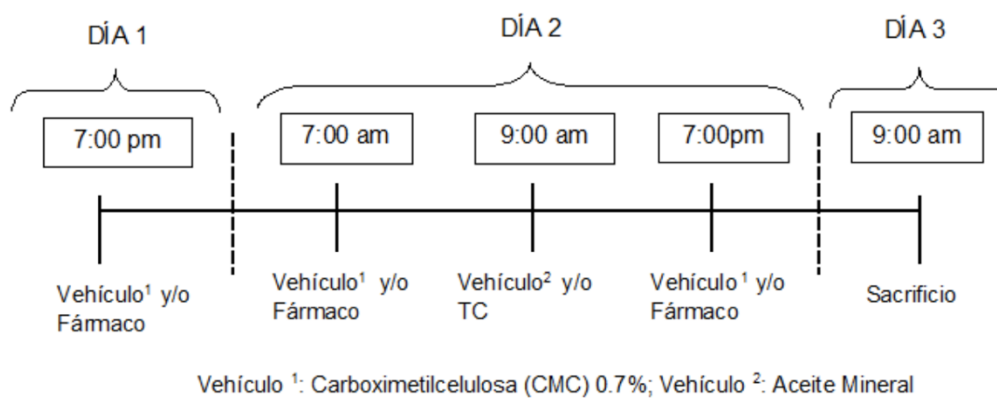
#### **5.3.2.3 Dispersión Dinámica de Luz (DLS).**

Para evaluar el tamaño hidrodinámico, se utilizó DLS. Esta técnica permitió analizar la distribución de tamaño de partícula en solución, proporcionando información sobre el grado de aglomeración y estabilidad del nanosistema en medios acuosos.

Además, se empleó para verificar que el tamaño de partícula resultante es adecuado para sus aplicaciones en sistemas biológicos.

## 5.4 Evaluación farmacológica

Se utilizaron ratas Wistar normopeso, las cuales han sido previamente utilizadas en estudios semejantes. Los animales fueron mantenidos en cajas de acrílico a una temperatura de 18 a 25 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con acceso libre al agua purificada y alimento estandar. Durante todo el tiempo de estudio, los animales recibieron un trato humanitario de acuerdo con los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999. La actividad conductual fue monitoreada por un lapso de 2 días, aunque nunca se ha evidenciado una conducta nociceptiva crítica en este modelo agudo. El nanosistema ZnO-teofilina, el ZnO, y la teofilina fueron administrados a los animales de experimentación de acuerdo con el siguiente diseño metodológico: Un total de 54 ratas Wistar macho con una masa de 180-200 g se integraron a 9 grupos experimentales (n= 6 c/u) tratados con 1) grupo control de controles (CC) administrado con vehículos; 2) teofilina, 50 mg/kg en CMC 0.7% administrado intragástricamente (i.g.), con cánula metálica de punta roma; 3) ZnO, dosis de 100 mg/kg suspendido en carboximetilcelulosa (CMC) al 0.7% como vehículo via i.g.; 4) nanosistema ZnO-teofilina con ácido cítrico como agente acoplante, 100 mg/kg en CMC 0.7% vía i.g.; todos estos grupos son controles para evaluar el efecto *per se* de los fármacos solos y del nanosistema. Los grupos 5) al 8) serán tratamientos idénticos, pero con daño inducido con la administración de tetracloruro de carbono (TC) 400 mg/kg disuelto 1:1 en aceite mineral como vehículo, y el grupo 9) también será dañado, pero administrado con el nanosistema ZnO-teofilina, 50 mg/kg en CMC 0.7%, vía i.g.; todos estos grupos son llamados reto y evidenciarán los efectos hepatoprotectores probables ver tabla 5. Las dosis utilizadas son similares a las usadas en las referencias consultadas; además, los fármacos serán administrados tres veces en intervalos de 12 h según la Figura 14 de tratamiento preventivo:



**Figura 14.** Esquema de administración para los grupos experimentales.



**Tabla 5.** Tratamiento administrado a cada uno de los grupos control y dañados.

<b>Grupo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>1</b>	Control de controles	CC	Vehículo del fármaco (CMC 0.7%) y Vehículo del CCl <sub>4</sub>
<b>2</b>	Control de teofilina	CC+Thp	Teofilina suspendida en vehículo del fármaco (CMC 0.7%)
<b>3</b>	Control de ZnO	CC+ZnO	ZnO QD's suspendido en vehículo del fármaco (CMC 0.7%)
<b>4</b>	Control de nanosistema	CC+NS 100	Nanosistema 100 mg/kg suspendido en vehículo del fármaco (CMC 0.7%)
<b>5</b>	Dañado por CCl <sub>4</sub>	TC	CCl <sub>4</sub> disuelto en vehículo del CCl <sub>4</sub> (aceite mineral)
<b>6</b>	Dañado y tratado por teofilina	TC+Thp	CCl <sub>4</sub> + Teofilina
<b>7</b>	Dañado y tratado por ZnO	TC+ZnO	CCl <sub>4</sub> + ZnO QD's
<b>8</b>	Dañado y tratado por nanosistema 100 mg/kg	TC+NS 100	CCl <sub>4</sub> + Nanosistema 100 mg/kg
<b>9</b>	Dañado y tratado por nanosistema 50 mg/kg	TC+NS 50	CCl <sub>4</sub> + Nanosistema 50 mg/kg

Después del sacrificio se determinó el grado de daño al hígado mediante el análisis bioquímico que se detallará posteriormente. El sacrificio de las ratas se realizó por exanguinación por punción cardiaca bajo anestesia con éter etílico y con ello se obtuvieron muestras de sangre con una jeringa previamente heparinizada. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma y se extrajeron también muestras de hígado, que fueron lavadas con solución salina isotónica, todas las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis.

## **5.5 Determinación de biomarcadores de funcionalidad.**

Una vez sacrificados los animales, se realizaron las determinaciones bioquímicas en plasma y en hígado de los indicadores de daño y funcionalidad hepática, así como la toma de muestras para análisis histológico.

### **5.5.1 Determinaciones en plasma.**

#### **5.5.1.1 Fosfatasa alcalina (FA)**

La FA es indicador de colestasis, cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfatos orgánicos con un pH alcalino óptimo; un incremento en suero de la actividad de FA, está relacionado con un daño en la membrana, es un marcador de colestasis ya que se libera en presencia de enfermedades que afectan el conducto biliar<sup>178</sup>. El método utilizado se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la FA, para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol el cual se lee a 410 nm en un espectrofotómetro<sup>179</sup>.

#### Procedimiento

1. 0.25 mL buffer de glicina 0.1 M y MgCl<sub>2</sub> 1mM, pH 10.5.
2. 0.25 mL de sustrato p-nitrofenilfosfato.
3. Se colocaron en baño de María a 37° C por 5 min.
4. Se añadió 50 µL de la muestra, mezclar suavemente.
5. Se incubaron 30 min a 37° C.
6. Se paró la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N, y se agitó por inversión.
7. Se realizó la lectura de la absorbancia a 410 nm.

El blanco es idéntico, pero colocando 50 µL de agua en lugar de muestra.

### 5.5.1.2 Gamma glutamil-transpeptidasa (GGTP).

GGTP es marcador de colestasis, es una enzima membranal que cataliza la transferencia del grupo  $\gamma$ -glutamil de péptidos a otros péptidos y a aminoácidos; la liberación de esta enzima a suero, indica daño celular y en consecuencia lesión hepática, específicamente permite medir la función excretora, por lo tanto es un marcador de colestasis<sup>178</sup>. En este método se utiliza como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la enzima  $\gamma$ -glutamil-transpeptidasa y del receptor del grupo  $\gamma$ -glutamilo, como lo es la glicil-glicina, produce la  $\gamma$ -glutamilglicina y p-nitroanilina que puede cuantificarse con un espectrofotómetro a 410 nm<sup>180</sup>.

Se utilizó la actividad estimulada con glicil-glicina, con un volumen total de reacción de 1 mL.

Procedimiento:

1. Se colocó en cada tubo:

- 400  $\mu$ L de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2
- 100  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 200 mM
- 100  $\mu$ L Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2
- 200  $\mu$ L  $\gamma$ -glutamil-p-nitroanilida 10 mM.

2. Se realizó una incubación previa por 10 min a 37°C, y se inició la reacción con 200  $\mu$ L de suero.

3. Se incubó a 37° C por 30 min y se detuvo la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5 M.

4. Se realizó la lectura a 410 nm, que cuantificó la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.

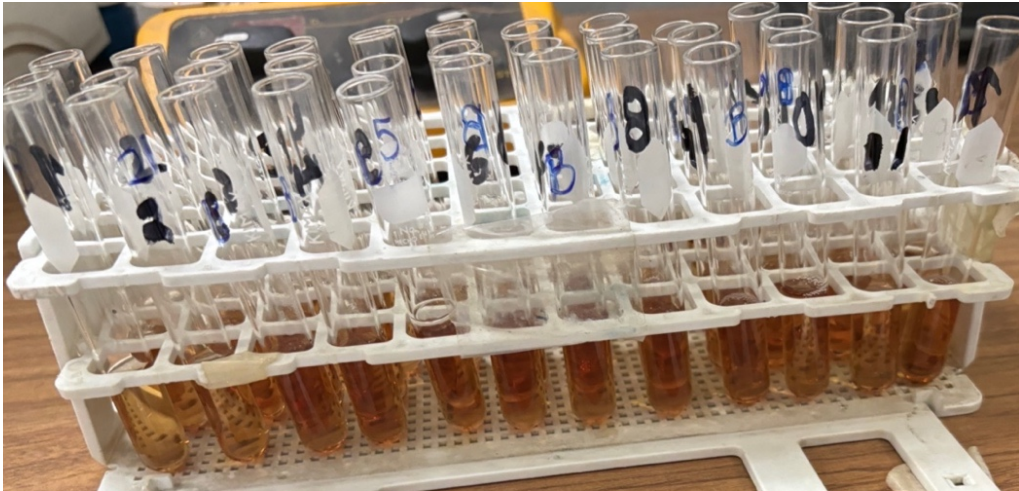
5. Se realizó un blanco sustituyendo los 200  $\mu$ L de suero por agua.

### 5.5.1.3 Alanina-aminotransferasa (ALT).

ALT es marcador de necrosis, cataliza la transferencia de un grupo  $\alpha$ -amino de alanina al grupo  $\alpha$ -cetoácido del ácido  $\alpha$ -oxoglutarico; un incremento de esta enzima en suero refleja un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática o destrucción celular, lo cual implica necrosis<sup>178</sup>. La técnica permite la obtención de piruvato a partir de la reacción de transaminación entre la alanina y el ácido  $\alpha$ -oxoglutarico, después al añadirse el 2,4-dinitrofenilhidrazina reacciona con el piruvato producido el cual, al reaccionar, presenta un color entre amarillo y marrón como se aprecia en la Figura 15, y se lee a 515 nm en un espectrofotómetro<sup>181</sup>.

Procedimiento:

	BLANCO (mL)	PROBLEMA (mL)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Suero problema	---	0.05
3.- Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37° C durante 60 min		
4.- Reactante cromógeno	0.25	0.25
5.- Suero problema	0.05	---
6.- Incubar a 37° C durante 15 min		
7.- NaOH 0.4 N	2.50	2.50



**Figura 15.** Color característico del cromógeno en el proceso de detección de ALT.

#### **5.5.1.4 Bilirrubinas totales (BT).**

La concentración de bilirrubinas es un indicador de colestasis y funcionalidad hepática, el método utilizado para cuantificar bilirrubinas totales se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante del Kit, marca Spinreact (España), este se basa en la reacción de la bilirrubina con ácido sulfanílico, para formar un compuesto azoico que tiene una absorbencia máxima de 560 nm, por lo que la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de bilirrubinas.

#### **5.5.2 Determinaciones en hígado**

##### **5.5.2.1 Peroxidación lipídica (LP).**

LP es indicador de daño membranal celular, se debe a la formación de especies reactivas que dañan a los lípidos componentes de la membrana celular, por lo tanto, este marcador indica el daño oxidativo en la membrana de los hepatocitos<sup>182</sup>. Esta técnica es colorimétrica y se basa en la cuantificación de especies reactivas al ácido

tiobarbitúrico (TBARS) que reaccionan con la molécula del malondialdehído (MDA), formando un pigmento rojo claro, el cual tiene un máximo de absorción en solución ácida de 532 nm en el espectrofotómetro.

Los resultados se expresan como nmol de MDA/mg proteína. Las proteínas se cuantificaron con el método de Bradford<sup>183</sup>.

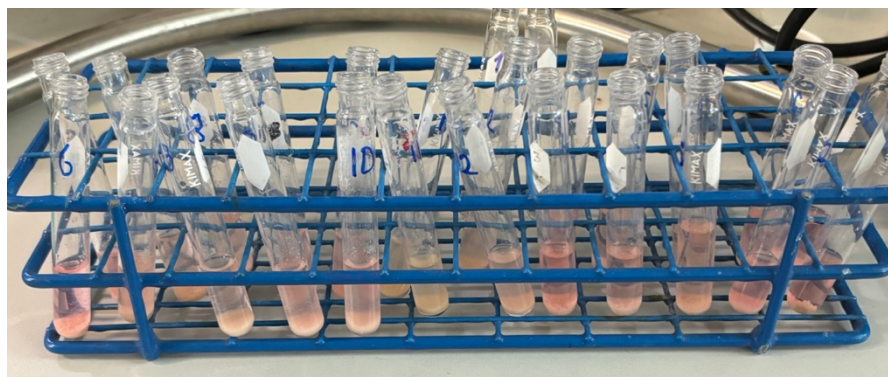
Procedimiento:

1. Se pesaron 0.5 g de hígado.
2. Se homogenizó en 5 mL de agua.
3. Se tomaron 300  $\mu$ L del homogenado al 10% y se agregaron 700  $\mu$ L de Tris-HCl 150 mM para completar 1 mL.
4. Se Incubó a 37° C por 30 min .
5. Se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
6. Se colocó a ebullición por 45 min .
7. Se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min.
8. Se lee el sobrenadante a 532 nm.

Cálculos:  $C = A / \xi L$ .

Dónde: A: Es la absorbancia de la muestra L: Es la longitud de la celda (1 cm)  $\xi$  : Es el coeficiente de extinción del malondialdehído (MDA)= $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

9. Los resultados se expresaron como nmoles de MDA/mg proteína



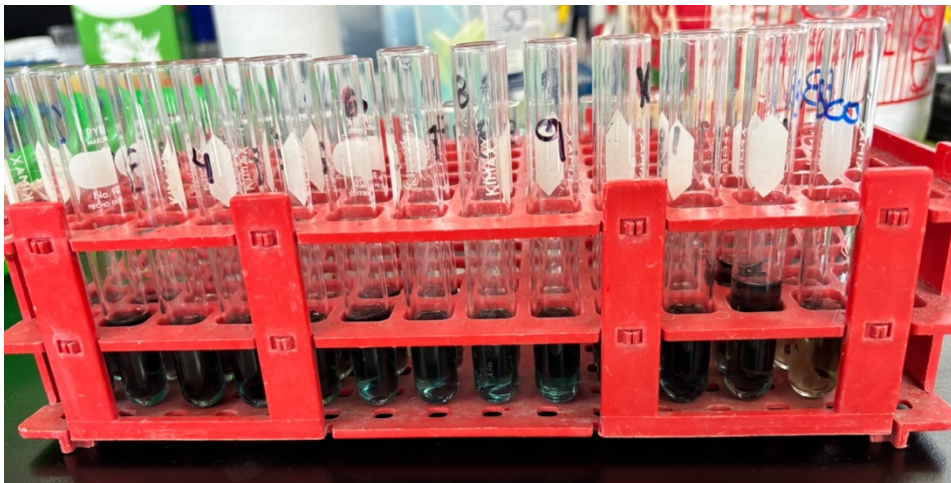
**Figura 16.** Muestras para determinación de LP.

### 5.5.2.2 Proteínas

Se determinó la cantidad de proteínas de acuerdo al método descrito por Bradford en 1976.

Procedimiento:

1. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del homogenado de hígado y se llevan a 1,000  $\mu\text{L}$  en agua tridestilada.
2. Se tomaron alícuotas del homogenado y se llevaron a 100  $\mu\text{L}$  con agua (20  $\mu\text{L}$  de la dilución anterior + 80  $\mu\text{L}$  de agua tridestilada).
3. El blanco se preparó poniendo 100  $\mu\text{L}$  de agua.
4. Se añadió 2.4 mL del reactante de Bradford.
5. Se realizó la lectura a una absorbancia de 595 nm.
6. Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1 mg/mL), poniendo 0, 10, 15, 25, 20, 30, 35, 40, 45, 50  $\mu\text{L}$ .
7. Completar con agua a 100  $\mu\text{L}$ .



**Figura 17.** Color azul verdoso característico de la determinación de proteínas mediante el método descrito por Bradford.

### 5.5.2.3 Glucógeno hepático (GH).

GH es indicador de estrés y funcionalidad hepáticos. Es la fuente principal de energía en el hígado. Al disminuir, el hígado no es capaz de llevar a cabo diferentes funciones relacionadas con obtención de energía. El daño crónico inducido por  $\text{CCl}_4$ , provoca alteraciones en la membrana de los hepatocitos por el incremento del contenido de colesterol y de AMPc. El incremento en los niveles de AMPc, produce una disminución en el contenido de glucógeno<sup>182</sup>. La cuantificación de glucógeno se obtendrá con la técnica de la antrona en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ <sup>184</sup>.

Procedimiento:

1. Se pesaron 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado.
2. Se adicionaron 1.5 mL de KOH al 30%.
3. Se taparon e hirvieron en baño de agua durante 30 min.
4. Después de enfriarse se pasó el contenido cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con agua agitando muy bien.
5. Del matraz anterior se tomaron de 40 a 160  $\mu\text{L}$  con pipeta volumétrica, se llevaron a 1 mL en tubos de 13 x 100 mm esmerilados, por duplicado, se preparó además un tubo blanco que con 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y otros 2 estándares con 20  $\mu\text{L}$  de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) y se llevaron a 1 mL con agua.
6. Se preparó una solución de antrona 0.2% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.
7. Se añadieron (con ayuda de una bureta) 2 mL a cada tubo agitando suavemente y enfriando sobre hielo, se taparon los tubos fríos y pusieron en un baño de agua hirviendo por 15 min, una vez que se enfriaron sobre agua con hielo.
8. Se realizó la lectura a 620nm.

Cálculos:  $20 \times \text{Am} / 1.11 \times \text{Ae} = \mu\text{g}$  de glucógeno en la alícuota

**Am** = Absorbencia de la muestra. **Ae** = Absorbencia del estándar.

Los resultados se expresaron como gramos de glucógeno por 100 g de hígado



#### 5.5.2.4 Catalasa (CAT).

CAT es indicador de estrés oxidativo y funcionalidad hepática. Es una enzima citosólica que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En un daño hepático, la actividad enzimática de la catalasa disminuye, por lo tanto hay una acumulación de  $H_2O_2$ , lo que provoca estrés oxidativo. Esta actividad enzimática se cuantificó utilizando permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ), ya que reacciona con el  $H_2O_2$  formando óxido de manganeso, por lo tanto, se cuantificó el  $KMnO_4$  residual en un espectrofotómetro a 480 nm . La actividad de CAT fue calculada con el índice constante de reacción de la descomposición de  $H_2O_2$  ( $K \cdot 10^2 / \text{min}$ )<sup>185</sup>.

Procedimiento para preparación de homogenado:

1. Se pesaron 0.5 g de hígado de rata.
2. Se homogenizó en 5 mL de PBS fría con 20 golpes en homogenizador de vidrio con pistilo de teflón.
3. El homogenizado se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Se tomó una alícuota de 1 mL de sobrenadante y se colocó en un tubo de ensaye de 13 x 100 en hielo.
4. Se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de etanol (aproximadamente 0.01 mL EtOH/mL de sobrenadante, queda así a 0.17 M de EtOH).
5. Se mezcló y se dejó incubar por 30 min en hielo.
6. Después de ese tiempo se añadió 100  $\mu\text{L}$  de tritón al 10%, quedando así en una concentración final del 1 % y se mezcló bien.
7. De esta mezcla de homogenado se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se agregaron a 4.9 mL de PBS, se mezcló bien para producir una dilución de 50 veces.

Procedimiento para actividad de catalasa:

La reacción se llevó a cabo en baño de hielo, se recomiendan intervalos de 10 s entre cada muestra para agregar los reactantes.

1. Se colocó por duplicado 0.5 mL de muestra (homogenado preparado) en tubos de 20 mL en hielo.

2. Se colocó por duplicado un blanco de 0.5 mL de agua destilada.
3. Se inició la reacción enzimática secuencialmente a intervalos de 10 s, añadiendo 5.0 mL de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fría y se mezcló en vórtex.
4. Después de exactamente 3 min, se detuvo la reacción agregando por intervalos de 10 s, 1mL de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se mezcló de nuevo en vórtex.
5. Se agregaron 7.0 mL de la solución de KMnO<sub>4</sub>, y se mezcló en vórtex.
6. La lectura se realizó a una absorbencia a 480 nm en espectrofotómetro.
7. Se preparó por duplicado un estándar espectrofotométrico (St), agregando 7.0 mL de la solución de KMnO<sub>4</sub> a una mezcla de 5.5 mL de amortiguador con pH = 7 y 1 mL de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; leer también su absorbencia a 480 nm.

Se realizó la lectura de la absorbencia dentro de los primeros 30-60 s, después de agregar la solución de KMnO<sub>4</sub>; esto debido a que no se debe prolongar el tiempo de medición porque se forma MnO<sub>2</sub> precipitado e interfiere con las lecturas, se recomienda lavar las celdas con agua destilada entre cada medición.

Cálculos:

Bajo las condiciones descritas, la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la CAT sigue una cinética de primer orden, dado por la ecuación siguiente:

$$k = \log (S_0/S_3 ) \times 2.3/t$$

Dónde:  $k$  = es la constante de velocidad de reacción de primer orden  $t$  = es el tiempo (el intervalo de reacción de 3 min).

