

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Titlle Paper/Título del artículo:

Perfil fitoquímico de extractos de *Annona muricata* y su empleo para la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc con actividad antimicrobiana

Phytochemical profile of *Annona muricata* extracts and their use for the synthesis of zinc oxide nanoparticles with antimicrobial activity

Authors/Autores: Flores Castellanos A. P., Gutiérrez Pinzón Y., Velázquez Juárez G., Velázquez-López J. M., Lomelí Rosales D. A.

ID: e1880

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

Received/Fecha de recepción: December 30th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: September 10th 2026

Available online/Fecha de publicación: September 22th 2026

Please cite this article as/Como citar este artículo: Flores Castellanos A. P., Gutiérrez Pinzón Y., Velázquez Juárez G., Velázquez-López J. M., Lomelí Rosales D. A. (2026). Phytochemical profile of *Annona muricata* extracts and their use for the synthesis of zinc oxide nanoparticles with antimicrobial activity. *Revista Bio Ciencias*, 13, e1880. <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

Artículo original / Original article

Perfil fitoquímico de extractos de *Annona muricata* y su empleo para la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc con actividad antimicrobiana

Phytochemical profile of *Annona muricata* extracts and their use for the synthesis of zinc oxide nanoparticles with antimicrobial activity

Flores Castellanos A. P.¹([ORCID: 0009-0008-8819-0756](#)), Gutiérrez Pinzón Y.² ([ORCID: 0009-0004-0861-2041](#)), Velázquez Juárez G.¹ ([ORCID: 0000-0002-1130-4021](#)), Velázquez-López J. M.¹ ([ORCID: 0000-0002-8714-3551](#)), Lomelí Rosales D. A.,^{1*}([ORCID: 0000-0002-9949-5829](#))

¹ Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara 44430, Jalisco, México.

² Doctorado en Procesos Biotecnológicos, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara 44430, Jalisco, México.

*Corresponding Author:

Diego Alberto Lomelí-Rosales. Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara 44430, Jalisco, México. Teléfono: +52 (33) 1378 5900. ext. 27529. E-mail: diego.lomeli4077@academicos.udg.mx

RESUMEN

En los últimos años ha habido un creciente interés en la obtención de nanopartículas metálicas debido a su potencial uso como agentes antimicrobianos, ante los recientes estudios de bacterias que presentan resistencia a antibióticos. Entre estas, las nanopartículas de plata han sido las más empleadas para tal aplicación; sin embargo, se ha puesto interés en otros metales como el zinc. En este sentido, en este artículo se presenta la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) preparadas a partir de extractos etanólicos de diferentes partes de la planta *Annona muricata*, como son hoja, semilla, cáscara y pulpa, presentando una nueva serie de nanopartículas funcionalizadas y estabilizadas por fitocompuestos encontrados en dichos tejidos vegetales, contribuyendo a una síntesis más redituable. Además, se realizó un análisis fitoquímico de los componentes principales presentes en los tejidos como son aminoácidos libres, taninos, polifenoles, flavonoides, y azúcares reductores, presentando una comparación del contenido de estos fitocomponentes antes y después de la síntesis de las ZnONPs, observando el consumo de algunos de ellos para la estabilización de las nanopartículas. Finalmente se evaluó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas frente a las bacterias *E. coli* y *S. aureus*.

PALABRAS CLAVE:

Annona muricata, fitoquímicos, síntesis verde, nanopartículas de óxido de zinc, efecto antimicrobiano.

ABSTRACT

In recent years, there has been growing interest in using metallic nanoparticles as potential antimicrobial agents, particularly amid the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Among these,

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

silver nanoparticles (AgNPs) have been the most extensively studied; however, there has recently been interest in other metals, such as zinc. Therefore, this article presents the synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) prepared from aqueous and ethanolic extracts of different parts of the *Annona muricata* plant, such as leaf, seed, peel, and pulp, presenting a new series of nanoparticles functionalized and stabilized by phytochemicals found in said plant tissues, contributing to a more profitable synthesis. Likewise, the phytochemical profile of the main components in the tissues, including free amino acids, tannins, polyphenols, flavonoids, and reducing sugars, was analyzed. A comparative assessment was conducted to determine the content of these phytochemicals before and after the nanoparticles' synthesis. Furthermore, the antibacterial activity of the resulting nanoparticles was evaluated against *E. coli* and *S. aureus* bacteria.

KEY WORDS:

Annona muricata, phytochemicals, green synthesis, zinc oxide nanoparticles, antimicrobial effect.

Introducción

La síntesis de nanopartículas metálicas ha sido uno de los focos de estudio en las últimas décadas, debido a que se busca que se produzcan de manera más amigable con el ambiente, dejando un poco atrás las síntesis típicas (químicas y físicas) y centrándose en un área emergente conocida como "síntesis verde" o "biosíntesis" de nanomateriales, donde se aprovechan las biomoléculas extraídas de componentes naturales que cumplen un doble propósito: son químicamente capaces de reducir iones metálicos para formar las nanopartículas (agentes reductores) y presentan grupos funcionales orgánicos capaces de coordinarse a la superficie de las nanopartículas para poder se estabilizarlas (agente estabilizante) (Iravani *et al.*, 2014; Kent, 2023; Kunjiappan *et al.*, 2014; Lomelí-Rosales *et al.*, 2019).

En este sentido, se han reportado algunos extractos a partir de tejidos vegetales, donde se ha estudiado el perfil fitoquímico y los biocomponentes empleados de la planta para la formación de nanopartículas metálicas, por ejemplo, tallos, hojas y algunas raíces de diversas especies vegetales, cáscaras de algunos cítricos, liofilizados de hongos y biomasa, por mencionar algunas fuentes de dichas biomoléculas (Eldeeb *et al.*, 2023; Iravani, 2011; Kobylinska *et al.*, 2022).

Una de las principales aplicaciones que han tenido algunas nanopartículas metálicas (NPSM), sobre todo las de plata (AgNPs) (Lomelí-Rosales *et al.*, 2022a) ha sido dentro del área de microbiología, donde algunos sistemas a base de nanopartículas han funcionado como nuevos agentes antimicrobianos con el objetivo de proporcionar nuevos sistemas contra bacterias que han generado resistencia a antibióticos. Con este fin, las nanopartículas de óxidos metálicos, como puede ser el óxido de zinc (ZnONPs) se están explorando como agentes antimicrobianos potenciales (Khajuria *et al.*, 2019), ya que son estables, robustas y tienen una larga vida útil, además de presentar una buena bioactividad, fuerte capacidad de absorción y toxicidad reducida (Ifeanyichukwu *et al.*, 2020; Vanathi *et al.*, 2014).

