

**Análisis del comportamiento antibacteriano,  
toxicológico y ambiental de nanozimas de Cu–  
Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde y su  
incorporación en membranas poliméricas**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

*Maestra en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de  
Ingeniería Ambiental*

PRESENTA

**Ing. Karen Guadalupe Quintero Garrido**

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Beatriz Liliana España Sánchez**

CODIRECTORA DE TESIS:

**Dra. María del Carmen Gonzalez Castillo**





Dr. Luis Antonio Ortiz Frade  
Director de Posgrado  
PICYT – CIDETEQ  
Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del Comité Tutorial de la alumna **KAREN GUADALUPE QUINTERO GARRIDO**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO ANTIBACTERIANO, TOXICOLÓGICO Y AMBIENTAL DE NANOZIMAS DE CU- $FE_2O_3$  OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE Y SU INCORPORACIÓN EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS”**, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de **Maestría en Ciencia y Tecnología** en la opción terminal de **INGENIERÍA AMBIENTAL** durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmo la presente a los **DIA** días del mes de **MES** del año dos mil **AÑO**.

---

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez  
Director de Tesis

---

Dra. María del Carmen Gonzales  
Castillo  
Codirector de Tesis

---

Dra. María Yolanda Reyes Vidal  
Asesor

---

Dra. Irma Robles Gutiérrez  
Asesor

---

Dra. Linda Victoria González Gutiérrez  
Asesor





Dr. Luis Antonio Ortiz Frade  
Director de Posgrado  
PICYT – CIDETEQ  
Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del Jurado del Examen de Grado de la alumna **KAREN GUADALUPE QUINTERO GARRIDO**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO ANTIBACTERIANO, TOXICOLÓGICO Y AMBIENTAL DE NANOZIMAS DE CU- $FE_2O_3$  OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE Y SU INCORPORACIÓN EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS”**, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de **Maestría en Ciencia y Tecnología** en la opción terminal de **INGENIERÍA AMBIENTAL** durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmo la presente a los **DIA** días del mes de **MES** del año dos mil **AÑO**.

---

Dra. Martha Cruz Soto  
Presidente

---

Dra. Irma Robles Gutiérrez  
Secretario

---

Dr. Francisco Javier Bacame  
Valenzuela  
Vocal



# Resumen

El presente trabajo describe el análisis del comportamiento antibacteriano, toxicológico y ambiental de nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde a partir del extracto de *Ageratina pichinchensis* (Axihuitl), planta medicinal mexicana de uso herbolario. Las nanozimas, definidas como nanomateriales con propiedades catalíticas similares a las enzimas naturales, presentaron una morfología irregular con un tamaño promedio de 29 nm que y, al compararse con las obtenidas por síntesis química mostraron diferencias estructurales. Las obtenidas por síntesis verde con extracto de Axihuitl presentaron una sola fase correspondiente a la hematita, mientras que en las químicas se detectó una fase adicional, lo que sugiere variaciones en el grado de dopaje del material. La actividad catalítica se determinó mediante la oxidación de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ambas nanozimas presentaron actividad tipo peroxidasa, aunque las sintetizadas con extracto vegetal mostraron una mayor eficiencia catalítica en comparación con otras nanozimas reportadas en la literatura, lo que confirma que el método de síntesis influye de manera directa en el comportamiento catalítico. Los análisis antibacterianos demostraron que las nanozimas Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde presentaron una actividad superior frente a *Staphylococcus aureus*, alcanzando porcentajes de inhibición >65 % tras 1 h de contacto, mientras que las nanozimas químicas mostraron valores >12.8 %, validando el potencial de la síntesis verde como estrategia para obtener nanomateriales antimicrobianos. El análisis de biocompatibilidad y citotoxicidad en fibroblastos reveló que, las nanozimas obtenidas por síntesis verde mantuvieron una viabilidad celular ≥ 70 % en comparación con el control de daño (Triton X-100), incluso a 100 µg/mL. Este efecto se asocia a fenómenos de aglomeración y sedimentación que favorecen un mayor contacto físico con la monocapa celular y estimulan transitoriamente la actividad metabólica. Bajo esta premisa, se realizó la formulación del nanocompuesto de PVA/PAA-Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> con 0.5 % p/p de nanozimas. Las membras de PVA/PAA con nanozimas obtenidas por síntesis verde presentaron una red de nanofibras continuas y uniformes, con un diámetro promedio de 246.91 nm, ligeramente inferior al de la membrana de PVA/PAA y a las que contenían nanozimas obtenidas por síntesis química. En conjunto, los resultados confirman que la síntesis verde de nanozimas Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a partir del extracto de *Ageratina pichinchensis* permite obtener materiales con propiedades catalíticas, antibacterianas y biocompatibles. Su incorporación en membranas de PVA/PAA da lugar a nanocompuestos biodegradables con potencial aplicación en el ámbito biomédico y

ambiental, sin evidenciar efectos tóxicos relevantes para la salud humana ni impactos negativos para el medio ambiente.

**Palabras clave:** Nanozimas, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, síntesis verde, membranas poliméricas y biocompatibilidad

# Abstract

This work describes the analysis of the antibacterial, toxicological, and environmental behavior of Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanozymes obtained by green synthesis using the extract of *Ageratina pichinchensis* (Axihuitl), a Mexican medicinal plant traditionally used in herbal medicine. The nanozymes, defined as nanomaterials with catalytic properties like natural enzymes, exhibited an irregular morphology with an average size of 29 nm and, when compared with those obtained by chemical synthesis, showed structural differences. The nanozymes synthesized with Axihuitl extract displayed a single phase corresponding to hematite, whereas in the chemically synthesized ones an additional phase was detected, suggesting variations in the degree of material doping. Catalytic activity was assessed through the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Both nanozymes exhibited peroxidase-like activity; however, those synthesized with plant extract showed higher catalytic efficiency compared to other nanozymes reported in the literature, confirming that the synthesis method directly influences the catalytic behavior. Antibacterial analyses demonstrated that Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanozymes obtained by green synthesis exhibited superior activity against *Staphylococcus aureus*, reaching inhibition percentages >65% after 1 h of contact, whereas the chemically synthesized nanozymes only showed values >12.8%, validating green synthesis as a strategy to obtain antimicrobial nanomaterials. Biocompatibility and cytotoxicity analyses in fibroblasts revealed that green-synthesized nanozymes maintained cell viability ≥70% compared with the damage control (Triton X-100), even at 100 µg/mL. This effect is associated with agglomeration and sedimentation phenomena that promote greater physical contact with the cell monolayer and transiently stimulate metabolic activity. Under this premise, a PVA/PAA–Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite formulation containing 0.5 wt% nanozymes was developed. PVA/PAA membranes with green-synthesized nanozymes exhibited a network of continuous and uniform nanofibers with an average diameter of 246.91 nm, slightly lower than that of the pure PVA/PAA membrane and those containing chemically synthesized nanozymes. Overall, the results confirm that the green synthesis of Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanozymes from *Ageratina pichinchensis* extract enables the development of materials with catalytic, antibacterial, and biocompatible properties. Their incorporation into PVA/PAA membranes leads to biodegradable nanocomposites with potential applications in the biomedical and environmental fields, without showing toxic effects relevant to human health or negative impacts on the environment.

**Keywords:** Nanozymes, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, green synthesis, polymeric membranes, and biocompatibility

# Agradecimientos

A Dios, por sostenerme a lo largo de este proyecto, por ser mi mayor fortaleza en los momentos en que no encontraba salida y por dar sentido y rumbo a cada paso de este camino.

A mi familia, por su amor incondicional y por ser mi más grande apoyo emocional; su confianza en mí fue el impulso que me permitió perseverar.

A Elena, por su amistad entrañable y por acompañarme con entusiasmo en cada etapa, siempre dispuesta a emprender nuevas historias a mi lado.

A Grissel, por su calidez, compañía y disposición cotidiana, que hicieron de esta etapa un proceso más amable y llevadero.

A Majo y Alejandro, por su guía constante, tanto en lo profesional como en lo personal; su ejemplo y consejo fueron fundamentales para mi crecimiento.

A cada una de las personas que conocí en el CIDETEQ, gracias por formar parte de esta historia y por el ambiente de colaboración que enriqueció mi formación académica y humana.

A la Dra. Carme y a Jimena, por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme con paciencia y dedicación. Agradezco profundamente el tiempo que invirtieron en transmitirme sus conocimientos y su disposición constante para orientarme.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular, por su trato amable y respetuoso durante mi estancia en San Luis Potosí. Su apoyo facilitó mi integración académica y personal, y convirtió ese periodo en una experiencia grata y significativa.

Finalmente, deseo expresar un agradecimiento muy especial a la Dra. Lili. Su liderazgo científico y su calidad humana han sido para mí un modelo a seguir. Agradezco su confianza al brindarme la oportunidad de realizar este proyecto y su compromiso para que yo aprendiera en cada etapa. Su paciencia, su acompañamiento cercano y su apoyo constante fueron un sostén imprescindible dentro y fuera del entorno académico. Gracias por creer en mí y por impulsar con generosidad mi desarrollo como investigadora.

# Índice general

<b>1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
1.1 ANTECEDENTES.....	20
1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....	23
1.3 JUSTIFICACIÓN .....	24
1.4 OBJETIVOS .....	25
1.4.1 <i>Objetivo general</i> .....	25
1.4.2 <i>Objetivo específico</i> .....	25
1.5 HIPÓTESIS .....	25
<b>2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOZIMAS .....</b>	<b>26</b>
2.1 INTRODUCCIÓN.....	26
2.2 MARCO TEÓRICO .....	27
2.2.1 <i>Definición y ventajas de las nanozimas frente a las enzimas naturales</i> .....	27
2.2.2 <i>Actividades enzimáticas imitadas y sus aplicaciones</i> .....	28
2.2.3 <i>Aplicaciones antibacterianas de nanozimas</i> .....	30
2.2.4 <i>Nanozimas basadas en óxidos de hierro: hematita y sus derivados metálicos</i> .....	31
2.2.5 <i>Síntesis verde de nanozimas</i> .....	32
2.3 OBJETIVO .....	35
2.4 METODOLOGÍA.....	35
2.4.1 <i>Materiales</i> .....	35
2.4.2 <i>Preparación del extracto de Ageratina pichinchensis (Axihuitl)</i> .....	35
2.4.3 <i>Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto para la síntesis de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i> .....	36
2.4.4 <i>Síntesis verde de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i> .....	37
2.4.5 <i>Síntesis química de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i> .....	38
2.4.6 <i>Caracterización fisicoquímica, estructural, morfológica, enzimática y antibacteriana NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i> .....	39
2.5 RESULTADOS.....	42
2.5.1 <i>Capacidad antioxidante del extracto de Axihuitl</i> .....	42
2.5.2 <i>Composición química, estructura cristalina y morfología de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i> .....	43
2.5.3 <i>Morfología y análisis elemental de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></i> .....	48

2.5.4 Evaluación de la actividad catalítica similar a la peroxidasa y análisis cinético estacionario de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	50
2.5.5 Actividad antibacteriana de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	54
2.6 CONCLUSIONES PARCIALES .....	56
<b>3 INCORPORACIÓN DE LAS NZS CU-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> EN UNA MEMBRANA POLIMÉRICA .....</b>	<b>58</b>
3.1 INTRODUCCIÓN.....	58
3.2 MARCO TEÓRICO .....	59
3.2.1 Composición y propiedades de las membranas poliméricas de PVA/PAA .....	59
3.2.2 Incorporación de nanozimas en matrices poliméricas .....	61
3.3 OBJETIVO .....	62
3.4 METODOLOGÍA.....	62
3.4.1 Materiales .....	63
3.4.2 Síntesis de la membrana polimérica con la incorporación de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	63
3.4.3 Caracterización fisicoquímica y morfológica NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	63
3.4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	64
3.5 RESULTADOS.....	64
3.5.1 Composición química de las membranas poliméricas con la incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	65
3.5.2 Morfología y análisis elemental de las membranas poliméricas con la incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	66
3.5.3 Polaridad superficial de las membranas poliméricas con la incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	69
3.5.4 Actividad antibacteriana de las membranas poliméricas con incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	71
3.6 CONCLUSIONES PARCIALES .....	73
<b>4 VALIDACIÓN TOXICOLÓGICA DE LAS NZS DE CU-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Y DEL NANOCOMPUESTO PVA/PAA-CU-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> .</b>	<b>74</b>
4.1 INTRODUCCIÓN.....	74
4.2 MARCO TEÓRICO .....	75
4.2.1 Biocompatibilidad.....	75
4.2.2 Citotoxicidad y viabilidad celular.....	76
4.2.3 Evaluación de la toxicidad de las nanozimas .....	76
4.2.4 Factores que modulan la respuesta celular a nanozimas.....	77
4.2.5 Mecanismos citotóxicos de las nanozimas .....	78
4.2.6 Programas y normativas internacionales y nacionales en nanomateriales .....	79
4.3 OBJETIVO .....	80
4.4 METODOLOGÍA.....	80
4.4.1 Materiales .....	80
4.4.2 Evaluación de la viabilidad y citotoxicidad de las nanozimas.....	80
4.4.3 Análisis morfológico basado en la tinción de hematoxilina y eosina en fibroblastos .....	81
4.4.4 Evaluación de la viabilidad y citotoxicidad de las membranas .....	82
4.5 RESULTADOS.....	82
4.5.1 Impacto citotóxico de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> en células de fibroblastos NIH3T3 .....	82
4.5.2 Análisis morfológico de fibroblastos basado en la tinción de hematoxilina y eosina .....	90
4.5.3 Impacto citotóxico de las membranas de PVA/PAA con la incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> en células de fibroblastos NIH3T3.....	92
4.5.4 Citotoxicidad.....	94
4.6 CONCLUSIONES PARCIALES .....	95
<b>5 IMPACTO AMBIENTAL DEL NANOCOMPUESTO PVA/PAA-CU-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: BIODEGRADACIÓN .....</b>	<b>97</b>
5.1 INTRODUCCIÓN.....	97
5.2 OBJETIVO .....	98

5.3 MARCO TEÓRICO .....	98
5.3.1 Biodegradación.....	98
5.3.2 Polímeros biodegradable .....	99
5.4 METODOLOGÍA.....	100
5.4.1 Materiales .....	100
5.4.2 Ensayo de biodegradación .....	101
5.5 RESULTADOS.....	103
5.5.1 Biodegradación del nanocompuesto PVA/PAA–Cu–Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	103
5.6 CONCLUSIONES PARCIALES .....	106
<b>6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>107</b>
6.1 CONCLUSIONES.....	107
6.2 RECOMENDACIONES .....	108
<b>7 PRODUCTOS OBTENIDOS .....</b>	<b>110</b>
7.1 PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS .....	110
7.2 ASISTENCIA A CONGRESOS .....	110
7.3 ACTIVIDADES EXTRA (CONTRIBUCIÓN SOCIAL Y CIENTÍFICA).....	111
<b>8 REFERENCIAS.....</b>	<b>113</b>
A.1 FÓRMULA DE DEBYE–SCHERRER.....	133
A.2 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE NZs CU–Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	133
A.3 VIABILIDAD CELULAR DE LAS NANOZIMAS EN TIEMPOS DE EXPOSICIÓN DE 3 Y 12 H .....	135
A.4 COMPARACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS APARENTE Y LA VELOCIDAD MÁXIMA DE REACCIÓN .....	136

# Índice de figuras

Figura 1 Planta de <i>Ageratina pichinchensis</i> .....	34
Figura 2 Reacciones químicas generales involucradas en la síntesis verde de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	38
Figura 3 Reacciones químicas generales involucradas en la síntesis química de NZs Cu- Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	39
Figura 4 Curva de calibración para la estimación del contenido fenólico total a 765 nm....	42
Figura 5 Espectro FTIR del extracto de Axihuitl (a) y de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (b) obtenidas por síntesis verde y (c) síntesis química. ....	44
Figura 6 Espectros Raman de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (NZs SV), obtenidas por síntesis química (NZs SQ) y la referencias de las fases hematita (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ). .....	46
Figura 7 Patrones de difracción de rayos X de nanozimas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> dopadas con iones Cu <sup>2+</sup> . .....	47
Figura 8 Micrografías SEM NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (a). En recuadro incluye una micrografía ampliada. Espectro de escaneo puntual EDX de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (b). Imágenes de mapeo EDS de las NZs Cu- Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (c). ....	49
Figura 9 Micrografías SEM NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis química (a). En recuadro incluye una micrografía ampliada. Espectro de escaneo puntual EDX de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis química (b). Imágenes de mapeo EDS de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis química (c). ....	50

Figura 10 Espectros de absorbancia, cambios visuales y reacción de oxidación de TMB en diferentes sistemas de reacción: TMB+ Buffer, TMB+ Buffer+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TMB+ Buffer+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NZs SV, TMB+ Buffer+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NZs SQ.....	51
Figura 11 Cinética Evaluación cinética de la oxidación del TMB a distintas concentraciones de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	52
Figura 12 Ensayo cinético en estado estacionario de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (a) y HRP (b), donde la velocidad de reacción se determinó a través de la oxTMB con base en la absorción a 652 nm con concentraciones variables de TMB.....	53
Figura 13 Actividad antibacteriana de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde y química en ensayos de microdilución seriada. Los datos se expresan como media ±DE para n>2. Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; ns=no significativo, *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 y ****p≤0.0001.....	56
Figura 14 Análisis FTIR de las membranas de PVA/PAA antes (a) y después de la incorporación de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> por síntesis verde (b) y síntesis química (c). .....	66
Figura 15 Micrografías SEM de la membrana de PVA/PAA obtenida mediante la técnica de electrohilado. En el recuadro se incluye una micrografía ampliada (a). Espectro de escaneo puntual EDX de la membrana de PVA/PAA (b). Imágenes de mapeo EDS de la membrana de PVA/PAA (c). .....	67
Figura 16 Micrografías SEM de la membrana de PVA/PAA con la incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (MSV) (a). En recuadro se incluye una micrografía ampliada (a). Espectro de escaneo puntual EDX de la MSV (b). Imágenes de mapeo EDS de la MSV (c). .....	68
Figura 17 Micrografías SEM de la membrana de PVA/PAA con la incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis química (MSQ) (a). En recuadro se incluye una micrografía ampliada (a). Espectro de escaneo puntual EDX de la MSQ (b). Imágenes de mapeo EDS de la MSQ.....	69
Figura 18 Mediciones del ángulo de contacto del nanocompuesto PVA/PAA- Cu- Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	70
Figura 19 Actividad antibacteriana de membranas poliméricas con incorporación de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> en ensayos de cámaras húmedas. Los datos se expresan como media ±DE para n>2. Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; ns=no significativo, *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 y ****p≤0.0001.....	72
Figura 20 Ensayo de viabilidad celular en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) tras el tratamiento a distintos tiempos 1 h (a), 6 h (b) y 24 h (c); con distintas concentraciones de NZs de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (SV) y síntesis química (SQ). Los datos se expresan como media ±SEM para n>3. Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ****p≤0.0001. ....	86
Figura 21 Ensayo de citotoxicidad en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) tras el tratamiento a distintos tiempos 1 h (a), 6 h (b), (c) 24 h; con distintas concentraciones de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (SV) y síntesis química (SQ). Los datos	

se expresan como media $\pm$ SEM para $n > 3$ . Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; * $p \leq 0.05$ , ** $p \leq 0.01$ , *** $p \leq 0.001$ , **** $p \leq 0.0001$ .....	89
Figura 22 Micrografías con tinción hematoxilina y eosina, con aumento de 40x de fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3), tratamiento a distintos tiempos 1 h (a-c), 6 h (d-f), 24 h (g-i); con 50 $\mu$ g/ml NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (SV) y síntesis química (SQ).....	90
Figura 23 Ensayo de viabilidad celular en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) tras el tratamiento a 24 h; con membranas electrohiladas con NZs de Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (MSV) y síntesis química (MSQ). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM para $n > 3$ . Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; * $p \leq 0.05$ , ** $p \leq 0.01$ , *** $p \leq 0.001$ , **** $p \leq 0.0001$ .....	93
Figura 24 Ensayo de citotoxicidad en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) tras el tratamiento a 24 h; con membranas electrohiladas con NZs de Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (SV) y síntesis química (SQ). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM para $n > 3$ . Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; * $p \leq 0.05$ , ** $p \leq 0.01$ , *** $p \leq 0.001$ , **** $p \leq 0.0001$ . ....	95
Figura 25 Esquema del montaje experimental para la evaluación de la biodegradación del nanocompuesto PVA/PAA-Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	102
Figura 26 Porcentaje de biodegradación del nanocompuesto a partir de la cuantificación de CO <sub>2</sub> . ....	104
Figura 27 Espectros FTIR de las membranas PVA/PAA y nanocompuestos PVA/PAA-Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> antes y después de la biodegradación, mostrando cambios en bandas características (O-H, C-H, C=O y C-O) asociados a modificaciones químicas de la matriz polimérica.....	105
Figura 28 Histogramas de distribución de tamaño de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (a) y NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis química (b), obtenidas a partir de micrografías SEM.....	134
Figura 29 Histogramas de distribución de tamaño del diámetro de las fibras de la membrana polimérica PVA/PAA antes (a) y después de la incorporación de las NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> por síntesis verde (b) y síntesis química (c), obtenidas a partir de micrografías SEM. ....	135
Figura 30 Ensayo de viabilidad celular en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) tras el tratamiento a 3 h (a) y 12 h (b); con distintas concentraciones de NZs de NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (SV) y síntesis química (SQ). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM para $n > 3$ . Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; * $p \leq 0.05$ , ** $p \leq 0.01$ , *** $p \leq 0.001$ , **** $p \leq 0.0001$ .....	135

# Índice de tablas

Tabla 1 Nanomateriales con actividad catalítica similar a las enzimas, junto con sus aplicaciones y resultados más relevantes.....	29
Tabla 2 Nanozimas obtenidas por síntesis verde a partir de extractos vegetales .....	33
Tabla 3 Reactivos para la preparación de las soluciones estándar .....	36
Tabla 4 Reactivos para la preparación de la solución de trabajo.....	37
Tabla 5 Concentración de compuestos fenólicos de extractos con capacidad antioxidante.	42
Tabla 6 Porcentaje de biodegradación por pérdida de peso .....	104
Tabla 7 Pérdida de peso de las membranas mediante la prueba de entierro .....	105
Tabla 8 Comparación de la constante de Michaelis aparente ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ).....	136

# Glosario

NZs	Nanozimas
Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Hematita dopada con cobre
NZs Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Nanozimas de hematita dopada con cobre
α-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Hematita
CuO	Óxido de cobre
PVA	Poli (vinil alcohol)
PAA	Ácido poli(acrílico)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PVA/PAA-Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Membrana polimérica de poli (vinil alcohol) y ácido poli(acrílico) con nanozimas de hematita dopadas con cobre
MSV	Membranas electrohiladas con NZs de Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde
MSQ	Membranas electrohiladas con NZs de Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> obtenidas por síntesis química
NIH 3T3	Fibroblastos embrionarios de ratón
SEM	Microscopio electrónico de barrido (por sus siglas en inglés)
DRX	Difracción de rayos X
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (por sus siglas en inglés)

# 1

## Introducción y Objetivos

### 1.1 Antecedentes

La resistencia bacteriana constituye uno de los principales problemas de salud pública y desarrollo a nivel mundial, al comprometer la eficiencia de antibióticos, antivirales, antifúngicos y antiparasitarios y, con ello, procedimientos médicos de alta complejidad (cirugías, quimioterapia, trasplantes) [1]. De acuerdo con estimaciones recientes, en el 2021 se reportaron alrededor de 1.14 millones de muertes atribuibles a la resistencia a los antimicrobianos (RAM), lo que significa que la resistencia constituyó la causa directa de dichos fallecimientos y hasta 4.71 millones de fallecimientos asociados a la RAM [2].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha advertido que, de no intervenir de manera contundente, hacia el año 2050 la resistencia antimicrobiana podría provocar hasta 10 millones de muertes anuales superando incluso las cifras relacionadas con el cáncer [3]. Este panorama ha sido respaldado por la Review on Antimicrobial Resistance, la cual estima que la mortalidad por RAM podría alcanzar una muerte cada tres segundos y generar pérdidas económicas acumuladas de hasta 100 billones de dólares para mediados de siglo [4]. En

términos más inmediatos, el Banco Mundial estima que para el 2030 la resistencia antimicrobiana podría generar pérdidas de hasta 3.4 billones de dólares anuales en el producto interno bruto (PIB) mundial [5].

Este fenómeno no solo aumenta la mortalidad por infecciones comunes, como neumonías o sepsis, sino que también tiene un impacto en la sostenibilidad de los sistemas de salud. Se estima que los costos adicionales de atención médica derivados de la resistencia antimicrobiana podrían alcanzar un billón de dólares anuales para 2050, afectando especialmente el manejo de infecciones en heridas, implantes biomédicos y entornos nosocomiales [4].

En este contexto, la resistencia bacteriana adquiere particular relevancia, pues representa la principal amenaza en infecciones asociadas a bacterias oportunistas y multirresistentes como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales han sido incluidas por la Organización Mundial de la Salud en su Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios 2024, como prioridad alta o crítica debido a su impacto global, capacidad de propagación y dificultad de tratamiento [6].