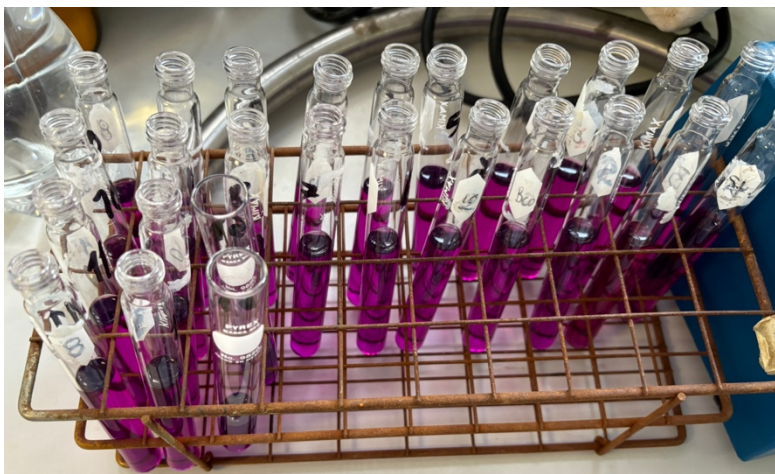
$S_0$  = es la concentración de substrato al tiempo cero,  $S_3$  = es la concentración de substrato a los 3 min.

Para obtener  $S_0$  (expresada en unidades de absorbencia), sustraer la absorbencia de los blancos del sistema de reacción (B) del estándar espectrofotométrico (St).

Para obtener  $S_3$ , sustraer la absorbencia de las muestras de reacción (A) del St.

Los resultados fueron expresados en términos de la constante de velocidad de primer orden como:  $k \times 10^2$ .

Observar que dependiendo del valor obtenido se puede convertir a  $k \times 10^2/\text{min}$



**Figura 18.** Color característico del  $\text{KMnO}_4$  residual en el proceso de determinación de CAT

## 5.6 Pruebas estadísticas.

Las pruebas estadísticas aplicadas a los datos de cada grupo experimental fueron un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para la comparación de todos los grupos contra todos, es la llamada comparación múltiple pareada total del método de Tukey; esta prueba proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una  $P < 0.05$ . La prueba se corrió en un paquete de GraphPad Prisma versión 10.0 (Systat Software, EUA).

# **Capítulo 6**

## **Resultados**

## 6.1 Simulación molecular resultados y discusión.

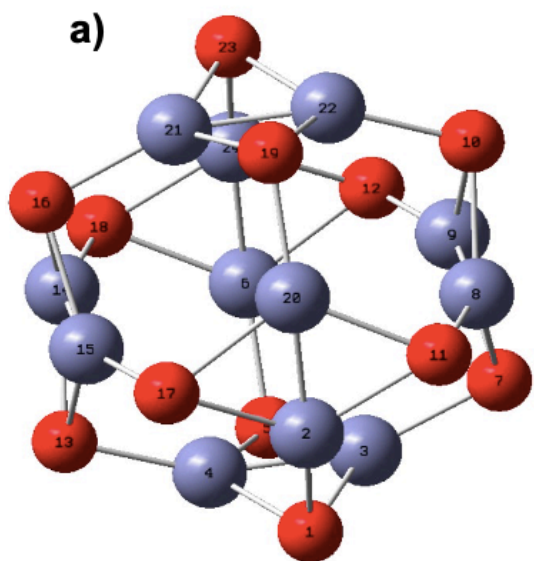
En este apartado se presentan y analizan los resultados obtenidos mediante métodos semiempíricos y de la teoría del funcional de la densidad (DFT), destacando las diferencias y similitudes entre ambos enfoques. Estos resultados incluyen valores de energía, parámetros termodinámicos y propiedades electrónicas, los cuales se exponen en tablas y se complementan con representaciones gráficas de las estructuras moleculares optimizadas. Este análisis detallado permite no solo comparar la precisión y consistencia de los métodos empleados, sino también evaluar la contribución de cada aproximación al entendimiento de las características estructurales y energéticas de los sistemas modelados.

Para las moléculas calculadas por DFT se determinó su electronegatividad ( $\chi$ ) a partir de la ecuación de (1), donde relaciona el valor del orbital HOMO y LUMO<sup>186</sup>.

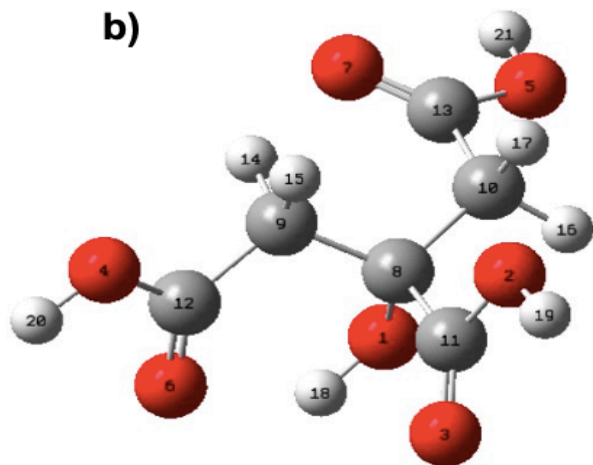
$$\chi = - \frac{(\text{Energía de HOMO} + \text{Energía de LUMO})}{2} \quad (1)$$

### 6.1.1 PM6

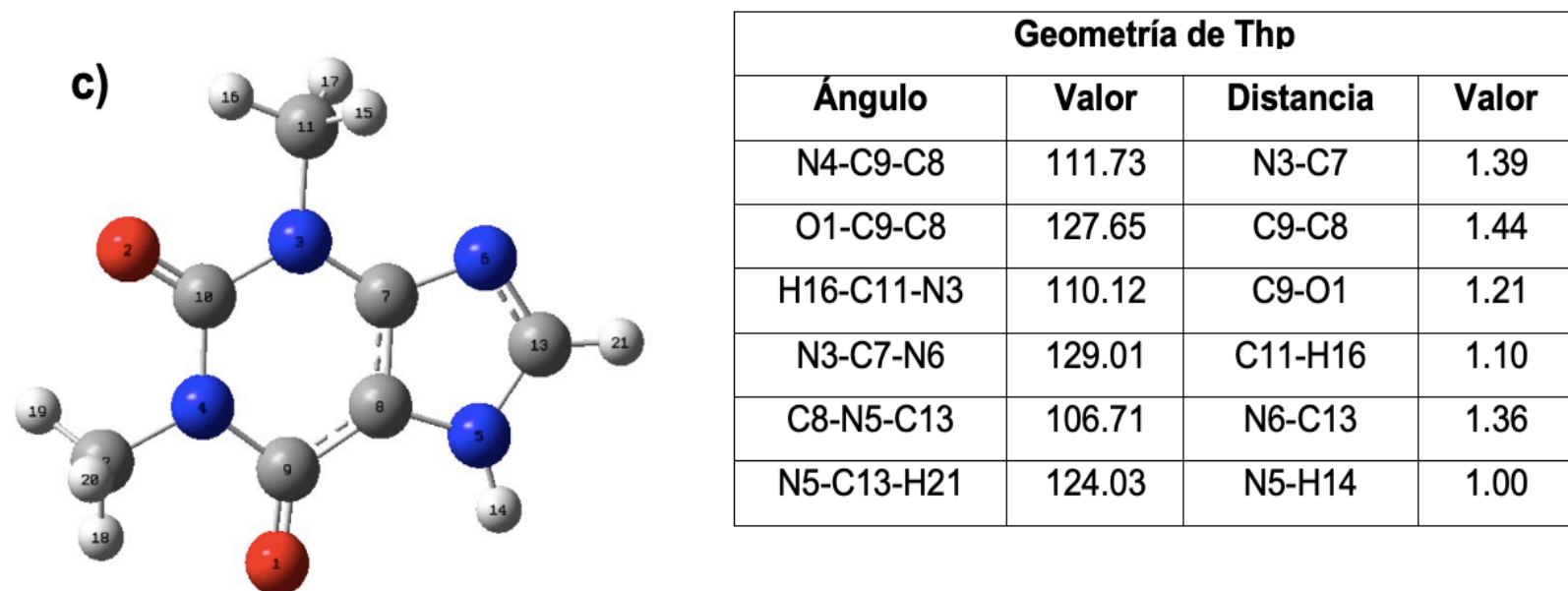
De los cálculos obtenido por PM6 se obtuvo una aproximación inicial de la estructura geométrica de las moléculas involucradas. Las distancia y ángulos de enlace más relevantes obtenidas son las que se muestran en la Figura 19:



Geometría de ZnO			
Ángulo	Valor	Distancia	Valor
Zn21-O19-Zn22	58.19	Zn21-Zn22	1.96
O19-Zn20-Zn2	156.94	Zn21-O19	2.02
Zn21-O16-Zn15	103.34	Zn21-O16	1.93
O16-Zn15-O17	119.60	Zn15-O17	1.93
Zn2-O11-Zn8	102.14	Zn8-Zn9	1.97
Zn21-O23-Zn22	58.15	Zn17-Zn21	3.81



Geometría de AC			
Ángulo	Valor	Distancia	Valor
H20-O4-C12	112.62	H20-O4	1.00
O4-C12-O6	120.63	C12-O6	1.21
C10-C13-O7	130.22	C12-C9	1.49
C10-C13-O5	109.45	C9-H14	1.13
O1-C8-C11	107.76	C8-C11	1.55
H17-C10-H16	105.05	O2-H19	0.99



**Figura 19.** Representación de la geometría y sus ángulos de enlace en grados, y distancias atómicas en Å para a) ZnO, b) AC y c) Thp. Utilizando el método semiempírico con PM6, con Gaussian 16.

### 6.1.2 LSDA/6-31+G(d,p)

Se llevó a cabo una optimización para el primer peldaño según la escalera de Jacob, los cálculos obtenidos para ZnO, AC y Thp. Donde se obtuvieron energías totales para las moléculas individuales, y una vez confirmado que todas las frecuencias fueran positivas se calcularon las energías con corrección al punto cero, como la energía de la molécula ( $\Delta E$ ), entalpía ( $\Delta H$ ), energía libre de formación ( $\Delta G$ ) y entropía del sistema ( $\Delta S$ ), como se muestra en la Tabla 9.

- Para el *cluster* de ZnO Figura 20, el tipo de enlace que predomina entre el Zn y el O es generalmente iónico, dado que el oxígeno tiene una mayor electronegatividad que el zinc, lo que normalmente generaría un desequilibrio de cargas en la molécula<sup>29</sup>. Sin embargo, al calcular su  $\chi$  a partir de la

ecuación (1), se obtuvo un valor de 0.212 eV , como se muestra en la tabla 6, lo que indica una baja tendencia a atraer electrones hacia sí misma cuando interactúa con otras especies químicas, lo que contradice el supuesto desequilibrio de cargas. Esta contradicción se refuerza aún más al analizar su momento dipolar magnético, que tiene un valor muy cercano a cero (0.021 Debye), lo que confirma la cancelación del desequilibrio de cargas debido a la geometría de la molécula. Como resultado, la molécula es globalmente apolar, aunque pueden existir regiones locales con densidad de carga parcial. Esto resalta su estabilidad y la hace adecuada para ser utilizada como base en un nanosistema. Además de sugerir una interacción de enlace covalente en el interior de la molécula.

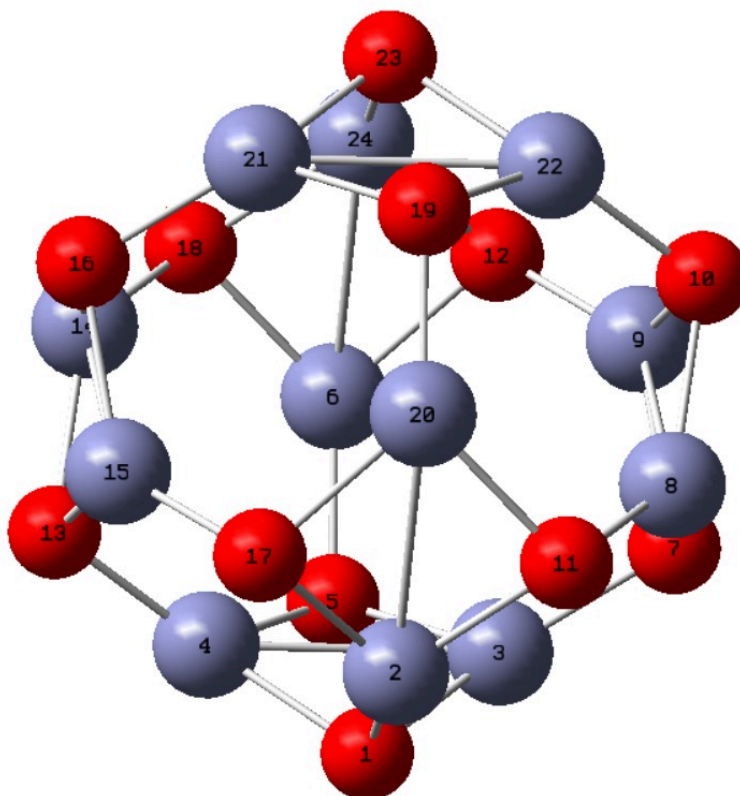
**Tabla 6.** Geometría molecular (ángulos en grados y distancias de enlace en Å) y propiedades electrónicas y dipolares para el ZnO.

Geometría de ZnO			
Ángulo	Valor	Distancia	Valor
Zn21-O19-Zn22	86.24	Zn21-Zn22	2.62
O19-Zn20-Zn2	142.67	Zn21-O19	1.91
Zn21-O16-Zn15	108.05	Zn21-O16	1.82
O16-Zn15-O17	129.48	Zn15-O17	1.82
Zn2-O11-Zn8	108.21	Zn8-Zn9	2.62
Zn21-O23-Zn22	86.22	Zn17-Zn21	3.70

Propiedades electrónicas y dipolares			
HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\chi$ (eV)	D (Debye)
-0.260	-0.164	0.212	0.021





**Figura 20.** Representación de ZnO utilizando el método DFT con LSDA/6-31+G(d,p), con Gaussian 16.

- Para la molécula de AC Figura 21, aunque contiene grupos funcionales con cierta polaridad, como los carboxilos<sup>98</sup>, su comportamiento global está determinado principalmente por su geometría y los valores electrónicos obtenidos. En la Tabla 7, podemos observar que la  $\chi$  del ácido cítrico es 0.174 eV, lo que indica una tendencia moderada a atraer electrones al interactuar con otras especies químicas. Esto sugiere que el ácido cítrico tiene una reactividad química controlada, lo que le permite formar interacciones estables sin generar un comportamiento excesivamente reactivo. Por otro lado, al aplicar la aproximación de Koopmans en un cálculo DFT, que relaciona los valores de HOMO y LUMO con el potencial de ionización y la afinidad electrónica<sup>187</sup>, respectivamente, obtenemos que la

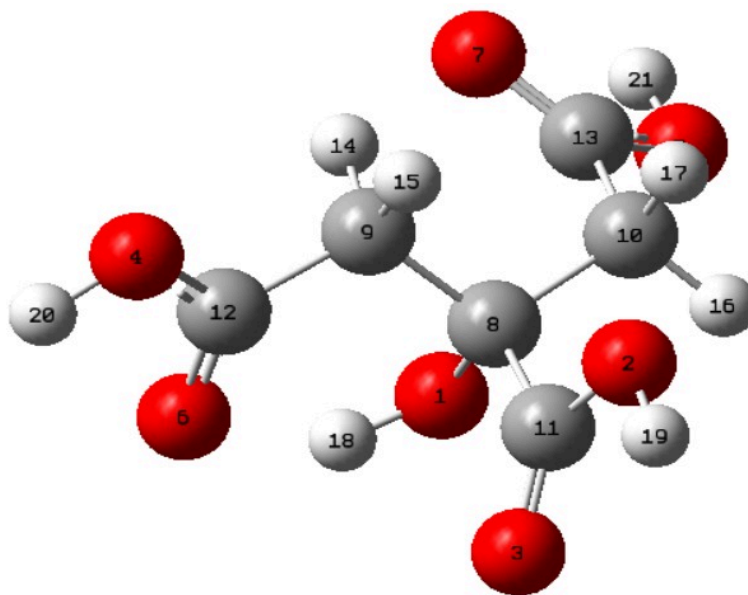
energía de ionización del ácido cítrico, calculada a partir de HOMO, es 0.259 eV. Este valor refleja que el ácido cítrico tiene una estabilidad moderada frente a la pérdida de electrones, lo que es consistente con su tendencia a formar enlaces covalentes estables. Asimismo, la afinidad electrónica del ácido cítrico, derivada de LUMO, es 0.089 eV, lo que indica una capacidad limitada para aceptar electrones. Esto resalta su naturaleza moderadamente electrófila y su baja capacidad a comportarse como un aceptor de electrones en reacciones químicas.

Su momento dipolar es significativamente alto, con un valor de 3.198 Debye, lo que indica que la molécula presenta una distribución de carga notablemente asimétrica, atribuible a los grupos funcionales carboxilos y al oxígeno. Por lo tanto, el ácido cítrico no es apolar y presenta regiones con densidades de carga parciales, lo que refuerza su capacidad para interactuar con otras moléculas o superficies a través de interacciones electrostáticas o dipolares. Esto lo hace apto para aplicaciones en sistemas biológicos, como agente quelante o como intermediario en interacciones moleculares con superficies metálicas o polímeros.

**Tabla 7.** Geometría molecular (ángulos en grados y distancias de enlace en Å) y propiedades electrónicas y dipolares para el AC.

Geometría de AC			
Ángulo	Valor	Distancia	Valor
H2O-O4-C12	106.38	H2O-O4	0.98
O4-C12-O6	121.57	C12-O6	1.22
C10-C13-O7	125.48	C12-C9	1.48
C10-C13-O5	112.36	C9-H14	1.11
O1-C8-C11	110.48	C8-C11	1.52
H17-C10-H16	108.33	O2-H19	0.98

Propiedades electrónicas y dipolares			
HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\chi$ (eV)	D (Debye)
-0.259	-0.089	0.174	3.198



**Figura 21.** Representación de AC utilizando el método DFT con LSDA/6-31+G(d,p), con Gaussian 16.

- Para la molécula de Thp Figura 22, La  $\chi$  de Thp es 0.167 eV, como se observa en la Tabla 8. Este valor relativamente bajo refleja una reactividad controlada, lo que la hace lo suficientemente estable para participar en enlaces covalentes sin ser excesivamente reactiva. Por otro lado, su momento dipolar de 3.553 Debye indica una polaridad global notable, evidenciando una distribución de carga significativamente asimétrica dentro de la molécula. Este resultado es coherente con la presencia de átomos electronegativos, como oxígeno y nitrógeno, en grupos funcionales específicos como  $\text{NH}_2$ , los cuales generan regiones de densidad de carga parcial<sup>120</sup>. Esta polaridad otorga a la teofilina una mayor capacidad para

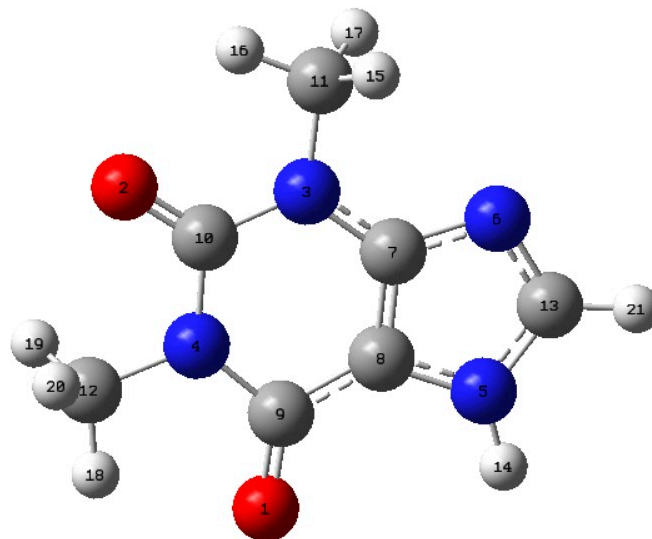
interactuar mediante enlaces de hidrógeno, interacciones dipolares y otras fuerzas intermoleculares en medios polares, como soluciones acuosas.

La energía de ionización calculada a partir del HOMO es 0.231 eV, lo que indica que la teofilina posee una estabilidad moderada frente a la pérdida de electrones, una característica favorable para moléculas que necesitan mantener su estructura en procesos químicos. Por su parte, la afinidad electrónica (AE) derivada del LUMO es 0.102 eV, lo que sugiere que la teofilina tiene una capacidad ligeramente mayor para aceptar electrones en comparación con moléculas con AE más bajas, como el caso del ácido cítrico (AC). Este comportamiento destaca su potencial para actuar tanto como donadora como receptora de electrones, dependiendo del entorno químico en el que se encuentre.

**Tabla 8.** Geometría molecular (ángulos en grados y distancias de enlace en Å) y propiedades electrónicas y dipolares para el Thp.

Geometría de Thp			
Ángulo	Valor	Distancia	Valor
N4-C9-C8	110.77	N3-C7	1.36
O1-C9-C8	126.50	C9-C8	1.41
H16-C11-N3	106.89	C9-O1	1.23
N3-C7-N6	126.71	C11-H16	1.10
C8-N5-C13	106.86	N6-C13	1.32
N5-C13-H21	122.48	N5-H14	1.02

Propiedades electrónicas y dipolares			
HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\chi$ (eV)	D (Debye)
-0.231	-0.102	0.167	3.553



**Figura 22.** Representación de Thp utilizando el método DFT con LSDA/6-31+G(d,p), con Gaussian 16.

**Tabla 9.** Energías con corrección al punto cero para las moléculas ZnO, AC y Thp, calculadas usando LSDA/6-31+G(d,p). Todas la energías se expresan en kcal/mol, excepto la entropía la cual se expresa en kcal/mol · K.

Energías con corrección al punto cero				
Molécula	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta G$	$\Delta S$
<b>ZnO</b>	-13944346.635	-13944326.303	-13944385.917	200.104
<b>AC</b>	-474484.174	-474475.389	-474510.090	116.400
<b>Thp</b>	-400075.277	-400067.558	-400098.808	104.930

De acuerdo con la Tabla 9, la  $\Delta E$  indica la estabilidad energética absoluta de las moléculas. En este sentido, el ZnO, al ser un compuesto inorgánico con enlaces iónicos fuertes, es considerablemente más estable que las moléculas orgánicas AC y Thp. Entre estas últimas, el AC presenta una mayor estabilidad debido a su estructura polifuncional.