De manera similar, se tienen también reportes de diversos extractos de tejidos vegetales como el de *Aloe barbadensis* (Sangeetha *et al.*, 2011), *Punica granatum* (Ifeanyichukwu *et al.*, 2020), *Viola canescens* (Khajuria *et al.*, 2019) e *Hibiscus sabdariffa* (Bala *et al.*, 2015). Con el propósito de contribuir a estudios de síntesis verde para la síntesis de nanopartículas de óxidos de zinc, es que en este trabajo se presenta la síntesis de nanopartículas estabilizadas por biocomponentes de extractos etanólicos de cáscara (ZnONPs-C), semilla (ZnONPs-S), pulpa (ZnONPs-P), y hoja

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

(ZnONPs-H) de *Annona muricata*, proponiendo nuevos sistemas que puedan funcionar como agentes antimicrobianos.

Material y Métodos

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Merck) y empleados sin purificación adicional. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua destilada estéril y etanol al 96 %.

Recolección y preparación de la planta de *Annona Muricata*

Las hojas, cáscaras y semillas de *Annona muricata* son residuos agroindustriales del poblado Camichín de Jauja, municipio de Tepic, Nayarit. Todos los tejidos fueron lavados por separado con agua corriente para eliminar el polvo y posteriormente enjuagados con agua bidestilada. Las hojas fueron secadas a 50 °C y posteriormente trituradas, mientras que el resto de los tejidos fue almacenado sin ningún tratamiento adicional, a -20 °C para su uso posterior.

Preparación de extractos

Se prepararon 4 matraces Erlenmeyer, a los cuales se añadieron 50.00 mL de etanol cada uno, junto con el tejido correspondiente, como sigue: para hoja se pesaron 5.00 g, mientras que para cáscara y semilla se pesaron y añadieron 10.00 g de cada una. Cada matraz fue cubierto con aluminio y colocado en agitación suave durante 24 h. Posteriormente fueron sonicados durante 10 min, los contenidos fueron filtrados al vacío y los líquidos almacenados en ausencia de luz a -20 °C para usos posteriores.

Síntesis y purificación de las nanopartículas de óxido de zinc

Una disolución 0.100 M de $(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ fue preparada disolviendo 1.48 g en 50 mL de agua destilada. Se tomaron 4 vasos de precipitado de 50 mL en los cuales se vertieron 10 mL de cada extracto de la planta previamente preparado, se mantuvieron en agitación constante y se llevaron a calentamiento de 50 °C, una vez alcanzada la temperatura se le añadió 1.00 mL de la solución de zinc y posteriormente se adicionó gota a gota la cantidad necesaria de una disolución acuosa de 0.05 M de NaOH, hasta observar un precipitado de color blanco. Los precipitados fueron purificados mediante centrifugación a 15,000 rpm durante 15 minutos y lavados con agua y etanol. Este procedimiento se realizó por triplicado. Los productos finales resultaron en polvos de color blanco que se sometieron a secado en un horno a 35 °C durante 24h.

Ensayo de microdilución en pozos para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) con resazurina.

Para llevar a cabo este ensayo se inocularon las cepas en medio TSB durante 8-12 h para alcanzar una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ entre 0.4 y 0.8. Posteriormente, estos inóculos se utilizaron para ajustar su $\text{OD}_{600\text{nm}}$ a 0.1. En una microplaca estéril se añadieron 300 μL del tratamiento disuelto en medio TSB suplementado con DMSO al 2% (w/v). Se realizaron diluciones 1:1 del tratamiento original con medio TSB, se añadieron 30 μL del cultivo ajustado. Como control positivo, se colocaron 300 μL del cultivo de bacterias en una fila de pozos y como control negativo, se colocaron 300 μL de medio TSB+DMSO al 2% estéril. Se dejaron incubar durante 24 h a 37 °C y transcurrido el tiempo se añadieron 15 μL de resazurina al 0.015%. Se dejó incubar a 37 °C durante 1 h y se analizaron los resultados.

Ensayo para obtener Concentración Mínima Bactericida (MBC)

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

Se emplearon las mismas diluciones utilizadas en los ensayos para calcular la MIC y la MBC. Se tomaron 100 µL de los pozos de las microplacas donde no se observó crecimiento bacteriano durante al menos 24-48 horas incubado a 37 °C. Se inocularon 100 µL se inocularon en placas con agar LB utilizando un asa se siembra en zigzag. Se incubaron durante 24-48 horas a 37 °C. Se considera MBC como la concentración más baja en la cual no se observa crecimiento de colonias.

Actividad antioxidante y perfil fitoquímico de los extractos y sobrenadantes

Para las pruebas de perfil fitoquímico (aminoácidos libres, flavonoides, taninos), así como para la actividad antioxidante (ABTS y DPPH) se analizaron los extractos puros (antes de la síntesis de las ZnONPs) y los sobrenadantes (después de la síntesis de las ZnONPs), siguiendo los protocolos en microplaca reportados por Lomelí-Rosales *et al.*, (2022)

Para la obtención de los sobrenadantes, las muestras fueron centrifugadas a 15 000 rpm durante 15 minutos para garantizar la remoción completa de las nanopartículas y evitar la interferencia del Zn en las mediciones de actividad antioxidante. Todos los valores se obtuvieron a partir de tres análisis independientes. Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Se utilizó una prueba de análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para el análisis estadístico de los datos.

Resultados

Síntesis de las nanopartículas

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas propuestas en este trabajo se empleó el método llamado coprecipitación, el cual consiste en agregar una sal metálica en medio acuoso seguida de un hidróxido o agente precipitante, durante este proceso se adicionaron los extractos de *Annona muricata* (semilla, hoja, cáscara y pulpa) con el fin de que las biomoléculas contenidas en los extractos actuaran como estabilizantes y a la vez como agentes funcionalizantes de la superficie.