Ante la creciente crisis de la resistencia bacteriana, surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias antibacterianas innovadoras que superen a los antibióticos tradicionales, los cuales actúan principalmente mediante un único mecanismo de acción como la inhibición de la síntesis de la pared celular, la interferencia en la síntesis proteica o la alteración de la replicación del ADN. Este mecanismo único y la rápida adaptación de las bacterias favorece la rápida aparición de resistencia [7]. En contraste, los nanomateriales ofrecen un enfoque multifuncional, al ejercer su actividad antimicrobiana a través de diversos mecanismos simultáneos que incluyen la liberación controlada de iones metálicos, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño directo a las membranas celulares bacterianas. Esta versatilidad reduce la probabilidad de desarrollar resistencia y posiciona a las nanotecnologías y a los biomateriales funcionalizados como herramientas prometedoras en la lucha contra infecciones resistentes [8].

Dentro de los nanomateriales metálicos la plata y el cobre han demostrado eficiencia antimicrobiana mediante la liberación de iones, generación de ROS y daño a la membrana bacteriana. Sin embargo, su aplicación se ve limitada por la toxicidad asociada y falta de control en la liberación de iones, lo que dificulta su uso seguro en sistemas biológicos [9]. Para superar estas limitaciones, se han desarrollado nanozimas, nanomateriales capaces de imitar actividades enzimáticas como peroxidasa, oxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, que han mostrado un gran potencial como catalizadores bioinspirados y agentes antibacterianos.

Estas nanozimas pueden generar ROS de forma catalítica y controlada, lo que potencia su actividad antibacteriana, sin recurrir a la liberación excesiva de iones metálicos. En

particular, las nanozimas con actividad tipo peroxidasa pueden descomponer concentraciones muy bajas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para producir radicales hidroxilos (-OH) y lograr una mayor eficiencia antibacteriana sin generar toxicidad en los tejidos sanos [10].

Además, las nanozimas han despertado gran interés debido a su estabilidad, bajo costo de producción y posibilidad de síntesis a gran escala, lo que las convierte en alternativas viables frente a las enzimas naturales como la peroxidasa de rábano picante [11], [12]. Sin embargo, su aplicación biomédica exige una evaluación exhaustiva de los efectos toxicológicos en la salud y medio ambiente, ya que factores como el tamaño, morfología y los grupos funcionales de superficie pueden influir en su citotoxicidad [13]. Este impacto puede ser regulado desde el diseño del material, donde la síntesis verde juega un papel importante al reducir la presencia de residuos tóxicos derivados de la síntesis y mejorar la biocompatibilidad en comparación con métodos químicos convencionales [14].

En este sentido, la síntesis verde aplicada a nanozimas basadas en óxidos metálicos ha cobrado relevancia, al permitir un diseño más seguro y sostenible. Entre ellas, la hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) se distingue por su versatilidad catalítica capaz de imitar múltiples actividades enzimáticas como la peroxidasa, la oxidasa y catalasa [15], con una estabilidad comparable o incluso superior a enzimas naturales [16].

Investigaciones recientes han demostrado que el dopaje con iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) introduce defectos estructurales en la red cristalina, evidenciados por cambios en el tamaño cristalino y la simetría estructural, lo que se traduce en una mayor eficacia antibacteriana [17].

El uso de extractos vegetales en la síntesis verde como agentes reductores y estabilizantes amplía aún más las posibilidades de obtener nanozimas biocompatibles y ambientalmente amigables. En particular, *Ageratina pichinchensis* (Axihuitl), reconocida en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades antibacterianas [18], antifúngicas [19] y gastroprotectoras [20], representa una fuente innovadora de metabolitos secundarios (flavonoides, benzofuranos y cromenos) capaces de participar en la reducción y estabilización de nanopartículas [21]. Su aprovechamiento en la síntesis de nanozimas  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_3$  representa una estrategia original y sostenible para el desarrollo de biomateriales con potencial aplicación biomédica y ambiental.

Además de la síntesis, resulta igualmente relevante considerar la incorporación de nanozimas en matrices poliméricas como estrategia atractiva para aplicaciones biomédicas. Polímeros como el poli (vinil alcohol) (PVA) y el ácido poliacrílico (PAA) son biocompatibles y biodegradables [22], [23], y al ser procesados mediante electrohilado pueden generar membranas con propiedades adecuadas para su uso como apósitos antimicrobianos o sistemas de liberación controlada. La presencia de nanozimas en estas membranas no solo aporta propiedades catalíticas y antibacterianas, sino que también

contribuye a modular especies reactivas de oxígeno, atenuar la inflamación y favorecer la angiogénesis, regulando de manera dinámica la interacción con fluidos biológicos y optimizando así su desempeño funcional [24].

De acuerdo con lo anterior, el presente trabajo propone la síntesis verde de nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> empleando extracto de *Ageratina pichinchensis* (Axihuitl) como agente reductor y estabilizante, con el fin de obtener nanomateriales biocompatibles y con propiedades catalíticas. Posteriormente, la incorporación de estas nanozimas en matrices poliméricas de PVA/PAA obtenidas por electrohilado permitirá transferir sus propiedades catalíticas y antibacterianas a una matriz biodegradable. De esta manera, se busca el desarrollo de biomateriales multifuncionales cuya evaluación antibacteriana, toxicológica y ambiental contribuya al diseño de materiales más seguros y sostenibles.

## 1.2 Definición del problema

La resistencia bacteriana constituye actualmente una de las principales amenazas para la salud pública global. En el 2021 se atribuyeron directamente cerca de 1.14 millones de muertes y hasta 4.71 millones de fallecimientos asociados [2] y de no implementarse medidas efectivas contra este problema de salud se proyecta que hacia 2050 esta crisis podría ocasionar hasta 10 millones de muertes anuales, superando incluso la mortalidad por cáncer, generando pérdidas económicas acumuladas cercanas a 100 billones de dólares [3], [4]. Este panorama no solo compromete la eficiencia de los antibióticos convencionales, sino que también afecta la seguridad de procedimientos médicos de alta complejidad, lo que plantea un desafío urgente para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas [1].

Aunque se han impulsado estrategias basadas en el desarrollo de nuevos antibióticos, campañas de uso racional y medidas de control hospitalario, estas estrategias han demostrado ser insuficientes para contener la magnitud del problema [25]. La capacidad de adaptación de las bacterias supera el ritmo de innovación farmacológica, lo que hace evidente que los enfoques tradicionales no garantizan soluciones sostenibles a largo plazo [26]. En este sentido, la nanotecnología ha emergido en las últimas décadas como una herramienta innovadora, al ofrecer materiales con propiedades multifuncionales capaces de ejercer actividad antibacteriana mediante mecanismos distintos y simultáneos como la liberación controlada de iones, la generación de especies reactivas de oxígeno y el daño directo a las membranas bacterianas [8].

Sin embargo, los nanomateriales metálicos convencionales como la plata y el cobre, pese a su efectividad, su aplicación se ve limitada por los efectos adversos en células y tejidos,

restringiendo su aplicación segura en el ámbito biomédico [9]. Ante este panorama, es importante el diseño de nanomateriales de nueva generación que aseguren una liberación controlada, mayor biocompatibilidad y estabilidad, capaces de mantener su eficacia antimicrobiana en el tiempo e incluso al ser incorporados en matrices poliméricas.

El presente trabajo plantea el análisis del comportamiento toxicológico y ambiental de nanozimas antibacterianas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde utilizando extracto de *Ageratina pichinchensis* (Axihuitl) y su incorporación en membranas poliméricas de PVA/PAA. La evaluación integral de estos aspectos permitirá el desarrollo de un nanomaterial biocompatible y biodegradable, contribuyendo al diseño de alternativas más sostenibles y eficaces frente a la resistencia bacteriana.

## 1.3 Justificación

La creciente resistencia bacteriana constituye una crisis global que exige soluciones terapéuticas eficaces, seguras y sostenibles. Si bien los nanomateriales han demostrado un notable potencial antimicrobiano, sus propiedades fisicoquímicas también pueden generar riesgos toxicológicos, lo que exige estrategias de diseño que no solo se centren en su eficacia, sino también en su seguridad y compatibilidad con sistemas biológicos.

Por lo que este proyecto propone la síntesis verde de nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utilizando extracto de *Ageratina Pichinchensis*, una planta medicinal mexicana con reconocidas propiedades biológicas, como alternativa ecológica y novedosa frente a los métodos de síntesis convencionales.

La incorporación de estas nanozimas en membranas poliméricas de PVA/PAA, materiales biocompatibles y biodegradables, permite ampliar su campo de aplicación en el ámbito biomédico mediante el desarrollo de apósitos o sistemas de liberación controlada con actividad antibacteriana.

Asimismo, la caracterización estructural y morfológica permitirá comprender cómo las condiciones de síntesis influyen en el desempeño catalítico y antibacteriano de las nanozimas, generando conocimientos que fortalece tanto la base científica como la aplicación funcional del material.

Este enfoque busca contribuir al diseño de nanomateriales multifuncionales, biocompatibles y ambientalmente seguros, respondiendo a una necesidad urgente de alternativas antimicrobianas que no solo enfrenten la resistencia bacteriana, sino que también se alineen con criterios de sostenibilidad y seguridad en salud.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Analizar la actividad toxicológica y ambiental de las nanozimas antibacterianas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas mediante síntesis verde e incorporadas en una membrana polimérica.

### 1.4.2 Objetivo específico

- Sintetizar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas y enzimáticas de las nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas mediante un extracto natural.
- Incorporar y analizar la interacción de las nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en una membrana polimérica de PVA/PAA.
- Evaluar el efecto antibacteriano de las nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y del compuesto nanozimas PVA/PAA-Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar el impacto citotóxico de las nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y del compuesto nanozimas PVA/PAA-Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mediante ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad.
- Evaluar el impacto ambiental del compuesto nanozimas PVA/PAA-Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mediante pruebas de biodegradación.

## 1.5 Hipótesis

La síntesis verde de nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a partir de un extracto natural, incorporadas en una membrana polimérica, favorecerá la fabricación de un material antibacteriano, biocompatible y biodegradable que no generará un efecto tóxico en la salud humana y en el medio ambiente.

# 2

## Síntesis y caracterización de nanozimas

### 2.1 Introducción

Las nanozimas son nanomateriales con capacidad catalítica similar a las enzimas naturales, capaces de imitar actividades enzimáticas como la peroxidasa, oxidasa o catalasa. Esta versatilidad enzimática ha generado un creciente interés en su aplicación en áreas biomédicas, ambientales y analíticas. En el área biomédica, una de las aplicaciones más relevantes de las nanozimas es su comportamiento antibacteriano, atribuido principalmente, a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de inducir daño oxidativo en la membrana celular bacteriana y comprometer su viabilidad celular [17].

Por otro lado, las nanozimas ofrecen ventajas frente a las enzimas naturales como, mayor estabilidad, menor costo, versatilidad y fácil producción [11]. Entre los materiales más estudiados para el desarrollo de nanozimas, los óxidos de hierro, como la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), han mostrado gran versatilidad para imitar múltiples actividades enzimáticas como la peroxidasa, la oxidasa y catalasa. Además, el dopaje con metales como el cobre, ha demostrado potenciar sus propiedades catalíticas [15]. Estas características, en conjunto con la incorporación de compuestos fitoquímicos como agentes reductores y estabilizantes, permiten diseñar nanozimas de forma sustentable y sin comprometer su actividad catalítica [27].

Este capítulo aborda el desarrollo de nanozimas basadas en óxidos de hierro dopados con cobre (NZs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_3$ ), obtenidas mediante síntesis verde utilizando un extracto vegetal de una planta medicinal tradicional mexicana. Esta estrategia de obtención busca aprovechar los compuestos fitoquímicos presentes en las plantas como agentes reductores y estabilizantes, proponiendo un enfoque sustentable para la producción de nanomateriales

funcionales. Adicionalmente, se describen los procedimientos empleados para su obtención, así como los análisis realizados para su caracterización fisicoquímica, con el fin de determinar su composición, morfología y estructura cristalina. Estos resultados permitieron establecer la relación entre sus propiedades estructurales y su posible desempeño funcional.

Posteriormente, se evaluó su actividad tipo peroxidasa mediante ensayo colorimétrico, basado en la oxidación del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este análisis permitió conocer su capacidad catalítica, así como su respuesta frente a diferentes concentraciones de sustrato.

Finalmente, se llevó a cabo la validación antibacteriana de las nanozimas frente a cepas representativas de *Staphylococcus aureus* en tiempos de exposición cortos, considerando su eficacia bajo condiciones fisiológicamente relevantes. Los resultados obtenidos aportan evidencia del potencial de estas nanozimas como agentes bioactivos, con posibles aplicaciones en el desarrollo de terapias alternativas para el control de infecciones bacterianas resistentes.

## **2.2 Marco teórico**

### **2.2.1 Definición y ventajas de las nanozimas frente a las enzimas naturales**

Las nanozimas son enzimas sintéticas basadas en nanomateriales con propiedades intrínsecamente similares a las enzimas naturales, ya que producen los mismos productos catalíticos que las enzimas, utilizando los mismos sustratos [28]. A diferencia de las enzimas naturales, las nanozimas no presentan estructuras proteicas, sino que están compuestas de nanoestructuras inorgánicas u orgánicas, como metales, óxidos metálicos o materiales a base de carbono [29], lo que les confiere propiedades únicas, como tamaño, morfología y área superficial [30], permitiéndoles aumentar su eficiencia catalítica. Además, al ser enzimas artificiales, buscan resolver las principales limitaciones de las enzimas naturales, como su baja estabilidad catalítica, elevado costo y complejidad en procesos de producción [11], [12]. En ese sentido, las nanozimas son más estables que las enzimas convencionales, especialmente en condiciones extremas de pH y temperatura elevada, debido a su tamaño nanométrico y composición, por lo que pueden resistir la degradación que normalmente afecta a las proteínas [31], [32], [33].

Las nanozimas muestran especificidad por los sustratos con los que interactúan; sin embargo, su especificidad hacia el sustrato es limitada en comparación con las enzimas [34],

ya que las nanozimas pueden poseer múltiples actividades similares a las enzimas, lo que les permite participar en reacciones en cascada [35]. Además, otra propiedad importante de las nanozimas es que presentan mecanismos de reacción y cinéticas similares a las enzimas naturales, y solo aceleran las velocidades de reacción, pero no alteran el equilibrio de reacción [36].

Gracias a su composición versátil, tamaño nanométrico, elevada área superficial y comportamiento catalítico similar al de las enzimas naturales, se ha impulsado la aplicación de las nanozimas en áreas como: diagnóstico biomédico, detección colorimétrica, eliminación de contaminantes y en el desarrollo de terapias antimicrobianas.

## 2.2.2 Actividades enzimáticas imitadas y sus aplicaciones

Las nanozimas se caracterizan por su capacidad para imitar distintas actividades enzimáticas presentes en sistemas biológicos. Entre las más estudiadas se encuentran las actividades tipo peroxidasa (POD), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y oxidasa (OD), cada una con mecanismos catalíticos particulares que les confieren aplicaciones específicas en campos biomédicos, ambientales y analíticos.

Las nanozimas con actividad catalítica similar a la peroxidasa catalizan la oxidación de un sustrato (como el TMB), en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Durante este proceso, facilitan la transferencia de electrones, permitiendo la reducción del  $H_2O_2$  a agua ( $H_2O$ ) y la oxidación del sustrato a un producto coloreado, lo cual resulta útil en sistemas de detección colorimétrica [37]. Además de su aplicación analítica, esta actividad también ha sido aprovechada en el desarrollo de estrategias antimicrobianas, ya que muchas bacterias liberan pequeñas cantidades de  $H_2O_2$  como parte de su metabolismo. Esto permite a las nanozimas generar especies reactivas de oxígeno (ROS) in situ, capaces de inducir daño oxidativo en la membrana celular bacteriana y comprometer su viabilidad celular [17].

Por su parte, las nanozimas con actividad tipo oxidasa catalizan la oxidación directa de sustratos utilizando oxígeno molecular como receptor de electrones, sin necesidad de cosustratos como el  $H_2O_2$  [38]. Esta propiedad ha sido especialmente útil en biosensores y sistemas de diagnóstico, al permitir una detección más directa y selectiva de biomoléculas. Las nanozimas con actividad tipo catalasa, descomponen el  $H_2O_2$  en oxígeno y agua, lo que resulta particularmente valioso en la reducción del estrés oxidativo en entornos fisiológicos [39], mientras que la actividad de superóxido dismutasa descomponen el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en  $H_2O_2$  con la liberación de oxígeno molecular [40].

Cada una de estas actividades le confiere a las nanozimas propiedades específicas que han sido aprovechadas en múltiples aplicaciones. En la tabla 1 se resumen diversos nanomateriales con actividad catalítica similar a las enzimas, junto con sus aplicaciones y

resultados más relevantes. Como se puede observar, las nanozimas han mostrado propiedades catalíticas que destacan en la detección de biomoléculas, terapias antibacterianas, eliminación de contaminantes, así como en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, entre otros.

Tabla 1 Nanomateriales con actividad catalítica similar a las enzimas, junto con sus aplicaciones y resultados más relevantes

Material	Actividad catalítica	Aplicación	Resultados	Referencia
Hemin@BSA@ZIF-8	Peroxidasa	Detección colorimétrica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y glucosa	Encapsulación en ZIF-8 mejoró notablemente la actividad catalítica. Utilizada en inmunoensayos.	[41]
Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> dopada con Cu <sup>+</sup>	Peroxidasa	Terapia antibacteriana y cicatrización de heridas	Plataforma sinérgica catalítica-fototérmica. El dopaje con Cu <sup>+</sup> mejora la eficiencia catalítica.	[42]
Ce-FITC@ATP	Oxidasa	Diagnóstico por imagen y tratamiento antibacteriano	Generación selectiva de O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> inducida por ATP. Eficiente a PH fisiológico.	[43]
Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -OV	Oxidasa	Detección colorimétrica de L-cisteína.	Selectividad s a L-Cys frente a otros aminoácidos (GSH, Ser, Gly)	[44]
Nanosondas mesoporosas de PdPt recubiertas de MnO <sub>2</sub>	Peroxidasa Catalasa Superóxido dismutasa	Tratamiento del daño hepático inducido por paracetamol	Eliminación de ROS intracelular.	[45]
AuNPs	Peroxidasa Catalasa	Tratamiento de colitis inducida por dextrano sulfato sódico	Actividad dual regulada por pH. Eliminación de ROS intracelular.	[46]

			Tratamiento in vivo eficaz.	
Cu-SAzyme	Superóxido dismutasa	Tratamiento de sepsis	Eliminación de ROS, protección de ADN y reducción de TNF- $\alpha$ e IL-6 en células RAW264.	[47]
CeO <sub>2</sub> PCFs	Catalasa Superóxido dismutasa	Eliminación de ROS y contaminantes aromáticos	Adsorción de benzo[a]pireno (B[a]P).	[48]
Mn-SAzyme	Superóxido dismutasa	Biosensado ultrasensible de acetamiprid	Sin actividad tipo catalasa o eliminación directa de •OH. Alta selectividad y exactitud en muestras reales.	[49]

En conjunto, las nanozimas representan una plataforma versátil con un amplio rango de aplicaciones, determinadas por la combinación de la composición química, tamaño nanométrico, elevada área superficial y actividad catalítica, lo que determina su aplicación en distintas áreas.

En particular, algunas nanozimas han demostrado un desempeño notable en áreas biológicas al generar especies reactivas capaces de comprometer la integridad celular de microorganismos patógenos, lo que ha impulsado su estudio como agentes con potencial antibacteriano.

### 2.2.3 Aplicaciones antibacterianas de nanozimas

Existen diversos agentes antibacterianos basados en nanozimas, entre los que destacan aquellos compuestos por cobre, metales nobles, carbono y óxidos de hierro. Por ejemplo, se ha reportado la síntesis de una enzima artificial a base de hidrogel con contenido de cobre, que presentó actividad intrínseca similar a la POD y mostró actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas resistentes a múltiples fármacos. Además, los iones de cobre contribuyeron a mejorar la cicatrización de heridas al estimular la deposición de colágeno y la angiogénesis [50]. Adicionalmente, en otro estudio, determinaron que las nanobarras de óxido de cobre (CuO) activadas con luz visible, mejoraron su afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acelerando 20 veces más la producción de especies reactivas de oxígeno, potenciando su actividad antibacteriana [51].

Las nanozimas de oro soportadas sobre sílice mesoporosa bifuncionalizada, reportadas anteriormente [52], combinaron actividad tipo peroxidasa y oxidasa para eliminar *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), mediante la descomposición del  $H_2O_2$  en radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y la generación de ROS. Adicionalmente, en otro estudio, sintetizaron nanozimas bimetalicas de plata-paladio con actividad enzimática similar a la oxidasa, con actividad oxidasa que eliminaron bacterias resistentes y retardaron la aparición de resistencia bacteriana [53]. También, se han sintetizado esferas de carbono dopadas con nitrógeno, con notable actividad tipo peroxidasa que catalizó eficientemente  $H_2O_2$ , confiriéndole actividad antibacteriana significativa [54].

Por otra parte, las nanozimas de óxido de hierro han mostrado una actividad catalítica similar a la peroxidasa, capaz de catalizar la conversión de  $H_2O_2$  en radicales hidroxilo en ambientes ligeramente ácidos. Esta propiedad les permitió ejercer un efecto bactericida eficaz contra *E. coli* y *S. aureus*, aumentando además la sensibilidad térmica de las bacterias tratadas. Como resultado del tratamiento sinérgico entre las nanozimas y la exposición al calor, la tasa de inhibición bacteriana alcanzó casi el 100%. Adicionalmente, estas nanozimas mostraron un efecto positivo en la cicatrización de heridas infectadas con *S. aureus*, lo que refuerza su potencial terapéutico en el control de infecciones cutáneas [55].

En conjunto, las nanozimas han demostrado ser herramientas prometedoras en el desarrollo de terapias antimicrobianas, gracias a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno de forma controlada. Este potencial ha favorecido la investigación de distintos materiales con propiedades catalíticas, entre los que destacan los óxidos de hierro, particularmente la hematita y sus derivados metálicos, por su desempeño en ambientes biológicos.

#### **2.2.4 Nanozimas basadas en óxidos de hierro: hematita y sus derivados metálicos**

Las nanopartículas basadas en óxido de hierro, como las de magnetita y hematita, han sido ampliamente estudiadas como nanozimas debido a su versatilidad para imitar múltiples actividades enzimáticas como la peroxidasa, la oxidasa y catalasa [15] con estabilidad similar o superior a las enzimas naturales como la peroxidasa de rábano picante (HRP) [16], tomando en cuenta sus características intrínsecas a nano escala. Además, su bajo costo, biocompatibilidad y facilidad de producción las convierte en candidatos ideales para aplicaciones biomédicas, diagnóstico y remediación ambiental [56].

El dopaje con metales como el cobre, ha demostrado potenciar las propiedades catalíticas de las nanozimas [15] como el óxido de hierro, pues en un estudio se sintetizaron nanozimas

de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  dopadas con  $\text{CuOx}$  mediante un método químico, las cuales mostraron una alta actividad tipo peroxidasa al facilitar la rápida generación de ROS a partir del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estas nanozimas fueron efectivas contra *E. coli* y *S. aureus*, y al ser incorporadas en un apósito, lograron prevenir infecciones bacterianas y acelerar la regeneración de heridas, además de presentar baja toxicidad en modelos murinos [57]. Por su parte, los nanoclusters bimetalicos  $\text{Cu-Fe}_3\text{O}_4$  con propiedades multienzimáticas, mostraron actividad tipo peroxidasa, pero en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, exhibieron funciones similares a superóxido dismutasa y catalasa, mostrando actividad antibacteriana incluso frente a cepas resistentes a metilina [58].

En otro estudio, se sintetizaron nanopartículas de hematita mediante coprecipitación bajo diferentes iluminaciones de diodo emisor de luz (LED), obteniendo tamaños entre 20.6 y 28.9 nm. Las muestras mostraron actividad enzimática tipo peroxidasa, así como capacidad antioxidante, antimicrobiana y de inhibición enzimática (ureasa, lipasa y amilasa). Las nanozimas obtenidas bajo luz roja y verde destacaron por su efecto antibacteriano frente a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *S. aureus* resistentes a metilina [59]. Otro ejemplo de la aplicación de la hematita para el desarrollo de nanozimas, es el estudio donde, se sintetizaron nanopartículas de  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  con morfologías de prisma hexagonal, cúbica y barras, evaluando su actividad peroxidasa tipo nanozima mediante la oxidación de TMB en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las nanoestructuras en forma de barra mostraron mayor eficiencia catalítica, con menores valores de  $K_m$  y mayores de  $V_{\max}$  y  $K_{\text{cat}}$ . Este comportamiento se atribuyó a su estructura unidimensional y a su porosidad circular, resaltando su potencial en aplicaciones biomédicas, biosensado y catálisis enzimática artificial [60]. Además, el uso de estas nanozimas no se limita a aplicaciones biológicas, pues en un estudio reportaron nanozimas de óxido de hierro dopadas con cobre con actividad tipo oxidasa, capaces de activar peroxodisulfato para degradar contaminantes como el azul de metileno, lo que extiende su aplicación a la remediación ambiental [61].