La  $\Delta H$  refleja los cambios de energía involucrados en procesos como la formación de los compuestos o reacciones químicas. La gran diferencia en los valores entre el ZnO y las moléculas orgánicas indica una interacción molecular más fuerte y estable en el caso del ZnO, lo que refuerza la idea de que las interacciones en este

compuesto son principalmente covalentes. Entre las moléculas orgánicas, el ácido cítrico es más favorable termodinámicamente.

Por su parte, la  $\Delta G$  indica la espontaneidad de los procesos. El ZnO es mucho más espontáneo que las moléculas orgánicas debido a su alta estabilidad inherente. Entre las moléculas orgánicas, el ácido cítrico presenta una mayor espontaneidad que la teofilina.

Finalmente, la  $\Delta S$  refleja el grado de desorden asociado con cada molécula. El ZnO tiene la mayor entropía debido a su naturaleza cristalina. Entre las moléculas orgánicas, el ácido cítrico muestra una mayor entropía que la teofilina, lo que puede atribuirse a su mayor tamaño molecular y flexibilidad conformacional<sup>188</sup>.

### 6.1.3 B3LYP/DGDZVP

Finalmente, este cálculo proporcionó una descripción más detallada de la interacción molecular, ya que permitió determinar las energías de formación (EF) y los momentos dipolares (D) para los complejos ZnO-AC y ZnO-AC-Thp. Una vez confirmada la positividad de todas las frecuencias, también se calcularon las energías con corrección al punto cero, como se muestra en la Tabla 12.

- El complejo ZnO-AC combina las propiedades del ZnO y del AC, formando una nueva entidad molecular con características electrónicas y estructurales diferentes. A partir de los datos proporcionados en la Tabla 10, se puede hacer la siguiente interpretación:

El valor del HOMO del complejo es ligeramente menos negativo que el del ZnO, lo que sugiere que el complejo tiene una mayor tendencia a perder electrones que el ZnO puro. Este resultado es esperado, ya que facilita la interacción adecuada con la Thp. En cuanto al LUMO, el complejo muestra una capacidad para aceptar electrones similar a la del ácido cítrico, lo que indica una baja disposición a aceptar electrones. Sin embargo, un resumen

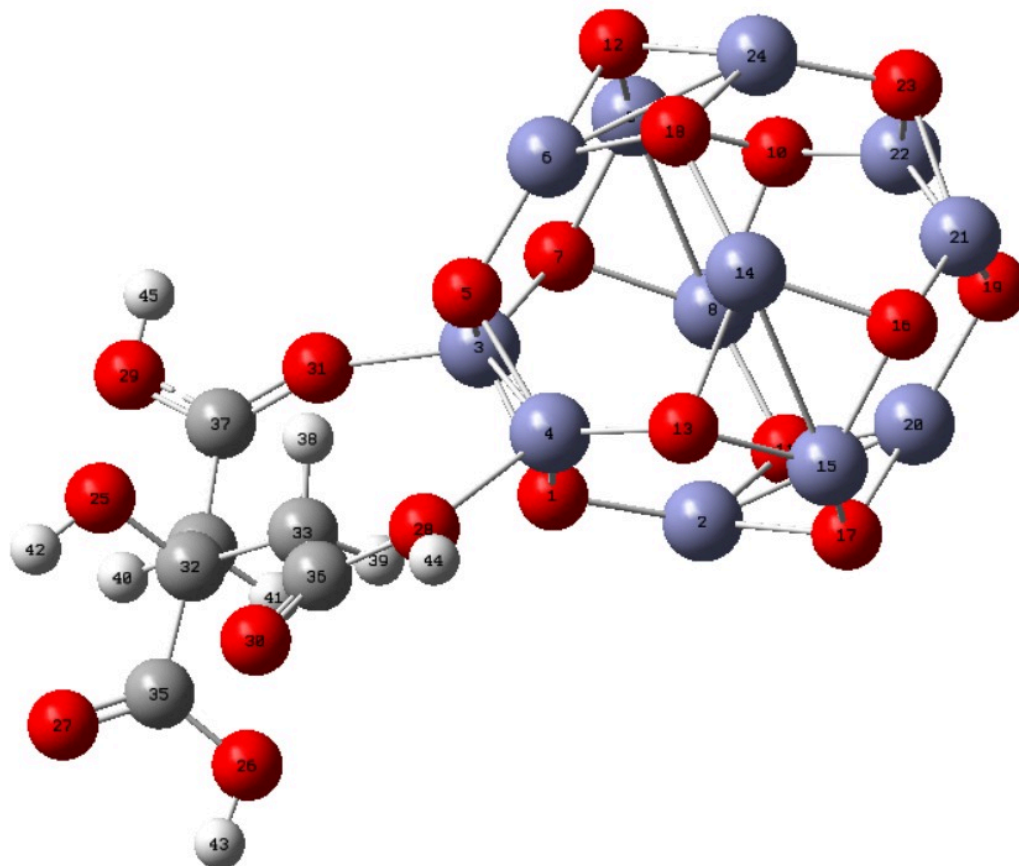
de estos valores los podemos tener en el resultado de la  $\chi$  que tiene un valor de 0.178 eV. Este valor sugiere una tendencia moderada a atraer electrones, ligeramente mayor que la del ácido cítrico y comparable a la del ZnO, lo que indica un equilibrio entre las propiedades electrónicas de ambos componentes.

El alto valor del momento dipolar sugiere que el complejo tiene una polaridad global considerable, lo que lo hace ideal para interacciones con medios polares y superficies cargadas. Además, esta polaridad podría mejorar su capacidad para formar enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas con otras moléculas.

**Tabla 10.** Geometría molecular (ángulos en grados y distancias de enlace en Å) y propiedades electrónicas y dipolares para el complejo ZnO-AC.

Geometría del complejo ZnO-AC			
Ángulo	Valor	Distancia	Valor
O31-Zn3-O5	106.33	O31-Zn3	2.01
C36-O28-Zn4	129.07	O28-Zn4	2.14
Zn3-Zn4-O28	115.40	O13-Zn6	3.82

Propiedades electrónicas y dipolares			
HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\chi$ (eV)	D (Debye)
-0.257	-0.098	0.178	5.189



**Figura 23.** Representación del complejo ZnO-AC utilizando el método DFT con B3LYP/DGDZVP, con Gaussian 16.

- El complejo ZnO-AC-Thp, resultado del último cálculo realizado, presenta características electrónicas y estructurales derivadas de las interacciones entre sus componentes. A partir de los datos de la Tabla 11, podemos determinar por el valor del orbital HOMO que el complejo tiene buena estabilidad frente a la pérdida de electrones, aunque es ligeramente más reactivo en comparación con el complejo ZnO-AC. El valor de LUMO refleja una mayor facilidad para aceptar electrones en comparación con ZnO-AC. Esto sugiere que la incorporación de Thp al sistema incrementa la capacidad del complejo para actuar como aceptor electrónico, lo que refuerza su potencial para participar en procesos redox. Aunque el complejo ZnO-AC-



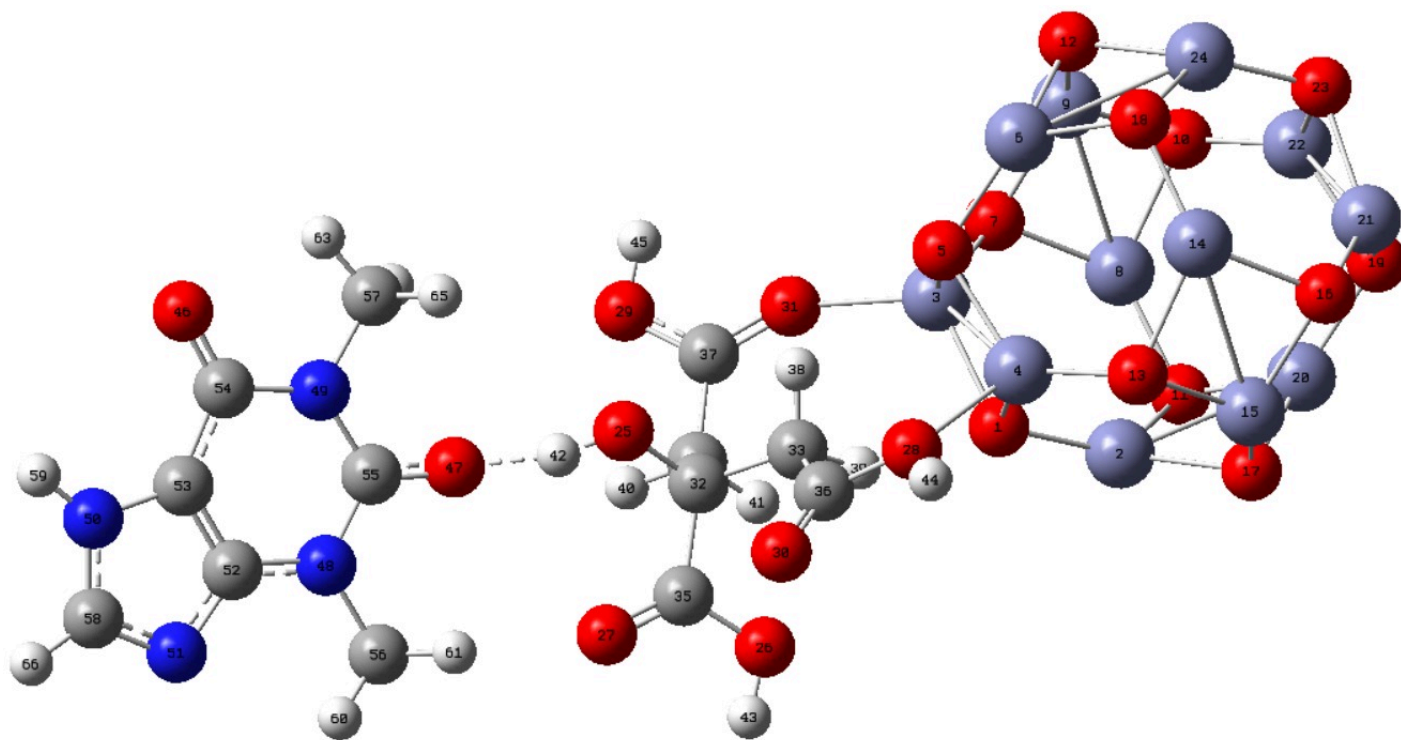
Thp es menos electronegativo que ZnO-AC, su capacidad para aceptar electrones se ve mejorada debido a un LUMO más alto. Esto lo hace más reactivo en términos de interacciones electrónicas, logrando un equilibrio entre reactividad y estabilidad. El alto momento dipolar del complejo, superior al de ZnO-AC, indica una elevada polaridad global. Esta característica lo hace ideal para interacciones en medios acuosos y polares, además de favorecer interacciones intermoleculares como enlaces de hidrógeno e interacciones dipolares. Su elevada polaridad podría ser crucial en aplicaciones biológicas, farmacológicas o ambientales.

**Tabla 11.** Geometría molecular (ángulos en grados y distancias de enlace en Å) y propiedades electrónicas y dipolares para el complejo ZnO-AC-Thp.

Geometría del complejo ZnO-AC-Thp			
Ángulo	Valor	Distancia	Valor
O31-Zn3-O5	109.81	O31-Zn3	2.08
C36-O28-Zn4	128.95	O28-Zn4	2.12
Zn3-Zn4-O28	111.35	O47-H42	1.52
C55-O47-H42	135.19	O13-Zn6	3.80
N48-C55-O47	121.12		

Propiedades electrónicas y dipolares			
HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\chi$ (eV)	D (Debye)
-0.247	-0.093	0.166	10.324



**Figura 24.** Representación del complejo ZnO-AC-Thp utilizando el método DFT con B3LYP/DGDZVP, con Gaussian 16.

**Tabla 12.** Energías con corrección al punto cero para los complejos ZnO-AC y ZnO-AC-Thp, calculadas usando B3LYP/DGDZVP. Todas la energías se expresan en kcal/mol, excepto la entropía la cual se expresa en kcal/mol · K.

Energías con corrección al punto cero				
Complejo	$\Delta E$	$\Delta H$	$\Delta G$	$\Delta S$
<b>ZnO-AC</b>	-14440724.932	-1451246.051	-14440776.451	273.494
<b>ZnO-AC-Thp</b>	-14842952.818	-14842914.415	-14843017.765	346.595

De la Tabla 12, podemos determinar por  $\Delta E$  que el complejo ZnO-AC-Thp es más estable que ZnO-AC, esto se debe a las interacciones adicionales que aporta la teofilina, incluyendo enlaces de hidrógeno y fuerzas dipolares con los componentes del sistema. De  $\Delta H$  que el complejo ZnO-AC-Thp no solo es más estable, sino que

su formación implica una mayor liberación de energía, lo que lo hace aún más termodinámicamente favorable que ZnO-AC. Por  $\Delta G$  interpretamos que ambos complejos son termodinámicamente favorables, pero ZnO-AC-Thp tiene una espontaneidad mayor debido a las interacciones adicionales que estabilizan el sistema. En la última energía calculada con la corrección al punto cero  $\Delta S$  nos revela que el complejo ZnO-AC-Thp presenta un mayor desorden que ZnO-AC, lo que es consistente con la inclusión de un tercer componente.

Las energías de formación de los complejos ZnO-AC y ZnO-AC-Thp brindan información sobre la estabilidad y la viabilidad termodinámica de su síntesis a partir de sus componentes individuales<sup>188</sup>.

Se calculó la energía de formación de los complejos a partir de la ecuación<sup>188</sup>:

$$EF = E_{\text{producto}} - (E_{\text{reactivo1}} + E_{\text{reactivo2}})$$

Para el complejo ZnO-AC:

$$EF = E_{\text{ZnO-AC}} - (E_{\text{ZnO}} + E_{\text{AC}})$$

$$EF = -14440724.9325 \text{ kcal/mol} - [ -13944346.6348 \text{ kcal/mol} + (-474484.1738 \text{ kcal/mol}) ]$$

$$EF = -21894.1239 \text{ kcal/mol}$$

Para el complejo ZnO-AC-Thp:

$$EF = E_{\text{ZnO-AC-Thp}} - (E_{\text{ZnO}} + E_{\text{AC}} + E_{\text{Thp}})$$

$$EF = -14842952.8182 \text{ kcal/mol} - [ -14440724.9325 \text{ kcal/mol} + (-400075.2767 \text{ kcal/mol}) + (-400075.277 \text{ kcal/mol}) ]$$

$$EF = -24046.7324 \text{ kcal/mol}$$

**Tabla 13.** Energías de formación de los complejos ZnO-AC y ZnO-AC-Thp, calculadas usando B3LYP/DGDZVP.

Energía de formación (EF)	
Complejo	EF (kcal/mol)
<b>ZnO-AC</b>	-21894.124
<b>ZnO-AC-Thp</b>	-2152.610

La diferencia entre las energías de formación es:

$$\Delta\Delta EF = \Delta EF (\text{ZnO-AC-Thp}) - \Delta EF (\text{ZnO-AC})$$

$$\Delta\Delta EF = -24046.7324 - (-21894.124) = -2152.6084 \text{ kcal/mol.}$$

Esto indica que la incorporación de Thp al complejo ZnO-AC introduce interacciones adicionales que aumentan la estabilidad del sistema en aproximadamente 2152.6084 kcal/mol.

## 6.2 Síntesis de ZnO QD's.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas de caracterización confirman la síntesis exitosa de ZnO QD's empleando el método de precipitación. A continuación, se presentan y discuten los resultados de cada técnica, haciendo énfasis en los datos clave que indican la correcta formación de los QD's.

### 6.2.1 UV-Vis

En el análisis de espectrofotometría UV-Vis, la curva de absorción presenta un pico característico de los ZnO QD's, ubicado en el rango de 300 a 350 nm (específicamente en 325nm, ver Figura 25). Esta banda de absorción es típica para el ZnO en forma de puntos cuánticos y se relaciona directamente con las transiciones electrónicas en la estructura de los nanocristales. La presencia de esta banda única en todo el espectro confirma que la obtención de ZnO QD's por el método de síntesis de precipitación posee una alta pureza. El corrimiento al azul en la absorción de excitación indica claramente el rango de confinamiento cuántico; la banda prohibida de las partículas aumentó, lo que resultó en un desplazamiento del borde de absorción hacia una longitud de onda menor, a medida que disminuyó el tamaño de las partículas, esto en comparación con el ZnO en *bulk*.

El *band gap* o banda prohibida del espectro de ZnO QD's fue calculada de la manera siguiente:

$$E = h \cdot c / \lambda$$

Donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34}$  Js),  $c$  es la velocidad de la luz ( $3 \times 10^8$  m/s) y  $\lambda$  es la longitud de onda de absorción de los ZnO QD's. El valor de  $1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-19}$  J.

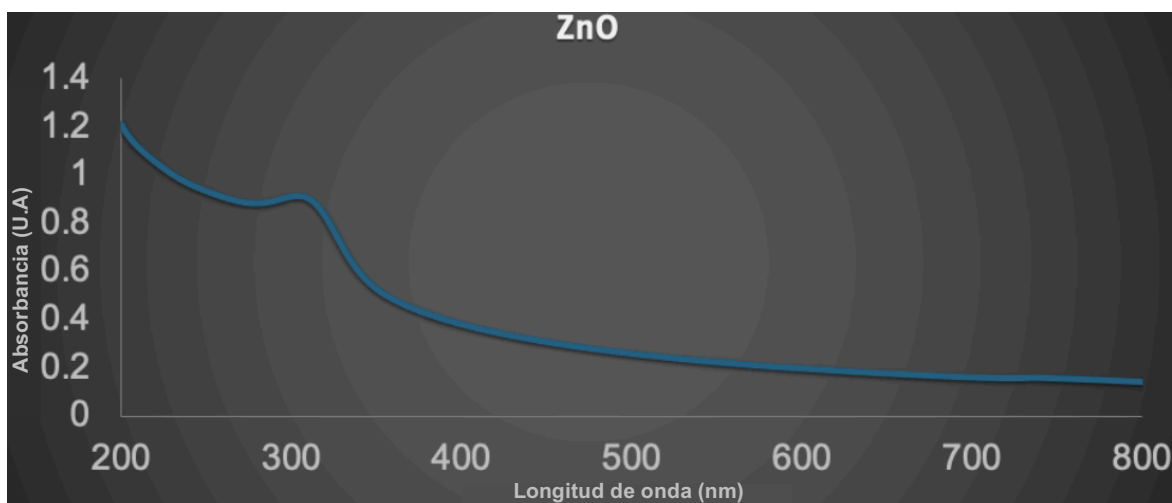
$$E = (6.626 \times 10^{-34} \text{ Js} \cdot 3 \times 10^8 \text{ m/s}) / 320 \text{ nm} = 1.9878 \times 10^{-25} \text{ Jm} / 320 \text{ nm}$$

$$E = (1.9878 \times 10^{-25} \text{ Jm} / 325 \times 10^{-9} \text{ m}) \cdot (1 \text{ eV} / 1.602 \times 10^{-19} \text{ J}) = 3.82 \text{ eV}.$$

El cálculo de la banda del espectro de absorción de los ZnO QD's es de 3.82 eV, la cual es mayor que la del material ZnO en *bulk* de 3.37 eV.

La absorción en este rango sugiere que el tamaño de las partículas está dentro de un rango característico de puntos cuánticos, permitiendo que el ZnO exhiba propiedades ópticas únicas que son útiles en aplicaciones como optoelectrónica, dispositivos de emisión de luz y biosensores.

En conjunto, los datos obtenidos en el espectro UV-Vis respaldan la formación de ZnO QD's de tamaño controlado mediante el método de precipitación, validando así la metodología de síntesis empleada y sentando una base sólida para las posteriores etapas de funcionalización y aplicaciones experimentales del nanosistema.

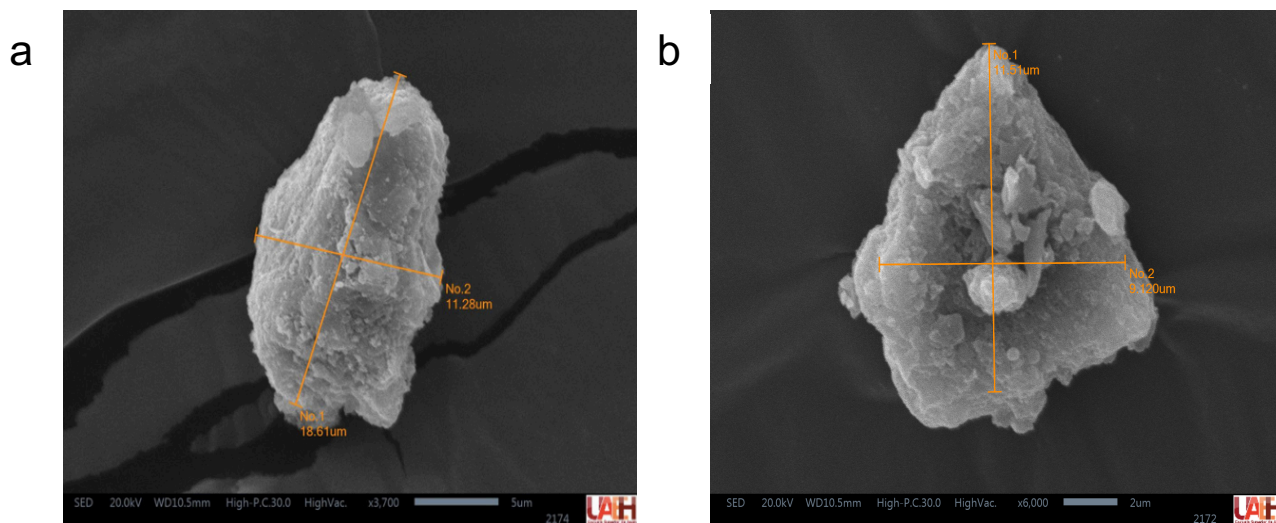


**Figura 25.** Banda de absorción de ZnO QD's con un pico de absorción en 325nm obtenida de una espectrofotometría UV-VIS

### 6.2.2 SEM

En la Figura 26 se muestra el análisis de microscopía electrónica de barrido, que permitió observar en detalle la morfología y la distribución de tamaño de los ZnO QD's. Las imágenes obtenidas muestran una agrupación de los ZnO QD's en estructuras tipo clúster, con tamaños característicos en función del nivel de aumento. A un aumento de 3,700x, los clústeres presentan un tamaño aproximado de 15  $\mu\text{m}$  (Ver Figura 26 a), mientras que al incrementar a 6,000x, el tamaño promedio de los clústeres observados es de alrededor de 10  $\mu\text{m}$  (Ver Figura 26 b). Estas diferencias en tamaño entre los niveles de aumento sugieren una variabilidad en la distribución y posible aglomeración de los QD's dentro de los clústeres, lo cual

es común en materiales nanométricos debido a la alta superficie específica y la tendencia a la interacción interparticular. Las morfología semi esférica, así como algunos agregados observados y el tamaño promedio de los clústeres de ZnO QD's obtenidos mediante SEM proporcionan una primera caracterización física del material y son de utilidad para futuras comparaciones de estabilidad, dispersión y funcionalización en aplicaciones específicas.