Para ello, se prepararon cuatro disoluciones de tejidos de *Annona muricata* empleando dos métodos de extracción de los biocomponentes: el primero consistió en realizar extracciones a 50 °C en medio acuoso, y el segundo, en etanol a temperatura ambiente, con la finalidad de extraer componentes con ligeras diferencias de polaridad, asegurando su solubilidad en disolventes polares para facilitar los análisis y aplicaciones.

Se prepararon 4 matraces Erlenmeyer, se añadieron 50 mL de agua y se colocaron a 50 °C, alcanzada la temperatura, se le añadieron los correspondientes tejidos como sigue: para hoja se pesaron 5.00 g, mientras que para cáscara, semilla y pulpa se tomaron 10.00 g de cada uno. Transcurridos 15 minutos de calentamiento, las disoluciones fueron enfriadas, filtradas al vacío y almacenadas para su uso posterior. Para las extracciones en etanol, se tomaron las mismas cantidades de tejidos, cada matraz fue cubierto con aluminio y permaneció en agitación suave durante 24 h. Posteriormente, se llevaron a sonicar durante 10 min y, finalmente, se filtraron al vacío y se almacenaron en ausencia de luz a -20 °C para su posterior uso. Los remanentes de la primera centrifugada se almacenaron para el posterior análisis del perfil fitoquímico y de actividad antioxidante.

Una vez preparadas las extracciones, se procedió a realizar la síntesis de las nanopartículas; para ello, se empleó una disolución acuosa de concentración de 0.100 M de nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Se prepararon cuatro vasos de precipitado conteniendo 10.00 mL de la disolución acuosa de cada uno de los tejidos y otros cuatro vasos conteniendo 10.00 mL de la disolución de etanol, a cada uno de ellos se le añadió 1.00 mL de la disolución de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ y permanecieron en

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

agitación durante 15 min. Este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y, en otro experimento, a 50 °C. Para ambos casos, después del tiempo de agitación se les adicionó gota a gota, una disolución de concentración 0.50 M de NaOH como agente precipitante. La adición terminó hasta observar que ya no se presentaba la precipitación del sólido blanco esperado. Los precipitados fueron purificados mediante centrifugación a 15,000 rpm durante 15 minutos y lavados con agua y etanol, el procedimiento se realizó por triplicado. Los productos finales resultaron en polvos de color blanco que se sometieron a secado en un horno a 35 °C durante 24h.

Caracterización por FTIR-ATR de las nanopartículas

La caracterización principal para estos sólidos se llevó a cabo mediante espectroscopía FTIR-ATR, para corroborar la presencia de los grupos funcionales orgánicos en la superficie de las nanopartículas. Para ello, a fin de comparar las señales que se observarían entre las nanopartículas y los extractos puros, los 4 extractos de los tejidos de *Annona muricata* (acuosos y etanólicos) fueron secados en un horno a 50 °C durante 24 h, los polvos de colores amarillentos o marrones resultantes fueron raspados y almacenados para el análisis.

Como resultado del primer análisis por FTIR-ATR, las nanopartículas obtenidas a partir de los extractos acuosos y etanólicos a temperatura ambiente no mostraron picos característicos que indicaran la presencia de material orgánico en su superficie. En general los espectros fueron similares, con señales en 3100 cm⁻¹ y 1300 cm⁻¹, los cuales son característicos de nanopartículas sin funcionalizar.

Por otro lado, al caracterizar las nanopartículas preparadas con los extractos acuosos a 50 °C se logró observar la presencia de algunos grupos orgánicos, sin embargo estas muestras fueron descartadas, ya que la intensidad de dichos picos era muy tenue, en ocasiones confundiendo con el ruido, indicando la baja concentración de los compuestos orgánicos en la superficie de las nanopartículas, todo lo contrario a las ZnONPs preparadas con los extractos etanólicos a 50 °C, mostrando señales bien definidas y de alta intensidad. Con estos resultados, se logró establecer los parámetros de síntesis adecuados para la obtención de las nanopartículas estabilizadas por biocomponentes de extractos etanólicos de cáscara (ZnONPs-C), semilla (ZnONPs-S), pulpa (ZnONPs-P), y hoja (ZnONPs-H) de *Annona muricata*, se procedió también a sintetizar una muestra de ZnONPs siguiendo el mismo protocolo pero sin añadir ningún extracto, es decir, sin funcionalizar, la cual sería empleada como comparativo en los análisis, así mismo se analizó la sal de Zn(NO₃)₂·6H₂O con el mismo propósito.

En la Figura 1 se muestran los espectros obtenidos de las muestras. Para el Zn(NO₃)₂·6H₂O se presentaron tres picos: el primero a 3326.9 cm⁻¹, el cual corresponde a las moléculas de H₂O, seguido de un pico de intensidad media a 1624.7 cm⁻¹ y finalmente otro a 1361.2 cm⁻¹ correspondientes a los estiramientos y flexiones del N-O. Por otro lado, al analizar a las ZnONPs se observaron tres picos similares a la sal de nitrato: 3025.5 cm⁻¹, 1647.3 cm⁻¹ y 1338.6 cm⁻¹, adicional a estos picos se presentan algunos pequeños en la zona entre 583 a 754 cm⁻¹, donde se podría apreciar el estiramiento del enlace Zn-O de acuerdo con la literatura. (Abdelghani *et al.*, 2022)

Al analizar los cuatro extractos, de manera general presentan cinco grupos de picos muy similares: alrededor de los 3306.3 se observa un pico debido a los estiramientos de enlaces -OH, seguido de dos picos de 2927.6 cm⁻¹ y 2855.6 cm⁻¹ que se pueden adjudicar a los estiramientos y flexiones de grupos -CH₂ y -CH₃, donde cabe destacar que el extracto de semilla los presenta con una intensidad relativa muy alta, indicando gran concentración de moléculas con cadenas alifáticas, (lo mismo se observó para el pico en 1746.1 cm⁻¹), el siguiente grupo de picos se presenta alrededor de 1665.5 cm⁻¹ a 1602.1 cm⁻¹ propios del estiramiento de grupos carbonilo (C=O), y finalmente de 1099.8 cm⁻¹ a 1027.8 cm⁻¹ aparece un pico ancho de intensidad media que corrobora la presencia de estiramientos C-C, CH y alcoholes primarios.