En conjunto, las nanozimas basadas en óxidos de hierro, incluyendo la hematita y sus derivados dopados, han demostrado un desempeño catalítico destacable, con aplicaciones que abarcan desde la biomedicina hasta la remediación ambiental. Si bien la mayoría de estos materiales se han obtenido mediante métodos de síntesis tradicionales como la coprecipitación, hidrotermal o síntesis química, el creciente interés por alternativas más sostenibles ha impulsado el desarrollo de rutas de síntesis verde, las cuales ofrecen una producción más simple, económica y ambientalmente compatible, sin comprometer la funcionalidad catalítica de las nanozimas.

## 2.2.5 Síntesis verde de nanozimas

La síntesis verde de nanozimas representa una alternativa frente a los métodos tradicionales, al permitir su producción a gran escala de manera no tóxica, amigable con el medio ambiente y económica, ya que utiliza extractos de plantas, jugo de frutas, entre otros, como agente reductor y estabilizante, mediante un proceso de óxido-reducción [27]. En la tabla 2 se resumen algunos ejemplos de la obtención de nanozimas por síntesis verde.

Tabla 2 Nanozimas obtenidas por síntesis verde a partir de extractos vegetales

Nanozima	Extracto	Actividad similar enzimática	Morfología/tamaño	Aplicación	Referencia
NPs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Polvo de aguja de <i>Pinus</i>	Peroxidasa	Asimétrica	Detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[62]
AuNPs	<i>Prunus nepalensis</i>	Peroxidasa	Esférica / 2-15 nm	Detección de <i>Mycobacterium bovis</i>	[63]
Nanopartículas de selenio	<i>Hericium erinaceus</i>	Catalasa, peroxidasa, glutatión peroxidasa	Esférica / 11 nm	Protección celular	[64]
NPs Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	<i>Punica granatum</i>	Peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa	Cúbica / 17.8 ± 6.5 nm	Catalítica	[65]
AuNPs	Extracto de agalla	Peroxidasa, glucosa oxidasa	Dodecaedros rómbicos, dodecaedros y bipirámide / 27.5 nm	Detección de glucosa	[66]
MoSe <sub>2</sub>	Planta de guía de Kudzu	Oxidasa	Nanohojas	Detección de hesperetina	[67]
Cu <sub>x</sub> Fe <sub>1-x</sub> O	<i>Punica Granatum</i>	Oxidasa	Esférica/66.17 nm	Degradación del tinte azul de metileno	[68]

Para que un extracto vegetal sea adecuado en la síntesis verde de nanozimas, debe contener una combinación suficiente de polifenoles, flavonoides, azúcares, proteínas y polisacáridos. Estas moléculas funcionan como agentes reductores y estabilizantes. Además, la concentración y proporción de estos fitoquímicos también determinan la uniformidad morfológica y la actividad final de la nanozima [69]. Bajo estos criterios, el extracto de *Ageratina pichinchensis* (axihuitl) se presenta como un candidato idóneo para la síntesis verde de nanozimas.

### 2.2.5.1 Axihuitl

*Ageratina pichinchensis* (H.B.K.) King & Rob., conocida comúnmente como axihuitl, es una planta nativa de México, distribuida en zonas templadas, que se caracteriza por ser un arbusto abundantemente ramificado con tallo erecto, hojas opuestas e inflorescencias agrupadas en capítulos [70]. En la figura 1 se muestra una imagen representativa de la planta de axihuitl. Su uso tradicional en la medicina herbolaria incluye tratamiento de heridas, afecciones dérmicas [18], infecciones micóticas [19], úlceras gástricas [20] y úlceras del pie diabético [71]. Los estudios fitoquímicos realizados sobre extractos alcohólicos y aceites esenciales de esta especie han revelado una diversidad de metabolitos secundarios, entre ellos flavonoides, benzofuranos, cromenos, derivados de acetofenona, así como compuestos fenólicos y terpenoides [72]. Entre los compuestos más relevantes se encuentran el 7-O-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-galactina con actividad cicatrizante en lesiones cutáneas en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina [18], benzofuranos con acción antifúngica [73] y la enecanescina responsable del efecto gastroprotector del Axihuitl [20].



Figura 1 Planta de *Ageratina pichinchensis*

En el contexto de la síntesis de nanomateriales, los fitoquímicos del Axihuitl, como flavonoides, benzofuranos, cromenos, poseen grupos funcionales como hidroxilos, carbonilos y anillos aromáticos [21] permiten actuar como agentes reductores y estabilizantes durante la obtención de nanopartículas metálicas, promoviendo así una síntesis verde eficiente [74]. Esto convierte al axihuitl no sólo en una fuente terapéutica tradicional, sino también en un recurso biotecnológico valioso. Su selección para la síntesis de nanozimas en este trabajo se fundamenta en la riqueza de metabolitos secundarios con grupos funcionales

capaces de actuar como agentes reductores y estabilizantes, así como en su uso histórico en la medicina herbolaria mexicana. Además, el limitado número de estudios que han explorado su aplicación en nanotecnología le confiere un carácter innovador como alternativa frente a otras plantas más ampliamente estudiadas.

## 2.3 Objetivo

Sintetizar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas y enzimáticas las nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas mediante un extracto natural.

## 2.4 Metodología

### 2.4.1 Materiales

Los reactivos utilizados en este estudio fueron: reactivo de fenol de Folin & Ciocalteu (Folin-C), etilenglicol, ácido gálico, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), peróxido de hidrogeno al 30%, acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) y peroxidasa de rábano picante (HRP), carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), todos adquiridos de Sigma-Aldrich. El sulfato de hierro heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) se adquirió de J.T Baker, mientras que el sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) se adquirió de Karal. Por su parte, el hidróxido de sodio (NaOH) y el dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirieron de Reactivos Química Meyer, y el ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH) de Fermont.

Para los ensayos de la actividad antibacteriana, se utilizó medio de cultivo BD™ Difco™ Mueller Hinton (MH) y agar bacteriológico BIOXON, ambos adquiridos de Becton Dickinson. La cepa de *Staphylococcus aureus* n.º 6538 se adquirió de American Type Cell Culture (ATCC).

### 2.4.2 Preparación del extracto de *Ageratina pichinchensis* (Axihuitl)

Se recolectaron hojas frescas de la planta silvestre *Ageratina pichinchensis* en Huitzilac, Morelos (19°01'16.0"N 99°15'53.7"W). Posteriormente, se lavaron con agua del grifo y se

enjuagaron con agua desionizada. Las hojas limpias se secaron a 40 °C hasta que estuvieron completamente deshidratadas. Una vez secas, se pesaron 20 g y se colocaron en 200 mL de agua destilada a 80 °C, manteniéndose en agitación constante durante 2 h. Al finalizar, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró con papel filtro de 8 µm, y posteriormente con uno de 1 µm, con el objetivo de eliminar residuos sólidos. Finalmente, el extracto se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min para eliminar partículas finas en suspensión que pudieran haber pasado el filtrado, y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

### 2.4.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto para la síntesis de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Previo a la síntesis verde de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> asistida con el extracto de axihuitl, se evaluó la capacidad antioxidante del extracto mediante el método de Folin-Ciocalteu, previamente reportado con algunas modificaciones [75], con el objetivo de estimar su potencial reductor frente a los precursores metálicos. Se realizaron pruebas por triplicado en el experimento.

Se utilizó ácido gálico como estándar, a partir del cual se preparó una solución madre de 100 mg/L y diluciones de 12, 16, 20, 24 y 28 mg/L, ajustadas con agua destilada. Adicionalmente, se preparó una solución 1 N del reactivo Folin-C y una solución 7.5 % p/v de carbonato de sodio. A partir de las soluciones antes mencionadas, se prepararon soluciones estándar como se muestra en la tabla 3. Las muestras se incubaron 1 h en oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm (BIOBASE BK-UV1800). A partir de estas lecturas se construyó una curva de calibración para cuantificar los polifenoles totales en el extracto.

Tabla 3 Reactivos para la preparación de las soluciones estándar

Muestra	Cantidad de H <sub>2</sub> O	Cantidad de ácido gálico	Solución Folin-Ciocalteu	Cantidad de Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Blanco	4.25	-	0.25	0.5
12 mg/L	3.75	0.5	0.25	0.5
16 mg/L	3.75	0.5	0.25	0.5
20 mg/L	3.75	0.5	0.25	0.5
24 mg/L	3.75	0.5	0.25	0.5
28 mg/L	3.75	0.5	0.25	0.5

La solución de trabajo con extracto de Axihuitl se preparó como se muestra en la tabla 4, de igual manera la solución se incubó durante 1 h en oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm.

Tabla 4 Reactivos para la preparación de la solución de trabajo.

Muestra	Cantidad de H <sub>2</sub> O	Cantidad de extracto (ml)	Solución Folin-Ciocalteu	Cantidad de Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Extracto de Axihuitl	3.75	0.5	0.25	0.5

La cuantificación de los polifenoles totales se obtuvo a partir de la ecuación de la recta de calibración, y el contenido de polifenoles se expresó en mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por gramo de peso seco (mg EAG/g de peso seco).

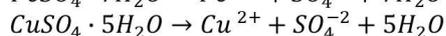
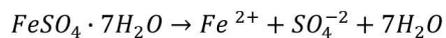
#### 2.4.4 Síntesis verde de NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Para la síntesis de NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, se emplearon soluciones precursoras de sulfato de hierro (II) heptahidratado y sulfato de cobre (II) pentahidratado. La solución de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O se preparó disolviendo 50.0002 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 800 ml de agua destilada (H<sub>2</sub>O dest.), bajo agitación constante a 500 rpm durante 1 h con 18 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 mL de etilenglicol y se continuó la agitación por 10 min adicionales.

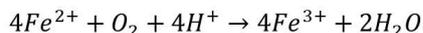
Posteriormente, se incorporó la solución de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, correspondiente al 6% en peso de iones metálicos de cobre (11.7829 g) con respecto al hierro, tal como se ha reportado en estudios previos [17], previamente agitada durante 1 h con 28 min a 500 rpm. Una vez mezcladas ambas soluciones, se agitó durante 10 min a 500 rpm. Después de ese tiempo, se añadieron 200 mL de extracto de axihuitl y se mantuvo la agitación durante 10 min adicionales.

La mezcla resultante se calentó a 60 °C con agitación constante durante 1 h con 30 min. Al finalizar, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1h y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 15 min para eliminar el sobrenadante. El sólido obtenido se lavó cuatro veces con H<sub>2</sub>O y tres veces con etanol al 96%, a 6000 rpm durante 15 min. Finalmente, se dejó secar en campana durante 72 h, se colocó en horno a 100 °C durante 11 h y se calcinó a 700 °C durante 4 h. En la figura 2 se muestran las reacciones químicas generales que se llevan a cabo en la síntesis antes mencionada.

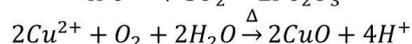
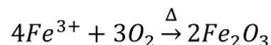
Disociación de los precursores



Reducción de iones



Formación de hematita y óxido de cobre



Incorporación del Cu a  $Fe_2O_3$

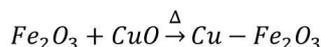


Figura 2 Reacciones químicas generales involucradas en la síntesis verde de NZs Cu- $Fe_2O_3$

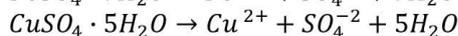
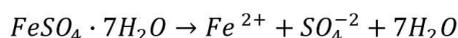
### 2.4.5 Síntesis química de NZs Cu- $Fe_2O_3$

La nanozimas de Cu- $Fe_2O_3$  obtenidas por síntesis química se sintetizaron mediante el método de coprecipitación, siguiendo la metodología establecida por [76] con algunas modificaciones. Para ello, se emplearon soluciones 0.2 M de sulfato de hierro (II) heptahidratado y sulfato de cobre (II) pentahidratado, disueltas por separado en 400 mL  $H_2O$  destilada. La cantidad de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  fue calculada para obtener un dopaje del 22.86% en peso de iones metálicos de cobre con respecto al hierro. Ambas soluciones se agitaron constantemente a 500 rpm durante 10 min y, posteriormente, se mezclaron lentamente bajo agitación constante, manteniéndose en agitación durante 10 min adicionales.

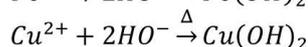
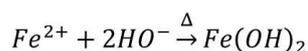
Transcurrido este tiempo, se añadió gota a gota una solución 0.4 M de NaOH bajo agitación vigorosa, favoreciendo así la formación del precipitado. Conforme se incrementa el pH del medio, comenzó a observarse la formación de un sólido de color oscuro, indicativo de la nucleación y crecimiento de las nanopartículas compuestas.

Una vez completada la precipitación, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 15 min para eliminar el sobrenadante. El sólido recuperado se lavó cuatro veces con  $H_2O$  y tres veces con etanol al 96%, a 6000 rpm durante 15 min. Finalmente, el material se secó en horno a 100 °C durante 11 h y se calcinó a 700 °C durante 4 h. En la figura 3 se muestran las reacciones químicas generales que se llevan a cabo en la síntesis antes mencionada.

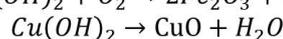
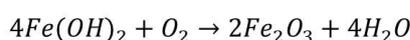
Disociación de los precursores



Formación de hidróxidos



Transformación térmica (calcinación)



Incorporación del Cu a  $Fe_2O_3$

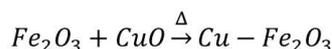


Figura 3 Reacciones químicas generales involucradas en la síntesis química de NZs Cu- $Fe_2O_3$

## 2.4.6 Caracterización fisicoquímica, estructural, morfológica, enzimática y antibacteriana NZs Cu- $Fe_2O_3$

### 2.4.6.1 Caracterización fisicoquímica, estructural y morfológica

Para determinar la composición química, estructura cristalina, tamaño y morfología las nanozimas, se utilizan diferentes técnicas de caracterización.

La composición química de las NZs Cu- $Fe_2O_3$  se determinó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU IRAffinity-1S en el rango de 450 a 4000  $cm^{-1}$ . Adicionalmente, la composición química se complementó mediante espectroscopía Raman para ello se utilizó un espectrofotómetro MicroRaman HORIBA Xplora con un detector CCD Sincerity, usando un láser de 638 nm como fuente de excitación, en el rango de 200 a 1800  $cm^{-1}$ . Por otro lado, la estructura cristalina se determinó mediante difracción de rayos X (DRX), mediante un difractómetro de rayos X Rigaku SmartLab (radiación  $CuK\alpha$ ,  $\lambda_{K\alpha1} = 1.540593 \text{ \AA}$ ,  $\lambda_{K\alpha2} = 1.544414 \text{ \AA}$ ). Los datos se recopilaron en el rango  $2\theta$  de ángulos de 10 a 100°. El análisis morfológico de las nanozimas se llevó a cabo mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) FEI Helios NanoLab™ 600 (8 kV) a 25,000 x y 150,000 x. Los diámetros promedio de las nanozimas se obtuvieron a partir de mediciones de imágenes SEM utilizando el software ImageJ (v. 1.54g, EE. UU.) y se presentaron en forma de histograma.

#### 2.4.6.2 Evaluación de la actividad catalítica similar a la peroxidasa y análisis cinético en estado estacionario de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

La actividad similar a la peroxidasa y la cinética en estado estacionario de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se evaluaron a partir de la oxidación catalítica del sustrato cromogénico TMB en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> siguiendo la metodología reportada por [77], con algunas modificaciones.

Para la evaluación preliminar de la actividad catalítica, se preparó una solución de reacción compuesta por 100 µg/mL de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 100 µL de una solución de TMB (10 mg/mL disuelto en DMSO) y 20.4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% p/p), todo ello en buffer de ácido acético-acetato de sodio (NaAc-HAc) (pH 3.4, 0.2 M), completando un volumen final de 2 mL. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, protegida de la luz directa debido a la fotosensibilidad del TMB. La concentración final del TMB fue de 0.5 mg/mL ( $\approx$ 2.08 mM) y la de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de 0.1 M. Inmediatamente después de la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se monitoreo la oxidación del TMB (oxTMB) mediante espectroscopía UV-Vis en el rango de 300 a 800 nm. La aparición de una banda a 652 nm se utilizó como indicador de la formación de la oxTMB y, por lo tanto, de la actividad catalítica similar a peroxidasa.

Una vez confirmada la actividad catalítica similar a peroxidasa a partir de la señal espectral característica a 652 nm, se procedió a la estandarización de la concentración de nanozimas. Para ello, se prepararon una serie de soluciones de reacción con un volumen final de 2 mL, compuestas por 100 µL de TMB (10 mg/mL), 20.4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % p/p) y NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a concentraciones de 10, 50 y 100 µg/mL, en buffer NaAc-HAc (pH 3.4). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y protegida de la luz. La oxidación de TMB se determinó mediante espectroscopía UV-Vis, registrando la absorbancia a 652 nm cada 30 s hasta los 400 s. Posteriormente, se calculó la velocidad inicial de reacción ( $V_0$ ) para cada concentración de NZs durante el primer minuto de reacción, utilizando la ley de Beer-Lambert (ecuación 1) [78].

Con base a esta estandarización de la concentración de nanozimas, se seleccionó la concentración de 50 µg/mL como la más adecuada para los ensayos cinéticos. A partir de esta concentración, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de TMB (0.05 a 5mM), manteniendo constante el volumen del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20.4 µL) y el volumen total de la reacción de 2 mL. La medición de la absorbancia a 652 nm se realizó cada 30 s durante el primer minuto de reacción. Las velocidades iniciales ( $V_0$ ) se calcularon nuevamente conforme a la ecuación 1 y los parámetros cinéticos de velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_m$ ) se obtuvieron mediante regresión no lineal en el software GraphPad Prism.

Ecuación 1 Ley de Beer-Lambert para el cálculo de la velocidad inicial de reacción

$$V_0 = \frac{\Delta A}{\Delta t * \epsilon * l}$$

Donde:

$\Delta A$ : Cambio de absorbancia (final-inicial)

$\Delta t$ : Cambio de tiempo (final-inicial)

$\epsilon$ : coeficiente de absorción molar del TMB a 652 nm (39000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

$l$ : longitud de la cubeta (1.25 cm)

### 2.4.6.3 Evaluación de la actividad antibacteriana NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

La actividad antibacteriana de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se evaluó frente a *S. aureus* (ATCC n° 6538) mediante el método de microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones de [79] con ligeras modificaciones.

Para ello, *S. aureus* se cultivó previamente en agar Mueller-Hinton a 37 °C durante 24 h, y posteriormente se inoculó en caldo MH, incubándose bajo las mismas condiciones. Este inóculo, se ajustó a una concentración aproximada de 1x10<sup>8</sup> UFC/mL. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas en caldo MH para obtener una concentración final de 1x10<sup>8</sup> UFC/mL.

Al mismo tiempo, se preparó una solución stock de NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 100 mg/ml en DMSO. A partir de este stock, se prepararon diluciones de 1000, 100 y 10 µg/mL, con el objetivo de evaluar concentraciones finales de 10, 1 y 0.1 µg/mL, respectivamente. Para ello, en cada pozo de una placa de 96 pocillos se añadieron 2 µL de la dilución correspondiente, 98 µL de caldo MH y 100 µL de suspensión bacteriana, alcanzando un volumen final de 200 µL por pozo.

Las placas se incubaron a 37°C durante 1 h. Como controles, se incluyeron pozos sin bacterias (control negativo), con bacterias sin tratamiento (control positivo) y con DMSO al 1% (v/v), para descartar efectos atribuibles al solvente. Finalmente, la actividad antibacteriana se calculó utilizando la ecuación 2.

Ecuación 2 Fórmula para calcular la actividad antibacteriana

$$\text{Actividad antibacteriana (\%)} = \frac{NC_{control} - NC_{tratamiento}}{NC_{control}}$$

Donde:

$NC_{control}$ : Número de colonias en el control positivo

$NC_{tratamiento}$ : Número de colonias en la muestra tratada con NZs

Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) para  $n > 2$ . El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey, utilizando el software Minitab Statistical Software. Se consideraron diferencias significativas según el siguiente criterio: ns = no significativo,  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$  y  $****p \leq 0.0001$ .”

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Capacidad antioxidante del extracto de Axihuitl

El extracto de Axihuitl mostró un contenido total de polifenoles de  $202.94 \pm 0.01$  mg EAG/g de peso seco (figura 4), valor comparable o incluso superior al reportado para otros extractos vegetales con reconocida capacidad antioxidante (tabla 5). Estos compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la síntesis verde de nanozimas, al actuar como agentes reductores y estabilizadores [80], permitiendo controlar el tamaño, forma y estabilidad de las nanozimas [81]. Además, los compuestos fitoquímicos presentes favorecen la reducción de iones metálicos [82] y promueve la formación de nanopartículas más pequeñas [83].

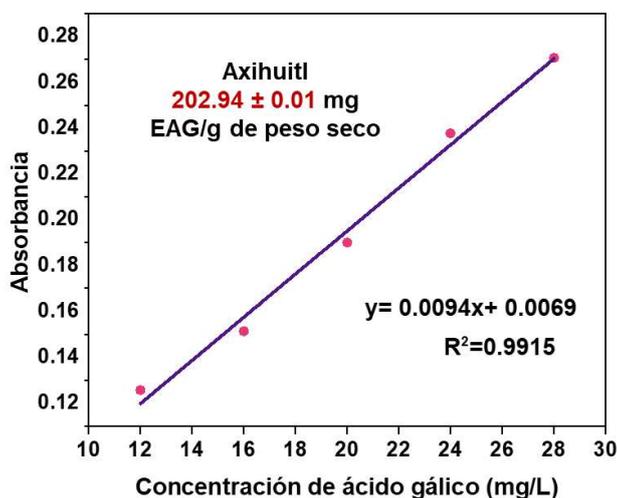


Figura 4 Curva de calibración para la estimación del contenido fenólico total a 765 nm

Tabla 5 Concentración de compuestos fenólicos de extractos con capacidad antioxidante

Extracto	CTP (mg EAG/g de peso seco)	Referencia
Cáscara de <i>Punica Granatum</i> (granada)	179.92 ± 1.31	[84].
<i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)	137.3 ± 15.6	[85].
Té verde	215 ± 2	[86].
<i>Moringa oleífera</i> (moringa)	31.56 ± 0.71	[87].
<i>Ageratina pichinchensis</i> (axihuitl)	202.94 ± 0.01	Este trabajo.

## 2.5.2 Composición química, estructura cristalina y morfología de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

### 2.5.2.1 Composición química de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

El análisis de la composición química de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (NZs SV) y síntesis química (NZs SQ), mediante espectroscopía FTIR (figura 5), permitió identificar los grupos funcionales presentes y evidenciar la participación de los compuestos fitoquímicos del extracto como agentes reductores de los precursores metálicos durante la síntesis [88], promoviendo así la formación de las nanozimas.

En el espectro correspondiente al extracto de axihuitl (figura 5 a), se observan señales características de sus fitoquímicos. La banda ancha entre 3500 y 3200 cm<sup>-1</sup> se atribuye al estiramiento del grupo funcional hidroxilo (–OH), característico de los compuestos polifenólicos, los cuales están estrechamente relacionados con la capacidad reductora del extracto, al ser capaces de donar electrones para facilitar la neutralización de especies reactivas y la reducción de iones metálicos durante la síntesis verde de nanopartículas [89]. Las bandas en 2925 y 2854 cm<sup>-1</sup> corresponden al estiramiento C–H de grupos metileno (–CH<sub>2</sub>), presentes en cadenas alifáticas de lípidos, carotenoides, carbohidratos y otros compuestos éster [90], biomoléculas que también desempeñan un papel importante en la reducción de iones y formación de nanopartículas [91]. La pequeña banda en 1735 cm<sup>-1</sup> se asocia al estiramiento del C=O del grupo carbonilo de ésteres [92], mientras que la banda intensa en ~1652 cm<sup>-1</sup> se atribuye al estiramiento del C=C del anillo aromático de los polifenoles [93], [94], mientras que la banda de 1050 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento del C–O de compuestos fenólicos [94].

Por otro lado, en el espectro de las NZs SV (figura 5 b), se observa una disminución o desaparición de las bandas asociadas a los fitoquímicos del extracto, lo que sugiere su participación directa en la formación de las nanozimas. En estudios anteriores, se ha reportado que los picos que permanecen inalterados tras la síntesis pertenecen a los grupos funcionales que son responsables de la estabilización de las nanopartículas [95]. En el espectro FTIR de las NZs SV se observa una banda intensa en  $586\text{ cm}^{-1}$  y una menos intensa en  $468\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a los modos de estiramiento y flexión del enlace Fe-O, los cuales también se observan en las NZs SQ (figura 5 c), con picos en  $518$  y  $431\text{ cm}^{-1}$  respectivamente [96]. Las vibraciones de Cu-O se encuentran en la misma región espectral que las de Fe-O, por lo que ambas contribuyen a una única señal, sin distinguirse por separado debido al solapamiento resultante del dopaje con cobre. [97].