**Figura 26.** Morfologías de clusters de ZnO QD's obtenidas por SEM a) Tamaño alrededor de 15  $\mu\text{m}$  a 3,700 aumentos, b) Tamaño alrededor de 10  $\mu\text{m}$  a 6,000 aumentos.

### 6.2.3 FT-IR

El análisis FT-IR empleado para identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de los ZnO QD's y confirmar la presencia de enlaces característicos del Zn-O es mencionado más adelante en los resultados de FT-IR del nanosistema.

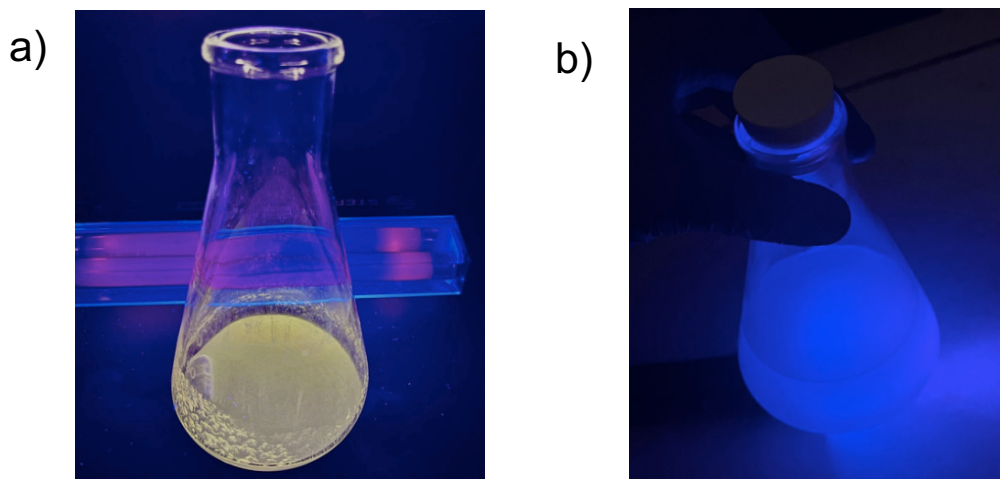
#### **6.2.4 Emisión espontanea de luz**

La evaluación de emisión espontánea bajo luz ultravioleta (UV) permitió observar una respuesta característica de los ZnO QD's, manifestada en emisiones de color verde y azul al ser excitados por luz UV (Figura 27). Esta emisión de luz confirma la presencia de ZnO QD's, cuya respuesta óptica se ve influenciada por el confinamiento cuántico inherente a estos materiales.

La emisión en color verde se asocia con partículas de aproximadamente 5-7 nm de diámetro (Ver Figura 27 a), mientras que la emisión azul indica un tamaño de partícula más pequeño, en el rango de 5 nm o menos (Ver Figura 27 b). Estas diferencias en color se deben a los efectos de confinamiento cuántico, donde el tamaño de los QD's afecta directamente la energía de su banda prohibida, desplazando la longitud de onda emitida hacia el azul conforme el tamaño de las partículas disminuye. Este fenómeno resulta útil para el control y ajuste de propiedades ópticas en aplicaciones específicas, ya que permite seleccionar longitudes de onda de emisión mediante el ajuste del tamaño de los ZnO QD's.

Este análisis evidencia la capacidad de manipular el tamaño de las partículas de ZnO para optimizar sus propiedades de emisión en futuras aplicaciones en fotocatalíticas y biomedicina.





**Figura 27.** Emisión espontánea bajo luz UV de soluciones de ZnO QD's. a) Solución con emisión en verde con QD's con diámetro aproximado de 5-7 nm, b) Solución con emisión en azul con QD's con diámetro menor a 5 nm.

### 6.2.5 Cálculo de área superficial y composición atómica.

La determinación del área superficial y la composición atómica de ZnO QD's, se realizó empleando la función lineal del inverso del diámetro de la partícula, que permite calcular el tamaño de esta en función del *band gap* ( $E_g$ ) obtenido en el espectro UV-Vis. Partiendo de la ecuación propuesta por Mingyang Chen *et al*; en 2016:

$$E_g = 3.3 + 0.549d^{-1} \longrightarrow d = \frac{0.549}{E_g - 3.3}$$

donde  $d$  es el diámetro del QD en nm y  $E_g = 3.8$  eV, se obtiene:

$$d = \frac{0.549}{3.82 \text{ eV} - 3.3} = 1.05 \text{ nm}$$

Este cálculo muestra que el diámetro de los QD's es de aproximadamente 1.05 nm.

Para el cálculo del volumen del QD ( $V_{QD}$ ), se asumió una morfología esférica y se utilizó la densidad del ZnO ( $\rho = 5.606 \text{ g/cm}^3$ ), la masa molar (M.M = 81.68 g/mol) y la estructura cristalina hcp ( $a = b \neq c$ ), con parámetros de celda  $a = 3.253 \text{ \AA}$  y  $c = 5.213 \text{ \AA}$ :

$$V_{QD} = \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{4}{3} \pi (0.525 \times 10^{-9})^3 = 6.06 \times 10^{-28} \text{ m}^3$$

Donde  $r$  es el radio de el QD en metros. Por lo tanto, el volumen del QD de 1.05 nm de diámetro es de  $6.06 \times 10^{-28} \text{ m}^3$ .

Sabiendo que la derivada parcial de un volumen respecto a una posición nos da como resultado una superficie, para calcular el área superficial ( $A_S$ ) se derivó el volumen respecto al radio:

$$A_S = \frac{dV_{QD}}{dr} = \frac{d}{dr} \left( \frac{4}{3} \pi r^3 \right) \longrightarrow V_{QD}(r) = \left( \frac{4}{3} \pi r^3 \right)$$

$$V_{QD}'(r) = \left( \frac{4}{3} \pi \right) (3r^2) + (r^3)(0) = 4\pi r^2 = 4\pi (0.525 \times 10^{-9} \text{ m})^2$$

$$A_S = 3.46 \times 10^{-18} \text{ m}^2$$

Lo que indica que el área superficial del QD es aproximadamente  $3.46 \times 10^{-18} \text{ m}^2$

El número de moles de ZnO presentes en cada QD se calculó mediante la densidad y el volumen del QD:

$$\rho = \frac{m}{V_{QD}} \longrightarrow m = V_{QD} \times \rho$$

$$m = 6.06 \times 10^{-28} \text{ m}^3 \times 5,606 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} = 3.397 \times 10^{-24} \text{ kg}$$

Luego, el número de moles ( $n$ ) es:

$$n = \frac{m}{\text{M.M}} = \frac{3.397 \times 10^{-24} \text{ kg}}{0.08168 \frac{\text{kg}}{\text{mol}}} = 4.15 \times 10^{-23} \text{ mol}$$

Esto indica que el número de moles por cada QD es de aproximadamente  $4.15 \times 10^{-23}$  mol.

Para calcular el número de átomos por cada QD, se determinó el volumen de la celda hcp ( $V_{celda}$ ), usando las dimensiones de la estructura de ZnO, ver Figura 2:

$$V_{celda} = A_{base} \times h$$

$$V_{celda} = \left( \frac{P \times ap}{2} \right) \times c; \quad P = 6a; \quad ap = \sqrt{a^2 - r^2}; \quad h = c; \quad a = 2r$$

$$V_{celda} = \frac{6a \times \sqrt{a^2 - r^2}}{2} \times c$$

$$V_{celda} = \frac{6a \times \sqrt{a^2 - \left(\frac{a}{2}\right)^2}}{2} \times c = \frac{6a \times \sqrt{a^2 - \frac{a^2}{4}}}{2} \times c$$

$$V_{celda} = \frac{6a \times \sqrt{\frac{3a^2}{4}}}{2} \times c$$

$$V_{celda} = \frac{6a \times \frac{\sqrt{3}}{2} \times a^2}{2} \times c$$

$$V_{celda} = \frac{3\sqrt{3} \times a^2}{2} \times c$$

$$V_{celda} = \frac{3\sqrt{3} \times (3.2533 \times 10^{-10})^2}{2} \times 5.213 \times 10^{-10} m$$

$$V_{celda} = 1.43 \times 10^{-28} m^3$$

Donde  $A_{base}$  es el área de la base,  $h$  es la altura de la celda,  $a$  es el parámetro de la celda con un valor de  $3.2533 \times 10^{-10} m$  y  $c$  es otro parámetro de celda con un valor de  $5.213 \times 10^{-10} m$ .

Dividiendo el volumen del QD entre el volumen de la celda hcp, se obtiene el número de celdas por QD ( $CpQ$ ) de 1.05 nm de diámetro:

$$CpQ = \frac{V_{QD}}{V_{celda}} = \frac{6.06 \times 10^{-28} m^3}{1.43 \times 10^{-28} m^3} = 4.23 \text{ celdas por QD}$$

Para determinar el número total de átomos en el QD, se multiplica el número de celdas hcp por la cantidad de átomos en una celda (6 átomos por celda en hcp):

$$ApQ = CpQ \times ApC = 4.23 \times 6 = 25.38 \text{ átomos por QD}$$

Por lo tanto, se determina que en un QD de 1.05 nm de diámetro hay aproximadamente 25 átomos.

### 6.3 Síntesis de nanosistema.

Tras confirmar la formación correcta de los ZnO QD's, se continuó con la caracterización del nanosistema ZnO-Ac-Teofilina, con un enfoque en su potencial aplicación como fármaco en biomodelos<sup>101</sup>.

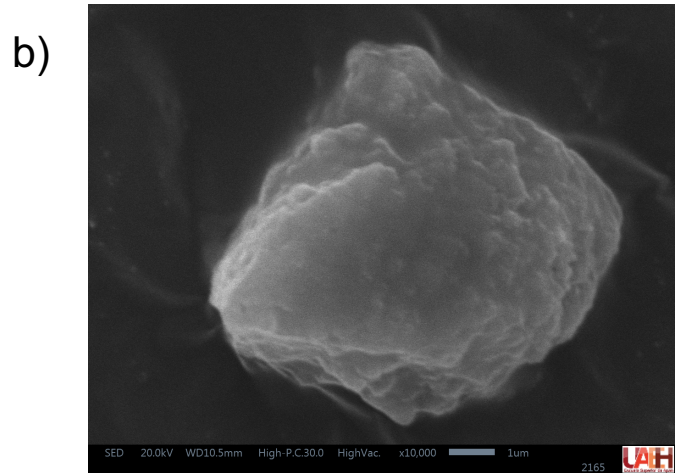
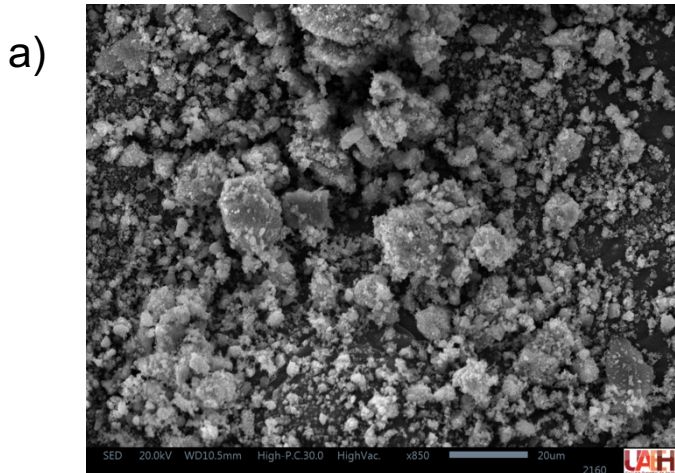
El análisis SEM-EDS brindó una visión detallada de la morfología (Figura 28) y la composición elemental del nanosistema funcionalizado. En las micrografías obtenidas del nanosistema ZnO-Ac-Teofilina, se observan dos imágenes representativas del material en diferentes aumentos, las cuales detallan la morfología y organización del sistema:

**Imagen a):** Esta micrografía muestra el nanosistema en una vista general, evidenciando una morfología con agregados irregulares que sugieren una estructura particulada y porosa. Las partículas se presentan en forma de

aglomerados, lo cual es típico en materiales funcionalizados debido a las interacciones entre los ZnO QD's y los agentes funcionalizantes (ácido cítrico y teofilina). Este tipo de aglomeración es beneficioso en aplicaciones biomédicas, ya que puede mejorar la capacidad de carga y liberación del fármaco. La distribución de las partículas parece homogénea, lo cual es crucial para asegurar una funcionalización uniforme y consistente del nanosistema.

**Imagen b):** En esta micrografía, tomada a aumento mayor, se observa con más detalle la estructura superficial de un agregado individual del nanosistema. Se aprecia una morfología rugosa y capas superpuestas, lo cual sugiere la presencia de una superficie activa y un recubrimiento efectivo con ácido cítrico y teofilina. La forma globular de los agregados indica una buena cohesión entre los ZnO QD's y los agentes funcionalizantes, lo que podría favorecer la estabilidad del nanosistema en aplicaciones biológicas. Esta estructura podría facilitar la interacción con medios acuosos, una característica esencial para su potencial uso en sistemas biológicos y su posterior aplicación farmacológica.

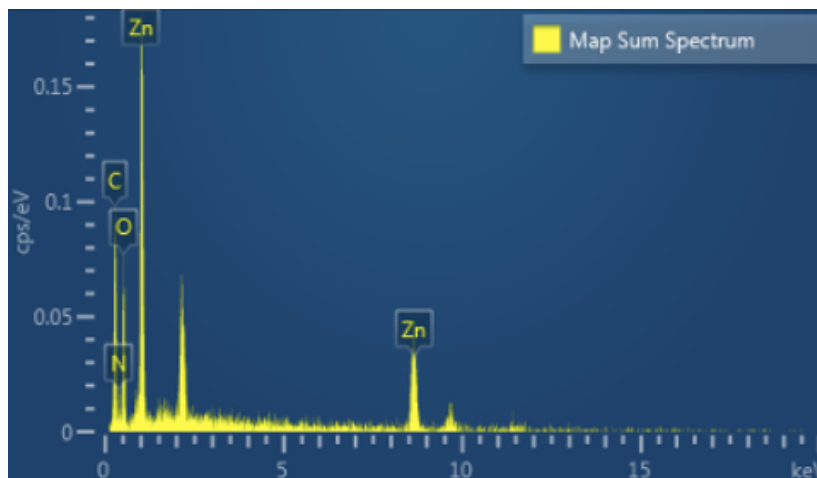
En conjunto, estas imágenes SEM confirman que el proceso de funcionalización ha generado un nanosistema bien estructurado, con una morfología adecuada para la interacción con medios biológicos. La uniformidad en la distribución y la cohesión de las partículas sugieren un material de alta pureza y con potencial para aplicaciones en biomodelos.



**Figura 28.** Morfologías de clusters del nanosistema obtenidas por SEM a) Micrografía del nanosistema a 850 aumentos, b) Micrografía del nanosistema a 10,000 aumentos.

En cuanto a la composición elemental, el espectro EDS detecta elementos clave (Figura 29): zinc (Zn) y oxígeno (O), correspondientes al núcleo de ZnO, así como carbono (C) y nitrógeno (N), que confirman la presencia del ácido cítrico y la teofilina. La distribución homogénea de estos elementos y la ausencia de contaminantes o elementos adicionales sugieren una elevada pureza del material, lo cual es crucial para minimizar posibles reacciones adversas en aplicaciones biomédicas.

Este perfil de pureza y la composición precisa de ZnO-Ac-Teofilina refuerzan su viabilidad como un nanosistema apto para aplicaciones farmacológicas. La funcionalización específica mejora la estabilidad y biocompatibilidad, cualidades esenciales para su desarrollo como un nuevo fármaco en el tratamiento de modelos biológicos.



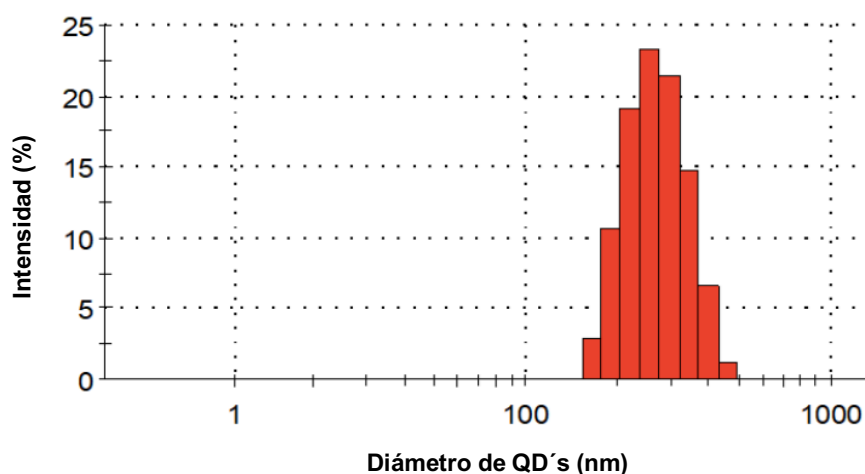
Elemento	Peso %	Error estándar de Peso %
C	42.08	3.17
N	10.50	4.64
O	23.90	2.24
Zn	23.51	2.01
<b>Total:</b>	100.00	

**Figura 29.** Gráfica del análisis EDS donde se muestra la presencia y distribución de los elementos presentes en el sistema.

El análisis mediante dispersión de luz dinámica (DLS) reveló una distribución de tamaño de partícula con un perfil normal, donde el tamaño hidrodinámico promedio del nanosistema se encuentra alrededor de los 375 nm. Esta técnica resultó fundamental para evaluar la dispersión de tamaños en solución, ya que permite obtener datos precisos sobre la distribución de partículas en el medio.

En la Figura 30 se observa la medición del tamaño hidrodinámico no solo proporciona información sobre el tamaño individual de las partículas, sino también sobre el grado de aglomeración y estabilidad del nanosistema en un entorno líquido. La distribución normal observada sugiere que el nanosistema presenta una

dispersión homogénea en solución, lo que es indicativo de una buena estabilidad coloidal, una característica importante para aplicaciones biomédicas, ya que facilita la administración del nanosistema en medios biológicos sin una rápida sedimentación o agregación.



**Figura 30.** Distribución del tamaño de partícula del nanosistema por DLS.

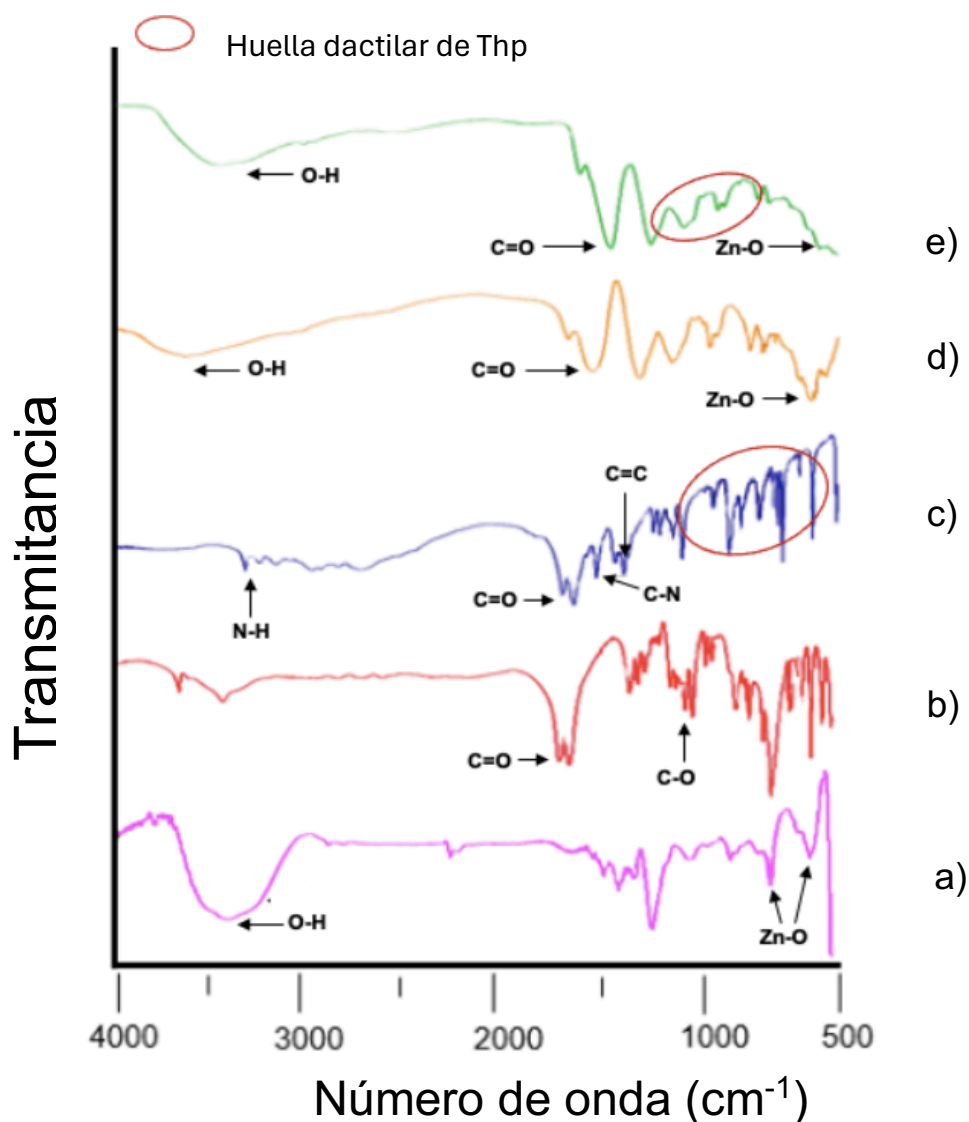
El análisis FT-IR del nanosistema permitió identificar las interacciones entre ZnO, ácido cítrico (AC), y teofilina (Thp), proporcionando evidencia de las modificaciones químicas que ocurren en cada etapa de la funcionalización, como se muestra en la Figura 31. Las curvas obtenidas corresponden a: a) ZnO, b) AC, c) Thp, d) el complejo ZnO-AC, y e) el nanosistema final (ZnO-AC-Thp).