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

Por otro lado, al analizar los espectros de las nanopartículas funcionalizadas se observó que las cuatro muestras presentaron el estiramiento de enlace -OH con picos que oscilan de 3306.8 cm^{-1} a 3252.1 cm^{-1} , así mismo se observó la presencia del estiramiento C=O que oscilaron entre 1594.93 cm^{-1} a 1568.0 cm^{-1} . Para ambos grupos funcionales al compararlos con los picos observados en los extractos puros, estos presentaron un desplazamiento a menores números de onda, indicando la coordinación de estos grupos a la superficie de la nanopartícula. Adicional a estos picos, en las cuatro muestras se presentaron los estiramientos cuyo número de onda se presentan de 1397.3 cm^{-1} a 1338.9 cm^{-1} y que en los extractos puros no se presentaron, esto puede ser indicativo de una especie oxidada de alcoholes secundarios (cetonas). Por último, generalizando, se observaron pequeños picos de 552 cm^{-1} a 533.5 cm^{-1} por el estiramiento Zn-O, debiendo señalar que estos movimientos son en la mayoría de las ocasiones, complicados de observados ya que los estiramientos metal-orgánico se aprecian mejor en otra región del espectro electromagnético de menor energía.

Ahora bien, de manera particular, para ZnONPs-S y ZnONPs-P se observaron los picos característicos de los estiramientos -CH₂ y -CH₃ a 2929.9 cm^{-1} y 2851.4 cm^{-1} y sus respectivas confirmaciones a 1026.7 cm^{-1} y 1019.0 cm^{-1} , indicando que los grupos alifáticos quedaron estabilizando a las nanopartículas sin sufrir cambio alguno. Los espectros de este análisis se muestran en la Figura 1.

Evaluación del perfil fitoquímico y actividad antioxidante

Una vez preparadas las nanopartículas siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se repitieron las síntesis por triplicado y sus remanentes fueron analizados para comparar las principales biomoléculas determinadas en los extractos puros, con el fin de presentar las biomoléculas que se ven consumidas al estar involucradas durante la síntesis, ya sea para contribuir a la formación de las nanopartículas o a la estabilidad y funcionalización de estas. Para hacer un comparativo adecuado, los extractos fueron diluidos al mismo volumen que los remanentes de cada síntesis de sus respectivas nanopartículas.

Como resultado del análisis de las muestras, se pueden apreciar los gráficos de la Figura 2, para lo cual a partir de los valores numéricos se obtuvo el porcentaje de consumo, de donde, para polifenoles totales se presentó un consumo de la concentración relativa inicial del extracto del 40.7 % en las ZnONPs-C, 38.9 % en ZnONPs-H, 18.1 % en las ZnONPs-P y un 3.5 % ZnONPs-S. Siguiendo con este análisis, los resultados más representativos al determinar flavonoides se presentaron con 22.9 % consumidos en ZnONPs-H y 13.52 % en las ZnONPs-C, del contenido inicial, las otras dos muestras tuvieron un consumo menor. Aunado a este resultado, para taninos las ZnONPs-S tuvieron un consumo de 55.4 %, seguido de las ZnONPs-H con un 48 %, ZnONPs-P con 31.5 % y en menor cantidad las NPsZnO-C con un consumo del 16.3 %, para finalmente llegar al análisis de los aminoácidos libres, donde los porcentajes relativos más relevantes de consumo fueron: 22.5% en ZnONPs-S, 33.7 % en ZnONPs-P y 68 % en ZnONPs-H. Cabe mencionar que los taninos y los aminoácidos fueron los grupos de biomoléculas que más fueron consumidos para la síntesis y estabilización de las nanopartículas.

Una vez analizado el perfil fitoquímico de los extractos, se procedió a analizar la actividad antioxidante de los mismos (Figura 3), encontrando que los extractos puros presentaron un valor inicial de $389.21 \pm 17.47\text{ }\mu\text{M TE (hoja)}$, $397.48 \pm 30.03\text{ }\mu\text{M TE (cáscara)}$, $253.36 \pm 84.98\text{ }\mu\text{M TE (semilla)}$ y $245.38 \pm 67.86\text{ }\mu\text{M TE (pulpa)}$ analizados mediante el método para DPPH, así mismo cuando se analizaron los valores de los sobrenadantes de las nanopartículas se encontraron cambios considerables, $373.53 \pm 10.71\text{ }\mu\text{M TE (ZnONPs-H)}$, $346.57 \pm 73.18\text{ }\mu\text{M TE (ZnONPs-C)}$, $187.08 \pm 122.09\text{ }\mu\text{M TE (ZnONPs-S)}$, $175.57 \pm 91.28\text{ }\mu\text{M TE (ZnONPs-P)}$, cuyos valores

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

corresponden respectivamente al 4.02 %, 12.81%, 26.15 % y 28.45 % de reducción de la actividad antioxidante determinada en DPPH.