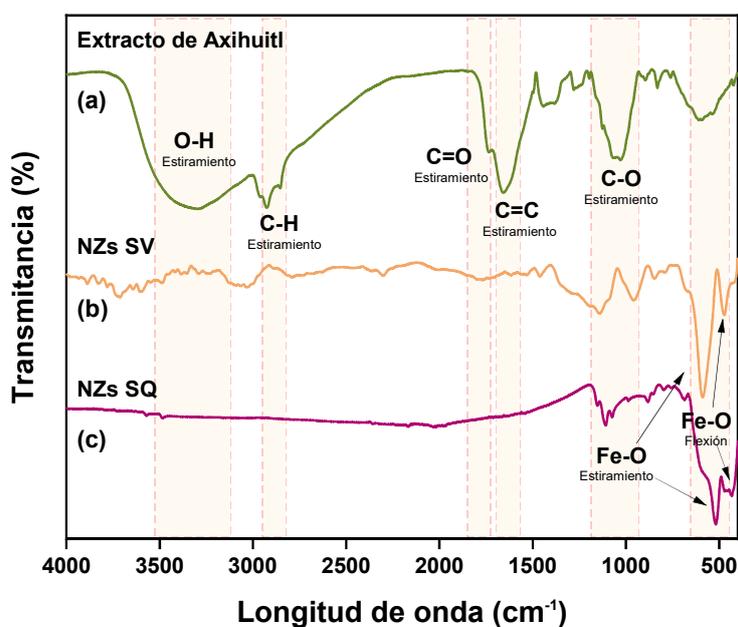


Figura 5 Espectro FTIR del extracto de Axihuitl (a) y de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (b) obtenidas por síntesis verde y (c) síntesis química.

Adicionalmente, la composición química de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se complementó mediante un análisis de espectroscopia Raman. En la figura 6 se observan los espectros correspondientes a las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde y síntesis química, así como una referencia de la Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [98]. En todos los espectros se observan bandas características de la fase hematita, así como alteraciones estructurales atribuibles al dopaje con iones de cobre (Cu<sup>2+</sup>). Cabe destacar, que en la región de  $200$  a  $700\text{ cm}^{-1}$ , la hematita presenta dos clases de modos activos Raman, el A<sub>1g</sub> y E<sub>g</sub> [99].

evidencia del potencial de estas nanozimas como agentes bioactivos, con posibles aplicaciones en el desarrollo de terapias alternativas para el control de infecciones bacterianas resistentes.

## **3.2 Marco teórico**

### **3.2.1 Composición y propiedades de las membranas poliméricas de PVA/PAA**

El poli (vinil alcohol) (PVA) es un polímero sintético hidrofílico y soluble en agua, constituido por una cadena principal de carbono con unidades repetitivas que contienen grupos hidroxilo. Su solubilidad se ve influida por el grado de hidrólisis y el peso molecular. Destaca por su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y cierta biodegradabilidad, atribuida a su capacidad para formar extensas redes de puentes de hidrógeno [22], [130], lo que ha favorecido su empleo en aplicaciones biomédicas como matrices para ingeniería de tejidos [131], sistemas de liberación controlada [132] y recubrimientos protectores [133]. El ácido poliacrílico (PAA) es un polímero sintético biocompatible, en forma de polvo blanco, higroscópico, rico en grupos carboxilo capaces de formar enlaces de hidrógeno o éster, [23], [134]. Estas interacciones facilitan su uso en hidrogeles, agentes espesantes y sistemas de liberación controlada

La combinación del PVA y PAA en membranas poliméricas permite aprovechar la sinergia entre la flexibilidad y resistencia del PVA y la capacidad de retención de agua y funcionalidad química del PAA. La miscibilidad de ambos polímeros se ve favorecida por la formación de enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo y carboxilo, lo que da lugar a redes poliméricas estables y homogéneas [135]. Gracias a estas propiedades, el sistema PVA/PAA se emplea ampliamente en la fabricación de nanofibras mediante electrohilado, obteniendo membranas porosas, uniformes y con alta superficie específica, adecuadas para aplicaciones biomédicas, filtración y liberación de agentes activos [136], [137].

#### **3.2.1.1 Fundamentos del electrohilado**

El electrohilado es una técnica electrodinámica para fabricar micro y nanofibras no tejidas, a partir de soluciones poliméricas, permitiendo obtener estructuras con alta superficie

específica, estructuras porosas jerárquicas, abundantes sitios activos y propiedades singulares de gran versatilidad [138].

El electrohilado está compuesto por una jeringa y aguja, bomba de inyección, fuente de alto voltaje y colector metálico, las fibras se generan cuando se aplica un alto voltaje eléctrico a una gota de polímero proveniente de la punta de la aguja, al aumentar continuamente el alto voltaje, la gota comienza a alargarse (chorro), adquiriendo una forma cónica conocida como “cono de Taylor”, cuando la repulsión electrostática supera la tensión superficial. De él emerge un chorro que se estira, sufre inestabilidades de flexión y solidifica por evaporación o enfriamiento antes de depositarse sobre el colector [139], [140], [141]. Voltaje, distancia entre aguja y colector, viscosidad, conductividad y tensión superficial controlan diámetro, uniformidad y porosidad de las fibras [142], así como de condiciones ambientales como temperatura y humedad.

Uno de los factores que influyen en el diámetro y morfología de las fibras es la distancia de la punta al colector, aunque en menor medida que otros parámetros; una distancia mayor favorece la formación de fibras más delgadas, mientras que valores extremos, ya sean demasiado largos o cortos, provocan goteo [143]. Otro factor relevante es la conductividad, que representa la densidad de carga y la repulsión de las cargas en la superficie del chorro de electrohilado, favoreciendo la elongación y estiramiento; soluciones con alta conductividad eléctrica tienden a generar fibras más delgadas, y una estrategia reportada para incrementarla es la adición de compuestos iónicos como sales [144].

Por otro lado, la tensión superficial de la solución influye en la formación del cono de Taylor y el inicio del chorro, ya que una tensión superficial alta combinada con una baja concentración de polímero favorece la formación de perlas, mientras que valores reducidos permiten iniciar el proceso a menor voltaje y obtener fibras lisas sin perlas, pudiendo ajustarse mediante disolvente o surfactantes [141], [145]. La viscosidad de la solución polimérica también es un factor clave en el proceso de electrohilado, que depende de la concentración y masa molar del polímero. Una viscosidad baja genera que el chorro se rompa antes de llegar al colector, originando electrospaying o fibras con perlas. Por otro lado un aumento moderado de la viscosidad favorece la formación de fibras continuas al incrementar las fuerzas viscoelásticas; sin embargo, también se aumenta el diámetro de las fibras. En cambio, soluciones con viscosidad excesiva pueden obstruir la aguja y dificultar el hilado [145]. En un estudio, determinaron que la viscosidad resultó ser el parámetro más crítico, ya que viscosidades bajas ( $< 0.12 \text{ Pa s}$ ) provocaron formación de gotas y defectos en la capa, mientras que viscosidades altas ( $> 0.19 \text{ Pa s}$ ) generaron fibras de gran diámetro aglomeradas [146], en este mismo estudio destacaron que parámetros como el voltaje o flujo pueden compensar parcialmente desviaciones, sin embargo la viscosidad sigue siendo el factor determinante para obtener fibras continuas y de alta calidad.

El electrohilado es una técnica versátil para fabricar membranas con aplicaciones biomédicas y funcionales gracias a las propiedades únicas de las fibras obtenidas, pues estas pueden presentar diámetros desde micras hasta nanómetros, alta porosidad, alineación controlada, gran relación de aspecto y elevada superficie específica. Además, el método permite ajustar la composición química y morfología mediante la modificación de parámetros de hilado antes mencionados, logrando membranas con baja densidad, alta resistencia mecánica y rigidez optimizada. Esta combinación de características favorece su aplicación en la liberación controlada de fármacos, andamios para ingeniería de tejidos, sistemas de filtración y dispositivos médicos avanzados [141], [147].

En síntesis, el electrohilado permite fabricar fibras con características controladas, donde la interacción entre parámetros operativos y propiedades de la solución define su morfología y funcionalidad, potenciando su aplicación en el desarrollo de membranas con desempeño específico en entornos biomédicos y tecnológicos. Esta versatilidad ofrece una plataforma ideal para la incorporación de nanozimas en matrices poliméricas, permitiendo no solo su inmovilización estable, sino también su exposición controlada al medio, aspecto clave para optimizar su desempeño catalítico y antibacteriano

## **3.2.2 Incorporación de nanozimas en matrices poliméricas**

### **3.2.2.1 Estrategias para la incorporación de nanozimas en matrices poliméricas**

La incorporación de las nanozimas en matrices poliméricas obtenidas por electrohilado puede realizarse mediante distintas estrategias que buscan lograr una dispersión uniforme y una adecuada interacción con la matriz. En las más empleadas se encuentra la técnica de un solo paso, a través de la dispersión previa de las nanopartículas en la solución polimérica, que permite su distribución homogénea durante la formación de las fibras [147], este método permite la preparación de nanofibras para cicatrización de heridas [148], regeneración celular [149], soluciones antimicrobianas [150], entre otros. La segunda técnica consiste en la producción de fibras en dos pasos, es decir, después del proceso de electrohilado, mediante métodos de procesamiento como reducción in situ [151], calcinación [152], método hidrotermal [153], entre otros.

La elección del método de incorporación no solo determina la presencia de las nanozimas en la estructura final, sino que también influye en cómo se distribuyen y se integran con la matriz, aspectos esenciales para garantizar un rendimiento óptimo del material en sus aplicaciones futuras.

### **3.2.2.2 Influencia de la incorporación de nanozimas en membranas poliméricas**

La incorporación de nanozimas en matrices poliméricas obtenidas mediante electrohilado pueden modificar sus propiedades morfológicas, mecánicas y funcionales de las membranas. La adición de nanozimas puede disminuir el diámetro de las fibras electrohiladas al incrementar la conductividad de la solución y/o modificar su viscosidad, lo que favorece un mayor estiramiento del chorro durante el electrohilado [154]. Además, el tamaño de las nanopartículas desempeña un papel importante ya que partículas más pequeñas tienden a generar fibras de menor diámetro, debido a al aumento de las fuerzas electrostáticas durante el proceso de hilado, lo que genera un mayor estiramiento y grados de orientación de las cadenas poliméricas [155], [156].

La adición de nanozimas también puede alterar la morfología superficial de la fibras, generando superficies más rugosas y, en algunos casos, incrementar la viscosidad de la solución de hilado, lo que amplía la la distribución de diámetros y modifica el tamaño de poro y la hidrofobicidad de la membrana [157]. Estos cambios estructurales no necesariamente afectan de forma negativa la porosidad global, pero sí inciden en su funcionalidad. En este sentido, la presencia de nanozimas con actividad catalítica puede conferir a la membrana propiedades específicas, como la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que contribuye a mitigar el daño celular y favorecer aplicaciones terapéuticas avanzadas, como promover la cicatrización de la herida [158] o potenciar el efecto bactericida [159].

En síntesis, la incorporación de nanozimas en matrices poliméricas obtenidas por electrohilado no solo modifica la morfología y las propiedades estructurales de las fibras, sino que también amplía su funcionalidad, permitiendo el desarrollo de membranas con capacidades específicas, como la eliminación de ROS, aplicables en áreas biomédicas avanzadas.

## **3.3 Objetivo**

Incorporar y analizar la interacción de las nanozimas de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en una membrana polimérica de PVA/PAA.

## **3.4 Metodología**

### 3.4.1 Materiales

Para la incorporación de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en las membranas poliméricas, se utilizó el poli (vinil alcohol) (Mw 89,000-98,000) y ácido poli(acrílico) (Mw ~450,000) adquiridos de Sigma Aldrich Co., Ltd.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se utilizó medio de cultivo BD™ Difco™ Mueller Hinton y agar bacteriológico BIOXON adquiridos de Becton Dickinson. Así como fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), adquiridos de J.T.Baker y cloruro de sodio (NaCl) adquirido de Golden Bell Reactivos, para preparar una solución buffer de fosfatos (PBS) 0.1630 M.

### 3.4.2 Síntesis de la membrana polimérica con la incorporación de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Se prepararon tres soluciones: una con NZs SV, otra con NZs SQ y una tercera sin la incorporación de nanozimas, la cual se empleó posteriormente como blanco en las pruebas correspondientes. En ambos casos con nanozimas, estas se incorporaron al 0.5 % p/p respecto a la masa total de polímeros. Posteriormente, se añadió poli (vinil alcohol) (PVA) al 10 % p/v, disolviendo 0.6667 g del polímero en agua. Esta cantidad se calculó considerando la proporción 3:1 (PVA: PAA), dividiendo el volumen total de solución (10 mL) entre tres partes, de las cuales dos correspondieron al PVA (6.667 mL) y una al PAA (3.333 mL). La mezcla se calentó a 80 °C a baño maría, con agitación constante durante 17 minutos hasta su completa disolución. A continuación, se incorporó ácido poli(acrílico) (PAA) al 5 % p/v, añadiendo 0.1667 g, procurando hacerlo de forma gradual para evitar la formación de aglomerados. La solución se mantuvo en agitación por 1 h 30 min, con calentamiento constante a 85 °C a baño maría.

Una vez preparada la solución, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente la solución cargó en una jeringa plástica de 5 ml con aguja metálica. El proceso de electrohilado se realizó en un equipo Giga IE® con colector rotatorio, bajo humedad relativa del 55-60%, a temperatura ambiente, depositando las fibras sobre papel aluminio colocado a 20 cm de distancia. Se utilizó una velocidad de alimentación 500 µL/h y un voltaje de 19 kV. Finalmente, las membranas obtenidas se reticularon a 60 °C 4 h.

### 3.4.3 Caracterización fisicoquímica y morfológica NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Para determinar la composición química, tamaño, morfología y mojabilidad de las fibras nanozimas, se utilizan diferentes técnicas de caracterización.

La composición química de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se analizó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), mediante un espectrofotómetro FT/IR-4X - Jasco Inc. en un rango de 450 a 4000 cm<sup>-1</sup>. La morfología de las fibras se examinó con un microscopio electrónico de barrido ZEISS EVO MA15, equipado con filamento de tungsteno (W), operado a (15 kV), con 1000x y 10,000x. El tamaño de partícula se estimó a partir del uso de ImageJ.

Por otro lado, la mojabilidad de las membranas se midió con goniómetro de ángulo de contacto KRÜSS DSA 30 mediante la técnica de gota sésil. Las muestras se midieron con una gota de agua desionizada (5 µl) en la superficie de cada una durante 30 segundos.

#### **3.4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

La actividad antibacteriana de las membranas con NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se evaluó según la norma ASTM 2149-01, con algunas modificaciones [160], utilizando *S. aureus* (ATCC 6538) como modelo biológico. Las muestras de 1 x 1 cm<sup>2</sup>, fueron irradiadas se irradiaron bajo luz UV durante 20 min para su esterilización y colocadas en placas Petri estériles que contenían secciones de papel filtro bien esterilizados y humedecidos con H<sub>2</sub>O estéril, funcionando como cámaras húmedas. Sobre cada muestra se depositaron se colocaron 20 µL de una suspensión de *S. aureus* (1x10<sup>5</sup> UFC/mL) y se a 37°C durante 1,3, 6 y 24 h. Transcurrido el tiempo de exposición, se retiró el papel filtro y cada muestra se lavó cuidadosamente con 3 mL de PBS en la caja Petri para recuperar las bacterias adheridas. De estas suspensiones, se sembraron 50 uL en agar Mueller-Hinton y se incubaron a 37 °C durante 16 h. La actividad antibacteriana de cada muestra se evaluó utilizando la ecuación 2, contando el número de colonias que crecían en cada placa.

Los datos se expresaron como media ± desviación estándar (SEM) para n > 2. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey, utilizando el software Minitab Statistical Software. Se consideraron diferencias significativas según el siguiente criterio: ns = no significativo, \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001 y \*\*\*\*p ≤ 0.0001.”

### **3.5 Resultados**

### 3.5.1 Composición química de las membranas poliméricas con la incorporación de NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

El análisis de la composición química de las membranas poliméricas antes (PVA/PAA) y después de la incorporación de NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (MSV) y síntesis química (MSQ), mediante espectroscopía FTIR (figura 14), permitió identificar los grupos funcionales presentes y evidenciar posibles interacciones entre el sistema polimérico y las nanozimas.

En el espectro correspondiente a la membrana sin modificar se observan señales características del PVA y PAA, como la banda ancha entre 3500 y 3114 cm<sup>-1</sup> atribuida al estiramiento del grupo funcional hidroxilo (O–H) del PVA y de los grupos carboxílicos (–COOH) presentes en el PAA [161], y las bandas de 2943 y 2916 cm<sup>-1</sup> correspondientes a las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo metileno (–CH<sub>2</sub>), respectivamente. La pequeña banda en ~1705 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) del PVA. Adicionalmente, las señales en 1418 y 1087 cm<sup>-1</sup> fueron asignadas a la flexión del grupo metileno (–CH<sub>2</sub>–) y al estiramiento del C–O del PAA, respectivamente [161], [162], [163], confirmando la presencia de ambos polímeros en la estructura.

Tras la incorporación de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, no se observaron nuevas bandas, lo que sugiere no se formaron nuevos enlaces que sugieran una reacción química entre los grupos funcionales del polímero y la superficie de las nanozimas, solo se observaron ligeras variaciones en la intensidad de ciertas bandas, lo que sugiere que la interacción entre las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y la membrana de PVA/PAA está relacionado con interacciones físicas que no fueron suficientes para alterar las vibraciones moleculares observadas [164]. Además, al no observarse bandas atribuibles a las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en el espectro FTIR, sugiere que la interacción molecular no se vio afectada por la baja concentración de NZs [165]. A pesar de que la incorporación de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> no generó nuevos enlaces químicos detectables por FTIR, ni alteró significativamente la composición funcional del sistema PVA/PAA, se ha documentado que la incorporación de nanopartículas puede inducir defectos en la red polimérica. Estos defectos no necesariamente se reflejan en el espectro infrarrojo, pero pueden tener implicaciones importantes en sus aplicaciones [166].

Este tipo de alteraciones estructurales, aunque no se manifiestan a nivel espectroscópico, podrían influir en la organización interna de la matriz y, por tanto, en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Por ello, resulta pertinente evaluar cómo la presencia de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se manifiesta en otros niveles del material, particularmente en lo referente a su morfología y distribución superficial.

de lactato deshidrogenasa (LDH) en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3), siguiendo umbrales de citotoxicidad de la ISO 10993-5:2009, lo que permitió identificar los efectos asociados a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Asimismo, se realizó un análisis morfológico mediante tinción con hematoxilina y eosina, con el propósito de identificar posibles alteraciones estructurales en las células expuestas.

La evaluación de la biocompatibilidad y citotoxicidad resulta indispensable en el estudio de nanozimas, ya que estos nanomateriales, aunque poseen propiedades catalíticas y antimicrobianas prometedoras, también pueden inducir respuestas adversas relacionadas con la liberación de iones metálicos, la generación de especies reactivas de oxígeno o la alteración de la integridad celular. En este sentido, validar su comportamiento frente a células modelo es esencial para diferenciar entre un efecto funcional y un posible riesgo tóxico. Esta necesidad responde no solo a criterios de seguridad biomédica, sino también a lineamientos internacionales que establecen la importancia de garantizar materiales seguros antes de considerar su incorporación en dispositivos o sistemas con contacto directo con tejidos vivos.

En este trabajo, la integración de los resultados permitió relacionar las propiedades fisicoquímicas de las nanozimas y del nanocompuesto con sus mecanismos de interacción celular, aportando evidencia sobre su comportamiento biológico y su viabilidad para su uso en dispositivos o sistemas con contacto directo con sistemas biológicos.

## **4.2 Marco teórico**

### **4.2.1 Biocompatibilidad**

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un material de coexistir con el tejido biológico en una aplicación determinada, permitiendo que cumpla su función prevista sin comprometer la salud o el bienestar. La “biocompatibilidad” es un concepto multidimensional que implica comprender cómo los materiales, tanto en sus propiedades a granel como en sus características superficiales, interactúan con los tejidos biológicos a nivel químico, metabólico, fisiológico y físico, con el fin de asegurar la seguridad y eficacia del material en contacto con un organismo vivo [180].

En este sentido, la viabilidad celular y la evaluación de la citotoxicidad constituyen métodos esenciales para verificar si un material cumple con los criterios de biocompatibilidad, al permitir identificar de forma directa la respuesta de las células frente a un material.

## 4.2.2 Citotoxicidad y viabilidad celular

La citotoxicidad describe la capacidad de un material, para causar daño o muerte celular, que puede manifestarse como disminución de la actividad metabólica, pérdida de la integridad de la membrana plasmática, alteraciones en la morfología y afectaciones en su capacidad regenerativa [181]. En la evaluación de biomateriales, la medición de la citotoxicidad es fundamental para determinar su seguridad, y se interpreta de acuerdo con criterios como los establecidos en la norma ISO 10993-5:2009, que define umbrales específicos para considerar un material como citotóxico o biocompatible. Según esta norma, para evaluaciones cuantitativas, una reducción de la viabilidad celular por parte de un material superior al 30 % respecto al control (es decir, una viabilidad >70 %) se considera potencialmente citotóxico, mientras que valores iguales o superiores al 70% se interpretan como ausencia de efecto citotóxico. En las evaluaciones cualitativas basadas en la morfología celular, la norma propone una clasificación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de 4 grados (0-4 grados), en la que los cambios observados, como redondeo celular, lisis o inhibición del crecimiento, permiten clasificar la respuesta como leve, moderada o severa [182].

## 4.2.3 Evaluación de la toxicidad de las nanozimas

Existen diversos métodos para evaluar la toxicidad de los nanomateriales en los organismos. Dentro de los que destacan los modelos de evaluación *in vitro* debido a sus ventajas como bajo costo, mayor rapidez y reducidas implicaciones éticas. Los modelos *in vitro* se pueden evaluar desde distintos enfoques que incluyen apoptosis, necrosis, estrés oxidativo y daño al ADN [183].

Entre los métodos más empleados en toxicología *in vitro* destacan los ensayos colorimétricos de viabilidad celular, que permiten cuantificar el número de células viables y funcionalmente activas en una muestra tras la exposición a un agente potencialmente tóxico [184]. Dentro de estos, el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) es ampliamente utilizado por su simplicidad, reproducibilidad y sensibilidad. Este método se basa en la conversión de MTT a cristales de formazán por la enzima deshidrogenasa presente en las células viables, el formazán presenta un color púrpura con una absorbancia máxima aproximadamente a 570 nm. De este modo, la intensidad de color medida por espectrofotometría es proporcional al número de células metabólicamente activas presentes en la muestra, cuanto más oscura sea la solución, mayor será el número de células viables y metabólicamente activas [185]. Sin embargo, el ensayo de MTT evalúa

únicamente la actividad metabólica y no permite distinguir si la señal observada se debe a muerte celular o a una reducción temporal de la actividad metabólica.

En ese sentido, es importante complementar esta técnica con otras que permitan evaluar la muerte celular, como el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH), que mide la citotoxicidad cuantificando la enzima LDH liberada por células tras su muerte celular debido a un daño o rompimiento de la membrana [186]. El mecanismo de este ensayo consiste que la enzima LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato, reduciendo la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), que después ocuparan las enzimas diaforasas para reducir el tetrazolio a formazán. El formazán rojo presenta una absorbancia máxima aproximadamente de 4902 a 520 nm. De este modo, la intensidad de color medida por espectrofotometría es proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio, que constituye un indicador directo de citotoxicidad [184]. La combinación de ambos métodos proporciona una visión más integral de la respuesta celular, al evaluar tanto el metabolismo activo como la integridad estructural de la célula.

A pesar de que los ensayos MTT y LDH proporcionan un enfoque claro del estado metabólico y estructural de las células, su aplicabilidad depende del modelo biológico seleccionado. En este contexto, los fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) constituyen una línea celular estándar y muy sensible a los nanomateriales [187], por lo que puede ser ampliamente utilizada en estudios de biocompatibilidad y toxicología, lo que la convierte en una herramienta ideal para evaluar citotoxicidad de nanozimas [188] con metodologías como MTT y LDH. En investigaciones previas se han demostrado que estas células responden de manera confiable a la detección de daño a la membrana plasmática mediante la liberación de LDH en entornos donde se evalúan nanomateriales [189].

#### **4.2.4 Factores que modulan la respuesta celular a nanozimas**

La magnitud y la naturaleza de la respuesta observada en la evaluación del estado metabólico y la integridad de la membrana no dependen únicamente del sistema de ensayo. Estas respuestas pueden variar significativamente en función de diversos factores físicos, químicos y experimentales asociados a las nanozimas y a las condiciones de exposición. Entre los más relevantes se encuentran la concentración y el tiempo de exposición, la aglomeración y sedimentación de las partículas en el medio de cultivo, así como propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la estabilidad coloidal y la presencia de fases secundarias, que influyen directamente en su interacción con las células y en procesos como la internalización o la liberación de iones.

La concentración y el tiempo de exposición determinan si una célula alcanza niveles tóxicos o adapta sus mecanismos de defensa, en un estudio determinaron que las

nanopartículas de plata (Ag NPs) redujeron la viabilidad celular de la línea celular de fibroblastos de piel humana normal dependiente de la concentración y tiempo. Además, la aglomeración y sedimentación incrementan el contacto físico entre nanozimas y células, lo que en algunos casos aumenta la citotoxicidad como en un estudio previo donde se informó sobre efecto citotóxico de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub> NPs) aglomeradas sobre células epiteliales (16HBE14o-, Caco-2 y THP-1) [190]. Finalmente, el tamaño, la estabilidad coloidal y la presencia de fases secundarias, influyen en la internalización, liberación de iones metálicos, disponibilidad de superficies activas y la generación de especies reactivas de oxígeno que influyen en la toxicidad celular [191], [192]. Esta compleja interacción de factores establece los fundamentos para comprender los mecanismos moleculares y fisiológicos que determinan a la citotoxicidad

#### **4.2.5 Mecanismos citotóxicos de las nanozimas**

Comprender la citotoxicidad provocada por las nanozimas implica analizar cómo las interacciones fisicoquímicas y celulares previamente descritas se traducen en daños específicos. Lejos de ser un proceso lineal, esta toxicidad suele activarse a través de rutas interrelacionadas. Entre ellas, la generación de ROS constituye el principal mecanismo responsable de la citotoxicidad de las nanopartículas, derivado de la reactividad fisicoquímica de las nanopartículas o por reacciones de tipo Fenton inducidas tras la liberación de iones metálicos [193]. Estas reacciones tipo Fenton se basan en la capacidad de iones metálicos de transición, como Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup>, para reaccionar con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y generar radicales hidroxilo, considerados entre las especies más reactivas capaces de inducir daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN [194].