En la curva a) se observa la banda característica del enlace Zn-O en el rango de 3,250 a 3,500  $\text{cm}^{-1}$ , confirmando la presencia de ZnO en el sistema. En la curva d), que representa el complejo ZnO-AC, se nota una disminución en las señales de los grupos -OH en comparación con la curva a) de ZnO puro. Esto se debe al recubrimiento de la superficie de ZnO con el ácido cítrico, el cual contribuye con sus grupos -COOH, evidentes en esta curva d) y que corresponden a las señales observadas en la curva b) del ácido cítrico puro.

Finalmente, la curva e), correspondiente al nanosistema ZnO-AC-Thp, se aprecia una disminución en la intensidad de los grupos -COOH junto con un aumento en la



presencia de grupos C=O. Este cambio sugiere un acoplamiento efectivo de la teofilina a la superficie del complejo ZnO-AC, en el que los grupos C=O son característicos de la estructura de la teofilina. Además, la curva e) muestra la "huella dactilar" distintiva de la teofilina, coincidiendo con las señales presentes en su curva individual (curva c), lo que respalda aún más la funcionalización exitosa del nanosistema con teofilina.

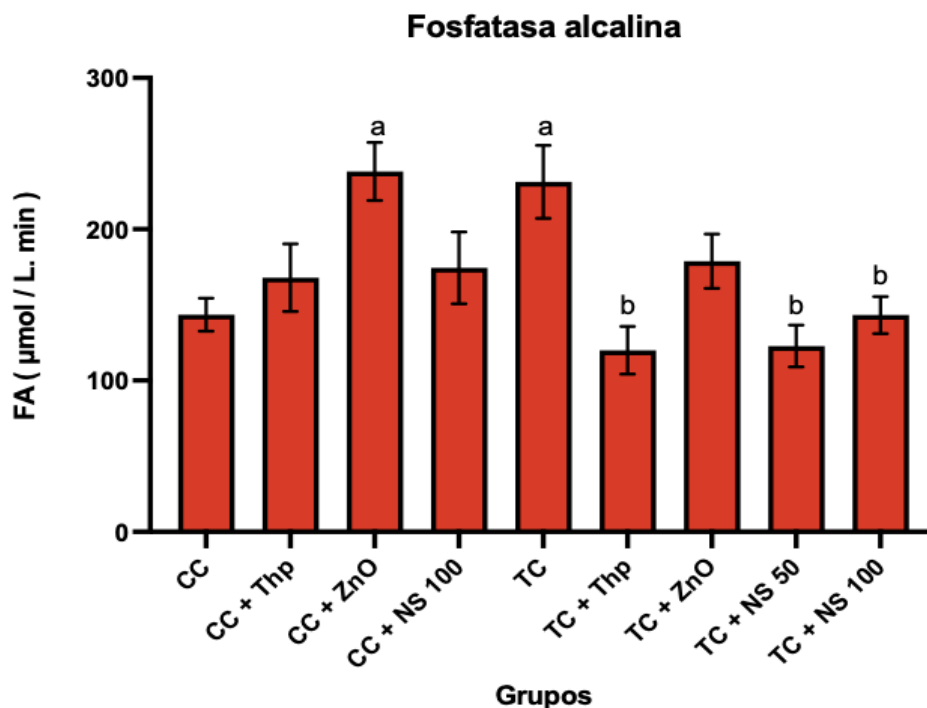


**Figura 31.** Espectro FT-IR de a) ZnO QD's, b) AC, c) Thp, d) ZnO-AC, e) Nanosistema

## **6.4 Biomarcadores de funcionalidad.**

### **6.4.1 Fosfatasa alcalina.**

La actividad enzimática de FA (Figura 32) muestra un incremento significativo en el grupo control dañado (TC) en comparación con el grupo control de controles (CC); mientras que los grupos control administrados (CC + Thp, y CC + NS 100) no modifican significativamente el nivel de FA, a excepción del grupo CC + ZnO, el cual mostró un incremento ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo CC. Sin embargo, en todos los grupos reto, es decir, dañados y tratados con los compuestos, se observa una prevención en el incremento de la actividad de FA en comparación con el grupo TC lo que sugiere un efecto anticoléstatco; a excepción del grupo TC + ZnO, que a pesar que muestra un valor de FA menor al inducido por TC, este no muestra una diferencia estadística significativa, sin embargo, sin un posible sinergismo en el daño, indicando que no lo empeora como sugería su grupo control CC + ZnO.

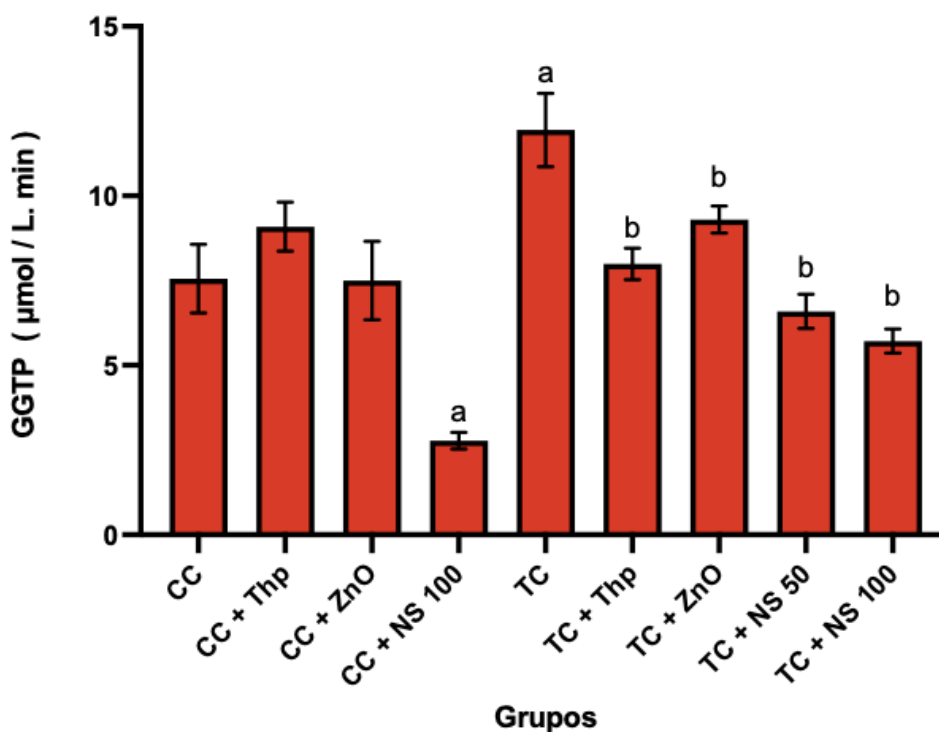


**Figura 32.** Actividad enzimática de FA, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM, con una  $n=6$  animales. (a) representa la diferencia con respecto al grupo CC y (b) la diferencia respecto al grupo TC, cada una con una  $P<0.05$ . ANOVA, método Tukey.

#### 6.4.2 Gamma glutamil-transpeptidasa.

En cuanto a la actividad enzimática de GGTP (Figura 33), se observa que el grupo dañado con TC tiene un incremento significativo en contraste con el grupo CC. El valor de los grupos controles (CC + Thp, CC + ZnO) no mostraron ninguna diferencia significativa al compararse con el grupo CC, a excepción del grupo CC + NS 100, el cual produjo un decremento ostensible en la actividad de GGTP. Los grupos reto (TC + Thp, TC + ZnO, TC + NS 50, y TC + NS 100) abolieron la elevación de dicha actividad causada por el daño. Estos datos sugieren una prevención del daño hepático colestático.

### Gamma glutamil-transpeptidasa

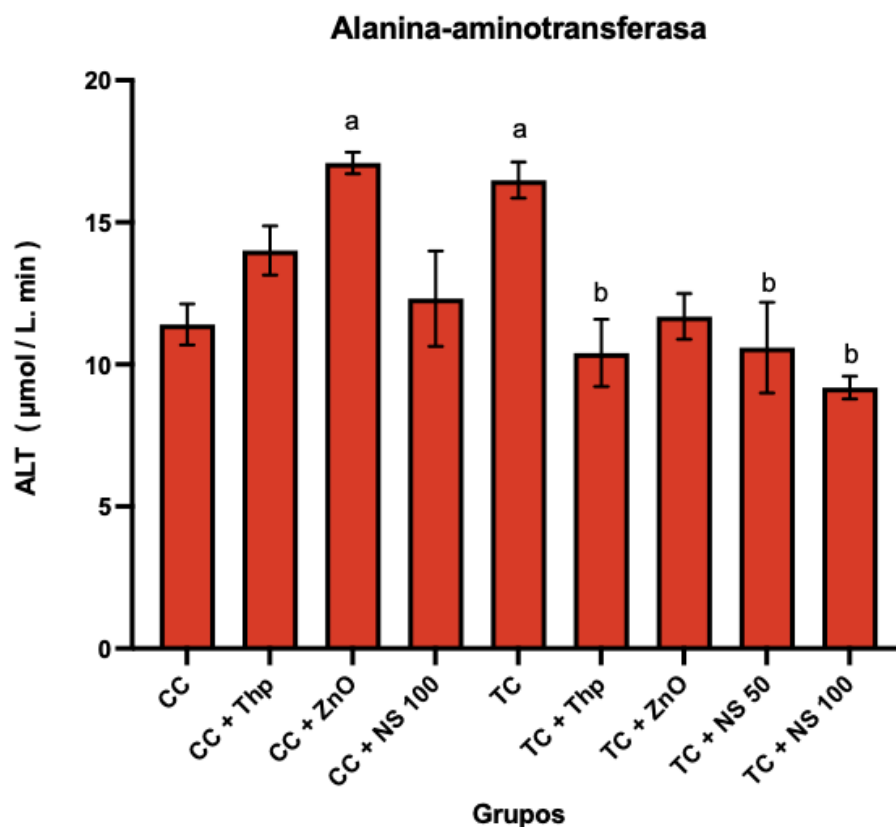


**Figura 33.** Actividad enzimática de GGTP, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM, con una  $n=6$  animales. (a) representa la diferencia con respecto al grupo CC y (b) la diferencia respecto al grupo TC, cada una con una  $P<0.05$ . ANOVA, método Tukey.

#### 6.4.3 Alanina-aminotransferasa.

La actividad enzimática de la ALT (Figura 34) evidencia un estado necrótico elevado en el grupo dañado TC vs. el grupo normal CC y, no hay una diferencia significativa para los grupos control administrados Thp y NS 100, a excepción del grupo CC + ZnO. Por otro lado, los grupos reto no mostraron una diferencia significativa contra el grupo CC, probando un efecto antinecrótico preventivo, siendo el grupo del nanosistema TC + NS 100 el más efectivo. Nuevamente, la promoción de la necrosis sugerida por los tratamientos en los grupos controles puede desestimarse al no

haber un efecto sinérgico durante el daño, por el contrario, se redujo la actividad de ALT ( $p < 0.05$ ).

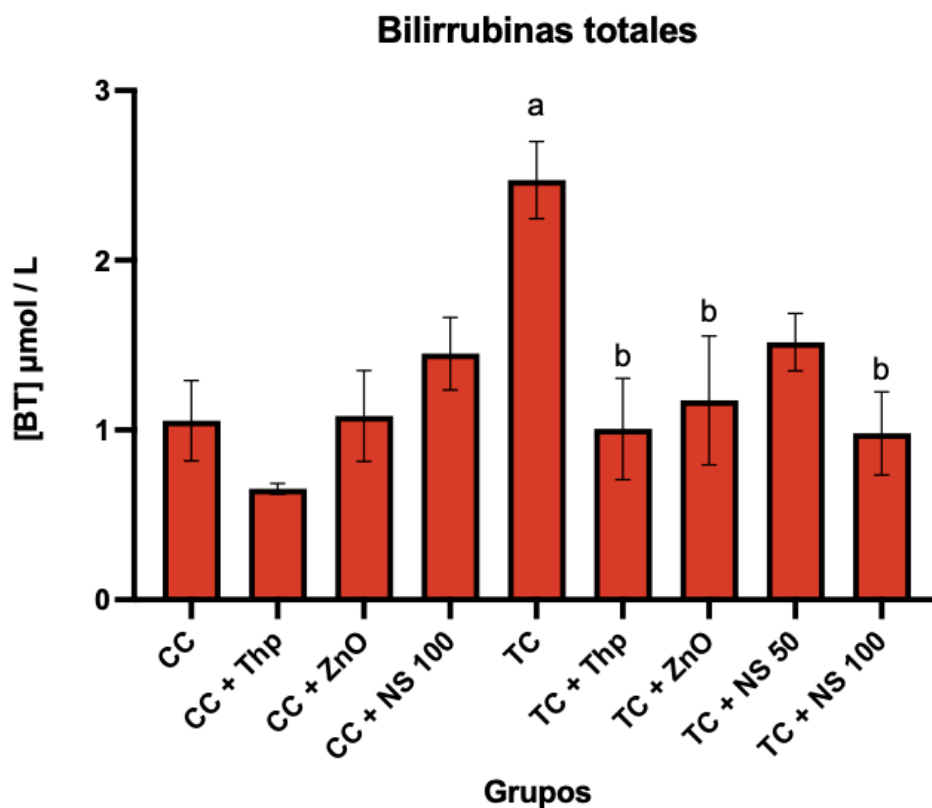


**Figura 34.** Actividad enzimática de ALT, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM, con una  $n=6$  animales. (a) representa la diferencia con respecto al grupo CC y (b) la diferencia respecto al grupo TC, cada una con una  $P < 0.05$ . ANOVA, método Tukey.

#### 6.4.4 Bilirrubinas totales.

La presencia de bilirrubinas totales en el plasma se incrementó en las ratas tras la administración de  $\text{CCl}_4$ , como se aprecia en el grupo TC, mientras que con la administración en los grupos controles no se modificó y, más aún, en los grupos reto (TC + Thp, TC + ZnO, TC + NS 100) se previno significativamente la elevación; este

resultado confirma el efecto antioleostático del nanosistema (Figura 35) que se observó en los marcadores FA y GGTP.

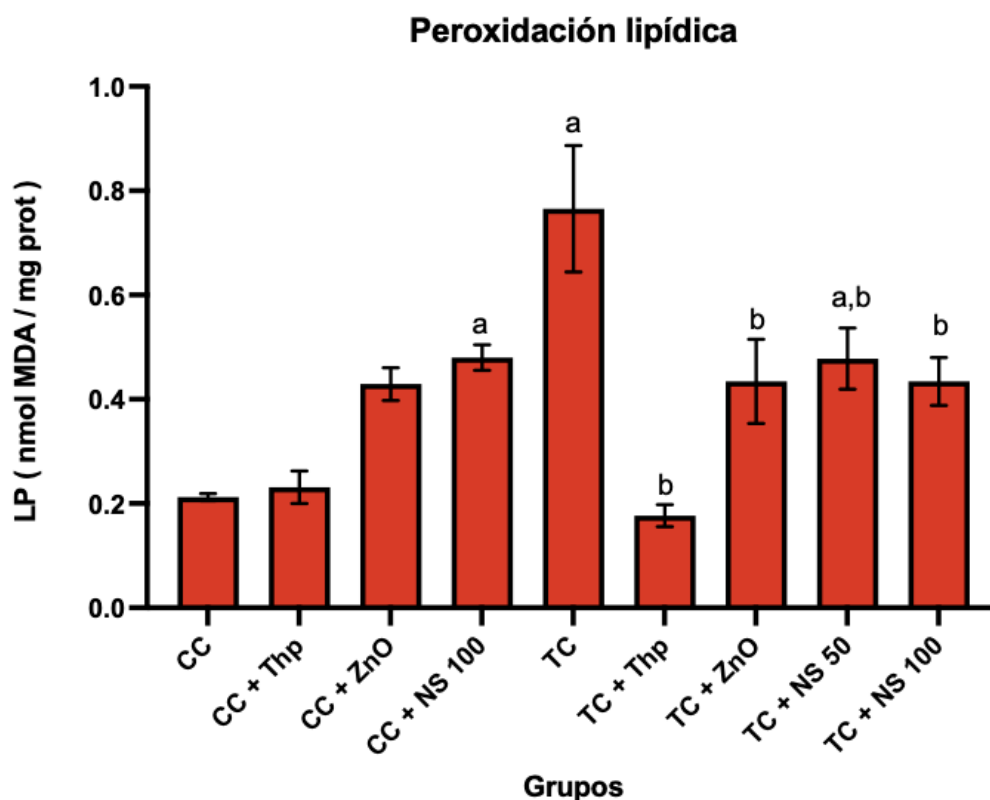


**Figura 35.** Concentración de bilirrubinas totales, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM, con una  $n=6$  animales. (a) representa la diferencia con respecto al grupo CC y (b) la diferencia respecto al grupo TC, cada una con una  $P<0.05$ . ANOVA, método Tukey.

#### 6.4.5 Peroxidación lipídica

El grado de LP es un indicador de estrés oxidativo (Figura 36). El grupo dañado TC, muestra una elevación marcada en comparación a los grupos control ( $p < 0.05$ ); asimismo, se aprecia un incremento significativo de la LP por la administración de NS100. Los grupos reto dañados con  $\text{CCl}_4$ , arrojan niveles parecidos a los grupos controles, pues tienen una disminución significativa del nivel de estrés oxidativo

respecto al grupo dañado TC. También, no hay una diferencia significativa entre los grupos (NS) tratados con el NS, por lo que se presenta un efecto antioxidante independiente de la dosis y no generan más daño oxidativo.

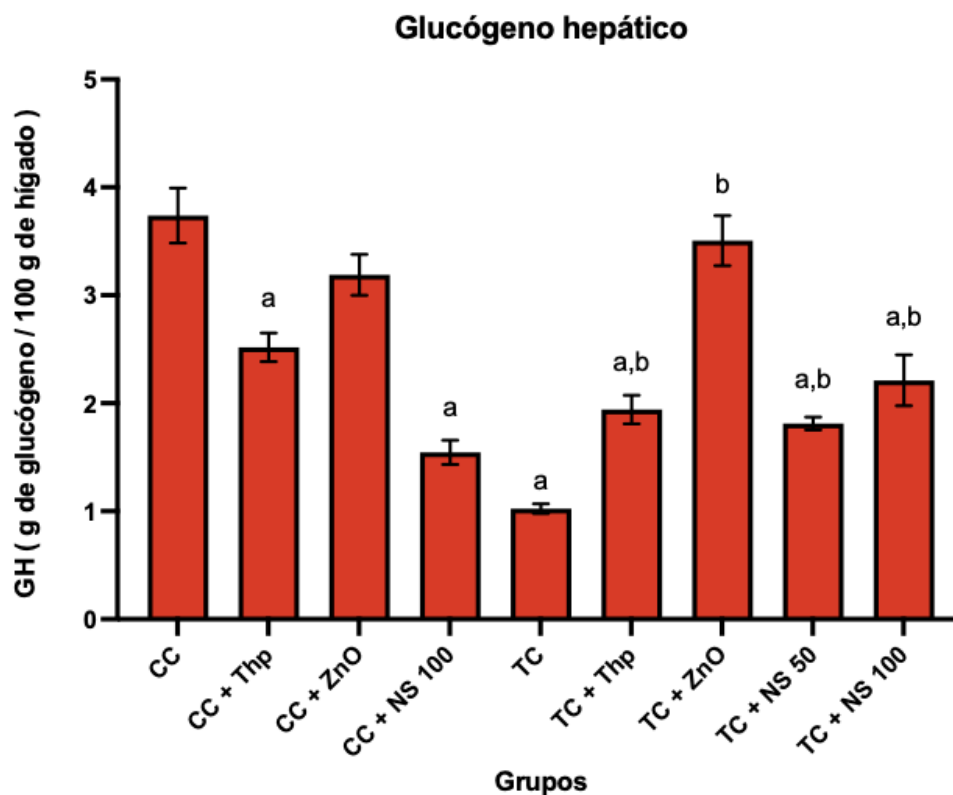


**Figura 36.** Grado de PL, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM, con una  $n=6$  animales. (a) representa la diferencia con respecto al grupo CC y (b) la diferencia respecto al grupo TC, cada una con una  $P<0.05$ . ANOVA, método Tukey.

#### 6.4.6 Glucógeno hepático

Existe un descenso marcado en la cantidad de GH, sin llegar a la depleción, en el grupo dañado TC (Figura 37) comparado contra el grupo sano CC; también, los grupos controles (CC + Thp, y CC + NS 100) indican que la administración de los fármacos redujo significativamente la reserva de GH. Sin embargo, los tratamientos

en los grupos reto previnieron parcialmente la pérdida de los almacenes de glucógeno respecto al grupo dañado TC, donde solo el grupo TC + ZnO mantienen la cantidad de GH del grupo CC; esto sugiere que el NS y sus componentes por separado protegen al hígado y lo mantienen todavía funcional.



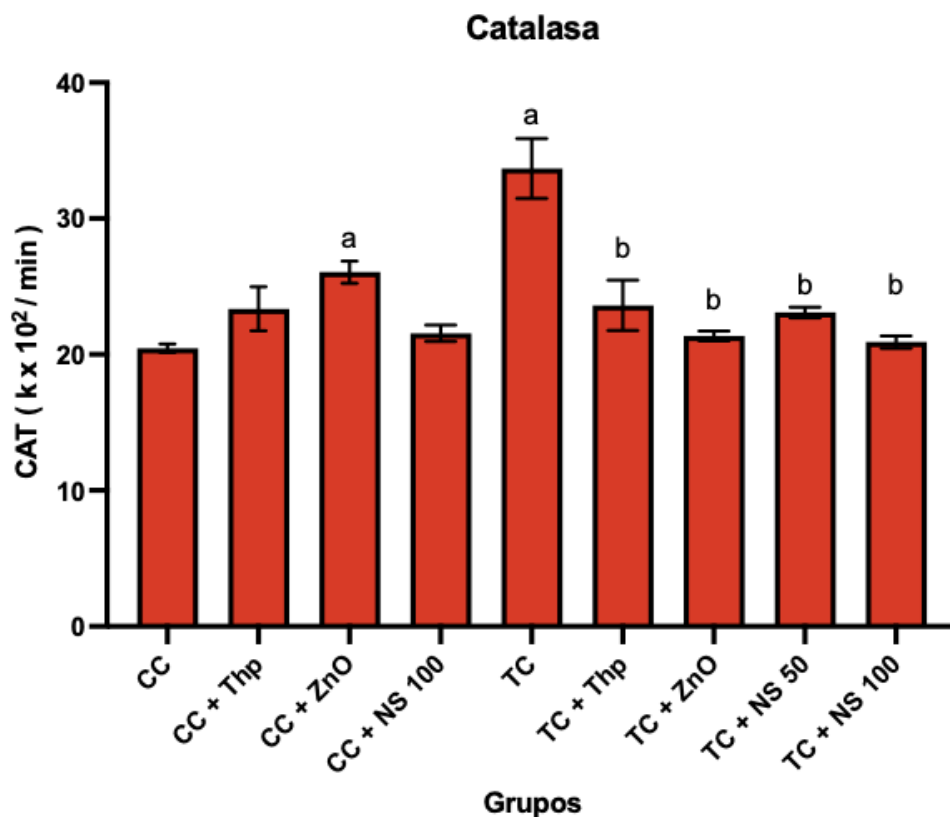
**Figura 37.** Cantidad de GH, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM, con una  $n=6$  animales. (a) representa la diferencia con respecto al grupo CC y (b) la diferencia respecto al grupo TC, cada una con una  $P<0.05$ . ANOVA, método Tukey.