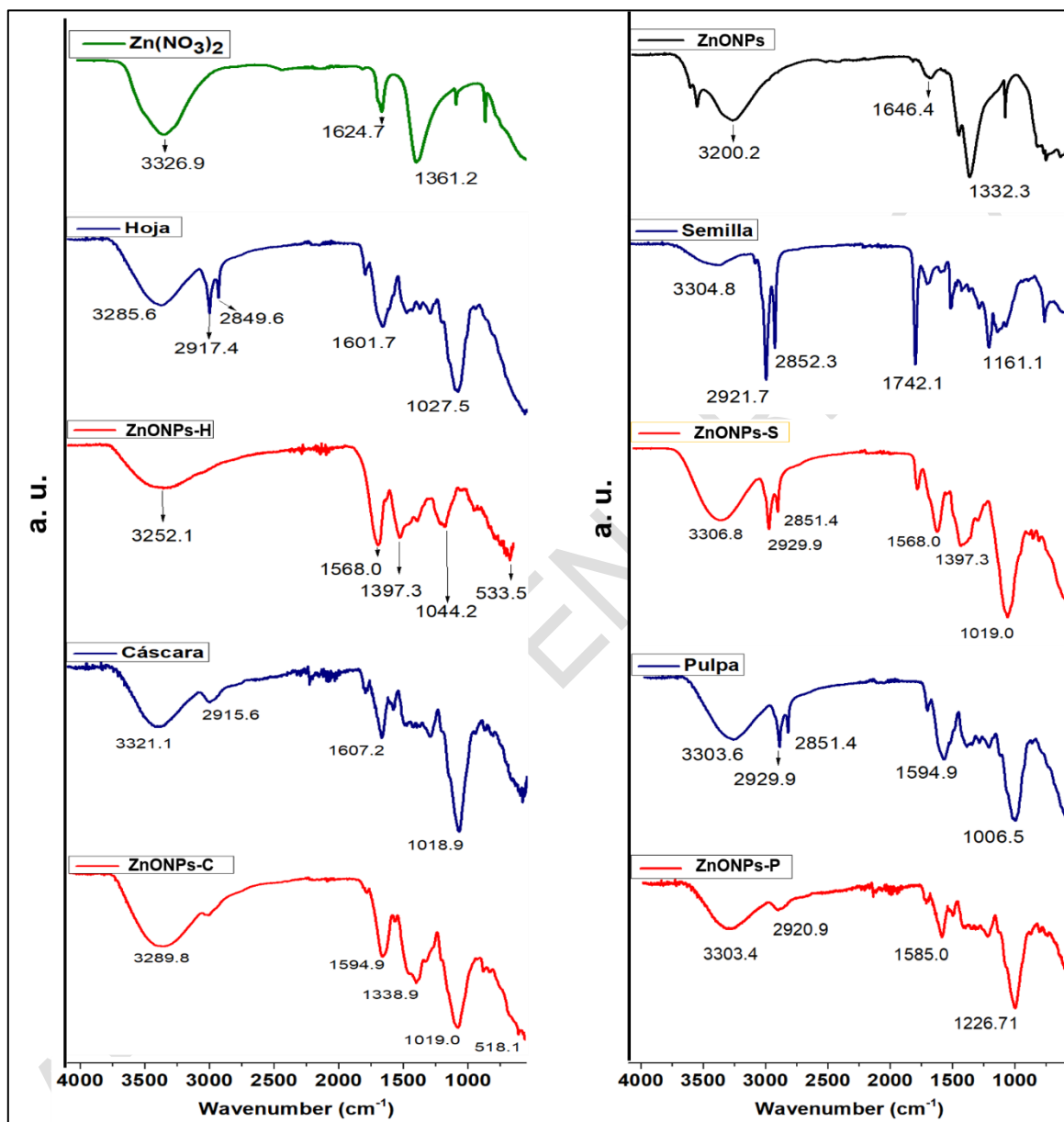


Figura 1. Espectro FTIR-ATR de los extractos etanólicos de los cuatro tejidos de *Annona muricata* y las nanopartículas derivadas de cada uno de los tejidos. Se colocan también la sal de nitrato de zinc y las NPZnO sin funcionalizar para un mejor comparativo de los picos observados.

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

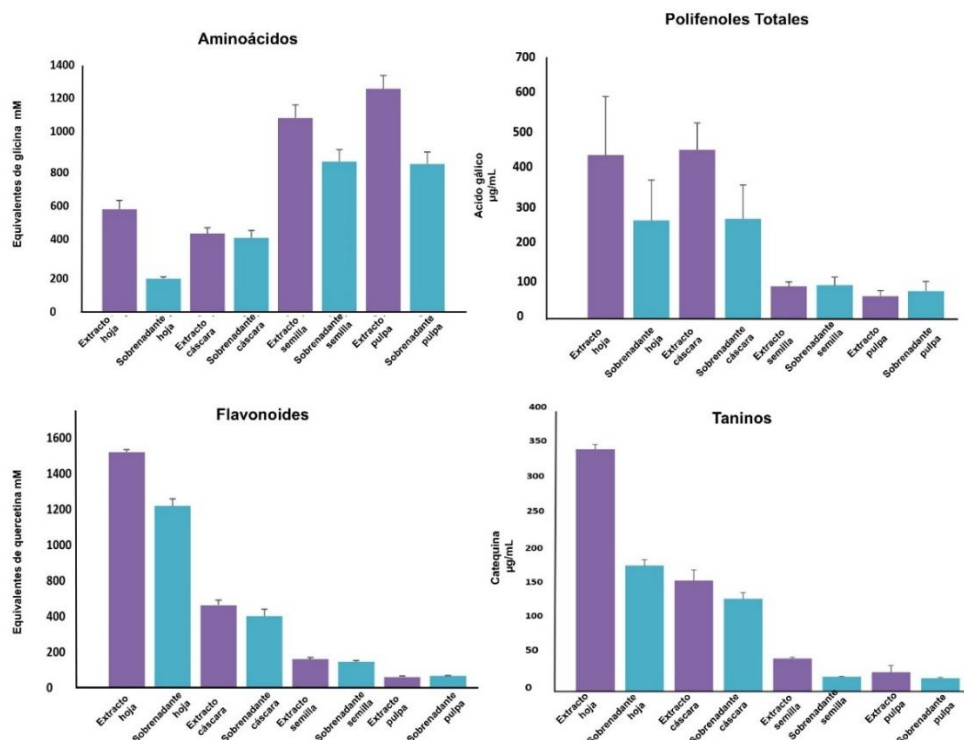


Figura 2. Perfil fitoquímico (aminoácidos libres, polifenoles totales, flavonoides y taninos) de los extractos y los sobrenadantes (después de la síntesis de las NPsZn-O). Para la determinación de aminoácidos se empleó el método de ninhidrina (Sun *et al.*, 2006). La concentración de polifenoles fue estimada mediante el método de Folin-Ciocalteu (Ainsworth & Gillespie, 2007), mientras que para los flavonoides se empleó la técnica de tricloruro de aluminio (Peñal & Pyrzyńska, 2014) y finalmente, para determinar los taninos, se realizó una estimación mediante el método (Broadhurst & Jones, 1978), empleando catequina como estándar.

Por otro lado, al hacer el análisis mediante ABTS se obtuvieron los valores de los extractos puros fueron: $286.80 \pm 1.15 \mu\text{M TE}$ (hoja), $297.29 \pm 3.94 \mu\text{M TE}$ (cáscara), $261.32 \pm 7.92 \mu\text{M TE}$ (semilla) y $216.15 \pm 7.57 \mu\text{M TE}$ (pulpa); mientras que los respectivos sobrenadantes presentaron valores de $276.35 \pm 5.33 \mu\text{M TE}$ (ZnONPs-H), $293.59 \pm 6.02 \mu\text{M TE}$ (ZnONPs-C), $161.32 \pm 7.92 \mu\text{M TE}$ (ZnONPs-S) y $192.57 \pm 12.17 \mu\text{M TE}$ (ZnONPs-P), cuyos valores representan el 3.6 %, 1.24 %, 38.4 % y 10.9 % de reducción de la actividad antioxidante medida por ABTS. Estos resultados indican que los componentes contenidos en los extractos de semilla y pulpa presentan mejor actividad antioxidante, y se involucran en mayor medida en la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc.