Dichos procesos pueden promover inflamación, estrés oxidativo y daños acumulativos sobre la membrana plasmática y material genético, comprometiendo así la viabilidad celular [195]. Adicionalmente, la liberación de iones metálicos puede generar una sobrecarga de iones en la célula que altera la homeostasis, generando efectos tóxicos y la aparición de diferentes tipos de muerte celular [196]. Este desequilibrio redox puede desencadenar la pérdida de potencial eléctrico de la membrana interna mitocondrial, que facilita la apertura de canales de permeabilidad y la liberación del citocromo c, activando así cascadas enzimáticas (caspasa-3 y caspasa-9) responsables de la muerte celular programada. Este proceso suele estar acompañado por un aumento en la producción de ROS, daño oxidativo a biomoléculas y alteraciones en la producción de energía (ATP) y disminución del uso de antioxidantes como el glutatión, lo que en conjunto genera la pérdida de viabilidad celular [197]. La magnitud y la predominancia de cada una de estas rutas dependen no solo de las características intrínsecas de la nanozima, como tamaño, morfología, estabilidad coloidal y

presencia de fases secundarias, sino también de factores experimentales como la concentración, el tiempo de exposición y el microambiente celular.

#### **4.2.6 Programas y normativas internacionales y nacionales en nanomateriales**

La producción y las amplias aplicaciones de nanomateriales han generado preocupación sobre sus posibles afectaciones en el medio ambiente y los seres humanos. Actualmente, existe el programa de pruebas de nanomateriales fabricados de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCD) en el que se garantiza que las pruebas utilizadas para abordar la seguridad de los nanomateriales fabricados sean consistentes y defendibles [198]. Así como este programa existen diversas regulaciones sobre los nanomateriales como el Programa de Gestión de Materiales a Nanoescala implementado por la Agencia de protección ambiental (EPA) [199] y la ISO/TR 13121:2011 que describe el proceso para identificar, evaluar, abordar, tomar decisiones y comunicar los riesgos potenciales del desarrollo y uso de nanomateriales fabricados, con el fin de proteger la salud y la seguridad del público, los consumidores, los trabajadores y el medio ambiente [200].

En México, actualmente existen Normas Técnicas Mexicanas relacionadas con el impacto toxicológico y ambiental de los nanomateriales, tal es el caso de la NMX-R-13121-SCFI-2019 que evalúa el riesgo de los nanomateriales [201], la PROY-NMX-R16197-SCFI-2018 que ofrece una recopilación y descripción de métodos *in vitro* e *in vivo* que pueden ser útiles para el examen toxicológico, incluida la detección ecotoxicológica de los nanomateriales manufacturados [202], cabe destacar que estas normas son idénticas a la ISO/TR 13121:2011 Nanotechnologies-Nanomaterial risk evaluation e ISO/TR 16197:2014 Nanotechnologies-Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials [203].

Asimismo, la ISO 10993-5:2009 establece los para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de dispositivos médicos o de extractos obtenidos de estos, ya sea mediante contacto directo o por difusión. Estos ensayos determinan la respuesta biológica de células de mamífero utilizando parámetros biológicos apropiados. Aunque fue desarrollada para dispositivos médicos, sus lineamientos son también aplicables a nanomateriales con potencial uso biomédico, ya que estandarizan las condiciones de ensayo y la interpretación de resultados, facilitando la comparabilidad y reproducibilidad de los estudios.

Adicionalmente, en México existe el Sistema Nacional de Evaluación Toxicológica de Nanomateriales (SINANOTOX), conformado por una red de 9 laboratorios de evaluación toxicológica, especializados en nanomateriales con el fin de determinar el riesgo implicado

en el desarrollo y uso de nanomateriales [204], y llevar a cabo una colección de evidencias experimentales inducidas por diversos nanomateriales en diferentes abordajes y modelos biológicos que coadyuven, en su momento con la generación de regulaciones mexicanas en materia de nanotecnología.

## 4.3 Objetivo

Evaluar del impacto citotóxico las nanozimas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y del compuesto nanozimas PVA/PAA-Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mediante ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad.

## 4.4 Metodología

### 4.4.1 Materiales

Para la evaluación de la viabilidad celular y citotoxicidad de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y las membranas con su incorporación, se empleó medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y penicilina/estreptomina, ambos adquiridos de Gibco®, así como suero bovino de ternera (ATCC® 30-2030™) adquirido de ATCC y dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich ®), Triton X-100 (Bio-Rad Laboratories®).

Para la tinción de hematoxilina y eosina se utilizó formaldehído adquirido de (Reactivos Química Meyer®), hematoxilina y eosina adquiridos de Sigma Aldrich, ácido clorhídrico adquirido de J.T Baker y bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>, J.T Baker ®).

### 4.4.2 Evaluación de la viabilidad y citotoxicidad de las nanozimas

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT y la citotoxicidad, mediante el ensayo de LDH. Para ello las células de fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) se cultivaron en cajas de cultivo celular con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino de ternera (BSC) y 1% de penicilina/estreptomina, a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Cuando el cultivo celular alcanzó un 80% de confluencia, se sembraron

15,000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos. Tras 48h de incubación bajo las mismas condiciones, se verificó una confluencia celular del 100 %.

Una vez alcanzada esta confluencia, se retiró el medio de crecimiento y se inició el tratamiento con las nanozimas, ajustando el volumen final de 200 µl por pozo. Se evaluaron cinco concentraciones de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.1, 1, 10, 50 y 100 µg/ml), además de un control sin tratamiento y un control de daño (Triton X-100 al 0.5%). Los fibroblastos se expusieron al material durante 1, 3, 6, 12 y 24 h.

Finalizada la exposición, se tomaron 100 µL del medio de cultivo de cada pozo y se transfirieron a una nueva placa para realizar el ensayo de LDH, siguiendo el protocolo del kit de detección de citotoxicidad [205]. Brevemente, se preparó la mezcla de reacción (solución de catalizador y colorante), se agregaron 25 µl a cada pozo y se incubó durante 30 min a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, la absorbancia se midió a 490 nm. La liberación de LDH, considerada como un marcador directo de daño en la membrana celular, se expresó como porcentaje de citotoxicidad utilizando la ecuación 3.

Ecuación 3 Fórmula para el cálculo del porcentaje de citotoxicidad en células.

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{Abs.muestra} - \text{Abs.células sin tratamiento}}{\text{Abs.Triton X} - \text{Ab.células sin tratamiento}} * 100$$

El volumen restante de cada pozo se empleó para el ensayo MTT, siguiendo el protocolo del kit de proliferación celular I [206]. Se añadieron 10 µl de MTT a cada pozo y se incubó 4 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. La reacción se detuvo con 100 µl del tampón de solubilización, dejándose reposar toda la noche y posteriormente se midió la absorbancia a 562 nm. La viabilidad celular se determinó mediante la ecuación 4.

Ecuación 4 Fórmula para el cálculo del porcentaje de viabilidad celular en células.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Absorbancia del tratamiento}}{\text{Absorbancia de las células sin tratamiento}} * 100$$

#### **4.4.3 Análisis morfológico basado en la tinción de hematoxilina y eosina en fibroblastos**

El análisis morfológico mediante tinción de hematoxilina y eosina (H&E) en fibroblastos NIH 3T3, se realizó tras su exposición a 50 µg/mL de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> durante 1, 6 y 24 h, en placas de 12 pozos. Al finalizar cada tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con 2 ml de PBS para eliminar residuos del medio de cultivo. La fijación se llevó a cabo con formaldehído al 10 % en PBS durante 1 h. Posteriormente, se eliminó el

fijador y se realizaron lavados sucesivos con etanol 95 %, 80 % y 70 %, dos veces por concentración y con una duración de 2 minutos cada lavado, posteriormente se enjuagó con H<sub>2</sub>O 2 min 2 veces. La tinción nuclear se realizó con hematoxilina de Harris [207] durante 5 min, seguida de un lavado de 2 min con agua destilada y la diferenciación con HCl 1% en etanol al 70% durante 2s. Las muestras se enjuagaron nuevamente con agua destilada para eliminar el exceso de ácido y se lavaron durante 1 min con una solución NaHCO<sub>3</sub> 1 %, fin de intensificar el tono azul y neutralizar la hematoxilina. Posteriormente, se tiñó el citoplasma con eosina B al 1% durante 10 min, se lavó con agua 2 min y etanol al 70% para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, las muestras se deshidrataron mediante pasajes de etanol al 70%, 80% y 96%. Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio EVOS M5000 (Invitrogen) a 40 x en modo RGB Transmitted.

#### **4.4.4 Evaluación de la viabilidad y citotoxicidad de las membranas**

Para evaluar la viabilidad celular y citotoxicidad del lixiviado de las membranas, se siguió el mismo procedimiento descrito previamente para las nanozimas, con la diferencia de que, se añadió el extracto obtenido de las membranas en vez de la solución de nanozimas. Para ello, las membranas se incubaron en DMEM durante 24 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> en una proporción superficie/volumen de 6 cm<sup>2</sup>/ml para obtener el lixiviado [208]. Posteriormente, se añadieron 200 µl del extracto a cada pozo con células con 100 % de confluencia y se dejó en incubación durante 24 h. Al finalizar el tiempo de exposición, se realizaron los ensayos de LDH y MTT conforme a los protocolos ya descritos.

## **4.5 Resultados**

### **4.5.1 Impacto citotóxico de las NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en células de fibroblastos NIH3T3**

#### **4.5.1.1 Viabilidad celular**

Se evaluó el impacto de nanozimas de Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas mediante síntesis verde (SV) y síntesis química (SQ) sobre la viabilidad celular de fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) mediante el ensayo MTT. Se probaron cinco concentraciones (0.1, 1, 10, 50 y 100

Los resultados obtenidos se discuten en función de la estructura y composición de las membranas, la influencia de las nanozimas en la integridad mecánica y la porosidad, así como su potencial efecto sobre la actividad microbiana del medio. Con ello, se busca establecer la relación entre las propiedades fisicoquímicas del material y su comportamiento frente a procesos de biodegradación, aportando evidencia sobre su desempeño ambiental y su viabilidad para aplicaciones en las que la degradabilidad controlada sea un requisito clave.

## **5.2 Objetivo**

Evaluar el impacto ambiental del compuesto nanozimas PVA/PAA–Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mediante pruebas de biodegradación.

## **5.3 Marco teórico**

### **5.3.1 Biodegradación**

La biodegradación es el proceso de descomposición de la matriz polimérica inducido por la actividad de microorganismos presentes en el medio natural, tales como bacterias, hongos y algas [234], que liberan enzimas capaces de romper los enlaces de las cadenas poliméricas. Este proceso ocurre en etapas sucesivas que incluyen el biodeterioro de la superficie, la despolimerización mediante hidrólisis u oxidación, la asimilación de los fragmentos generados y su mineralización final a compuestos simples como dióxido de carbono, agua y biomasa. La velocidad y extensión de este proceso dependen tanto de la estructura química del polímero como de factores intrínsecos de la formulación [235], por ejemplo, la presencia de nanopartículas que pueden modificar la porosidad, la integridad mecánica [166] y la interacción con la comunidad microbiana del entorno [236].

#### **5.3.1.1 Mecanismos de degradación**

La comprensión de este proceso requiere identificar las etapas que lo conforman y los mecanismos específicos implicados en cada una. De manera general, la biodegradación de materiales poliméricos puede desarrollarse en distintos periodos de tiempo, según las normas ASTM D5988-18, siendo 6 meses el período recomendado [237] y bajo diversas condiciones

ambientales, preferentemente de manera natural y sin intervención humana. Este proceso comprende cuatro fases principales: biodeterioro, biofragmentación (despolimerización), asimilación y mineralización, solo se considera que un plástico ha sido realmente biodegradado cuando se confirma su completa mineralización.

- Biodeterioro: Es un complejo proceso de alteración inducidos por el crecimiento, la actividad metabólica de microorganismos y factores abióticos que generan un cambio indeseable en las propiedades del polímero [238].
- Biofragmentación: Consiste en la despolimerización, en la cual los compuestos catalíticos liberados por los microbios (como enzimas y radicales libres) descomponen los polímeros progresivamente para formar intermediarios más pequeños y simples, que se disuelven fácilmente en agua y luego puedan ser absorbidos por las células microbianas. [235].
- Asimilación: La asimilación ocurre en el citoplasma cuando los microorganismos ingieren las pequeñas moléculas producidas en la despolimerización se integran con el metabolismo microbiano para realizar funciones básicas de su crecimiento y reproducción [239] .
- Mineralización: Etapa final del proceso de biodegradación que ocurre de manera simultánea a la asimilación, pues cuando los microorganismos consumen todos los compuestos biodegradables, los átomos de carbono se convierten en CO<sub>2</sub> y moléculas de agua dentro de la célula [239].

Los mecanismos de biodegradación descritos son aplicables a una amplia gama de polímeros biodegradables, ya que estos materiales están formulados para ser susceptibles a la acción de microorganismos en condiciones ambientales. Así, la comprensión de estos mecanismos resulta esencial para optimizar la formulación y el desempeño ambiental de los polímeros biodegradables.

### **5.3.2 Polímeros biodegradable**

Los polímeros biodegradables son materiales cuyas cadenas poliméricas pueden ser fragmentadas por la acción de microorganismos, resultando en productos simples como dióxido de carbono, agua y biomasa en un plazo razonable y bajo condiciones específicas. Este comportamiento está directamente vinculado a los mecanismos de biodegradación previamente descritos, que operan de forma secuencial o simultánea según la naturaleza del polímero y del entorno en el que se encuentre. Cabe destacar que la biodegradación de los

polímeros depende principalmente de la estructura química y no del origen (petróleo o biomasa) [240].

En términos generales, los polímeros biodegradables pueden clasificarse según su origen en: (i) polímeros naturales, obtenidos directamente de recursos biológicos (almidón, celulosa, quitosano, proteínas) [241]; (ii) polímeros sintéticos de base biológica, producidos a partir de monómeros renovables mediante síntesis química o biotecnológica (ácido poliláctico (PLA), polihidroxialcanoatos (PHA)) [242]; y (iii) polímeros sintéticos derivados del petróleo pero biodegradables, que incorporan enlaces y grupos funcionales hidrolizables en su estructura (poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(vinil alcohol) (PVA), ácido poliacrílico (PAA)) [243]. Cada grupo presenta ventajas y limitaciones específicas en cuanto a procesabilidad, estabilidad y velocidad de degradación.

La eficacia de la biodegradación de los polímeros está estrechamente relacionada con sus propiedades intrínsecas, como se ha reportado en la literatura reciente. Un estudio destaca que aspectos como la estructura química, morfología, tratamientos y peso molecular son factores clave del proceso de biodegradación, ya que afectan la hidrólisis, la accesibilidad difusiva de enzimas y los enlaces susceptible a degradación [244]. Además, de la accesibilidad de la estructura para la humedad y la difusión enzimática, así como la capacidad de los microbios del entorno para asimilar los monómeros finales [245].

Existen múltiples normas para evaluar la biodegradación de plásticos en diferentes medios, entre ellas ASTM D6400 (compostaje industrial), ASTM D6691 (medio marino) e ISO 17556 (suelo)[240]. Particularmente, la norma ASTM D5988-18 establece un método estandarizado para determinar la biodegradación aeróbica de materiales plásticos en suelo midiendo la evolución de CO<sub>2</sub>, comparada con la cantidad teórica esperada. Este ensayo utiliza suelos con diversidad microbiana y condiciones controladas de humedad y temperatura, y es ampliamente empleado para evaluar la degradabilidad de polímeros destinados a aplicaciones terrestres, como en el caso de materiales biomédicos biodegradables (férulas, suturas o apósitos) que, tras su uso, pueden ser dispuestos en suelos controlados para su degradación [237].

## **5.4 Metodología**

### **5.4.1 Materiales**

Para la evaluación de la biodegradación del nanocompuesto PVA/PAA–Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se emplearon tres tipos de suelo (agrícola, de bosque y de pradera), sustrato de perlita (Ekologi), frascos de vidrio herméticos de 1 L (Ball®), separadores de pizza, papel filtro de celulosa (Whatman®). Fenolftaleína adquirido de Sigma Aldrich, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio adquiridos de Reactivos Química Meyer ®.

## **5.4.2 Ensayo de biodegradación**

### **5.4.2.1 Montaje del experimental para la evaluación de la biodegradación del nanocompuesto**

La evaluación de la biodegradación del nanocompuesto PVA/PAA–Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se llevó a cabo conforme a la norma ASTM D5988-18. Se emplearon tres tipos de suelo: agrícola, de bosque y de pradera. El suelo agrícola se adquirió como tierra preparada para plantas/huertos (Ekologi), el suelo de bosque se adquirió de la localidad de San Juan Tlacotenco, Tepoztlán, Morelos (19°01'05.7"N 99°06'08.6"W) y el suelo de pradera se adquirió de la localidad de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro (20°28'14.5"N 99°55'43.5"W). Todos los suelos, se secaron al aire, se tamizaron a través de una malla de 2 mm y se homogenizaron antes de su uso.

Para la preparación del suelo, se humedecieron 18 kg de suelo con 800 mL de agua, hasta obtener una pasta compacta al ejercer presión manual. De manera similar, se humedecieron 120 g de perlita con 300 mL de agua, hasta alcanzar una humedad perceptible sin generar escurrimiento.

El montaje experimental consistió en colocar, dentro de cada frasco, una capa inicial de 13.4 g de perlita, seguida de 99 g de suelo. Sobre esta base se dispuso la muestra del nanocompuesto con un área de 3x3 en posición horizontal, asegurando su contacto directo con el suelo y evitando dobleces o irregularidades. Posteriormente, se añadió una segunda capa compuesta por 99 g de suelo y 13.4 g de perlita. Finalmente, sobre las capas se colocó un separador rígido de pizza y, sobre este, una trampa de 20 mL hidróxido de sodio (NaOH 0.5 N), para cuantificar el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Los frascos fueron almacenados a temperatura ambiente en la oscuridad. En la figura 25 se muestra el esquema final del montaje.



Figura 25 Esquema del montaje experimental para la evaluación de la biodegradación del nanocompuesto PVA/PAA-Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### 5.4.2.2 Cuantificación del dióxido de carbono

La cuantificación del dióxido de carbono liberado durante el ensayo de biodegradación se realizó conforme a la metodología descrita en la norma ASTM D5988-18. Para ello, el CO<sub>2</sub> producido por la actividad microbiana fue capturado en una trampa de NaOH 0.5 N colocada en la parte superior de cada frasco, sobre un separador rígido que evitó el contacto directo con el suelo.

Cada 3 y 4 días, se retiró la trampa y se determinó la cantidad de CO<sub>2</sub> retenido mediante titulación con ácido clorhídrico (HCl 0.25 N) y fenolftaleína 1%. Las titulaciones se efectuaron durante un periodo total de 26 días manteniendo en todo momento las condiciones de humedad iniciales, a partir del monitoreo de peso. En cada titulación, los frascos se dejaron abiertos durante 15 min, para que el aire se renovara antes de reemplazar la solución de KOH fresca. La concentración de CO<sub>2</sub> se calculó a partir del volumen de HCl consumido, corrigiendo con los valores obtenidos en los controles de suelo sin material de prueba, de acuerdo con las ecuaciones establecidas en la ASTM D5988-18.

De forma complementaria, se registró el peso inicial de cada montaje y el peso individual de cada membrana antes de su entierro en el suelo, así como el peso final al concluir el ensayo. Esta medición permitió monitorear tanto la pérdida de humedad del sistema como la pérdida de masa del nanocompuesto, utilizada como indicador adicional del grado de

una interacción estable con las células y ausencia de daño significativo en membrana plasmática. En contraste, las nanozimas obtenidas por síntesis química presentaron una mayor reducción de la viabilidad celular, confirmando que la ruta de síntesis influye directamente en la respuesta biológica.

La incorporación de nanozimas Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> SV en membranas PVA/PAA produjo materiales con una estructura homogénea, que superaron la actividad antibacteriana de la membrana con nanozimas obtenidas por síntesis química. Asimismo, en las pruebas de biodegradación bajo la norma ASTM D5988-18, las membranas con nanozimas mostraron un incremento en la mineralización del carbono, especialmente en aquellas con aglomerados, sugiriendo que las nanopartículas pueden contribuir a la fragmentación y degradación de la matriz polimérica.

En conjunto, los resultados validan la hipótesis planteada, confirmando que es posible obtener un material antibacteriano, biocompatible y biodegradable mediante la síntesis verde e incorporación de nanozimas Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en membranas poliméricas, con potencial aplicación en el ámbito biomédico y ambiental, sin generar efectos tóxicos relevantes para la salud humana ni impactos negativos para el medio ambiente.

## 6.2 Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos, se considera pertinente profundizar en ciertos aspectos que podrían fortalecer el entendimiento y aplicación de las nanozimas Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sintetizadas mediante extracto de *Ageratina pichinchensis*. En primer lugar, sería recomendable realizar un análisis exhaustivo de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto, con el fin de identificar cuáles fitoquímicos participan directamente en la reducción y estabilización durante la síntesis, y si alguno de ellos contribuye de manera específica a la actividad antibacteriana o a la biocompatibilidad de las nanozimas.

En cuanto a la caracterización fisicoquímica, se sugiere complementar los estudios realizados con técnicas de mayor resolución, tales como espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), que permitan confirmar el dopaje de Cu<sup>2+</sup> a nivel atómico. Además, la cuantificación de la liberación de iones metálicos y la determinación de especies reactivas de oxígeno resultan esenciales para establecer una correlación directa entre las propiedades fisicoquímicas de las nanozimas, su comportamiento catalítico y las respuestas biológicas observadas.

Desde la perspectiva biológica, resulta relevante ampliar la evaluación toxicológica en modelos in vivo, lo que permitiría analizar con mayor precisión el impacto de las nanozimas en sistemas biológicos complejos. Así mismo, la determinación de especies reactivas de oxígeno permitiría establecer una correlación clara entre el comportamiento catalítico, la respuesta celular y la actividad antibacteriana observada. En términos de la aplicación de los nanomateriales sintetizados, se recomienda validar el desempeño de las membranas en condiciones simuladas, como apósitos para heridas infectadas o sistemas de liberación controlada, así como en escenarios reales de alta carga microbiana.

Finalmente, en el ámbito ambiental, se sugiere realizar pruebas de germinación y vigor de plántulas para evaluar el posible impacto de las nanozimas y membranas sobre organismos vegetales, así como prolongar los ensayos de biodegradación bajo condiciones más controladas. De igual manera, la implementación de un análisis de ciclo de vida aportaría una visión integral de la sustentabilidad del material, desde su síntesis hasta su disposición final.

Finalmente, en cuanto a la contribución científica, este trabajo aporta conocimiento novedoso al explorar por primera vez el uso de *A. pichinchensis* como fuente de compuestos químicos, en particular flavonoides, benzofuranos, cromenos, cuyos grupos hidroxilos, carbonilos y anillos aromáticos actúan como agente reductor y estabilizantes en la síntesis de nanozimas Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Asimismo, demuestra la viabilidad de integrar estas nanozimas en membranas poliméricas biodegradables, lo que abre nuevas perspectivas en el diseño de materiales bioinspirados para aplicaciones biomédicas y ambientales.

# 7

## Productos obtenidos

### 7.1 Publicación de artículos

Se aprobó la publicación del artículo de divulgación titulado “Nanozimas: La nueva generación de agentes antimicrobianos al combate de la Resistencia bacteriana” en la revista Ciencia Vital Revista de Divulgación Científica de la UACJ

### 7.2 Asistencia a congresos

- Se asistió al Primer Simposium Nacional de Investigación e Innovación en Nanociencias, como ponente del poster titulado “Síntesis verde de nanozimas de  $\text{CuFe}_2\text{O}_3$ : Caracterización y determinación de su actividad antibacteriana”,

realizado los días 4 y 5 de noviembre de 2024 en las instalaciones del Centro de Emprendimiento e Innovación UASLP.

- Se asistió al 4º Congreso Estatal de Ciencia e Ingeniería de Materiales celebrado en Santiago de Querétaro, en donde se obtuvo el segundo lugar en el concurso de presentación científica en la modalidad de póster con el trabajo titulado “Catalizadores bioinspirados basados en nanozimas de  $\text{CuFe}_2\text{O}_3$  con actividad antibacteriana obtenidas mediante extracto de Axihuitl”, realizado del 10 al 13 de junio de 2025.
- Se tuvo participación el 33rd International Materials Research Congress celebrado en la ciudad de Cancún, como ponente del poster titulado “Bioinspired catalysts based on  $\text{CuFe}_2\text{O}_3$  nanozymes with antibacterial activity obtained from axihuitl extract”, realizado del 17 al 21 de agosto de 2025.
- Se tuvo participación el 33rd International Materials Research Congress celebrado en la ciudad de Cancún, como ponente oral con la charla “Applied nanotoxicology: biosafety evaluation of  $\text{CuFe}_2\text{O}_3$  nanozymes obtained by green synthesis for biomedical applications”, realizado del 17 al 21 de agosto de 2025.