#### 6.4.7 Catalasa

La actividad de CAT (Figura 38) se eleva de forma marcada ( $p < 0.05$ ) en el grupo dañado por TC, en comparación al grupo CC; sin embargo, en los grupos controles no se promueve una diferencia con respecto a ese grupo sano, con distinción del grupo CC + ZnO el cual sí presenta un incremento ligero pero significativo. Además,



los grupos reto tienen una actividad de CAT semejante a los grupos controles y, por lo tanto, presentan una baja significativa de estrés oxidativo respecto al grupo dañado; por ende, se confirma lo observado en LP, donde el efecto del nanosistema es independiente de la dosis, así como de manera similar sus componentes tienen un efecto antioxidante.



**Figura 38.** Grado de Estrés Oxidativo, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental  $\pm$  SEM, con una  $n=6$  animales. (a) representa la diferencia con respecto al grupo CC y (b) la diferencia respecto al grupo TC, cada una con una  $P<0.05$ . ANOVA, método Tukey.

# Capítulo 7

## Discusión

## 7.1 Formación de compuestos para nanosistema en estudio teórico computacional.

El estudio de simulación molecular realizado permitió obtener un análisis detallado de las interacciones energéticas entre los componentes del sistema (ZnO)<sub>12</sub>, AC y Thp. Inicialmente, las estructuras fueron optimizadas mediante un método semiempírico PM6. Posteriormente, se empleó DFT con LSDA y base 6-31+G(d,p) para analizar las propiedades electrónicas individuales de cada molécula, seguido de un cálculo de frecuencia para confirmar la estabilidad de los complejos. Finalmente, se aplicó B3LYP y DZVP2 para estudiar las interacciones entre (ZnO)<sub>12</sub>-AC y AC-Thp, lo cual brindó una mejor comprensión de las energías de acoplamiento y de los posibles sitios activos de interacción en el nanosistema. Estos cálculos permiten prever cómo interactúan las moléculas, lo cual es fundamental para entender la estabilidad y funcionalidad del nanosistema en aplicaciones biológicas. Los resultados sugieren que la interacción AC-Thp tiene una afinidad energética significativa, lo cual contribuye a la efectividad del recubrimiento y la funcionalización de los ZnO QD's, ofreciendo estabilidad al sistema y potenciales propiedades farmacológicas.

## 7.2 Análisis de síntesis y caracterización de ZnO QD's.

La síntesis ZnO QD's mediante el método de precipitación ha demostrado ser una estrategia efectiva para obtener nanomateriales con propiedades ópticas modificables. En este trabajo, se logró un control del tamaño de los QD's al variar parámetros de reacción como la temperatura, concentración, agitación y tiempo, lo cual se manifiesta en la emisión de fotoluminiscencia en el rango del visible, con bandas características en las regiones verde y azul. Estos resultados son consistentes con los reportados en la literatura, como Xi Chen *et al.* en 2021<sup>189</sup>, y se atribuyen al efecto de confinamiento cuántico.

### 7.2.1 Mecanismo de crecimiento y control de tamaño.

El mecanismo de crecimiento de los ZnO QDs por precipitación involucra la nucleación inicial de pequeños núcleos cristalinos, seguida por su crecimiento a través de la adición de iones  $Zn^{2+}$  y  $O^{2-}$ .<sup>76</sup> La modulación de los parámetros de reacción influye en la velocidad de nucleación y crecimiento, permitiendo así controlar el tamaño final de las nanopartículas. Por ejemplo, un aumento en la temperatura favorece la cinética de reacción y puede resultar en la formación de partículas más grandes. Por otro lado, una mayor concentración de reactivos puede promover la nucleación y generar un mayor número de partículas más pequeñas<sup>77,79</sup>.

Es recomendable someterlos en un baño ultrasónico para evitar aglomeraciones y promover a que sigan dispersos.

El uso de LiOH monohidratado como agente reductor en lugar de KOH o NaOH en este método se debe a que, cuando estas bases reaccionan con disolventes orgánicos como acetato, sulfato o carbonato de zinc, liberan sus respectivos iones ( $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ), mientras que los disolventes liberan iones de zinc. Esto crea una competencia entre los iones para formar los primeros *clusters* atómicos. Sin embargo, debido a su estructura electrónica más compleja, el ion de zinc tiende a formar los clústeres inicialmente, aunque el Li es más energético. Al ser el ion  $Li^+$  pequeño y estar presente en una concentración desfavorable, no logra formar una estructura estable y permanece disgregado. Sin embargo, debido a su alta reactividad, el  $Li^+$  sigue intentando interactuar con los clústeres de Zn, impidiendo que se formen adecuadamente como zinc metálico. En este punto, el ion  $OH^-$  se aproxima, generando clústeres de ZnOH. Al estar estos ya parcialmente oxidados por los grupos hidroxilo, la estructura electrónica del zinc sufre una degeneración; sin embargo, el zinc tiende a recuperar algunas de sus propiedades metálicas con el aumento de temperatura, lo que induce la liberación del átomo de H del grupo -OH, completando así la formación de ZnO. Si se continúa el proceso, eventualmente podría formarse  $ZnO_2$ .<sup>74,76</sup>

### **7.2.2 Espectroscopía UV-Vis y *band gap*.**

El espectro de absorción UV-Vis muestra un pico característico del ZnO en la región ultravioleta, específicamente en 320 nm, confirmando la formación de nanopartículas de óxido de zinc. El desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas del borde de absorción en comparación con el ZnO *bulk* es una evidencia clara del efecto de confinamiento cuántico. El valor de *band gap* obtenido de 3.87 eV es consistente con la disminución del tamaño de las partículas y el aumento de la energía de los estados cuánticos confinados<sup>74</sup>.

### **7.2.3 Microscopía electrónica de barrido.**

La microscopía SEM ha revelado una morfología de los ZnO QDs caracterizada por la formación de agregados o clústeres. Si bien los tamaños individuales de los QDs se encuentran dentro del rango nanométrico, la presencia de estos agregados puede influir en las propiedades ópticas y electrónicas de los materiales. Para obtener información más detallada sobre la morfología y tamaño de las partículas individuales, sería recomendable realizar análisis de TEM<sup>190</sup>.

### **7.2.4 Cálculo de área superficial y composición atómica.**

La caracterización de ZnO QD's mediante el cálculo del área superficial, el número de moles, el diámetro y la cantidad de átomos por nanopartícula resulta fundamental para comprender y optimizar sus propiedades, especialmente en aplicaciones donde el efecto de confinamiento cuántico desempeña un papel importante.

En primer lugar, el diámetro de los ZnO QD's calculado en este estudio fue de aproximadamente 1.05 nm, lo cual se relaciona directamente con el efecto de confinamiento cuántico. Dado que el tamaño de los QD's es menor a la longitud de onda de De Broglie los electrones en el material, específicamente es menor que el

radio de exciton de Bohr<sup>40</sup>, que para el ZnO es de 2.34 nm, lo que provoca una modificación de sus propiedades electrónicas y ópticas. Esta reducción de tamaño incrementa la energía de el *band gap*, como se evidenció en el análisis UV-Vis, lo cual sugiere un aumento en el potencial fotocatalítico y óptico de estos QD's para su aplicación en biosensores. Este confinamiento fue evidenciado en los resultados de emisión espontánea de luz, donde se observó una emisión en color verde y azul cuando la solución de ZnO QD's es sometida a una excitación por luz UV.

El área superficial de los ZnO QD's es también un parámetro crítico. Un área superficial elevada implica una mayor exposición de la nanopartícula a su entorno, lo que incrementa su reactividad y facilita su interacción con otros compuestos. Esto es particularmente relevante en aplicaciones donde el ZnO actúa como soporte catalítico o como agente activo en reacciones de superficie, como en la degradación de contaminantes a través de fotocatalisis<sup>32</sup>. Además, una mayor área superficial es beneficiosa para el acoplamiento de biomoléculas o fármacos en la superficie de los QD's, incrementando su potencial en aplicaciones biomédicas, tales como sistemas de liberación controlada de medicamentos o terapias fotodinámicas.

Por otro lado, el cálculo del número de moles por QD de ZnO, en este caso de aproximadamente  $4.15 \times 10^{-23}$  moles, permite una cuantificación precisa de la cantidad de partículas en una muestra dada, lo cual es útil para ajustar dosis y concentraciones en aplicaciones biológicas o farmacéuticas. Este valor es esencial para establecer dosis adecuadas en futuros usos médicos, asegurando que se alcance la concentración óptima para lograr el efecto deseado sin exceder niveles que puedan causar toxicidad.

Finalmente, conocer el número de átomos por cada QD de ZnO (aproximadamente 25 átomos) es particularmente útil en estudios de modelado computacional. Esta información permite desarrollar modelos más realistas a nivel atómico, facilitando el estudio de la interacción de los QD's con otros sistemas moleculares o con agentes químicos y biológicos específicos. Al contar con una estimación precisa del número de átomos en un solo QD, es posible realizar simulaciones detalladas para analizar la interacción de estas nanopartículas con ligandos específicos o con membranas celulares, lo cual es esencial para el diseño de sistemas de administración de

fármacos y para comprender la biodistribución y efectos de los nanomateriales en sistemas biológicos<sup>34</sup>.

La estimación de 25 átomos por QD respalda la elección de la molécula  $(\text{ZnO})_{12}$ , ya que esta molécula cuenta con 24 átomos y es muy cercana a los resultados experimentales. Fue seleccionada debido a que es uno de los números mágicos mencionados por Baolin Wang, *et al*; (2007), donde menciona que el  $(\text{ZnO})_{12}$  presenta energías de enlace relativamente más altas y mayores brechas HOMO-LUMO que otras moléculas  $(\text{ZnO})_x$ <sup>177</sup>. Las altas energías de enlace se traducen en una mayor estabilidad estructural ya que los átomos en el *cluster* están unidos de manera más fuerte. Esto hace que las estructuras de jaula sean más estables y menos susceptibles a la fragmentación o cambios estructurales bajo condiciones externas. Además, la brecha amplia HOMO-LUMO (gap entre el orbital molecular ocupado más alto y el orbital molecular desocupado más bajo) es indicativa de una menor tendencia a la reactividad química, ya que se requiere más energía para promover electrones desde el HOMO al LUMO, esto nos indica un efecto de confinamiento cuántico.

### 7.2.5 Aplicaciones potenciales.

Los ZnO QD's sintetizados en este trabajo presentan un gran potencial para diversas aplicaciones, incluyendo:

- **Optoelectrónica:** Debido a su alta eficiencia de emisión de luz y modificabilidad del espectro de emisión, los ZnO QD's pueden ser utilizados en la fabricación de diodos emisores de luz (LEDs), láseres y células solares<sup>191</sup>.
- **Sensores:** La alta superficie específica y la sensibilidad a cambios en el entorno químico hacen de los ZnO QD's excelentes candidatos para el desarrollo de sensores químicos y biosensores. Pueden detectar biomoléculas, cambios de pH o gases, lo que los hace útiles en monitoreos ambientales y de salud<sup>192</sup>.

- **Catálisis:** Los ZnO QD's pueden actuar como catalizadores en diversas reacciones químicas, aprovechando su alta área superficial y su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno<sup>37</sup>.
- **Antibacteriano y Antimicrobiano:** Los ZnO QD's tienen propiedades antimicrobianas y antibacterianas debido a su capacidad para producir ROS en condiciones específicas, lo cual es útil en recubrimientos antibacterianos en dispositivos médicos o en tratamientos para reducir infecciones<sup>34</sup>.

### **7.3 Análisis de síntesis y caracterización de nanosistema.**

La caracterización del nanosistema funcionalizado ZnO-AC-Thp ha revelado una estructura y composición que lo posicionan como un candidato prometedor para aplicaciones biomédicas. Los resultados obtenidos a través de las técnicas de SEM, EDS, DLS y FT-IR han proporcionado una caracterización completa del nanosistema.

#### **7.3.1 Morfología y Estructura.**

Las micrografías SEM revelan una morfología aglomerada y porosa característica de materiales funcionalizados. Esta estructura no solo aumenta la capacidad de carga y liberación de fármacos, sino que también favorece la interacción con el medio biológico. La distribución homogénea de las partículas y la presencia de una superficie rugosa y activa sugieren una funcionalización exitosa y una buena estabilidad del nanosistema<sup>193</sup>.

#### **7.3.2 Composición Elemental.**

El análisis EDS confirma la presencia de los elementos esperados: zinc y oxígeno del núcleo de ZnO, así como carbono y nitrógeno de los agentes funcionalizantes.



La distribución homogénea de estos elementos descarta la presencia de impurezas y garantiza la pureza del nanosistema, lo cual es fundamental para su biocompatibilidad<sup>194</sup>.

### **7.3.3 Tamaño y Distribución de Tamaño.**

El análisis DLS indica un tamaño hidrodinámico promedio de aproximadamente 375 nm y una distribución de tamaño relativamente estrecha. Este tamaño es adecuado para aplicaciones de liberación controlada de fármacos y permite una buena dispersión en medios acuosos<sup>34,74</sup>.

### **7.3.4 Interacciones Químicas.**

La espectroscopía FT-IR confirma las interacciones químicas entre los componentes del nanosistema. La disminución en la intensidad de los grupos -OH presentes en la superficie del ZnO y el aumento de las señales de los grupos -COOH del ácido cítrico indican un correcto recubrimiento del núcleo de ZnO. Asimismo, la presencia de las bandas características de la teofilina y la disminución de los grupos -COOH en el espectro del nanosistema confirma su integración en la estructura.

Los resultados obtenidos sugieren que el nanosistema ZnO-AC-Thp posee las siguientes características deseables para aplicaciones biomédicas:

- Biocompatibilidad: La pureza del nanosistema y la ausencia de elementos tóxicos sugieren una buena biocompatibilidad<sup>32</sup>.
- Estabilidad coloidal: La distribución de tamaño estrecha y la morfología aglomerada favorecen la estabilidad en medios acuosos<sup>34</sup>.
- Capacidad de carga: La estructura porosa y la superficie activa permiten una alta capacidad de carga de fármacos<sup>193</sup>.
- Liberación controlada: La funcionalización con ácido cítrico y teofilina podría modular la liberación del fármaco en respuesta a estímulos específicos<sup>34</sup>.

## **7.4 Evaluación de efecto hepatoprotector en daño inducido por TC en ratas.**

El  $\text{CCl}_4$  es compuesto tóxico ampliamente utilizada en modelos experimentales para simular y estudiar el daño hepático debido a su capacidad para inducir lesiones en el hígado de forma controlada. La administración de  $\text{CCl}_4$  en estos modelos reproduce cambios patológicos similares a los causados por diversas hepatotoxinas en humanos, lo cual es posible gracias a su mecanismo de acción, pues el TC forma radicales libres que provocan estrés oxidativo<sup>195</sup>. El TC es metabolizado en el citocromo P450 (CYP450), específicamente en las isoformas CYP2E1, CYP2B1, CYP2B2, aunque también podría estar implicada la isoforma CYP3A; el proceso de estrés oxidativo comienza cuando el TC sufre una deshalogenación que da lugar a la formación del radical triclorometilo ( $\text{CCl}_3^{\cdot}$ ), y una cadena de reacciones de peroxidación con aminoácidos, lípidos, o nucleótidos<sup>196-198</sup>. Aunque el  $\text{CCl}_4$  no es una causa común de intoxicación en escenarios clínicos, su mecanismo de acción y los tipos de daño que ocasiona presentan múltiples similitudes con los patrones de lesión hepática observados en humanos. Por estas razones, su empleo en modelos experimentales ha sido ampliamente validado y es aceptado como un método confiable para el estudio de enfermedades hepáticas y los mecanismos de hepatotoxicidad<sup>199</sup>.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian el potencial hepatoprotector del nanosistema evaluado en un modelo de daño hepático inducido por  $\text{CCl}_4$ . Los análisis bioquímicos realizados permitieron identificar efectos diferenciados sobre diversos marcadores enzimáticos y bioquímicos, lo que sugiere una acción multifactorial del nanosistema.

### **7.4.1 Efectos Anticolestáticos.**

La colestasis se define como un trastorno de excreción biliar y obstrucción de la bilis impidiendo un flujo funcional de la misma en los conductos biliares intra o extrahepáticos, junto con los componentes que pasan a la sangre<sup>144</sup>.

#### **7.4.1.1 Fosfatasa alcalina (FA).**

El aumento significativo en los niveles de FA en el grupo dañado TC confirma el daño colestático inducido por  $\text{CCl}_4$ . Sin embargo, el incremento de FA en el grupo CC + ZnO, que alcanza niveles similares al grupo TC, no indica un daño en sí mismo. En cambio, sugiere una activación del mecanismo hepatoprotector, reflejada en el aumento de la actividad de FA. Esto se debe a que el Zn es un mineral traza divalente, al igual que el Mg, el cual actúa como cofactor en la reacción de determinación de FA, ya que esta es una metaloenzima que contiene Zn y se sabe que el Zn incrementa la actividad enzimática de FA, principalmente en hueso, por lo que la elevación de FA con la administración de ZnO no indicó un efecto procolestático *per se*<sup>127,179</sup>. Por otro lado, los grupos dañados tratados con el nanosistema mostraron una reducción significativa en la actividad de FA en comparación con el grupo TC, lo que sugiere un efecto anticolestático, al prevenir la obstrucción biliar<sup>200</sup>.

#### **7.4.1.2 Gamma-glutamil transferasa (GGTP).**

Los resultados obtenidos para GGTP refuerzan los efectos anticolestáticos del nanosistema. La disminución en los niveles de GGTP en los grupos tratados con el nanosistema en comparación con el grupo TC indica una protección frente al daño en los conductos biliares. Esto podría explicarse por el hecho de que el nanosistema está basado en ZnO, y se ha reportado que el zinc estimula la producción de metalotioneínas, las cuales han demostrado tener un efecto antioxidante incluso superior al del glutatión al reducir los radicales  $\text{OH}^-$ . Debido a esta mayor actividad antioxidante, el hígado podría presentar una menor necesidad de producir GGTP para metabolizar el glutatión, lo cual se refleja en una reducción de los niveles de esta enzima<sup>201</sup>.

### **7.4.1.3 Bilirrubina total.**

El aumento de bilirrubina en el grupo dañado TC es un marcador clásico de colestasis. La reducción de los niveles de bilirrubina en los grupos tratados, especialmente en el grupo TC + NS 100, confirma el efecto hepatoprotector del nanosistema, al prevenir la acumulación de bilirrubina. Esto puede explicarse por estudios que reportan que las metilxantinas, como la teofilina presente en el nanosistema, favorecen la eliminación de bilirrubina conjugada al mejorar el proceso de conjugación de bilirrubina indirecta a bilirrubina directa, permitiendo que el hígado la excrete de manera más eficiente. Este efecto se observa también en el grupo CC + Thp, que muestra una reducción aparente en los niveles de bilirrubina comparado con el grupo CC, sugiriendo un beneficio adicional de la teofilina en el proceso de conjugación y eliminación de bilirrubina<sup>202</sup>. Lo cual podemos constatar con el grupo CC + Thp el cual muestra una aparente reducción comparada con el grupo CC. Asimismo, el efecto protector del ZnO en nanopartícula en estos marcadores de colestasis concuerda con lo reportado en un modelo de hepatocarcinoma (HCC)<sup>33</sup>.

### **7.4.2 Efectos Antioxidantes.**

#### **7.4.2.1 Peroxidación lipídica (LP).**

La peroxidación lipídica, se define como la descomposición mitocondrial de los lípidos, constituyentes de la membrana celular de los hepatocitos y es el resultado del efecto de los radicales libres liberados mediante los modelos de daño con TC lo que permite valorar el grado de estrés oxidativo<sup>203,204</sup>. En el estudio realizado se detectó un aumento significativo de LP en el grupo dañado, lo indica un estrés oxidativo severo. Los grupos dañados tratados con el nanosistema mostraron una disminución significativa en los niveles de LP, lo que evidencia una potente actividad antioxidante del nanosistema. Este efecto puede atribuirse al Zn presente en el nanosistema, que tiene la capacidad de activar el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2).

La activación de Nrf2 potencia el efecto antioxidante en el organismo al regular la producción de antioxidantes endógenos, como el glutatión, el superóxido dismutasa (SOD) y la CAT<sup>205</sup>.

#### **7.4.2.2 Catalasa (CAT).**

Es una enzima que interviene en el balance oxidante/antioxidante, esta cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno; por lo que se encuentra ligada a la peroxidación lipídica, siendo utilizada también como un marcador de estrés oxidativo<sup>205</sup>. Ante el daño hepático agudo la actividad de CAT disminuye por su síntesis a la baja del hígado enfermo y, por ende, hay un incremento de ROS y radicales libres, lo que lleva a la acumulación de peróxido de hidrogeno. La presencia de antioxidantes protege al hígado de las ROS<sup>207</sup>. El aumento de CAT en el grupo dañado refleja un esfuerzo del hígado por contrarrestar el estrés oxidativo generado por el daño inducido. En este estudio, se detectó una disminución de la actividad de CAT en los grupos tratados con el nanosistema, lo que sugiere que este contribuye de manera efectiva a reducir el estrés oxidativo, posiblemente al potenciar las defensas antioxidantes endógenas. Este efecto puede explicarse por la presencia de Zn en el nanosistema, que retarda la oxidación al inducir la producción de metalotioneínas. Estas proteínas, junto con un aumento en la actividad de antioxidantes como el glutatión y la propia CAT, fortalecen el sistema de defensa antioxidante. Esto también se observa en el grupo CC + ZnO, donde se aprecia un aumento significativo de CAT, promoviendo así un efecto antioxidante más robusto<sup>200</sup>. Nuevamente, estos resultados concuerdan con los reportes donde el ZnO en nanopartícula tienen efectos antioxidantes sobre CAT y LP y similares a los efectos antioxidantes que tiene la cafeína<sup>33,173</sup>.