Resultados de actividad antimicrobiana

Para evaluar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas (ZnONPs-C, ZnONPs-S, ZnONPs-P y ZnONPs-H), se probaron contra las cepas de *E. coli* y *S. aureus* con el objetivo de determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC). Para dichos fines, se prepararon suspensiones estables, esto es, evitando la precipitación de las nanopartículas (ya que las ZnONPs no funcionalizadas siempre precipitaron y, por ello, no fueron eficaces para este análisis), estableciendo una concentración de $680 \mu\text{g}$ de la nanopartícula correspondiente por cada $300 \mu\text{L}$ de suspensión, empleando como medio de dispersión TSB suplementado con DMSO (2.00 % w/v). Se empleó una microdilución seriada en pozos iniciando con

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

680 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y terminando en 1.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), cuyos resultados se presentan en la Tabla 1. Se observó que las que las ZnONPs-H requirieron una concentración más alta en comparación con los otros tres materiales, así mismo, los cuatro nanomateriales resultaron ser más eficientes contra *E. coli* que contra *S. aureus*.

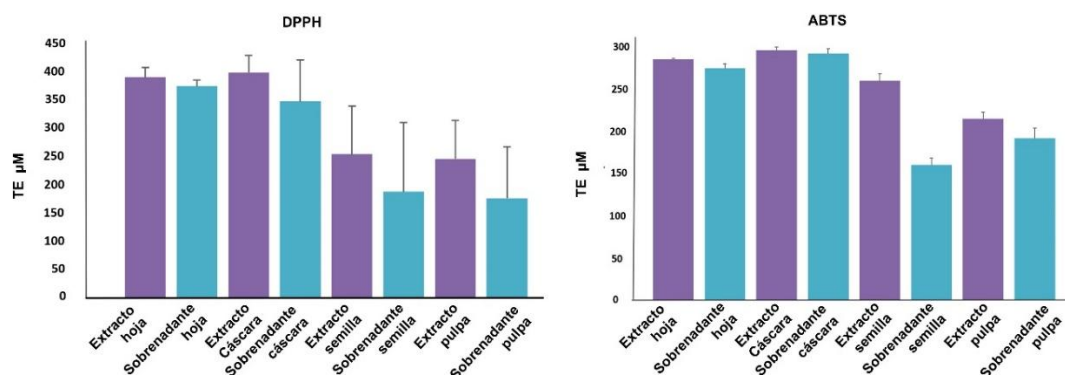


Figura 3. Actividad antioxidante de extractos (antes de la síntesis de NPsZn-O) y sobrenadantes (después de la síntesis) medidos mediante DPPH y ABTS. Se utilizó una curva estándar en el rango de 0-400 μM de estándar de Trolox. Los resultados se expresan como μmol de equivalentes de Trolox equivalent (TE μM).

Continuando con este estudio, se tomaron las 3 concentraciones a partir de la MIC determinada, así como las dos siguientes diluciones más concentradas cercanas a la MIC con el fin de determinar la concentración mínima bactericida (MBC). Para ello, se tomaron 100 μL de los pozos de las microplacas donde no se observó crecimiento bacteriano durante al menos 24 horas incubado a 37 °C. Los 100 μL se inocularon en placas con agar. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C, teniendo en consideración que de la MBC como la concentración más baja en la cual no se observa crecimiento de colonia, el límite de detección de esta técnica es de 10 CFU (unidades formadoras de colonias) por mL, la ausencia de colonias en la placa nos indicó que la concentración se encuentra por debajo de este valor.

Para *S. aureus* únicamente las ZnONPs-P presentaron actividad bactericida al emplear una concentración de 680 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que para *E. coli*, las ZnONPs-H, ZnONPs-S y ZnONPs-Pp presentaron actividad con una concentración de 680 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente. Los resultados se aprecian en la Figura 4.

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias observadas para los cuatro nanomateriales.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Material	MIC ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	MIC ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
ZnONPs-C	42.50	340.0
ZnONPs-S	21.25	170.0
ZnONPs-P	21.25	170.0
ZnONPs-H	170.0	340.0