### **7.3 Actividades extra (contribución social y científica)**

- Se tuvo participación como miembro del STAFF en el 7º verano infantil CIDETEQ “Ciencia a la vista”, realizado el 9 de agosto de 2024.
- Se tuvo participación como miembro del STAFF durante el Primer Simposium Nacional de Investigación e Innovación en Nanociencias, realizado los días 4 y 5 de noviembre de 2024 en las instalaciones del Centro de Emprendimiento e Innovación UASLP.

- Se tuvo participación como monitor durante el 33rd International Materials Research Congress celebrado en la ciudad de Cancún, realizado del 17 al 21 de agosto de 2025.

# Referencias

- [1] World Health Organization, “Antimicrobial resistance,” Antimicrobial resistance.
- [2] Institute for Health Metrics and Evaluation, “Measuring Infectious Causes and Resistance Outcomes for Burden Estimation.” Accessed: Oct. 26, 2024. [Online]. Available: <https://vizhub.healthdata.org/microbe/>
- [3] World Health Organization, “New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis,” New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis.
- [4] Review on Antimicrobial Resistance, “Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations,” London, 2016.
- [5] World Health Organization, “Antimicrobial resistance: accelerating national and global responses,” 2023.
- [6] World Health Organization, “WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance,” 2024.
- [7] S. K. Ahmed *et al.*, “Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects,” *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, vol. 2, p. 100081, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.glmedi.2024.100081.
- [8] N. Parvin, S. W. Joo, and T. K. Mandal, “Nanomaterial-Based Strategies to Combat Antibiotic Resistance: Mechanisms and Applications,” *Antibiotics*, vol. 14, no. 2, p. 207, Feb. 2025, doi: 10.3390/antibiotics14020207.
- [9] G. Vasiliev *et al.*, “Synergistic antibacterial effect of copper and silver nanoparticles and their mechanism of action,” *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, p. 9202, Jun. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-36460-2.
- [10] Y. Zhang *et al.*, “Emerging nanozyme-based multimodal synergistic therapies in combating bacterial infections,” *Theranostics*, vol. 12, no. 13, pp. 5995–6020, 2022, doi: 10.7150/thno.73681.
- [11] Y. Huang, J. Ren, and X. Qu, “Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications,” *Chem Rev*, vol. 119, no. 6, pp. 4357–4412, Mar. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00672.
- [12] L. Mei, S. Zhu, Y. Liu, W. Yin, Z. Gu, and Y. Zhao, “An overview of the use of nanozymes in antibacterial applications,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 418, p. 129431, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.cej.2021.129431.

- [13] C. Egbuna *et al.*, “Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology,” *J Toxicol*, vol. 2021, no. 1, p. 9954443, 2021, doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>.
- [14] J. Singh, T. Dutta, K.-H. Kim, M. Rawat, P. Samddar, and P. Kumar, “‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation,” *J Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, p. 84, Dec. 2018, doi: [10.1186/s12951-018-0408-4](https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4).
- [15] Y. Wu, D. C. Darland, and J. X. Zhao, “Nanozymes—Hitting the Biosensing ‘Target,’” *Sensors*, vol. 21, no. 15, p. 5201, Jul. 2021, doi: [10.3390/s21155201](https://doi.org/10.3390/s21155201).
- [16] C. Lu, M. Zandieh, J. Zheng, and J. Liu, “Comparison of the peroxidase activities of iron oxide nanozyme with DNAzyme and horseradish peroxidase,” *Nanoscale*, vol. 15, no. 18, pp. 8189–8196, 2023, doi: [10.1039/D3NR01098H](https://doi.org/10.1039/D3NR01098H).
- [17] P. Rajapandi and G. Viruthagiri, “Probing analysis of Cu-doping on the structural, optical, morphological and magnetic properties of hematite nanoparticles and their antibacterial activity,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 305, p. 123471, Jan. 2024, doi: [10.1016/j.saa.2023.123471](https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123471).
- [18] O. Romero-Cerecero *et al.*, “Pharmacological and Chemical Study to Identify Wound-Healing Active Compounds in *Ageratina pichinchensis*,” *Planta Med*, vol. 79, no. 08, pp. 622–627, Apr. 2013, doi: [10.1055/s-0032-1328462](https://doi.org/10.1055/s-0032-1328462).
- [19] B. Aguilar-Guadarrama, V. Navarro, I. León-Rivera, and M. Y. Rios, “Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*,” *Nat Prod Res*, vol. 23, no. 16, pp. 1559–1565, Nov. 2009, doi: [10.1080/14786410902843301](https://doi.org/10.1080/14786410902843301).
- [20] M. E. Sánchez-Mendoza *et al.*, “Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls,” *Fitoterapia*, vol. 81, no. 1, pp. 66–71, Jan. 2010, doi: [10.1016/j.fitote.2009.07.009](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.07.009).
- [21] M. Sánchez-Ramos *et al.*, “Constituents from *Ageratina pichinchensis* and Their Inhibitory Effect on Nitric Oxide Production,” *Applied Sciences*, vol. 14, no. 9, p. 3942, May 2024, doi: [10.3390/app14093942](https://doi.org/10.3390/app14093942).
- [22] W. Li *et al.*, “Preparation, mechanical properties, fatigue and tribological behavior of double crosslinked high strength hydrogel,” *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 126, p. 105009, Feb. 2022, doi: [10.1016/j.jmbbm.2021.105009](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.105009).
- [23] M. G. Cordes, “Polyacrylic Acid,” in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007, pp. 1–2. doi: [10.1016/B978-008055232-3.62440-7](https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62440-7).
- [24] S.-J. Zhang *et al.*, “Nanozyme-driven multifunctional dressings: moving beyond enzyme-like catalysis in chronic wound treatment,” *Mil Med Res*, vol. 12, no. 1, p. 27, May 2025, doi: [10.1186/s40779-025-00611-5](https://doi.org/10.1186/s40779-025-00611-5).
- [25] K. Zay Ya, J. Patel, and G. Fink, “Assessing the impact of antimicrobial resistance policies on antibiotic use and antimicrobial resistance-associated mortality in children and adults in low and middle-income countries: a global analysis,” *BMJ Public Health*, vol. 3, no. 1, p. e000511, Feb. 2025, doi: [10.1136/bmjph-2023-000511](https://doi.org/10.1136/bmjph-2023-000511).

- [26] Md. A. Salam *et al.*, “Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health,” *Healthcare*, vol. 11, no. 13, p. 1946, Jul. 2023, doi: 10.3390/healthcare11131946.
- [27] S. Ying *et al.*, “Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations,” *Environ Technol Innov*, vol. 26, p. 102336, May 2022, doi: 10.1016/j.eti.2022.102336.
- [28] M. Zandieh and J. Liu, “Nanozyme Catalytic Turnover and Self-Limited Reactions,” *ACS Nano*, vol. 15, no. 10, pp. 15645–15655, Oct. 2021, doi: 10.1021/acsnano.1c07520.
- [29] N. Saini, R. Choudary, D. S. Chopra, D. Singh, and N. Singh, “Nanozymes: classification, synthesis and challenges,” *Appl Nanosci*, vol. 13, no. 9, pp. 6433–6443, Sep. 2023, doi: 10.1007/s13204-023-02933-z.
- [30] M. Wei *et al.*, “Chemical design of nanozymes for biomedical applications,” *Acta Biomater*, vol. 126, pp. 15–30, May 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.02.036.
- [31] A. M. Ashrafi, Z. Bytesnikova, J. Barek, L. Richtera, and V. Adam, “A critical comparison of natural enzymes and nanozymes in biosensing and bioassays,” *Biosens Bioelectron*, vol. 192, p. 113494, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113494.
- [32] N. Stasyuk *et al.*, “Synthesis, Catalytic Properties and Application in Biosensorics of Nanozymes and Electronanocatalysts: A Review,” *Sensors*, vol. 20, no. 16, p. 4509, Aug. 2020, doi: 10.3390/s20164509.
- [33] Y. Zhang, X. Rui, and B. K. Simpson, “Trends in nanozymes development versus traditional enzymes in food science,” *Curr Opin Food Sci*, vol. 37, pp. 10–16, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.cofs.2020.08.001.
- [34] H. Fan, R. Zhang, K. Fan, L. Gao, and X. Yan, “Exploring the Specificity of Nanozymes,” *ACS Nano*, vol. 18, no. 4, pp. 2533–2540, Jan. 2024, doi: 10.1021/acsnano.3c07680.
- [35] G. Wei, S. Liu, Y. Peng, and H. Wei, “On the Specificity of Nanozymes: A Perspective,” *Chin J Chem*, vol. 42, no. 13, pp. 1515–1522, Jul. 2024, doi: 10.1002/cjoc.202300755.
- [36] L. Gao, X. Gao, and X. Yan, “Kinetics and Mechanisms for Nanozymes,” in *Nanozymology: Connecting Biology and Nanotechnology*, X. Yan, Ed., Singapore: Springer Singapore, 2020, pp. 17–39. doi: 10.1007/978-981-15-1490-6\_2.
- [37] F. K. de Oliveira, L. O. Santos, and J. G. Buffon, “Mechanism of action, sources, and application of peroxidases,” *Food Research International*, vol. 143, p. 110266, May 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110266.
- [38] S. Singh, “Nanomaterials Exhibiting Enzyme-Like Properties (Nanozymes): Current Advances and Future Perspectives,” *Front Chem*, vol. 7, Feb. 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00046.
- [39] Z. Chu, J. Yang, W. Zheng, J. Sun, W. Wang, and H. Qian, “Recent advances on modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor microenvironment for enhanced cancer therapeutic efficacy,” *Coord Chem Rev*, vol. 481, p. 215049, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.ccr.2023.215049.

- [40] M. Zheng, Y. Liu, G. Zhang, Z. Yang, W. Xu, and Q. Chen, “The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics,” *Antioxidants*, vol. 12, no. 9, p. 1675, Aug. 2023, doi: 10.3390/antiox12091675.
- [41] N. Zhu *et al.*, “Biomimic Nanozymes with Tunable Peroxidase-like Activity Based on the Confinement Effect of Metal–Organic Frameworks (MOFs) for Biosensing,” *Anal Chem*, vol. 94, no. 11, pp. 4821–4830, Mar. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c00058.
- [42] Y. Zhao *et al.*, “Defect-rich porous two-dimensional copper-cobalt oxide nanozyme with photothermal performance and enhanced catalytic activity for antibacterial therapy and wound healing,” *J Mater Sci*, vol. 58, no. 17, pp. 7429–7440, May 2023, doi: 10.1007/s10853-023-08448-w.
- [43] D. Mehta, P. Sharma, and S. Singh, “ATP-triggered, selective superoxide radical generating oxidase-mimetic cerium oxide nanozyme exhibiting efficient antibacterial activity at physiological pH,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 231, p. 113531, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113531.
- [44] W. Lu, J. Chen, L. Kong, F. Zhu, Z. Feng, and J. Zhan, “Oxygen vacancies modulation Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanozyme with enhanced oxidase-mimicking performance for l-cysteine detection,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 333, p. 129560, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.129560.
- [45] Y. Lu *et al.*, “MnO<sub>2</sub> Coated Mesoporous PdPt Nanoprobes for Scavenging Reactive Oxygen Species and Solving Acetaminophen-Induced Liver Injury,” *Adv Healthc Mater*, vol. 12, no. 22, Sep. 2023, doi: 10.1002/adhm.202300163.
- [46] H. S. Kim, S. Lee, and D. Y. Lee, “Aurozyme: A Revolutionary Nanozyme in Colitis, Switching Peroxidase-Like to Catalase-Like Activity,” *Small*, vol. 19, no. 41, Oct. 2023, doi: 10.1002/smll.202302331.
- [47] J. Yang *et al.*, “Bioinspired copper single-atom nanozyme as a superoxide dismutase-like antioxidant for sepsis treatment,” *Exploration*, vol. 2, no. 4, Aug. 2022, doi: 10.1002/EXP.20210267.
- [48] H. Zhong, C. Jiang, J. Zou, G. Zhu, and Y. Huang, “CeO<sub>2</sub>-Based Porous Carbonaceous Frameworks as Antioxidant Nanozymes for Scavenging Reactive Oxygen Species and Adsorbing Benzo[a]pyrene,” *Inorg Chem*, vol. 62, no. 33, pp. 13168–13172, Aug. 2023, doi: 10.1021/acs.inorgchem.3c02145.
- [49] S. Luo *et al.*, “Mn Single-Atom Nanozymes with Superior Loading Capability and Superb Superoxide Dismutase-like Activity for Bioassay,” *Anal Chem*, vol. 95, no. 24, pp. 9366–9372, Jun. 2023, doi: 10.1021/acs.analchem.3c01623.
- [50] H. Qiu *et al.*, “Hydrogel-based artificial enzyme for combating bacteria and accelerating wound healing,” *Nano Res*, vol. 13, no. 2, pp. 496–502, Feb. 2020, doi: 10.1007/s12274-020-2636-9.
- [51] Md. N. Karim *et al.*, “Visible-Light-Triggered Reactive-Oxygen-Species-Mediated Antibacterial Activity of Peroxidase-Mimic CuO Nanorods,” *ACS Appl Nano Mater*, vol. 1, no. 4, pp. 1694–1704, Apr. 2018, doi: 10.1021/acsanm.8b00153.
- [52] W. Hu, M. R. Younis, Y. Zhou, C. Wang, and X. Xia, “In Situ Fabrication of Ultrasmall Gold Nanoparticles/2D MOFs Hybrid as Nanozyme for Antibacterial Therapy,” *Small*, vol. 16, no. 23, Jun. 2020, doi: 10.1002/smll.202000553.

- [53] F. Gao, T. Shao, Y. Yu, Y. Xiong, and L. Yang, "Surface-bound reactive oxygen species generating nanozymes for selective antibacterial action," *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, p. 745, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-20965-3.
- [54] J. Xi *et al.*, "Light-enhanced sponge-like carbon nanozyme used for synergetic antibacterial therapy," *Biomater Sci*, vol. 7, no. 10, pp. 4131–4141, 2019, doi: 10.1039/C9BM00705A.
- [55] J. Guo, W. Wei, Y. Zhao, and H. Dai, "Iron oxide nanoparticles with photothermal performance and enhanced nanozyme activity for bacteria-infected wound therapy," *Regen Biomater*, vol. 9, Apr. 2022, doi: 10.1093/rb/rbac041.
- [56] A. Ghazzy *et al.*, "Magnetic iron oxide-based nanozymes: from synthesis to application," *Nanoscale Adv*, vol. 6, no. 6, pp. 1611–1642, 2024, doi: 10.1039/D3NA00903C.
- [57] M. Ding *et al.*, "A novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CuOx nanozyme: Intrinsic peroxidase-like activity to kill bacteria and sterilize wounds," *Appl Surf Sci*, vol. 625, p. 157185, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.apsusc.2023.157185.
- [58] X. Jin *et al.*, "Bimetallic oxide Cu–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoclusters with multiple enzymatic activities for wound infection treatment and wound healing," *Acta Biomater*, vol. 173, pp. 403–419, Jan. 2024, doi: 10.1016/j.actbio.2023.10.028.
- [59] A. Sajjad, S. Hussain, G. H. Jaffari, S. Hanif, M. N. Qureshi, and M. Zia, "Fabrication of Hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles under different spectral lights transforms physio chemical, biological, and nanozymatic properties," *Nano Trends*, vol. 2, p. 100010, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.nwnano.2023.100010.
- [60] K. N. Chaudhari, N. K. Chaudhari, and J.-S. Yu, "Peroxidase mimic activity of hematite iron oxides ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) with different nanostructures," *Catal. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 119–124, 2012, doi: 10.1039/C1CY00124H.
- [61] S. Basak, S. Sikdar, S. Ali, M. Mondal, and M. N. Roy, "Green synthesized copper assisted iron oxide nanozyme for the efficient elimination of industrial pollutant via peroxodisulfate activation," *J Mol Struct*, vol. 1283, p. 135267, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.molstruc.2023.135267.
- [62] M. Buzdar, A. Yaqub, A. Hayat, M. Z. Ul Haq, A. Khan, and H. Ajab, "Paper based colorimetric sensor using novel green magnetized nanocomposite of pinus for hydrogen peroxide detection in water and milk," *Food Biosci*, vol. 55, p. 103014, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2023.103014.
- [63] B. Das *et al.*, "Peroxidase-Mimicking Activity of Biogenic Gold Nanoparticles Produced from *Prunus nepalensis* Fruit Extract: Characterizations and Application for the Detection of *Mycobacterium bovis*," *ACS Appl Bio Mater*, vol. 5, no. 6, pp. 2712–2725, Jun. 2022, doi: 10.1021/acsabm.2c00180.
- [64] H. He, C. Liu, C. Shao, Y. Wu, and Q. Huang, "Green synthesis of ultrasmall selenium nanoparticles (SeNPs) using *Hericium erinaceus* polysaccharide (HEP) as nanozymes for efficient intracellular antioxidation," *Mater Lett*, vol. 317, p. 132079, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.matlet.2022.132079.
- [65] D. Mundekkad and A. V. Alex, "Analysis of structural and biomimetic characteristics of the green-synthesized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanozyme from the fruit peel extract of *Punica granatum*," *Chemical Papers*, vol. 76, no. 6, pp. 3863–3878, Jun. 2022, doi: 10.1007/s11696-022-02130-2.

- [66] A. R. Deshmukh, H. Aloui, and B. S. Kim, “Novel biogenic gold nanoparticles catalyzing multienzyme cascade reaction: Glucose oxidase and peroxidase mimicking activity,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 421, p. 127859, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.cej.2020.127859.
- [67] L. Rao *et al.*, “Green synthesis of kudzu vine biochar decorated graphene-like MoSe<sub>2</sub> with the oxidase-like activity as intelligent nanozyme sensing platform for hesperetin,” *Chemosphere*, vol. 289, p. 133116, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133116.
- [68] S. Basak, S. Sikdar, S. Ali, M. Mondal, and M. N. Roy, “Green synthesized copper assisted iron oxide nanozyme for the efficient elimination of industrial pollutant via peroxodisulfate activation,” *J Mol Struct*, vol. 1283, p. 135267, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.molstruc.2023.135267.
- [69] H. A. Widatalla *et al.*, “Green synthesis of silver nanoparticles using green tea leaf extract, characterization and evaluation of antimicrobial activity,” *Nanoscale Adv*, vol. 4, no. 3, pp. 911–915, 2022, doi: 10.1039/D1NA00509J.
- [70] G. C. Rzedowski and J. Rzedowski, *Flora fanerogámica del Valle de México*, 2nd ed. Pátzcuaro (Michoacán), 2005.
- [71] O. Romero-Cerecero, A. Zamilpa, and J. Tortoriello, “Effectiveness and Tolerability of a Standardized Extract from *Ageratina pichinchensis* in Patients with Diabetic Foot Ulcer: A Randomized, Controlled Pilot Study,” *Planta Med*, vol. 81, no. 04, pp. 272–278, Feb. 2015, doi: 10.1055/s-0034-1396315.
- [72] M. Sánchez-Ramos, S. Marquina-Bahena, L. Alvarez, A. Román-Guerrero, A. Bernabé-Antonio, and F. Cruz-Sosa, “Phytochemical, Pharmacological, and Biotechnological Study of *Ageratina pichinchensis*: A Native Species of Mexico,” *Plants*, vol. 10, no. 10, p. 2225, Oct. 2021, doi: 10.3390/plants10102225.
- [73] M. Y. Ríos, A. B. Aguilar-Guadarrama, and V. Navarro, “Two new benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity,” *Planta Med*, vol. 69, no. 10, pp. 967–970, Oct. 2003, doi: 10.1055/s-2003-45113.
- [74] D. M. Aziz, A. A. M. Amin, S. A. Hassan, H. Özmen, G. K. INCILI, and Y. Say, “One-pot synthesis of quercetin-functionalized silver and copper nanoparticles for enhanced optical, antimicrobial, and computational properties,” *Sci Rep*, vol. 15, no. 1, p. 26391, Jul. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-12586-3.
- [75] F. Bärlocher and M. A. S. Graça, “Total Phenolics,” in *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, F. Bärlocher, M. O. Gessner, and M. A. S. Graça, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 157–161. doi: 10.1007/978-3-030-30515-4\_18.
- [76] M. Bhushan, Y. Kumar, L. Periyasamy, and A. K. Viswanath, “Study of synthesis, structural, optical and magnetic characterizations of iron/copper oxide nanocomposites: A promising novel inorganic antibiotic,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 96, pp. 66–76, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.11.009.
- [77] B. Jiang *et al.*, “Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes,” *Nat Protoc*, vol. 13, no. 7, pp. 1506–1520, 2018, doi: 10.1038/s41596-018-0001-1.

- [78] H. Cao *et al.*, “Deciphering the Catalytic Mechanism of Peroxidase-like Activity of Iron Sulfide Nanozymes,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 16, no. 24, pp. 30958–30966, Jun. 2024, doi: 10.1021/acsami.4c06024.
- [79] CLSI, “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition,” 2012.
- [80] S. Chihi, A. Bouafia, S. Meneceur, S. E. Laouini, and R. Z. Ahmed, “Effect of precursor concentration on the bandgap energy and particles size for green synthesis of hematite  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles by the aqueous extract of *Moltkia ciliata* and evaluation of the antibacterial activity,” *Biomass Convers Biorefin*, 2023, doi: 10.1007/s13399-023-04739-z.
- [81] B. Javed, M. Ikram, F. Farooq, T. Sultana, Z.-R. Mashwani, and N. I. Raja, “Biogenesis of silver nanoparticles to treat cancer, diabetes, and microbial infections: a mechanistic overview,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 6, pp. 2261–2275, 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11171-8.
- [82] V. Soni *et al.*, “Sustainable and green trends in using plant extracts for the synthesis of biogenic metal nanoparticles toward environmental and pharmaceutical advances: A review,” *Environ Res*, vol. 202, p. 111622, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.envres.2021.111622.
- [83] G. Marslin *et al.*, “Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles,” *Materials*, vol. 11, no. 6, 2018, doi: 10.3390/ma11060940.
- [84] M. Russo *et al.*, “Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 410, no. 15, pp. 3507–3520, 2018, doi: 10.1007/s00216-018-0854-8.
- [85] H. Kheiria, A. Mounir, Q. María, J. Maria José, and S. Bouzid, “Total Phenolic Content and Polyphenolic Profile of Tunisian Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Residues,” in *Natural Drugs from Plants*, IntechOpen, 2022. doi: 10.5772/intechopen.97762.
- [86] Q. Luo *et al.*, “Green Extraction of Antioxidant Polyphenols from Green Tea (*Camellia sinensis*),” *Antioxidants*, vol. 9, no. 9, 2020, doi: 10.3390/antiox9090785.
- [87] E. Bozinou, I. Karageorgou, G. Batra, V. G. Dourtoglou, and S. I. Lalas, “Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of *Moringa oleifera* Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques,” *Beverages*, vol. 5, no. 1, p. 8, Jan. 2019, doi: 10.3390/beverages5010008.
- [88] J. A. A. Abdullah, M. J. Rosado, A. Guerrero, and A. Romero, “Eco-friendly synthesis of ZnO-nanoparticles using *Phoenix dactylifera* L., polyphenols: physicochemical, microstructural, and functional assessment,” *New Journal of Chemistry*, vol. 47, no. 9, pp. 4409–4417, 2023, doi: 10.1039/D3NJ00131H.
- [89] H. R. El-Seedi *et al.*, “Updated Review of Metal Nanoparticles Fabricated by Green Chemistry Using Natural Extracts: Biosynthesis, Mechanisms, and Applications,” *Bioengineering*, vol. 11, no. 11, p. 1095, Oct. 2024, doi: 10.3390/bioengineering11111095.
- [90] S. Ulpathakumbura, N. Marikkar, and L. Jayasinghe, “FTIR spectral correlation with alpha-glucosidase inhibitory activities of selected leafy plants extracts,”

- International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, vol. 3, no. 3, pp. 104–113, 2023, doi: 10.29228/ijpbp.22.
- [91] S. Rajeshkumar and L. V. Bharath, “Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity,” *Chem Biol Interact*, vol. 273, pp. 219–227, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.019.
- [92] T. K. Patle, K. Shrivastava, R. Kurrey, S. Upadhyay, R. Jangde, and R. Chauhan, “Phytochemical screening and determination of phenolics and flavonoids in *Dillenia pentagyna* using UV–vis and FTIR spectroscopy,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 242, p. 118717, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.saa.2020.118717.
- [93] F. A. Shtewi, W. M. Barag, and A. A. Tarroush, “Green Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Using *Mentha Piperita* Leaves Extract,” *International Science and Technology Journal*, vol. 24, 2021.
- [94] M. M. , Mohammed *et al.*, “Purification and characterization of extracts from the stem bark of *Sclerocarya birrea* (marula),” *International Journal of Modelling & Applied Science Research* , vol. 28, no. 9, pp. 141–152, 2023.
- [95] S. Pasiczna-Patkowska, M. Cichy, and J. Flieger, “Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in Characterization of Green Synthesized Nanoparticles,” *Molecules*, vol. 30, no. 3, p. 684, Feb. 2025, doi: 10.3390/molecules30030684.
- [96] P. Rajapandi and G. Viruthagiri, “Probing analysis of Cu-doping on the structural, optical, morphological and magnetic properties of hematite nanoparticles and their antibacterial activity,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 305, p. 123471, Jan. 2024, doi: 10.1016/J.SAA.2023.123471.
- [97] A. Ahmadi-Arpanah *et al.*, “The photocatalytic antibacterial behavior of Cu-doped nanocrystalline hematite prepared by mechanical alloying,” *Appl Nanosci*, vol. 11, no. 3, pp. 817–832, 2021, doi: 10.1007/s13204-020-01659-6.
- [98] RRUFF, “Hematite R050300,” Projecto RRUFF. Accessed: Jul. 26, 2025. [Online]. Available: <https://rruff.info/hematite/display=default/R050300>
- [99] S. Jain, J. Shah, N. S. Negi, C. Sharma, and R. K. Kotnala, “Significance of interface barrier at electrode of hematite hydroelectric cell for generating ecpower by water splitting,” *Int J Energy Res*, vol. 43, no. 9, pp. 4743–4755, Jul. 2019, doi: 10.1002/er.4613.
- [100] J. S. Nyarige, T. P. J. Krüger, and M. Diale, “Structural and optical properties of hematite and L-arginine/hematite nanostructures prepared by thermal spray pyrolysis,” *Surfaces and Interfaces*, vol. 18, p. 100394, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.SURFIN.2019.100394.
- [101] B. Ahmmad *et al.*, “Green synthesis of mesoporous hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles and their photocatalytic activity,” *Advanced Powder Technology*, vol. 24, no. 1, pp. 160–167, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.appt.2012.04.005.
- [102] P. Kumar, S. Kumar, and N. Thakur, “Azadirachta indica and polyvinylpyrrolidone encapsulated Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to enhance the photocatalytic and antioxidant activity,” *Inorg Chem Commun*, vol. 155, p. 111084, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.inoche.2023.111084.