### 7.4.3 Efectos Antinecróticos

#### 7.4.3.1 Alanina aminotransferasa (ALT)

Es una enzima encontrada en el citosol de los hepatocitos y un aumento de esta enzima en el plasma sanguíneo refleja una mayor permeabilidad de la membrana plasmática, asociada con muerte celular, además de permitir la salida de esta enzima hacia la sangre<sup>151</sup>. Este estudio muestra que el aumento de ALT en el grupo dañado es indicativo de daño celular y necrosis hepática, lo cual es consistente con los efectos tóxicos del CCl<sub>4</sub>. La disminución de los niveles de ALT en los grupos tratados sugiere un efecto protector del nanosistema contra la necrosis hepática inducida. Este efecto puede atribuirse en gran medida a las propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y por ende antiinflamatorias del zinc, que contribuyen a la preservación del tejido hepático. Cabe destacar que el grupo CC + ZnO también presentó niveles elevados de ALT similares al grupo dañado TC, lo cual podría deberse a una activación en la actividad enzimática del hígado ante la presencia de ZnO. Esto se explicaría por el hecho de que el zinc, al ser un metal divalente, puede actuar como cofactor en varias reacciones enzimáticas, lo que podría incrementar la actividad de ciertas enzimas, incluyendo ALT, sin que esto necesariamente implique un daño hepático adicional<sup>200</sup>. Por lo tanto, la elevación de ALT en el grupo CC + ZnO podría reflejar una respuesta adaptativa del hígado a la presencia del metal, activando vías metabólicas que requieren de este cofactor sin llegar a niveles que impliquen daño significativo<sup>208</sup>; además, el efecto antinecrótico es similar a los reportes donde el ZnO en nanopartícula tiene efectos hepatoprotectores así como los que posee la cafeína<sup>33,173</sup>.

## **7.4.4 Efectos sobre el Metabolismo Energético.**

### **7.4.4.1 Glucógeno hepático (GH).**

Es la forma principal de almacenamiento de los carbohidratos, este se presenta sobre todo en hígado y el músculo. El glucógeno hepático sirve, en gran parte, para el almacenamiento y exportación de unidades de hexosa para conservar la glucosa sanguínea y una disminución en este se interpreta como la existencia de un padecimiento<sup>209</sup>. El estudio evidenció una disminución de GH en el grupo dañado, lo que indica una alteración en el metabolismo energético. Sin embargo, el grupo CC + Thp también presentó una disminución significativa en comparación con el grupo CC. Esta diferencia puede explicarse por el hecho de que las metilxantinas, como la teofilina, tienen la capacidad de inhibir las fosfodiesterasas, lo que favorece la formación y acumulación de AMP cíclico (AMPc), debido a que la adenilato ciclasa continúa produciéndolo. El AMPc, a su vez, activa las quinasas de proteínas dependientes de AMPc, las cuales fosforilan proteínas involucradas en la contracción muscular y en la regulación de las reservas de glucógeno hepático reduciendo su síntesis<sup>175</sup>.

De igual manera, la acumulación de AMPc inhibe la vía de señalización NF- $\kappa$ B, que es proinflamatoria, ya que reduce la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Esta inhibición disminuye el estrés oxidativo, así como los procesos inflamatorios y necróticos en el hígado<sup>175</sup>.

Los grupos tratados con el nanosistema mostraron una menor disminución en los niveles de GH, lo que sugiere que el nanosistema podría contribuir a la preservación de las reservas energéticas del hígado. Esto se debe al efecto sinérgico de las propiedades de la teofilina y el ZnO, ya que este último, al interactuar y generar Zn<sup>2+</sup>, presenta efectos inmunomoduladores y antioxidantes. Además, el ZnO tiene la capacidad de inhibir las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, lo que provoca una acumulación de GMP cíclico (GMPc) y activa un mecanismo muy similar al de

la teofilina. Esto también resulta en la reducción de la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  a través de la vía de señalización NF- $\kappa$ B<sup>210</sup>.

#### **7.4.5 Mecanismos de acción propuestos.**

Los resultados obtenidos sugieren que el nanosistema ejerce su acción hepatoprotectora a través de múltiples mecanismos, incluyendo:

- **Antioxidación:** El nanosistema puede actuar como un captador de radicales libres, previniendo el daño oxidativo a las membranas celulares y a las biomoléculas.
- **Anti-inflamatoria:** El nanosistema podría modular la respuesta inflamatoria inducida por CCl<sub>4</sub>, reduciendo la producción de citocinas proinflamatorias y mediadores de daño tisular.
- **Modulación de vías de señalización:** El nanosistema podría interactuar con vías de señalización celular involucradas en la respuesta al daño hepático, promoviendo la supervivencia celular y la reparación tisular.



# **Capítulo 8**

## **Conclusiones**

- Los resultados de la simulación molecular demostraron que el acoplamiento del nanosistema de ZnO QD's con Thp es termodinámicamente estable. Asimismo, sus propiedades electrónicas sugieren un equilibrio entre estabilidad y reactividad, lo que permite su potencial uso en aplicaciones relacionadas con procesos redox. La inclusión de Thp no solo incrementa la polaridad global del sistema, haciéndolo más adecuado para interacciones en medios polares, sino que también mejora su capacidad para aceptar electrones, lo que podría ser crucial en aplicaciones catalíticas, electrónicas o biológicas. Además, la elevada estabilidad termodinámica y la alta espontaneidad de formación del complejo refuerzan su viabilidad como plataforma funcional en entornos químicos y biomiméticos.
- En este trabajo se ha demostrado la síntesis exitosa de ZnO QDs mediante el método de precipitación y se ha estudiado su caracterización estructural y óptica. Los resultados obtenidos muestran que el tamaño y las propiedades ópticas de los QDs pueden ser controlados de manera precisa mediante la modulación de los parámetros de síntesis. Las aplicaciones potenciales de estos nanomateriales son amplias y prometedoras, lo que abre nuevas perspectivas para el desarrollo de tecnologías avanzadas.
- Los resultados obtenidos de la funcionalización de ZnO QD's con teofilina, confirman que la utilizando ácido cítrico como agente acoplante es eficiente para establecer una unión estable. La caracterización del nanosistema resultante demostró la formación de un sistema homogéneo y estable, lo que valida la hipótesis inicial. Estos hallazgos resaltan la importancia del ácido cítrico como herramienta para la funcionalización de nanomateriales y abren nuevas posibilidades para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos.
- La caracterización del nanosistema ZnO-AC-Thp ha revelado un sistema con propiedades prometedoras para aplicaciones biomédicas. Los resultados

obtenidos respaldan la hipótesis de que este nanosistema podría ser una herramienta eficaz para la liberación controlada de fármacos y el tratamiento de diversas enfermedades hepáticas. Sin embargo, se requieren aún más estudios adicionales *in vivo* para confirmar su eficacia y seguridad.

- Los resultados de este estudio demuestran el potencial del nanosistema como una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>. La acción multifactorial del nanosistema, combinando efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y antinecróticos, lo convierte en un candidato atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades hepáticas.

# **Capítulo 9**

## **Perspectivas y trabajos futuros**

Los resultados obtenidos en este estudio abren prometedoras perspectivas para el desarrollo de nuevas terapias basadas en nanotecnología. Sin embargo, es necesario profundizar en ciertos aspectos para trasladar este sistema a aplicaciones clínicas:

- **Mecanismos de liberación:** Es fundamental elucidar los mecanismos precisos de liberación de la teofilina desde el nanosistema (por ejemplo, degradación, difusión).
- **Interacciones biológicas:** Las interacciones del nanosistema con proteínas plasmáticas y componentes celulares pueden influir en su eficacia y seguridad.
- **Imagenología:** Utilizar técnicas de imagenología para visualizar la distribución del nanosistema en tejidos y órganos.
- **Toxicidad y seguridad:** Se deben realizar estudios de toxicidad a largo plazo en modelos animales para evaluar la seguridad del nanosistema y establecer una ventana terapéutica.
- **Escalado de la síntesis:** Para aplicaciones clínicas, es necesario desarrollar procesos de síntesis escalables y reproducibles que garanticen la calidad y la homogeneidad de las nanopartículas.
- **Estudios clínicos:** Finalmente, el desarrollo de ensayos clínicos permitirá evaluar la eficacia y seguridad del nanosistema en pacientes.

# **Bibliografía**

1. Poole CP, Owens FJ. *Introduction to Nanotechnology*. Hoboken (NJ): Wiley-Interscience; 2003.
2. Vasconcelos Pacheco A. *Diseño y síntesis de nanosistemas derivatizados con péptidos y su aplicación en biomedicina*. 2015.
3. Lozano Guzmán A, Rojas Molina A, García Hernández F, Rivera Mejía J, Vela Martínez L, Espinosa Peña M. *La nanotecnología en México. Situación actual*. Santiago de Querétaro (Qro.): Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro; Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería; 2008. □  
Cioffi N, Rai M. *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects*. Heidelberg (Alemania): Springer; 2012.
4. Cioffi N, Rai M. *Nano-Antimicrobials: Progress and prospects*. Heidelberg, Germany: Springer; 2012.
5. Drexler E. *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation*. New York: John Wiley & Sons; 1992.
6. Pranenda A. The generations of nanotechnology. Medium; 2018 Oct 30 [cited 2023 Jan 20].
7. Roco MC. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J Nanopart Res*. 2011;13:427-45. DOI: 10.1007/s11051-010-0192-z.
8. Wang L, Muhammed M. Synthesis of zinc oxide nanoparticles with controlled morphology. *J Mater Chem*. 1999;9:2871-8.
9. Latour RA. Molecular simulation methods to investigate protein adsorption behavior at the atomic level. *Comprehensive Biomaterials II*. 2017;3:268-94.
10. Young D. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. New York: John Wiley & Sons; 2001. ISBN: 0-471-33368-9.
11. Cantudo Agudo R. *Introducción a las técnicas de simulación molecular y su potencial aplicación en el ámbito de la ingeniería química* [tesis]. Cantabria (España): Universidad de Cantabria, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación; 2018.
12. Martín-Santamarina S. *Computational tools for chemical biology*. London: Royal Society of Chemistry; 2018.
13. Levine IN. *Quantum Chemistry*. Boston: Pearson; 2014.

14. Dorsett H, White A. Overview of molecular modelling and *ab initio* molecular orbital methods suitable for use with energetic materials. Salisbury (Australia): Defence Science and Technology Organization; 2000.
15. Takeuchi N, Romero AH. *Simulaciones computacionales de materiales y nanoestructuras*. Ediciones Científicas Universitarias; 2019.
16. Perdew JP, Schmidt K. Jacob's ladder of density functional approximations for the exchange-correlation energy. *AIP Conf Proc*. 2001;577:1-20.
17. Vela A. Logros y perspectivas de la Química Teórica. *Educación Química*. 2016;27(2):278-85.
18. Von Barth U, Hedin L. A local exchange-correlation potential for the spin-polarized case: I. *J Phys C: Solid State Phys*. 1972;5:1629-42.
19. Moroni S, Ceperley DM, Senatore G. Accurate pair-correlation function for the electron gas. *Phys Rev Lett*. 1992;69:1837-40.
20. Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple. *Phys Rev Lett*. 1996;77:3865-8.
21. Langreth DC, Mehl MJ. Beyond the local-density approximation in calculations of ground-state electronic properties. *Phys Rev B*. 1983;28:1809-21.
22. Sun J, Haunschild R, Xiao B, Bulik IW, Scuseria GE, Perdew JP. Semilocal density functional obeying a strongly tightened bound for exchange. *J Chem Phys*. 2013;138:044113.
23. Perdew JP, Schmidt K. Density functional theory and its application to materials. In: Van Doren VE, Van Alsenoy K, Geerlings P, editors. *AIP Conference Proceedings*. Melville (NY): American Institute of Physics; 2001.
24. Perdew JP, Ernzerhof M, Burke K. Rationale for mixing exact exchange with density functional approximations. *J Chem Phys*. 1996;105:9982-5.
25. Harl J, Schimka L, Kresse G. Cohesive energies of transition-metal oxides calculated by the random phase approximation. *Phys Rev B*. 2010;81:115126.
26. Langreth DC, Perdew JP. Exchange-correlation energy of a metallic surface: Wave-vector analysis. *Solid State Commun*. 1979;31:567-70; and Erratum: 1980;21:5469-71.
27. Villa Ortega V. *Pseudopotenciales transferibles para elementos de transición en la teoría del funcional de la densidad* [tesis]. Valladolid (España): Universidad de Valladolid; 2017.



28. Limo MJ, Sola-Rabada A, Boix E, Thota V, Westcott ZC, Puddu V, Perry CC. Interactions between metal oxides and biomolecules: from fundamental understanding to applications. *Chem Rev.* 2018, 118, 11118–11193
29. Aquino Granados P. Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de zinc obtenidas por el método de precipitación para su aplicación en pintura esmalte comercial. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química; 2016.
30. Tena R. El óxido de zinc: crecimiento cristalino mediante transporte en fase gaseosa y caracterización de propiedades físicas. Valencia: Universitat de València, Departament de Física Aplicada Electromagnetisme; 2004.
31. Jaimes OD, Rincón IC, Peña-Pedraza H. Método de la correlación en un cristal de ZnO. *Ciencia en Desarrollo.* 2018;9(2):57-67.
32. Biswas S, Das S, Sastry SS. Recent advances in synthesis, characterization and biomedical applications of zinc oxide nanoparticles. *J Nanomat.* 2016;2016:1-14.
33. Hassan HF, Mansour AM, Abo-Youssef AM, Elsadek BE, Messiha BA. Zinc oxide nanoparticles as a novel anticancer approach; in vitro and in vivo evidence. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(2):235-43.
34. Dutta P, Sastry SS. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, and biomedical applications. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10(1):1-16.
35. Singh T, Das J, Sil P. Zinc oxide: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risk. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;286:102317.
36. López Vázquez A. Crecimiento de nanoalambres de óxido de zinc verticalmente alineados usando el método sol-gel hidrotermal. Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas; 2015.
37. Hernández BA, González R, Viesca J, Fernández J, Díaz FJ, Machado A, et al. CuO, ZrO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles as antiwear additive in oil lubricants. *Wear.* 2008;265(3-4):422-28.
38. Ekimov A, Onushenko AA. The quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor. *JETP Lett.* 1981;34:363–66.
39. Pombo Barros V, Goyanes Villaescusa V. Puntos cuánticos: nueva aportación de la nanotecnología en investigación y medicina. Quantum dots: the new

contribution of nanotechnology to research and medicine. *Rev Complut Cienc Vet.* 2011;5(1):69-102.

40. Castillo Jáuregui LA. Efecto de la temperatura de síntesis en el tamaño y ancho de banda prohibida de nanopartículas de ZnO producidas por sol-gel [tesis de licenciatura]. Trujillo, Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2011.

41. Gómez-Piñeros B, Granados-Oliveros G. Síntesis y caracterización de las propiedades ópticas de puntos cuánticos de CdSe y CdSe/ZnS. *Rev Colomb Quim.* 2018;47(1):57-63. doi:10.15446/rev.colomb.quim.v47n1.61067.

42. López IA. Efecto del campo eléctrico y tamaño de partícula sobre la morfología de arreglos nanoestructurados de CdS obtenidos mediante deposición electroforética [tesis de licenciatura]. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas; 2009.

43. Hernández Casillas LP. Estudio de la obtención de nanopartículas de PbS bajo distintas condiciones de síntesis [tesis de maestría]. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, División de Estudios de Posgrado; 2013.

44. Sattler KD. Handbook of Nanophysics: Nanotubes and Nanowires. Taylor & Francis; 2011. p. 16-3.

45. Pisanic TR II, Zhang Y, Wang TH. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms. *NIH Public Access.* 2014;139(12):2968–2981. doi:10.1039/c4an00294f.

46. Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;249:37–52.

47. Malfatti L, Pinna A, Enzo S, Falcaro P, Marmioli B, Innocenzi P. Tuning the phase transition of ZnO thin films through lithography: An integrated bottom-up and top-down processing. *J Synchrotron Radiat.* 2015;22:165–171.

48. Krupiński P, Kornowicz A, Sokołowski K, Cieślak AM, Lewiński J. Applying mechanochemistry for bottom-up synthesis and host–guest surface modification of semiconducting nanocrystals: A case of water-soluble  $\beta$ -cyclodextrin-coated zinc oxide. *Chem Eur J.* 2016;22:7817–7823.

49. Raja A, Ashokkumar S, Pavithra Marthandam R, Jayachandiran J, Khatiwada CP, Kaviyarasu K, et al. Eco-friendly preparation of zinc oxide nanoparticles using *Tabernaemontana divaricata* and its photocatalytic and antimicrobial activity. *J Photochem Photobiol B.* 2018;181:53–58.

50. Agarwal H, Menon S, Kumar V, Shanmugam R. Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chem Biol Interact.* 2018;286.
51. Saravanan A, Huang B, Kathiravan D, Prasannan A. Natural biowaste-cocoons derived granular activated carbon-coated ZnO nanorods: A simple route to synthesis core-shell structure and their highly enhanced UV and hydrogen sensing properties. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9.
52. Taran M, Rad M, Alavi M. Biosynthesis of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles by *Halomonas elongata* IBRC-M 10214 in different conditions of medium. *BiolImpacts.* 2018;8:81–89.
53. Shamsuzzaman, Mashrai A, Khanam H, Aljawfi RN. Biological synthesis of ZnO nanoparticles using *C. albicans* and studying their catalytic performance in the synthesis of steroidal pyrazolines. *Arab J Chem.* 2017;10:S1530–S1536.
54. Azizi S, Ahmad MB, Namvar F, Mohamad R. Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga *Sargassum muticum* aqueous extract. *Mater Lett.* 2014;116:275–277.
55. Żelechowska K, Karczewska-Golec J, Karczewski J, Łoś M, Kłonkowski AM, Węgrzyn G, et al. Phage-directed synthesis of photoluminescent zinc oxide nanoparticles under benign conditions. *Bioconjug Chem.* 2016;27:1999–2006.
56. Agarwal H, Kumar V, Shanmugam R. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles—An eco-friendly approach. *Resour Eff Technol.* 2017;3.
57. Li N, Gao Y, Hou L, Gao F. DNA-based toolkit for directed synthesis of zinc oxide nanoparticle chains and understanding the quantum size effects in ZnO nanocrystals. *J Phys Chem C.* 2011;115:25266–25272.
58. Gharagozlou M, Baradaran Z, Bayati R. A green chemical method for synthesis of ZnO nanoparticles from solid-state decomposition of Schiff-bases derived from amino acid alanine complexes. *Ceram Int.* 2015;41:8382–8387.
59. Gawade VV, Gavade NL, Shinde HM, Babar SB, Kadam AN, Garadkar KM. Green synthesis of ZnO nanoparticles by using *Calotropis procera* leaves for the photodegradation of methyl orange. *J Mater Sci.* 2017;28:14033–14039.
60. Ogunyemi SO, Abdallah Y, Zhang M, Fouad H, Hong X, Ibrahim E, et al. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47:341–352.

61. Jin SE, Jin HE. Synthesis, characterization, and three-dimensional structure generation of zinc oxide-based nanomedicine for biomedical applications. *Pharmaceutics*. 2019 Nov 4; Review.
62. Zeng H, Cai W, Li Y, Hu J, Liu P. Composition/structural evolution and optical properties of ZnO/Zn nanoparticles by laser ablation in liquid media. *J Phys Chem B*. 2005;109:18260–6.
63. Peng H, Fangli Y, Liuyang B, Jinlin L, Yunfa C. Plasma synthesis of large quantities of zinc oxide nanorods. *J Phys Chem C*. 2007;111:194–200.
64. Chang I. Plasma synthesis of metal nanopowders. *Adv Powder Metall Prop Process Appl*. 2013:69–85.
65. Fouad O, Ismail A, Zaki Z, Mohamed RM. Zinc oxide thin films prepared by thermal evaporation deposition and its photocatalytic activity. *Appl Catal B*. 2006;62:144–9.
66. Yadav RS, Mishra P, Pandey AC. Tuning the band gap of ZnO nanoparticles by ultrasonic irradiation. *Inorg Mater*. 2010;46:163–7.
67. Thareja RK, Shukla S. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles by laser ablation of zinc in liquid. *Appl Surf Sci*. 2007;253:8889–95.
68. Haq NU, Nadhman A, Ullah I, Mustafa G, Yasinzaï M, Khan I. Synthesis approaches of zinc oxide nanoparticles: The dilemma of ecotoxicity. *J Nanomater*. 2017;2017:14.
69. Fricke M, Voigt A, Veit P, Sundmacher K. Miniemulsion-based process for controlling the size and shape of zinc oxide nanoparticles. *Ind Eng Chem Res*. 2015;54:10293–300.
70. Valdez CN, Schimpf AM, Gamelin DR, Mayer JM. Low capping group surface density on zinc oxide nanocrystals. *ACS Nano*. 2014;8:9463–70.
71. Demir MM, Muñoz-Espí R, Lieberwirth I, Wegner G. Precipitation of monodisperse ZnO nanocrystals via acid-catalyzed esterification of zinc acetate. *J Mater Chem*. 2006;16:2940–7.
72. Santos L, Nunes D, Calmeiro T, Branquinho R, Salgueiro D, Barquinha P, et al. Solvothermal synthesis of gallium–indium–zinc-oxide nanoparticles for electrolyte-gated transistors. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7:638–46.
73. Aneesh PM, Vanoja MA, Jayaraj M. Synthesis of ZnO nanoparticles by hydrothermal method. *Nanophotonic Mater IV*. 2007.