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

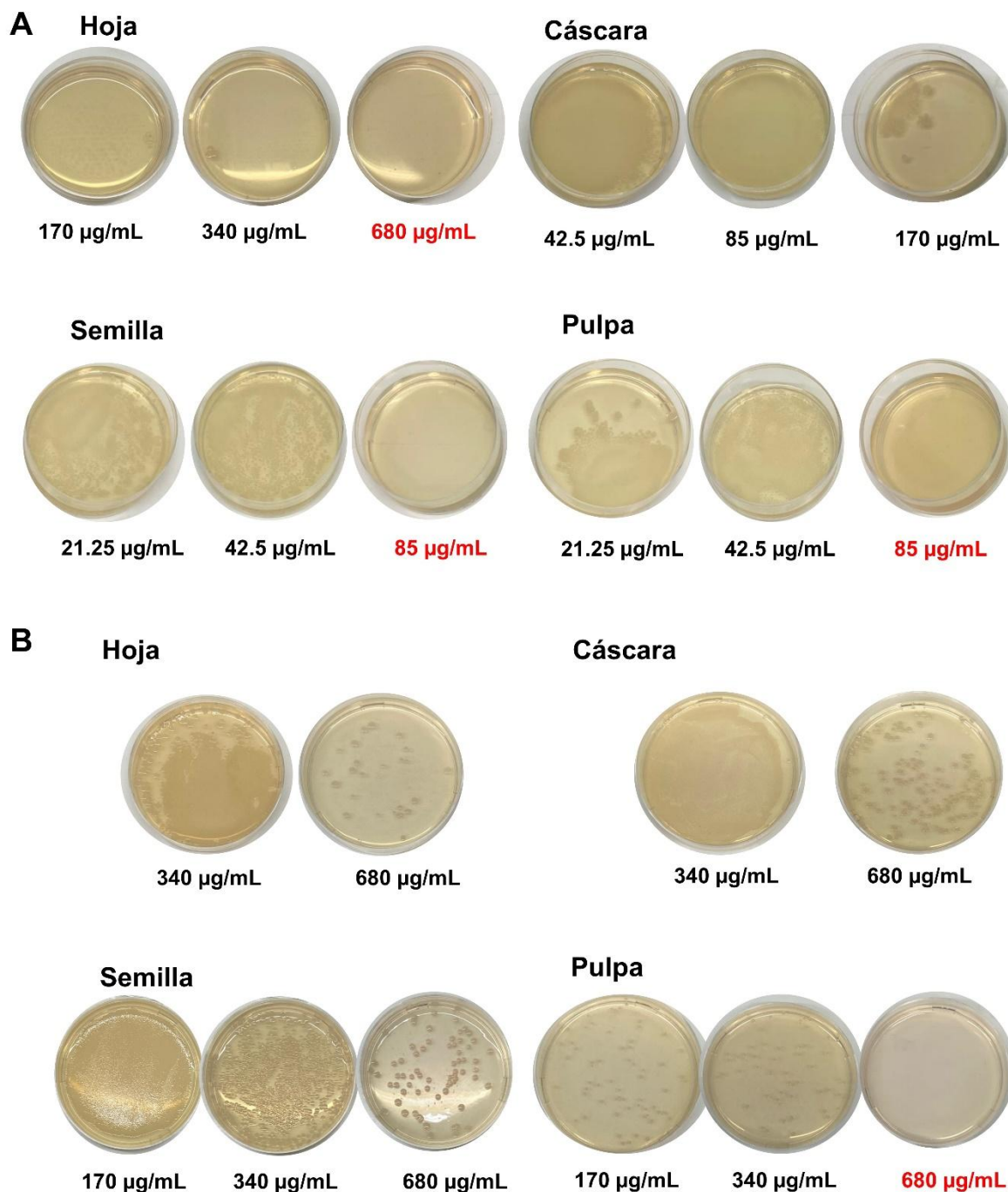


Figura 4. Prueba de actividad antimicrobiana probada mediante el ensayo de MBC (Concentración Mínima Bactericida) para las nanopartículas sintetizadas con extractos etanólicos de guanábana contra las cepas (A) *E. coli* y (B) *S. aureus*. En rojo se resalta la MBC de las diferentes nanopartículas probadas. Algunas de ellas no presentan actividad bactericida como en el caso de las NPsZnO-P contra ambas cepas, o las NPsZnO-L y NPsZnO-S para la cepa *S. aureus*.

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que los extractos etanólicos de diferentes tejidos de *Annona muricata* estudiados pueden participar en la formación y estabilización superficial de las ZnONPs y que la naturaleza del tejido vegetal influye tanto en los cambios fitoquímicos que ocurren durante la síntesis como en el comportamiento biológico de los materiales resultantes.

Los espectros FTIR-ATR aportaron evidencia de la presencia de grupos funcionales orgánicos asociados con las ZnONPs. En particular, los cambios observados en las bandas correspondientes a grupos que contienen –OH y C=O son consistentes con la interacción de los fitoquímicos con la superficie del ZnO. En este sentido, se han reportado cambios espectrales similares para las ZnONPs sintetizadas utilizando extractos de *Aloe barbadensis* (Sangeetha *et al.*, 2011), *Punica granatum* (Ifeanyichukwu *et al.*, 2020) y *Viola canescens* (Khajuria *et al.*, 2019), en los propuso que compuestos fitoquímicos como polifenoles, flavonoides y otros metabolitos que contienen oxígeno participan en la formación y estabilización de las nanopartículas.

Un hallazgo importante del presente trabajo es que los componentes fitoquímicos no se vieron afectados de manera uniforme durante la síntesis de las ZnONPs. El análisis comparativo de los extractos y de los sobrenadantes de reacción correspondientes mostró diferentes grados de disminución, dependiendo tanto del grupo fitoquímico como del tejido vegetal utilizado. Por ejemplo, el consumo de polifenoles totales alcanzó 40.7 % para las ZnONPs-C y 38.9 % para las ZnONPs-H, mientras que se observaron cambios sustancialmente menores para ZnONPs-P y ZnONPs-S. Las concentraciones de los taninos y de los aminoácidos libres también mostraron variaciones marcadas, incluyendo una reducción de taninos de hasta 55.4 % y una reducción de aminoácidos libres de hasta 68 %. Este comportamiento diferencial sugiere que la contribución de los extractos a la formación de las ZnONPs no puede atribuirse a una sola familia de compuestos. Los grupos hidroxilo fenólicos y otros grupos que contienen oxígeno pueden interactuar con especies de zinc y con las superficies de ZnO, mientras que los aminoácidos aportan grupos amino y carboxilo capaces de interactuar con iones metálicos o con sitios superficiales. Aunque varios autores han destacado el papel de los compuestos fenólicos en la síntesis verde (Iravani, 2011; Ramesh *et al.*, 2015), pocos estudios han cuantificado comparativamente el consumo relativo de biomoléculas antes y después de la formación de nanopartículas. Este análisis proporciona evidencia indirecta del papel activo de estos compuestos no solo como agentes reductores, sino también como estabilizadores superficiales.

Aun así, la observación simultánea de la disminución de fitoquímicos y de señales FTIR-ATR atribuibles a grupos funcionales orgánicos proporciona evidencia complementaria de que los compuestos presentes en los extractos de *A. muricata* influyen en la formación de las ZnONPs y en su química superficial. Esta interpretación es consistente con reportes de ZnONPs mediadas por plantas, en los que la composición fitoquímica del extracto afecta las características de las nanopartículas y su actividad biológica posterior (Bala *et al.*, 2015; Ifeanyichukwu *et al.*, 2020; El-Saadony *et al.*, 2024).

Por otro lado, los cambios en la capacidad antioxidante observados tras la síntesis de nanopartículas proporcionan información adicional sobre la participación de los componentes de los extractos. Mediante el ensayo DPPH, la capacidad antioxidante de los sobrenadantes de reacción disminuyó en 4.02, 12.81, 26.15 y 28.45 % para ZnONPs-H, ZnONPs-C, ZnONPs-S y ZnONPs-P, respectivamente. En el ensayo ABTS, se observó que las reducciones correspondientes fueron de 3.6, 1.24, 38.4 y 10.9 %. Así, aunque la magnitud varió según el método analítico y el tejido vegetal, la formación de nanopartículas estuvo acompañada de cambios medibles en la capacidad de captación de radicales que permaneció en solución.