- [103] C. P. Marshall and W. J. B. Dufresne, "Resonance Raman and polarized Raman scattering of single-crystal hematite," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 53, no. 5, pp. 947–955, May 2022, doi: 10.1002/jrs.6309.
- [104] M. Tadic, D. Trpkov, L. Kopanja, S. Vojnovic, and M. Panjan, "Hydrothermal synthesis of hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticle forms: Synthesis conditions, structure, particle shape analysis, cytotoxicity and magnetic properties," *J Alloys Compd*, vol. 792, pp. 599–609, Jul. 2019, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2019.03.414.
- [105] K. F. McCarty, "Inelastic light scattering in  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Phonon vs magnon scattering," *Solid State Commun*, vol. 68, no. 8, pp. 799–802, Nov. 1988, doi: 10.1016/0038-1098(88)90067-1.
- [106] A. M. Jubb and H. C. Allen, "Vibrational Spectroscopic Characterization of Hematite, Maghemite, and Magnetite Thin Films Produced by Vapor Deposition," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 2, no. 10, pp. 2804–2812, Oct. 2010, doi: 10.1021/am1004943.
- [107] L. Macera, V. Daniele, C. Mondelli, M. Capron, and G. Taglieri, "New Sustainable, Scalable and One-Step Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles by Ion Exchange Process," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 3, p. 798, Mar. 2021, doi: 10.3390/nano11030798.
- [108] M. Amiri, H. Akbari Javar, H. Mahmoudi-Moghaddam, and M. Salavati-Niasari, "Green synthesis of perovskite-type nanocomposite using Crataegus for modification of bisphenol a sensor," *Microchemical Journal*, vol. 178, p. 107411, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.microc.2022.107411.
- [109] P. Kumar, J. P. Singh, Y. Kumar, A. Gaur, H. K. Malik, and K. Asokan, "Investigation of phase segregation in Zn<sub>1-x</sub>Mg<sub>x</sub>O systems," *Current Applied Physics*, vol. 12, no. 4, pp. 1166–1172, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.cap.2012.02.042.
- [110] M. A. S. Amulya, H. P. Nagaswarupa, M. R. A. Kumar, C. R. Ravikumar, K. B. Kusuma, and S. C. Prashantha, "Evaluation of bifunctional applications of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized by a sonochemical method," *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 148, p. 109756, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.jpcs.2020.109756.
- [111] S. K K, P. N. P M, and M. Vasundhara, "Enhanced photocatalytic activity in ZnO nanoparticles developed using novel *Lepidagathis ananthapuramensis* leaf extract," *RSC Adv*, vol. 13, no. 3, pp. 1497–1515, 2023, doi: 10.1039/D2RA06967A.
- [112] A. H. Cahyana, A. R. Liandi, Y. Yulizar, Y. Romdoni, and T. P. Wendari, "Green synthesis of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles mediated by *Morus alba* L. leaf extract: Crystal structure, grain morphology, particle size, magnetic and catalytic properties in Mannich reaction," *Ceram Int*, vol. 47, no. 15, pp. 21373–21380, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.ceramint.2021.04.146.
- [113] A. G. Kaningini *et al.*, "Effect of Optimized Precursor Concentration, Temperature, and Doping on Optical Properties of ZnO Nanoparticles Synthesized via a Green Route Using Bush Tea (*Athrixia phylicoides* DC.) Leaf Extracts," *ACS Omega*, vol. 7, no. 36, pp. 31658–31666, Sep. 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c00530.
- [114] I. S. Okeke *et al.*, "Impact of particle size and surface defects on antibacterial and photocatalytic activities of undoped and Mg-doped ZnO nanoparticles,

- biosynthesized using one-step simple process,” *Vacuum*, vol. 187, p. 110110, May 2021, doi: 10.1016/j.vacuum.2021.110110.
- [115] M. G. Demissie, F. K. Sabir, G. D. Edossa, and B. A. Gonfa, “Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Leaf Extract of *Lippia adoensis* (Koseret) and Evaluation of Its Antibacterial Activity,” *J Chem*, vol. 2020, pp. 1–9, Oct. 2020, doi: 10.1155/2020/7459042.
- [116] Q. Yang, Y. Li, X. Zhao, J. Zhang, X. Cheng, and N. Zhu, “Recent advances of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and its applications in neuroscience under external magnetic field,” *Appl Nanosci*, vol. 13, no. 8, pp. 5489–5500, Aug. 2023, doi: 10.1007/s13204-023-02803-8.
- [117] L. Kilanski, S. Lewinska, A. Slawska-Waniewska, V. B. Pavlović, and S. Filipović, “Attempts to obtain BaTiO<sub>3</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> core-shell type structures: The role of iron oxide nanoparticle formation and agglomeration,” *Inorg Chem Commun*, vol. 145, p. 109960, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.inoche.2022.109960.
- [118] J. A. A. Abdullah, M. Jiménez-Rosado, A. Guerrero, and A. Romero, “Effect of Calcination Temperature and Time on the Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles: Green vs. Chemical Method,” *Materials*, vol. 16, no. 5, p. 1798, Feb. 2023, doi: 10.3390/ma16051798.
- [119] Y. Zu *et al.*, “The age of bioinspired molybdenum-involved nanozymes: Synthesis, catalytic mechanisms, and biomedical applications,” *VIEW*, vol. 2, no. 3, Jun. 2021, doi: 10.1002/VIW.20200188.
- [120] B. Srinivasan, “A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond,” *FEBS J*, vol. 289, no. 20, pp. 6086–6098, Oct. 2022, doi: 10.1111/febs.16124.
- [121] W. Yang, X. Yang, L. Zhu, H. Chu, X. Li, and W. Xu, “Nanozymes: Activity origin, catalytic mechanism, and biological application,” *Coord Chem Rev*, vol. 448, p. 214170, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214170.
- [122] Y. Huang, Z. Ding, Y. Li, F. Xi, and J. Liu, “Magnetic Nanozyme Based on Loading Nitrogen-Doped Carbon Dots on Mesoporous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Glucose,” *Molecules*, vol. 28, no. 12, p. 4573, Jun. 2023, doi: 10.3390/molecules28124573.
- [123] F. Xia, Q. Shi, and Z. Nan, “Facile synthesis of Cu-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanozymes for sensitive assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and GSH,” *Dalton Transactions*, vol. 49, no. 36, pp. 12780–12792, 2020, doi: 10.1039/D0DT02395G.
- [124] Q. Liu, A. Zhang, R. Wang, Q. Zhang, and D. Cui, “A Review on Metal- and Metal Oxide-Based Nanozymes: Properties, Mechanisms, and Applications,” *Nanomicro Lett*, vol. 13, no. 1, p. 154, Dec. 2021, doi: 10.1007/s40820-021-00674-8.
- [125] Y. Ai, Z. Hu, X. Liang, H. Sun, H. Xin, and Q. Liang, “Recent Advances in Nanozymes: From Matters to Bioapplications,” *Adv Funct Mater*, vol. 32, no. 14, Apr. 2022, doi: 10.1002/adfm.202110432.
- [126] Y. Wu *et al.*, “Defect engineering in nanozymes,” *Materials Today*, vol. 52, pp. 327–347, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.mattod.2021.10.032.
- [127] J. Yang *et al.*, “Mechanistic and kinetic insights into size-dependent activity in ultra-small Pt/CNTs nanozymes during antibacterial process,” *Arabian Journal of*

- Chemistry*, vol. 15, no. 11, p. 104238, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.104238.
- [128] F. Cao *et al.*, “Defect-Rich Adhesive Nanozymes as Efficient Antibiotics for Enhanced Bacterial Inhibition,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 58, no. 45, pp. 16236–16242, Nov. 2019, doi: 10.1002/anie.201908289.
- [129] A. F. Seixas, A. P. Quendera, J. P. Sousa, A. F. Q. Silva, C. M. Arraiano, and J. M. Andrade, “Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation,” *Front Genet*, vol. 12, Jan. 2022, doi: 10.3389/fgene.2021.821535.
- [130] C. M. Hassan, P. Trakampan, and N. A. Peppas, “Water Solubility Characteristics of Poly(vinyl alcohol) and Gels Prepared by Freezing/Thawing Processes,” in *Water Soluble Polymers*, Boston, MA: Springer US, 2002, pp. 31–40. doi: 10.1007/0-306-46915-4\_3.
- [131] S. Barbon *et al.*, “Enhanced Biomechanical Properties of Polyvinyl Alcohol-Based Hybrid Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering,” *Processes*, vol. 9, no. 5, p. 730, Apr. 2021, doi: 10.3390/pr9050730.
- [132] X. Liang *et al.*, “Polyvinyl Alcohol (PVA)-Based Hydrogels: Recent Progress in Fabrication, Properties, and Multifunctional Applications,” *Polymers (Basel)*, vol. 16, no. 19, p. 2755, Sep. 2024, doi: 10.3390/polym16192755.
- [133] D. K. Shurmasti, P. R. Kermani, M. Sarvarian, and C. G. Awuchi, “Egg shelf life can be extended using varied proportions of polyvinyl alcohol/chitosan composite coatings,” *Food Sci Nutr*, vol. 11, no. 9, pp. 5041–5049, Sep. 2023, doi: 10.1002/fsn3.3394.
- [134] C. Shen *et al.*, “Bifunctional low molecular weight polyacrylic acid as aqueous binder and coating agent enables high performance LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> cathode for lithium-ion batteries,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 489, p. 151287, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.151287.
- [135] A. Kapourani, K. Chachlioutaki, E. G. Andriotis, D. G. Fatouros, and P. Barmplexis, “Evaluating PAA/PVA thermal crosslinking process during the preparation of in-situ high-drug loading amorphous solid dispersions,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 79, p. 104030, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.jddst.2022.104030.
- [136] N. Arik *et al.*, “Modification of electrospun PVA/PAA scaffolds by cold atmospheric plasma: alignment, antibacterial activity, and biocompatibility,” *Polymer Bulletin*, vol. 76, no. 2, pp. 797–812, Feb. 2019, doi: 10.1007/s00289-018-2409-8.
- [137] G. Grasso, D. Zane, S. Foglia, and R. Dragone, “Application of Electrospun Water-Soluble Synthetic Polymers for Multifunctional Air Filters and Face Masks,” *Molecules*, vol. 27, no. 24, p. 8753, Dec. 2022, doi: 10.3390/molecules27248753.
- [138] R. Liu *et al.*, “Progress of Fabrication and Applications of Electrospun Hierarchically Porous Nanofibers,” *Advanced Fiber Materials*, vol. 4, no. 4, pp. 604–630, Aug. 2022, doi: 10.1007/s42765-022-00132-z.
- [139] Y. Li *et al.*, “Developments of Advanced Electrospinning Techniques: A Critical Review,” *Adv Mater Technol*, vol. 6, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.1002/admt.202100410.

- [140] A. Keirouz *et al.*, “The History of Electrospinning: Past, Present, and Future Developments,” *Adv Mater Technol*, vol. 8, no. 11, Jun. 2023, doi: 10.1002/admt.202201723.
- [141] G. Kumar Sharma and N. Rachel James, “Electrospinning: The Technique and Applications,” in *Recent Developments in Nanofibers Research*, IntechOpen, 2023. doi: 10.5772/intechopen.105804.
- [142] B. Mahesh, D. Kathyayani, D. Channe Gowda, A. Sionkowska, and S. Ramakrishna, “Miscibility and thermal stability of synthetic glutamic acid comprising polypeptide with polyvinyl alcohol: Fabrication of nanofibrous electrospun membranes,” *Mater Chem Phys*, vol. 281, p. 125847, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.matchemphys.2022.125847.
- [143] G. Şimşek Gündüz and I. Üçgül, “The Effects of The Distance Between Needle And Collector Plate On The Morphology Of Fibers Produced By The Electrospinning Method,” *International Journal of Engineering and Innovative Research*, vol. 5, no. 3, pp. 211–222, Oct. 2023, doi: 10.47933/ijeir.1312118.
- [144] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, “Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications,” *Chem Rev*, vol. 119, no. 8, pp. 5298–5415, Apr. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.
- [145] G. B. Medeiros, F. de A. Lima, D. S. de Almeida, V. G. Guerra, and M. L. Aguiar, “Modification and Functionalization of Fibers Formed by Electrospinning: A Review,” *Membranes (Basel)*, vol. 12, no. 9, p. 861, Sep. 2022, doi: 10.3390/membranes12090861.
- [146] J. Kočí, M. Míka Havlík, V. Procházka, N. Klusoňová, and E. Sedláčková, “The effect of solution viscosity on the quality of electroactive nanofibers produced by electrospinning,” *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, vol. 155, no. 3–4, pp. 349–352, Apr. 2024, doi: 10.1007/s00706-023-03156-2.
- [147] M. Ahmadi Bonakdar and D. Rodrigue, “Electrospinning: Processes, Structures, and Materials,” *Macromol*, vol. 4, no. 1, pp. 58–103, Feb. 2024, doi: 10.3390/macromol4010004.
- [148] B. Wu, J. Yang, Y. Zu, J. Chi, and K. Shi, “Aligned electrospun fiber film loaded with multi-enzyme mimetic iridium nanozymes for wound healing,” *J Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1, p. 478, Nov. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01685-2.
- [149] G. Zheng *et al.*, “Neuroimmune modulating and energy supporting nanozyme-mimic scaffold synergistically promotes axon regeneration after spinal cord injury,” *J Nanobiotechnology*, vol. 22, no. 1, p. 399, Jul. 2024, doi: 10.1186/s12951-024-02594-2.
- [150] S. Pi *et al.*, “Durable Rapid Self-Disinfection, Reusable Protective Clothing Based on the Ag-Pd@MoS<sub>2</sub> Nanozyme with Enhanced Triple-Mode Synergistic Antibacterial Effect,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 15, no. 14, pp. 18032–18044, Apr. 2023, doi: 10.1021/acsami.2c23130.
- [151] Y. Xia *et al.*, “In Situ Electrospinning MOF-Derived Highly Dispersed  $\alpha$ -Cobalt Confined in Nitrogen-Doped Carbon Nanofibers Nanozyme for Biomolecule Monitoring,” *Anal Chem*, vol. 96, no. 3, pp. 1345–1353, Jan. 2024, doi: 10.1021/acs.analchem.3c05053.

- [152] P. S. Thakur and M. Sankar, “Fe-porphyrin-derived carbon nanofiber-based nanozymes: enhanced peroxidase-like activity for ultrasensitive glucose and ascorbic acid sensing,” *Mater Adv*, vol. 6, no. 7, pp. 2356–2364, 2025, doi: 10.1039/D4MA01289E.
- [153] W. Wang *et al.*, “Development of a Janus nanofibrous patch with antibacterial and anti-oxidative properties for urethral regeneration,” *Theranostics*, vol. 15, no. 13, pp. 6428–6443, May 2025, doi: 10.7150/thno.112435.
- [154] R. M. Schofield *et al.*, “Driving fiber diameters to the limit: nanoparticle-induced diameter reductions in electrospun photoactive composite nanofibers for organic photovoltaics,” *Adv Compos Hybrid Mater*, vol. 6, no. 6, p. 229, Dec. 2023, doi: 10.1007/s42114-023-00788-0.
- [155] F. S. Navarro Oliva, S. N. Murthy, L. Lenglet, A. Ospina, S. Weigand, and F. Bedoui, “In-situ WAXS and SAXS microstructural investigation of Poly(vinylidene fluoride)-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> coaxial-electrospun nanocomposites under thermal and mechanical loading: Nanoparticles size effects on fibers molecular orientation, mechanical properties and crystalline polymorphs,” *Polymer (Guildf)*, vol. 308, p. 127406, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.polymer.2024.127406.
- [156] F. S. Navarro Oliva *et al.*, “Coaxial electrospinning process toward optimal nanoparticle dispersion in polymeric matrix,” *Polym Compos*, vol. 42, no. 3, pp. 1565–1573, Mar. 2021, doi: 10.1002/pc.25924.
- [157] W. Ren *et al.*, “Fabrication and characterization of PVDF-CTFE/SiO<sub>2</sub> electrospun nanofibrous membranes with micro and nano-rough structures for efficient oil-water separation,” *Sep Purif Technol*, vol. 311, p. 123228, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.seppur.2023.123228.
- [158] D. Jian *et al.*, “Enhance efferocytosis capacity of dendritic cells for diabetic wound healing by nanozyme-loaded nanofiber dressings,” *Nano Today*, vol. 64, p. 102787, Oct. 2025, doi: 10.1016/j.nantod.2025.102787.
- [159] W. Xu *et al.*, “Metal-Free Nanozyme-Hydrogel Enabled by Conductive Polymer Nanofibers for Multimodal Antibacterial Therapy,” *Chemistry of Materials*, vol. 37, no. 6, pp. 2106–2124, Mar. 2025, doi: 10.1021/acs.chemmater.4c02480.
- [160] S. Ahmadi, A. Hivechi, S. H. Bahrami, P. B. Milan, and S. S. Ashraf, “Cinnamon extract loaded electrospun chitosan/gelatin membrane with antibacterial activity,” *Int J Biol Macromol*, vol. 173, pp. 580–590, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.156.
- [161] R. R. Choudhury, J. M. Gohil, and K. Dutta, “Eco-friendly method for preparation of cross-linked PVA/PAA thin films and membranes thereof for water treatment,” *Iranian Polymer Journal*, vol. 31, no. 12, pp. 1537–1550, Dec. 2022, doi: 10.1007/s13726-022-01096-y.
- [162] K. W. Kim, H. Kim, J. Choi, S.-J. Choi, and K. R. Yoon, “Internally connected porous PVA/PAA membrane with cross-aligned nanofiber network for facile and long-lasting ion transport in zinc–air batteries,” *Energy Storage Mater*, vol. 71, p. 103594, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.ensm.2024.103594.
- [163] Y. H. Lim, E. C. Wong, W. C. Chong, A. W. Mohammad, C. H. Koo, and W. J. Lau, “Introducing self-healing properties to polyethersulfone (PES) membrane via

- poly(vinyl alcohol)/ polyacrylic acid (PVA/PAA) surface coating,” *Chemosphere*, vol. 349, p. 140772, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140772.
- [164] M. Al-Zu’bi, L. Anguilano, and M. Fan, “Effect of incorporating carbon- and silicon-based nanomaterials on the physico-chemical properties of a structural epoxy adhesive,” *Polym Test*, vol. 128, p. 108221, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.polymertesting.2023.108221.
- [165] L. M. Gradinaru *et al.*, “Composite Materials Based on Iron Oxide Nanoparticles and Polyurethane for Improving the Quality of MRI,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 24, p. 4316, Dec. 2021, doi: 10.3390/polym13244316.
- [166] O. Folorunso, Y. Hamam, R. Sadiku, and W. Kupolati, “Effects of Defects on the Properties of Polymer Nanocomposites: A Brief Review,” *J Inorg Organomet Polym Mater*, vol. 34, no. 12, pp. 5667–5690, Dec. 2024, doi: 10.1007/s10904-024-03179-0.
- [167] S. Zhang, Q. Shi, C. Christodoulatos, G. Korfiatis, and X. Meng, “Adsorptive filtration of lead by electrospun PVA/PAA nanofiber membranes in a fixed-bed column,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 370, pp. 1262–1273, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.cej.2019.03.294.
- [168] M. Ahmadi Bonakdar and D. Rodrigue, “Electrospinning: Processes, Structures, and Materials,” *Macromol*, vol. 4, no. 1, pp. 58–103, Feb. 2024, doi: 10.3390/macromol4010004.
- [169] E. Ewaldz, J. Randrup, and B. Brettmann, “Solvent Effects on the Elasticity of Electrospinnable Polymer Solutions,” *ACS Polymers Au*, vol. 2, no. 2, pp. 108–117, Apr. 2022, doi: 10.1021/acspolymersau.1c00041.
- [170] M. Lauricella, D. Pisignano, and S. Succi, “Effects of nanoparticles on the dynamic morphology of electrified jets,” *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 119, no. 4, p. 44001, Aug. 2017, doi: 10.1209/0295-5075/119/44001.
- [171] A. Hosny, B. El-Deeb, Z. Mohamed, and E. Ibrahim, “Biosynthesis of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CuO Nanoparticles and Comparative Study for Dielectric Properties,” *Sohag Journal of Sciences*, vol. 9, no. 2, pp. 206–210, Mar. 2024, doi: 10.21608/sjsc.2024.246871.1143.
- [172] Y.-S. Zhao *et al.*, “Electrospun nanofibers and their application as sensors for healthcare,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 13, Mar. 2025, doi: 10.3389/fbioe.2025.1533367.
- [173] T. Y. Chee *et al.*, “Fabrication, characterization and application of electrospun polysulfone membrane for phosphate ion removal in real samples,” *Chemosphere*, vol. 303, p. 135228, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135228.
- [174] N. T. N. Vo, L. Huang, H. Lemos, A. L. Mellor, and K. Novakovic, “Genipin-crosslinked chitosan hydrogels: Preliminary evaluation of the in vitro biocompatibility and biodegradation,” *J Appl Polym Sci*, vol. 138, no. 34, Sep. 2021, doi: 10.1002/app.50848.
- [175] N. S. M. Nawi, W. J. Lau, N. Yusof, and A. F. Ismail, “The Impacts of Iron Oxide Nanoparticles on Membrane Properties for Water and Wastewater Applications: a Review,” *Arab J Sci Eng*, vol. 47, no. 5, pp. 5443–5464, May 2022, doi: 10.1007/s13369-021-06373-1.