74. Sepulveda-Guzman S, Reeja-Jayan B, de la Rosa E, Torres-Castro A, Gonzalez-Gonzalez V, Jose-Yacaman M. Synthesis of assembled ZnO structures by precipitation method in aqueous media. *Mater Chem Phys*. 2009;115:172–8.
75. Škapin SD, Dražič G, Crnjak Orel Z. Microstructure of nanoscale zinc oxide crystallites. *Mater Lett*. 2007;61:2783–8.
76. Hu Z, Oskam G, Searson PC. Influence of solvent on the growth of ZnO nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2003;263:454–60.
77. Zanella R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*. 2012;5(1):69–81.
78. Rodríguez-Paéz JE, Caballero AC, Villegas M, Moure C, Durán P, Fernández JF. Controlled precipitation methods: formation mechanism of ZnO nanoparticles. *J Eur Ceram Soc*. 2001;21:925–30.
79. Kumar SS, Venkateswarlu P, Rao VR, Rao GN. Structural and optical characterization of ZnO nanoparticles synthesized by microemulsion route. *Int Nano Lett*. 2013;3:1–6.
80. Pourrahipi AM, Liu D, Pallon LK, Andersson RL, Abad AM, Lagaron JM, et al. *RSC Adv*. 2014;4:35568–77.
81. Rocha Formiga F, Ansorena E, Estella-Hermoso de Mendoza A, Imbuluzqueta E, González D, Blanco Prieto MJ. Nanosistemas a base de poliésteres. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra. 2016
82. Abril Díaz N, Bárcena Ruiz J, Fernández Reyes E, Galván Cejudo A, Jorrín Novo J, Peinado Peinado J, et al. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales. Disponible en: [https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf)
83. García Fabila M. Apuntes para Espectrometría de Radiación Ultravioleta Visible (UV/VIS). Toluca, México: Universidad Autónoma del Estado de México; 2016. Facultad de Química.
84. Straughan B. Spectroscopy. Chapman and Hall; 1976.
85. Rosari S, Nadia FD. UV light photocatalytic degradation of organic dyes with Fe-doped ZnO nanoparticles. *Superlattices and Microstructures*. 2014;74:217-33.

86. Osama M, El Feky A, Hassan EA, Fadel SM, Hassan ML. Use of ZnO nanoparticles for protecting oil paintings on paper support against dirt, fungal attack, and UV aging. *J Cult Herit.* 2014;15:165-72.
87. Cabrera J, Paredes C, Urday E, Santiago J. Preparación y caracterización de películas de alcohol polivinílico conteniendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
88. Sequeda LG, Díaz JM, Gutiérrez SJ, Perdomo SJ, Gómez OL. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev Colomb Cienc Químico-Farm.* 2012;41(1):50-66.
89. Amrut SL, Satish JS, Raghmani SN, Ahn JS, Ramchandra BP. Low temperature dielectric studies of zinc oxide (ZnO) nanoparticles prepared by precipitation method. *Adv Powder Technol.* 2013;24:331–335.
90. Crespo GR, Carbonero E, Sánchez V. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) modos de operación y aplicaciones. 2013.
91. Cruz M, Gonzalez R, Castrellón-Urbe J. Microscopio de Fuerza Atómica.
92. Barjat H, Morris GA, Smart S, Swanson AG, Williams SCR. High-resolution diffusion-ordered 2D spectroscopy (HR-DOSY) - A new tool for the analysis of complex mixtures. *J Magn Reson Series B.* 1995;108:170-172.
93. Chatzigiannis CM, Kiriakidi S, Tzakos AG, Mavromoustakos T. Chapter 18 in *Drug Delivery Systems*. Vol. 2207, pp. 235-246.
94. Beckman Coulter. ¿Qué es la dispersión dinámica de la luz?. Beckman Coulter México. Disponible en: <https://beckman.mx/support/faq/scientific/what-is-dynamic-light-scattering>
95. Malvern Panalytical. Dispersión de luz dinámica DLS. Disponible en: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
96. Yadav A, Prasad V, Khate AA, Raj S, Yadav D, Sundaramoorthy C, Vigneshwaran N. Functional finishing in cotton fabrics using zinc oxide nanoparticles. *Mater Sci.* 2006;29:641-645.
97. Skoog D, Leary J, Holler F. *Principios de Análisis Instrumental*. 5th ed. México D.F.: McGraw-Hill; 1998.
98. Ruiz Estrada GA. Desarrollo de un sistema de liberación de fármacos basado en nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenglicol para el tratamiento

de diferentes enfermedades [tesis de doctorado]. Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid; 2014.

99. Lorenzo P. Farmacología básica y clínica. 18th ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008.

100. Jaramillo F. Farmacología general. 3rd ed. México: Textos Universitarios; 2012.

101. Villavicencio Carbajal DH. Las vicisitudes de la innovación en biotecnología y nanotecnología en México. ITACA, Universidad Autónoma Metropolitana; 2017.

102. Rocha Formiga F. Nanosistemas a base de poliésteres. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia; 2009.

103. Maity A, Stepensky D. Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: Analysis of research trends and targeting efficiencies. Int J Pharm. 2015;496(2):268-274.

104. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r) evolución de la terapia contra el cáncer?. Educ Quím. 2016;27(4):286-291.

105. Mendoza N. Farmacología médica. México: Editorial Médica Panamericana; 2008.

106. Caldwell J, Gardner I, Swales N. An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. Toxicol Pathol. 1995 Mar-Apr;23(2):102-14.

107. Mayersohn M. Drug absorption. J Clin Pharmacol. 1987 Sep;27(9):634-8.

108. Viruete Cisneros SA. Manual de conocimientos básicos de farmacología. Guadalajara: Universidad de Guadalajara; 2015.

109. Currie GM. Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. J Nucl Med Technol. 2018 Sep;46(3):221-230.

110. Weil A. Harper, bioquímica ilustrada. 28th ed. México: McGraw-Hill, Lange; 2010.

111. Brunton L. Godman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics. 12th ed. EE.UU.: McGraw-Hill; 2011.

112. Sotoca Momblona JM. Problemas relacionados con la medicación de los pacientes procedentes de un centro de salud que son causa de ingreso en su

hospital de referencia. Tesis para optar al grado de Doctor en Farmacia. Universidad de Barcelona; 2007.

113. Montalvo González R, Salinas Mardueño M, Becerra Verdín EM, Barrón Jaime A. Química Orgánica: Introducción a la química heterocíclica. Universidad Autónoma de Nayarit; 2013.

114. Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. In: Fredholm BB, editor. Handbook of Experimental Pharmacology. Methylxanthines. 200. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. p. 33-91

115. Martínez López S. Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud: estudios de biodisponibilidad de metilxantinas y efectos en salud en voluntarios sanos y con riesgo cardiovascular. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición y Bromatología; 2014.

116. Kamimori GH, Karyekar CS, Otterstetter R, Cox DS, Balkin TJ, Belenky GL, Eddington ND. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *Int J Pharm.* 2002;234(1):159-67.

117. Rodopoulos N, Norman A. Elimination of theophylline metabolites in healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest.* 1997;57(3):233-40.

118. Latini R, Bonati M, Gaspari F, Traina GL, Jiritano L, Bortolotti A, et al. Kinetics and metabolism of theobromine in male and female non-pregnant and pregnant rabbits. *Toxicology.* 1984;30(4):343-54.

119. McLean C, Graham TE. Effects of exercise and thermal stress on caffeine pharmacokinetics in men and eumenorrheic women. *J Appl Physiol.* 2002;93(4):1471-8.

120. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit.* 2003;9(9):BR325-30.

121. Jilani TN, Preuss CV, Sharma S. Theophylline. StatPearls Publishing; 2021.

122. García Vicente JA. Estudio de la interacción farmacocinética de la teofilina con un nuevo antihistamínico H1, en voluntarios sanos. [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona; 1995.

123. Tröger U, Meyer FP. Influence of endogenous and exogenous effectors on the pharmacokinetics of theophylline: Focus on biotransformation. *Clin Pharmacokinet.* 1995;28(4):287–314.



124. Church M, Featherstone R, Cushley M, Mann J, Holgate S. Relationships between adenosine, cyclic nucleotides, and xanthines in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1986;78(5):670–675.
125. Dawson A, Whyte I. The assessment and treatment of theophylline poisoning. *Med J Aust.* 1989;151(11):689–693.
126. Krzanowski J, Polson J. Mechanism of action of methylxanthines in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;82(1):143–145.
127. Milgrom H, Bender B. Current issues in the use of theophylline. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(1):33–39.
128. Sibulesky L. Anatomía normal del hígado. *Clin Liver Disease.* 2013;2(S4):1–7. doi: 10.1002/cld.124.
129. Hiatt JR, Gabbay J, Busuttil RW. Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Ann Surg.* 1994;220:50–52.
130. Netter FH. Sistema digestivo: Hígado, vías biliares y páncreas. In: Colección Ciba de ilustraciones médicas, Tomo 3.3. Barcelona: Científicas y técnicas Masson-Salvat de medicina; 1981.
131. Cubero FJ, Nieto N. Células de Kupffer y hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Enferm Dig.* 2006;98(6):460–472.
132. Kuntz E, Kuntz HD. *Hepatology: Principles and practice.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 906.
133. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica.* US: University of Mississippi Medical Center; 2009.
134. Geneser F. *Histología. Sobre bases biomoleculares.* Argentina: Medica Panamericana; 2008.
135. Herrerías-Gutiérrez JM, et al. *Tratado de Hepatología.* Sevilla: Universidad de Sevilla; 1996.
136. González RC, Hevia VA, Davidson HG. Anatomía microscópica del hígado. In: *Tratado de hepatología.* Tomo I y II. Sevilla: Universidad de Sevilla; 1996.
137. González FJ, Tukey RH. Goodman & Gilman's the Pharmacological basis of therapeutics. Vol. I. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
138. Rojas Lemus M, Milán Chávez R, Delgado Medina A, Bizarro Nevares P, Cano Gutiérrez G, Cafaggi Padilla D, Cervantes Yépez S, Fortoul van der Goes TI.

El hepatocito como un ejemplo de interacción entre la biología celular y las rutas metabólicas. *Rev Fac Med (México)*. 2017;60(2):52–58.

139. Hoftman AF. Secreción biliar circulación entero hepática de los ácidos biliares. In: *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas*. 6th ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2000. p. 999–1011.

140. Tumani MF, Tapia G, Aguirre C, Obregón AM, Pettinelli P. Rol de la microbiota intestinal en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *Rev Med Chile*. 2021;149:570–579.

141. Robbins SL, Cotran R, Kumar V. *Patología estructural y funcional*. 5th ed. Ed. Interamericana, McGraw-Hill; 1995. p. 1486.

142. Pérez-Tamayo R, López-Corella E. *Principios de Patología*. México: Medica Panamericana; 2007.

143. Porth CM. *Fisiopatología, salud-enfermedad: Un enfoque conceptual*. 7th ed. Medica Panamericana; 2006. p. 917–946.

144. Fernández-Martínez E, Pérez-Soto E, González-Hernández C, Ortiz MI, Pérez-Álvarez V, Muriel P, Shibayama M. Immunomodulatory effects by oral contraceptives in normal and cholestatic female rats: role of cytokines. *Int Immunopharmacol*. 2014;21:10–19.

145. Pérez-Tamayo R, López-Corella E. *Principios de Patología*. 4th ed. Medica Panamericana; 2007. p. 206–220.

146. Iimuro Y, Brenner DA. Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. *Pharm Res*. 2008;25:249–258.

147. Diaz BA. Cirrosis hepática, etiopatogenia y diagnóstico. *Tratado de Histología*. Tomo I y II. Ed. Universidad de Sevilla; 1996. p. 705–713.

148. Park JC, Hur JM, Park JG, Kim SC, Park JR, Choi SH, Choi JW. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother Res*. 2004;18:19–24.

149. Kountouras J, Billing BH, Schever PH. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rats. *Br J Exp Pathol*. 1984;65:305–331.

150. Ochoa C, Granda C, Chapoñan M, Borja R, Borjar P, Ortiz J, Ugaz G, Puerta E, Pucutay M. Efecto protector de *Peumus boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. *Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*. 2008;13:20–25.

151. Álvarez-Amezcuca MC. Modificación del curso de la cirrosis experimental con extractos totales de Romero (*Rosmarinus officinalis*). Tesis de maestría, Universidad de Colima; 1994.
152. Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J Cell Biol.* 1963;19:139–157.
153. Ad VG, Mehendale HM, O'Neal RM. Chlordecone-induced potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: A light and electron microscopy study. *Exp Mol Pathol.* 1983;39:230–245.
154. Zimmermann HJ. Experimental hepatotoxicity. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Vol. 16. Experimental Production of diseases part 5: Liver. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 1976. p. 1–120.
155. Raucy JL, Krane JC, Lasker JM. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23:1–20.
156. Castro JA. Mechanistic studies and prevention of free radical cell injury. IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology. MacMillan; 1983. p. 243–250.
157. Muriel P. Peroxidation of lipids and liver damage. In: *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Taylor & Francis Press, USA; 1997. p. 237–257.
158. Torres CA, Perales MI, Zúñiga H, Carranza E. Niveles de malondialdehído y catalasa en tejidos de cobayos nativos de la altura. *Ciencia e Investigación, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.* 2004;7:28–34.
159. Devlin TM. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 5th ed. Wiley-Liss and John-Wiley and Sons Inc. Publications Canada; 2002. p. 526–527, 818–819, 1071–1075.
160. Bhagavan NV. *Biochemistry, a comprehensive review*. Lippincott; 1974. p. 916–923.
161. Kaplan MM. *Laboratory tests. Diseases of the liver*. 7th ed. Lippincott Company, Philadelphia, EUA; 1993. p. 108–144.
162. Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. *Bioquímica*. 5th ed. Reverte, Barcelona, España; 2004. p. 974.
163. Hashim M, Mujahid H, Hassan S, Bukhari S, Anjum I, Hano C, Abbasi BH, Anjum S. Implication of nanoparticles to combat chronic liver and kidney diseases: Progress and perspectives. *Biomolecules.* 2022 Sep 21;12(10):1337.

164. Rani V, Verma Y, Rana K, Rana SVS. Zinc oxide nanoparticles inhibit dimethylnitrosamine induced liver injury in rat. *Chem-Biol Interact.* 2018;295:84–92. doi: 10.1016/j.cbi.2017.10.009.
165. Bashandy SA, Ahmed-Farid OA, Abdelmottaleb-Moussa S, Omara EA, Abdel Jaleel G, Ibrahim FA. Efficacy of zinc oxide nanoparticles on hepatocellular carcinoma-induced biochemical and trace element alterations in rats. *J Appl Pharm Sci.* 2021;11:108–117.
166. Hussein RM, Elsirafy OM, Wahba YS, Abdel Kawy HS, Hasanin AH, Hamam GG. Theophylline, an old drug with multi-faceted effects: Its potential benefits in immunological liver injury in rats. *Life Sci.* 2015;136:100–107.
167. Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol.* 1998;56:773–779.
168. Muriel P, Rivera-Espinoza Y. Beneficial drugs for liver diseases. *J. Appl. Toxicol.* 2008; 28: 93-103.
169. Kargozar S, Bains F, Hamzehlou S, Hamblin MR, Mozafari M. Nanotechnology for angiogenesis: opportunities and challenges. *Chem Soc Rev.* 2019 Oct;48(10):2503-2525. doi: 10.1039/c8cs01021h.
170. Wang J, Zhang Y, Wang X. Zinc enhances lipid metabolism through the regulation of AMPK signaling pathway in HepG2 cells. *J Cell Biochem.* 2019;119(1):19-28.
171. Bloom A, Bloom S, Silva H, Nicoll AJ, Sawhney R. Zinc supplementation and its benefits in the management of chronic liver disease: An in-depth literature review. *Ann Hepatol.* 2021;25:100549.
172. Vargas-Pozada EE, Ramos-Tovar E, Acero-Hernández C, Cardoso-Lezama I, Galindo-Gómez S, Tsutsumi V, Muriel P. The antioxidant and anti-inflammatory activities of caffeine effectively attenuate nonalcoholic steatohepatitis and thioacetamide-induced hepatic injury in male rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2023 Mar 1;101(3):147-159. doi: 10.1139/cjpp-2022-0303. Epub 2023 Feb 6. PMID: 36744700.
173. Dutta R, Ghosh S. Theophylline: A novel therapeutic agent for non-alcoholic fatty liver disease. *J Cell Mol Med.* 2017;21(1):183-92.
174. Guinet Y, Paccou L, Hédoux A. Analysis of Co-Crystallization Mechanism of Theophylline and Citric Acid from Raman Investigations in Pseudo Polymorphic Forms Obtained by Different Synthesis Methods. *Molecules.* 2023 Feb 7;28(4):1605. doi: 10.3390/molecules28041605. PMID: 36838593; PMCID: PMC9960353.

175. Chen M, Straatsma TP, Fang Z, Dixon DA. Structural and Electronic Property Study of  $(\text{ZnO})_n$ ,  $n \leq 168$ : Transition from Zinc Oxide Molecular Clusters to Ultrasmall Nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2014;118(23):12747-12756.
176. González Angulo MA. Síntesis de películas delgadas y nanohilos de ZnO para la fabricación de un fotodiodo [Tesis de maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México; 2015.
177. Wang B, Nagase S, Zhao J, Wang G. Structural Growth Sequences and Electronic Properties of Zinc Oxide Clusters  $(\text{ZnO})_n$ . *J Phys Chem A*. 2007;111(33):7786-7792.
178. Kaplan M. Laboratory tests. In: Diseases of the Liver. 7th ed. JB Lippincott Company; 1993. p. 108-44.
179. Berger L, Rudolph G. Alkaline phosphatase. In: Meites J, editor. Standard methods of clinical chemistry. Meites Academic Press; 1967.
180. Glossman M, Neville D. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett*. 1972;19:340-4.
181. Reitman S, Frankel SA. A colorimetric for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*. 1978;28:56-63.
182. Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol*. 1998;56:773-9.
183. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
184. Seifter S, et al. The estimation of glycogen with the reagent. *Arch Biochem*. 1950;25:30-2.
185. Cohen G, et al. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem*. 1969;34:30-8.
186. Chattaraj PK, Maiti S. Reactivity descriptors. In: Bultinck P, De Winter H, Langenaeker W, Tollenaere JP, editors. Computational Medicinal Chemistry for Drug Delivery. Marcel Dekker, Inc.; 2004. p. 295-322.
187. Tsuneda T, Song JW, Suzuki S, Hirao K. On Koopmans' theorem in density functional theory. *J Chem Phys*. 2010;133:174101. doi: 10.1063/1.3491272.

188. Jardínez C, Nicolás-Vázquez I, Cruz Borbolla J, González-Ramírez CA, Cepeda M, Correa-Basurto J, Pandiyan T, Miranda R. DFT and docking studies of rhodostreptomycins A and B and their interactions with solvated/nonsolvated Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions. *J Mol Model*. 2013;19(9):3817-28.
189. Chen X, Wang Q, Wang XJ, et al. Synthesis and performance of ZnO quantum dots water-based fluorescent ink for anti-counterfeiting applications. *Sci Rep*. 2021;11:5841.
190. Pal U, Santiago P. Controlling the morphology of ZnO nanostructures in a low-temperature hydrothermal process. *J Phys Chem B*. 2005;109(32):15317-21. doi: 10.1021/jp052496i.
191. Xie J, Deng H, Xu ZQ, Li Y, Huang J. Growth of ZnO photonic crystals by self-assembly. *J Cryst Growth*. 2006;292(2):227-9.
192. Dorfman A, Kumar N, Hahm JI. Highly sensitive biomolecular fluorescence detection using nanoscale ZnO platforms. *Langmuir*. 2006;22(11):4890-5. doi: 10.1021/la053270+.
193. Kanchana US, Mathew TV. Surface functionalization of ZnO nanoparticles with functionalized bovine serum albumin as a biocompatible photochemical and antimicrobial agent. *Surf Interface*. 2021;24:101056.
194. Herry CA, Nurhayati N, Utomo B, Ardiansah B. Ulva fasciata-mediated preparation of zinc oxide nanocrystalline for one-pot multicomponent synthesis of 6-amino-3-methyl-4-phenyl-2,4-dihydropyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*. 2017;188:012053.
195. Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanisms: a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(1):118–33.
196. Chung H, Hong DP, Jung JY, Kim HJ, Jang KS, Sheen YY, Ahn JI, Lee YS, Kong G. Comprehensive analysis of differential gene expression profiles on carbon tetrachloride-induced rat liver injury and regeneration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;206(1):27-42.
197. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 2003;33(2):105–36.
198. Mout R, Moyano DF, Rana S, Rotello VM. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2539.
199. Perez-Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3:112-120.

200. Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacology*. 2017 Feb;25(1):11-24. doi: 10.1007/s10787-017-0309-4.
201. Sato M. Biological antioxidant defense system and metallothionein. *Jpn J Toxicol Env Heal*. 1992;38:228–39.
202. Gutha I, Matos-Pardala CF, Ferreira-Lima R, Loureiro-Rebouças R, Sobrala AC, Moraes-Marques CA, Kubrusly LF. Caffeine attenuates liver damage and improves neurologic signs in a rat model of hepatic encephalopathy. *Rev Gastroenterol Mex*. 2022;87(2):159-169.
203. Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RT. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther*. 1989;43:139-154.
204. Fernández-Martínez E, Pérez-Soto E, González-Hernández C, Ortiz MI, Pérez-Álvarez V, Muriel P, Shibayama M. Immunomodulatory effects by oral contraceptives in normal and cholestatic female rats: role of cytokines. *Int Immunopharmacol*. 2014;21:10–19.
205. Torres CA, Perales MI, Zúñiga H, Carranza E. Niveles de malondialdehído y catalasa en tejidos de cobayos nativos de la altura. *Ciencia e Investigación, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM*. 2004;7:28-34.
206. Zhao Y, Tan Y, Dai J, et al. Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. *Toxicol Lett*. 2010;200:100–106.
207. Shimizu I, Ito S. Protection of estrogens against the progression of chronic liver disease. *Hepatol Res*. 2007;37:239–247.
208. Hu J, Cai X, Li J, Zheng N, Zhang J. Associations between serum zinc levels and alanine aminotransferase elevation in adults. *Biol Trace Elem Res*. 2021 Jun;199(6):2077-2084. doi: 10.1007/s12011-020-02318-1.
209. Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med*. 2002;196:9–22.
210. Mayes PA. *Bioquímica de Harper. Metabolismo del glucógeno*. 15th ed. El Manual Moderno; 2001. p. 233-66.