- [176] I. Maliszewska and T. Czapka, “Electrospun Polymer Nanofibers with Antimicrobial Activity,” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 9, p. 1661, Apr. 2022, doi: 10.3390/polym14091661.
- [177] M. Harun-Ur-Rashid, T. Foyez, S. B. N. Krishna, S. Poda, and A. Bin Imran, “Recent advances of silver nanoparticle-based polymer nanocomposites for biomedical applications,” *RSC Adv*, vol. 15, no. 11, pp. 8480–8505, 2025, doi: 10.1039/D4RA08220F.
- [178] P. Chen *et al.*, “Electrospun nanofibrous membrane with antibacterial and antiviral properties decorated with Myoporium bontioides extract and silver-doped carbon nitride nanoparticles for medical masks application,” *Sep Purif Technol*, vol. 298, p. 121565, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.seppur.2022.121565.
- [179] A. M. Ferreira, A. Vikulina, M. Loughlin, and D. Volodkin, “How similar is the antibacterial activity of silver nanoparticles coated with different capping agents?,” *RSC Adv*, vol. 13, no. 16, pp. 10542–10555, 2023, doi: 10.1039/D3RA00917C.
- [180] W. Al-Zyoud, D. Haddadin, S. A. Hasan, H. Jaradat, and O. Kanoun, “Biocompatibility Testing for Implants: A Novel Tool for Selection and Characterization,” *Materials*, vol. 16, no. 21, p. 6881, Oct. 2023, doi: 10.3390/ma16216881.
- [181] A. Sukumaran, V. K. Sweety, B. Vikas, and B. Joseph, “Cytotoxicity and Cell Viability Assessment of Biomaterials,” in *Cytotoxicity - Understanding Cellular Damage and Response*, IntechOpen, 2023. doi: 10.5772/intechopen.111822.
- [182] International Organization for Standardization, *ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. 2009.
- [183] V. Kumar, N. Sharma, and S. S. Maitra, “In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles,” *Int Nano Lett*, vol. 7, no. 4, pp. 243–256, Dec. 2017, doi: 10.1007/s40089-017-0221-3.
- [184] L. Khalef, R. Lydia, K. Filicia, and B. Moussa, “Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments,” *Cell Biochem Funct*, vol. 42, no. 3, Apr. 2024, doi: 10.1002/cbf.4007.
- [185] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, and E. Capanoglu, “Guidelines for cell viability assays,” *Food Front*, vol. 1, no. 3, pp. 332–349, Sep. 2020, doi: 10.1002/fft2.44.
- [186] C. Korzeniewski and D. M. Callewaert, “An enzyme-release assay for natural cytotoxicity,” *J Immunol Methods*, vol. 64, no. 3, pp. 313–320, Nov. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90438-6.
- [187] J. Małaczewska and A. K. Siwicki, “Commercial Metal-Based Nanocolloids - Evaluation of Cytotoxicity,” *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, vol. 59, no. 1, pp. 115–122, Mar. 2015, doi: 10.1515/bvip-2015-0017.
- [188] X. Zhang, S. Zhang, Z. Yang, Z. Wang, X. Tian, and R. Zhou, “Self-cascade MoS<sub>2</sub> nanozymes for efficient intracellular antioxidation and hepatic fibrosis therapy,” *Nanoscale*, vol. 13, no. 29, pp. 12613–12622, 2021, doi: 10.1039/D1NR02366G.
- [189] K. M. Eder *et al.*, “Standardization of an in vitro assay matrix to assess cytotoxicity of organic nanocarriers: a pilot interlaboratory comparison,” *Drug Deliv Transl Res*, vol. 12, no. 9, pp. 2187–2206, Sep. 2022, doi: 10.1007/s13346-022-01203-9.
- [190] S. Murugadoss, N. Das, L. Godderis, J. Mast, P. H. Hoet, and M. Ghosh, “Identifying nanodescriptors to predict the toxicity of nanomaterials: a case study on

- titanium dioxide,” *Environ Sci Nano*, vol. 8, no. 2, pp. 580–590, 2021, doi: 10.1039/D0EN01031F.
- [191] B. Halamoda-Kenzaoui *et al.*, “The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation,” *J Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 48, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12951-017-0281-6.
- [192] W. Zheng *et al.*, “Acute and chronic cadmium telluride quantum dots-exposed human bronchial epithelial cells: The effects of particle sizes on their cytotoxicity and carcinogenicity,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 495, no. 1, pp. 899–903, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.074.
- [193] P. Ling, P. Yang, X. Gao, X. Sun, and F. Gao, “ROS generation strategy based on biomimetic nanosheets by self-assembly of nanozymes,” *J Mater Chem B*, vol. 10, no. 46, pp. 9607–9612, 2022, doi: 10.1039/D2TB01639G.
- [194] C. M. C. Andrés, J. M. Pérez de la Lastra, C. A. Juan, F. J. Plou, and E. Pérez-Lebeña, “Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies,” *Stresses*, vol. 2, no. 3, pp. 256–274, Jul. 2022, doi: 10.3390/stresses2030019.
- [195] M. Nikzamid, A. Akbarzadeh, and Y. Panahi, “An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 61, p. 102316, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jddst.2020.102316.
- [196] Y. Lai, F. fen Gao, R. ting Ge, R. Liu, S. Ma, and X. Liu, “Metal ions overloading and cell death,” *Cell Biol Toxicol*, vol. 40, no. 1, p. 72, Aug. 2024, doi: 10.1007/s10565-024-09910-4.
- [197] S. M. Korotkov, “Mitochondrial Oxidative Stress Is the General Reason for Apoptosis Induced by Different-Valence Heavy Metals in Cells and Mitochondria,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 19, p. 14459, Sep. 2023, doi: 10.3390/ijms241914459.
- [198] Organization for Economic Co-operation and Development, “Testing Programme of Manufactured Nanomaterials.” Accessed: Aug. 12, 2025. [Online]. Available: <https://web-archiver.oecd.org/2017-04-12/67429-testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm>
- [199] Environmental Protection Agency, “Nanoscale Materials Stewardship Program,” Environmental Protection Agency. Federal Register. Accessed: Aug. 12, 2025. [Online]. Available: <https://www.federalregister.gov/documents/2008/01/28/E8-1411/nanoscale-materials-stewardship-program>
- [200] International Organization for Standardization, *ISO/TR 13121:2011 Nanotechnologies — Nanomaterial risk evaluation*. 2011.
- [201] Secretaría de Economía, *NMX-R-16197-SCFI-2019: Compilación y descripción de métodos toxicológicos de cribado para nanomateriales manufacturados*. ISO/TR 16197:2014 , 2020.
- [202] Secretaría de Economía, *PROY-NMX-R-16197-SCFI-2018: Compilación y descripción de métodos de detección toxicológica para nanomateriales manufacturados*. 2019.
- [203] International Organization for Standardization, *ISO/TR 16197:2014 Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials*. 2014.

- [204] Y. Toledano Magaña, R. Vázquez Duhalt, and L. Acosta Torres, “Presentation,” *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 11, no. 21, pp. 13–14, 2018.
- [205] Roche, “Cytotoxicity Detection Kit (LDH),” Nov. 2020. Accessed: Aug. 09, 2025. [Online]. Available: [https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/167/504/11644793001.pdf?srsId=AfmBOooFmos\\_eHbRaKiCoyx1u-ycTOxfHVgp9DvWytCV3\\_z55V02OM0K](https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/167/504/11644793001.pdf?srsId=AfmBOooFmos_eHbRaKiCoyx1u-ycTOxfHVgp9DvWytCV3_z55V02OM0K)
- [206] Roche, “Cell Proliferation Kit I (MTT),” Dec. 2020, Accessed: Aug. 09, 2025. [Online]. Available: [https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/191/466/11465007001.pdf?srsId=AfmBOoqqvf0w-3DsoGwmo7\\_KpqADTpX35Ib35MoYswjiJ4-tndUhZNzU](https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/191/466/11465007001.pdf?srsId=AfmBOoqqvf0w-3DsoGwmo7_KpqADTpX35Ib35MoYswjiJ4-tndUhZNzU)
- [207] J. D. Bancroft and C. Layton, “The hematoxylin and eosin,” in *Bancroft’s Theory and Practice of Histological Techniques*, Elsevier, 2013, pp. 173–186. doi: 10.1016/B978-0-7020-4226-3.00010-X.
- [208] T. B. Alberti, D. S. Coelho, M. de Prá, M. Maraschin, and B. Veleirinho, “Electrospun PVA nanoscaffolds associated with propolis nanoparticles with wound healing activity,” *J Mater Sci*, vol. 55, no. 23, pp. 9712–9727, Aug. 2020, doi: 10.1007/s10853-020-04502-z.
- [209] J. López-García, M. Lehocký, P. Humpolíček, and P. Sába, “HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation,” *J Funct Biomater*, vol. 5, no. 2, pp. 43–57, May 2014, doi: 10.3390/jfb5020043.
- [210] L. Reijnders, “Safe Functional Modified CuO Nanoparticles?,” *Applied Sciences*, vol. 13, no. 6, p. 3425, Mar. 2023, doi: 10.3390/app13063425.
- [211] N. Müller *et al.*, “3D-cell phantom-experimental setup to assess thermal effects and cell viability of lung tumor cells after electroporation,” *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, p. 27144, Nov. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-78339-w.
- [212] P. Ickrath *et al.*, “Time-Dependent Toxic and Genotoxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles after Long-Term and Repetitive Exposure to Human Mesenchymal Stem Cells,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 14, no. 12, p. 1590, Dec. 2017, doi: 10.3390/ijerph14121590.
- [213] S. Jelinkova *et al.*, “TiO<sub>2</sub> P25 nanoparticles induce mitochondrial damage and increased glutathione synthesis in SH-SY5Y neural cells,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 202, p. 115496, Aug. 2025, doi: 10.1016/j.fct.2025.115496.
- [214] M. K. Ha, Y. J. Shim, and T. H. Yoon, “Effects of agglomeration on in vitro dosimetry and cellular association of silver nanoparticles,” *Environ Sci Nano*, vol. 5, no. 2, pp. 446–455, 2018, doi: 10.1039/C7EN00965H.
- [215] D. Redolfi-Bristol *et al.*, “Exploring the cellular antioxidant mechanism against cytotoxic silver nanoparticles: a Raman spectroscopic analysis,” *Nanoscale*, vol. 16, no. 20, pp. 9985–9997, 2024, doi: 10.1039/D4NR00462K.
- [216] H. Wei, Y. Hu, J. Wang, X. Gao, X. Qian, and M. Tang, “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Metabolism, and Cellular Behavior in

- Biomedicine Applications,” *Int J Nanomedicine*, vol. Volume 16, pp. 6097–6113, Aug. 2021, doi: 10.2147/IJN.S321984.
- [217] G. Bisht, S. Rayamajhi, B. KC, S. N. Paudel, D. Karna, and B. G. Shrestha, “Synthesis, Characterization, and Study of In Vitro Cytotoxicity of ZnO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Composite Nanoparticles in Human Breast Cancer Cell Line (MDA-MB-231) and Mouse Fibroblast (NIH 3T3),” *Nanoscale Res Lett*, vol. 11, no. 1, p. 537, Dec. 2016, doi: 10.1186/s11671-016-1734-9.
- [218] H.-L. Lee *et al.*, “Gold Nanodandelions as Nanozymes and Reactive Oxygen Species Scavengers in Tumor Microenvironment Components,” *ACS Appl Nano Mater*, vol. 6, no. 22, pp. 21359–21370, Nov. 2023, doi: 10.1021/acsnm.3c04734.
- [219] J. O. Adeyemi, T. O. Ajiboye, A. O. Oyedeji, M. Singh, and O. A. Fawole, “Cytotoxic evaluation of Dovyalis Caffra leaf extract-mediated hematite-(Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles for biological applications,” *Nano Express*, vol. 5, no. 3, p. 035004, Sep. 2024, doi: 10.1088/2632-959X/ad5d80.
- [220] J. L. de la Fuente-Jiménez *et al.*, “A Comparative and Critical Analysis for In Vitro Cytotoxic Evaluation of Magneto-Crystalline Zinc Ferrite Nanoparticles Using MTT, Crystal Violet, LDH, and Apoptosis Assay,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 16, p. 12860, Aug. 2023, doi: 10.3390/ijms241612860.
- [221] I. Papageorgiou *et al.*, “The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 19, pp. 2946–2958, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.034.
- [222] J. Liu, A. Rickel, S. Smith, Z. Hong, and C. Wang, “‘Non-cytotoxic’ doses of metal-organic framework nanoparticles increase endothelial permeability by inducing actin reorganization,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 634, pp. 323–335, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.jcis.2022.12.020.
- [223] H.-G. Kim, M.-H. Ro, and M. Lee, “The role of alternative autophagy in cell viability and response to paclitaxel treatment in v-Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 736, p. 150506, Dec. 2024, doi: 10.1016/j.bbrc.2024.150506.
- [224] L. F. Barraza-Vergara, L. Carmona-Sarabia, W. Torres-García, M. Domenech-García, J. Mendez-Vega, and M. Torres-Lugo, “In vitro assessment of inflammatory skin potential of poly(methyl methacrylate) at non-cytotoxic concentrations,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 111, no. 11, pp. 1822–1832, Nov. 2023, doi: 10.1002/jbm.a.37591.
- [225] M.-T. Zhu *et al.*, “Oxidative Stress and Apoptosis Induced by Iron Oxide Nanoparticles in Cultured Human Umbilical Endothelial Cells,” *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 10, no. 12, pp. 8584–8590, Dec. 2010, doi: 10.1166/jnn.2010.2488.
- [226] F. Sbrana *et al.*, “Label-free three-dimensional imaging and quantitative analysis of living fibroblasts and myofibroblasts by holotomographic microscopy,” *Microsc Res Tech*, vol. 87, no. 11, pp. 2757–2773, Nov. 2024, doi: 10.1002/jemt.24648.
- [227] M. Safi and J.-F. Berret, “The role of the coating and aggregation state in the interactions between iron oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts,” *Phys Procedia*, vol. 9, pp. 266–269, 2010, doi: 10.1016/j.phpro.2010.11.059.

- [228] D. Zhang, L. Wei, M. Zhong, L. Xiao, H.-W. Li, and J. Wang, “The morphology and surface charge-dependent cellular uptake efficiency of upconversion nanostructures revealed by single-particle optical microscopy,” *Chem Sci*, vol. 9, no. 23, pp. 5260–5269, 2018, doi: 10.1039/C8SC01828F.
- [229] S. Mazumdar, D. Chitkara, and A. Mittal, “Exploration and insights into the cellular internalization and intracellular fate of amphiphilic polymeric nanocarriers,” *Acta Pharm Sin B*, vol. 11, no. 4, pp. 903–924, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.apsb.2021.02.019.
- [230] M. Ledda *et al.*, “Biocompatibility assessment of sub-5 nm silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in human stem cells and in mice for potential application in nanomedicine,” *Nanoscale*, vol. 12, no. 3, pp. 1759–1778, 2020, doi: 10.1039/C9NR09683C.
- [231] M. Harun-Ur-Rashid, T. Foyez, S. B. N. Krishna, S. Poda, and A. Bin Imran, “Recent advances of silver nanoparticle-based polymer nanocomposites for biomedical applications,” *RSC Adv*, vol. 15, no. 11, pp. 8480–8505, 2025, doi: 10.1039/D4RA08220F.
- [232] International Organization for Standardization, “ISO 10993-5:2009,” 2009.
- [233] A. D. Sekar, V. Kumar, H. Muthukumar, P. Gopinath, and M. Matheswaran, “Electrospinning of Fe-doped ZnO nanoparticles incorporated polyvinyl alcohol nanofibers for its antibacterial treatment and cytotoxic studies,” *Eur Polym J*, vol. 118, pp. 27–35, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.05.038.
- [234] American Society for Testing and Materials, *ASTM D883-17: Terminology Relating to Plastics*. ASTM International, 2017. doi: 10.1520/D0883-17.
- [235] Y. S. Heris, “Bacterial biodegradation of synthetic plastics: a review,” *Bull Natl Res Cent*, vol. 48, no. 1, p. 87, Sep. 2024, doi: 10.1186/s42269-024-01241-y.
- [236] D. Das *et al.*, “Soil microbial dynamics in response to the impact of nanoparticles on agricultural implications,” *Discover Soil*, vol. 2, no. 1, p. 58, Jul. 2025, doi: 10.1007/s44378-025-00087-8.
- [237] American Society for Testing and Materials, *ASTM D5988-18: Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil*, vol. 08.03. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2018. doi: 10.1520/D5988-18.
- [238] E. Di Carlo, G. Barresi, and F. Palla, “Biodeterioration,” in *Biotechnology and Conservation of Cultural Heritage*, Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 1–30. doi: 10.1007/978-3-030-97585-2\_1.
- [239] M. Tania and V. Anand, “The implementation of microbes in plastic biodegradation,” *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, vol. 11, no. 2, pp. 208–218, Jun. 2025, doi: 10.1007/s43994-023-00077-y.
- [240] M. S. Kim *et al.*, “A Review of Biodegradable Plastics: Chemistry, Applications, Properties, and Future Research Needs,” *Chem Rev*, vol. 123, no. 16, pp. 9915–9939, Aug. 2023, doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00876.
- [241] S. Hahn and D. Hennecke, “What can we learn from biodegradation of natural polymers for regulation?,” *Environ Sci Eur*, vol. 35, no. 1, p. 50, Jun. 2023, doi: 10.1186/s12302-023-00755-y.
- [242] S. Jha, B. Akula, H. Enyioma, M. Novak, V. Amin, and H. Liang, “Biodegradable Biobased Polymers: A Review of the State of the Art, Challenges, and Future

- Directions,” *Polymers (Basel)*, vol. 16, no. 16, p. 2262, Aug. 2024, doi: 10.3390/polym16162262.
- [243] G. Satchanska, S. Davidova, and P. D. Petrov, “Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications,” *Polymers (Basel)*, vol. 16, no. 8, p. 1159, Apr. 2024, doi: 10.3390/polym16081159.
- [244] A. Samir, F. H. Ashour, A. A. A. Hakim, and M. Bassyouni, “Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications,” *Npj Mater Degrad*, vol. 6, no. 1, p. 68, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41529-022-00277-7.
- [245] M. C. Zambrano, J. J. Pawlak, and R. A. Venditti, “Effects of chemical and morphological structure on biodegradability of fibers, fabrics, and other polymeric materials,” *Bioresources*, vol. 15, no. 4, pp. 9786–9833, Sep. 2020, doi: 10.15376/biores.15.4.Zambrano.
- [246] N. Nomadolo, O. E. Dada, A. Swanepoel, T. Mokhena, and S. Muniyasamy, “A Comparative Study on the Aerobic Biodegradation of the Biopolymer Blends of Poly(butylene succinate), Poly(butylene adipate terephthalate) and Poly(lactic acid),” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 9, p. 1894, May 2022, doi: 10.3390/polym14091894.
- [247] Z. W. Abdullah and Y. Dong, “Biodegradable and Water Resistant Poly(vinyl) Alcohol (PVA)/Starch (ST)/Glycerol (GL)/Halloysite Nanotube (HNT) Nanocomposite Films for Sustainable Food Packaging,” *Front Mater*, vol. 6, Apr. 2019, doi: 10.3389/fmats.2019.00058.
- [248] J. Oliveira *et al.*, “Marine Environmental Plastic Pollution: Mitigation by Microorganism Degradation and Recycling Valorization,” *Front Mar Sci*, vol. 7, Dec. 2020, doi: 10.3389/fmars.2020.567126.
- [249] R. R. A. Silva, C. S. Marques, T. R. Arruda, S. C. Teixeira, and T. V. de Oliveira, “Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects,” *Macromol*, vol. 3, no. 2, pp. 371–399, Jun. 2023, doi: 10.3390/macromol3020023.
- [250] W. Li, G.-C. Fan, F. Gao, Y. Cui, W. Wang, and X. Luo, “High-activity Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanozyme as signal amplifier: A simple, low-cost but efficient strategy for ultrasensitive photoelectrochemical immunoassay,” *Biosens Bioelectron*, vol. 127, pp. 64–71, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2018.11.043.
- [251] F. Wei, X. Cui, Z. Wang, C. Dong, J. Li, and X. Han, “Recoverable peroxidase-like Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MoS<sub>2</sub>-Ag nanozyme with enhanced antibacterial ability,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 408, p. 127240, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.cej.2020.127240.

# Apéndice A

## A.1 Fórmula de Debye–Scherrer

A continuación, se presenta la fórmula de Debye–Scherrer para el cálculo del tamaño de cristalito.

Ecuación 5 Fórmula de Debye–Scherrer

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Donde:

$D$ : Tamaño del cristalito

$\lambda$ : Longitud de onda de rayos X (1.54 Å)

$k$ : Constante de Scherrer

$\beta$ : ancho total a la mitad del máximo (FWHM)

$\theta$ : ángulo de Bragg

## A.2 Distribución de tamaño de NZs Cu–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

A continuación, se presenta el histograma de la distribución de tamaño de partícula de las nanozimas Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (a) y por síntesis química (b). Se observa que las nanozimas sintetizadas mediante ruta verde presentan un tamaño promedio de 29 nm, mientras que las obtenidas por síntesis química alcanzan un tamaño promedio de 108 nm

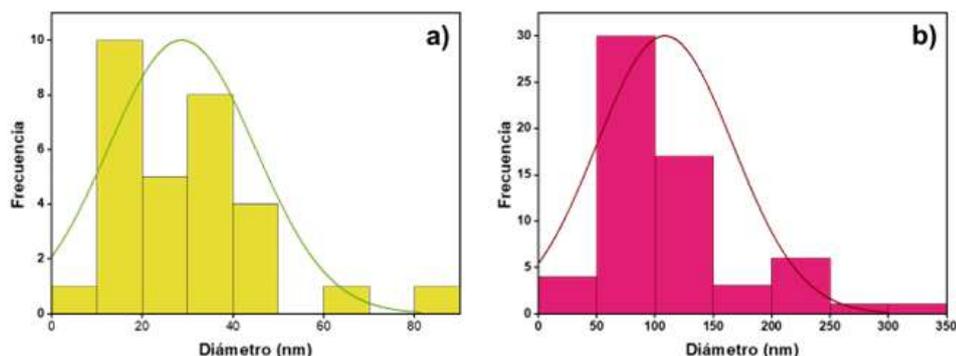


Figura 28 Histogramas de distribución de tamaño de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (a) y NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis química (b), obtenidas a partir de micrografías SEM.

A continuación, se presenta el histograma de la distribución de tamaño de del diámetro de las fibras de la membrana polimérica PVA/PAA antes (a) y después de la incorporación de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por síntesis verde (b) y síntesis química (c). Se observa que las fibras de la membrana polimérica PVA/PAA presentaron un diámetro de 299.75, las membranas con nanozimas obtenidas por síntesis verde de 246.91nm y las químicas de 268.21 nm.

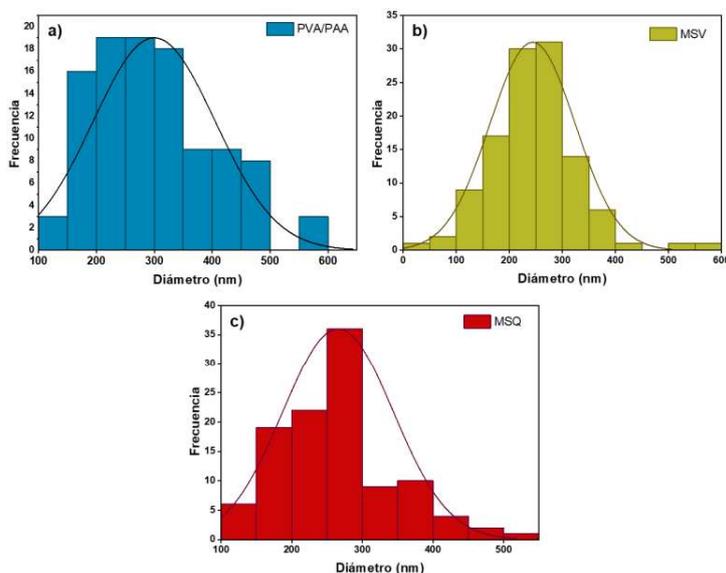


Figura 29 Histogramas de distribución de tamaño del diámetro de las fibras de la membrana polimérica PVA/PAA antes (a) y después de la incorporación de las NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por síntesis verde (b) y síntesis química (c), obtenidas a partir de micrografías SEM.

### A.3 Viabilidad celular de las nanozimas en tiempos de exposición de 3 y 12 h

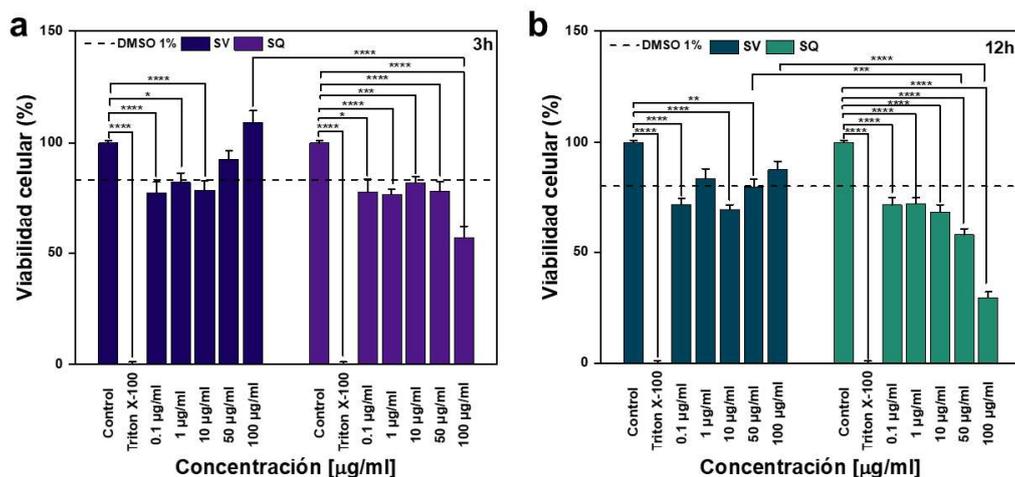


Figura 30 Ensayo de viabilidad celular en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) tras el tratamiento a 3 h (a) y 12 h (b); con distintas concentraciones de NZs de NZs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde (SV) y síntesis química (SQ). Los datos se expresan como media ±SEM para n>3.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de una prueba post-hoc de Tukey con el software Minitab Statistical Software; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

## A.4 Comparación de la constante de Michaelis aparente y la velocidad máxima de reacción

A continuación, se muestra la tabla con los valores de la constante de Michaelis aparente ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ) de las Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtenidas por síntesis verde, junto con su comparación frente a otras nanozimas reportadas en la literatura.

Tabla 8 Comparación de la constante de Michaelis aparente ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ).

Catalizador	Sustrato	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	Referencia
<b>CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	TMB	$2.26 \times 10^3$	1.242	[123]
<b>His- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	TMB	$6.22 \times 10^3$	9.42	[250]
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MoS<sub>2</sub></b>	TMB	250	6.66	[251]
<b>Cu- Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	TMB	3.514	15.84	Este trabajo
<b>HRP</b>	TMB	97.37	2.85	Este trabajo