Este comportamiento es compatible con la eliminación, transformación o asociación de algunos fitoquímicos con actividad antioxidante con el nanomaterial durante la síntesis. Los compuestos

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

fenólicos y los flavonoides son particularmente relevantes porque sus propiedades antioxidantes están estrechamente relacionadas con su capacidad para donar electrones o átomos de hidrógeno, mientras que los mismos grupos funcionales pueden participar en interacciones con superficies inorgánicas. En el mismo sentido, también se ha reportado que ZnONPs sintetizadas mediante métodos verdes a partir de extractos vegetales conservan actividad captadora de radicales medible mediante DPPH y ABTS, lo que respalda la relevancia de las interacciones fitoquímico-nanomateriales en las propiedades antioxidantes de estos sistemas (El-Saadony *et al.*, 2024).

Más ampliamente, los resultados fitoquímicos y antioxidantes indican que cada tejido de *A. muricata* constituye un entorno de reacción químicamente distinto. Esta observación es relevante porque las diferencias en la composición de los extractos pueden influir en la nucleación, el recubrimiento superficial y el comportamiento coloidal y, en última instancia, contribuir a diferencias en la actividad biológica entre ZnONPs-C, ZnONPs-S, ZnONPs-P y ZnONPs-H.

En relación con la actividad antimicrobiana, varios estudios han reportado que las nanopartículas de ZnO sintetizadas mediante métodos verdes presentan una mayor eficacia frente a bacterias Gram negativas que frente a bacterias Gram positivas, lo cual se ha atribuido a diferencias estructurales en la pared celular bacteriana (Ifeanyichukwu *et al.*, 2020; Khajuria *et al.*, 2019; Sirelkhatim *et al.*, 2015). En el presente trabajo se observó un comportamiento similar, en el que la respuesta dependió tanto del tipo de ZnONPs como del microorganismo evaluado. Los cuatro materiales presentaron valores de MIC menores frente a *E. coli* que frente a *S. aureus*: los valores de MIC frente a *E. coli* variaron entre 21.25 y 170 µg/µL, mientras que frente a *S. aureus* variaron entre 170 y 340 µg/µL.

Diversos mecanismos pueden contribuir a la actividad antibacteriana de las ZnONPs, incluyendo la generación de especies reactivas de oxígeno, la alteración de la integridad de la membrana, las interacciones entre la superficie de las nanopartículas y la envoltura bacteriana, así como la liberación de especies de Zn²⁺. Estos procesos pueden generar daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos e interferir con la homeostasis celular (Sirelkhatim *et al.*, 2015; El-Saadony *et al.*, 2024). Comparativamente, los valores de MIC obtenidos (21.25–170 µg/µL para *E. coli*) se encuentran dentro del intervalo reportado en la literatura para ZnO sintetizado con extractos vegetales (Bala *et al.*, 2015; Ifeanyichukwu *et al.*, 2020), lo que confirma la eficacia del método propuesto. Sin embargo, la variabilidad observada entre los tejidos vegetales sugiere que la composición fitoquímica inicial influye directamente en la bioactividad final del nanomaterial.

Además, el hecho de que las nanopartículas no funcionalizadas presentaran problemas de estabilidad coloidal, mientras que las nanopartículas funcionalizadas formaron suspensiones estables, respalda la importancia de la funcionalización superficial. Este comportamiento también se ha reportado en estudios de síntesis verde de metales nobles (Lomelí-Rosales *et al.*, 2019, 2022), en los que las biomoléculas adsorbidas actúan como agentes estabilizantes eficaces.

En conjunto, estos resultados sugieren una relación entre el tejido vegetal empleado, su composición fitoquímica, la participación de sus constituyentes durante la formación de las ZnONPs y la respuesta biológica del nanomaterial resultante. Por lo tanto, los extractos de hoja, cáscara, semilla y pulpa no deben considerarse fuentes fitoquímicas equivalentes. Sus diferentes composiciones se reflejaron en patrones distintos de disminución de polifenoles, flavonoides, taninos y aminoácidos, en cambios distintos en la capacidad antioxidante y en distintas respuestas de MIC y MBC. Este enfoque comparativo constituye un aspecto importante del presente estudio, ya que la mayoría de los trabajos que involucran *A. muricata* y ZnONPs se han centrado principalmente en extractos de hoja. La literatura reciente sobre nanomateriales mediados por especies del género *Annona* destaca la contribución de los fitoquímicos de este género a la funcionalización de nanopartículas y a su desempeño biológico (Gutiérrez-Pinzón *et al.*, 2025). El presente trabajo amplía este concepto al evaluar comparativamente cuatro tejidos de una misma especie vegetal y al examinar los cambios fitoquímicos que ocurren antes y después de la síntesis de las ZnONPs.

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

Conclusiones

Considerando el trabajo realizado, se obtuvieron nanopartículas de óxido de zinc que se pudieron sintetizar de manera sencilla y con componentes de baja toxicidad. Los análisis realizados en FTIR-ATR, demostraron que los grupos de picos que se encontraron en los espectros concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis del perfil fitoquímico, por ejemplo, los grupos carbonilos encontrados corresponden a los aminoácidos y a la forma oxidada de los polifenoles, así mismo, el estiramiento que corresponde a los grupos -OH, podrían deberse a los fenoles que no fueron oxidados en el momento de la síntesis pero que si se emplean para funcionalizar a las nanopartículas, contribuyendo a presentar un proceso de funcionalización de nanomateriales no dirigido, lo cual nos lleva a proponer que en futuros trabajos se puedan aislar específicamente los componentes de algún tejido y llevar a cabo una funcionalización dirigida, esto es, funcionalizar con una molécula en especial para una aplicación específica. Se destaca la importancia de la funcionalización de las nanopartículas de óxidos metálicos para aplicaciones en las que se necesiten en dispersiones líquidas, ya que esas moléculas generan interacciones intermoleculares con los disolventes, promoviendo así una buena estabilidad en suspensión, lo que permitió, en este estudio, aplicarlas contra *E. coli* y *S. aureus*, demostrando los mejores resultados contra *E. coli*.

Contribución de los autores

“Conceptualización del trabajo, A. P. F-C., Y. G-P.; desarrollo de la metodología, A. P. F-C., autor 2.; manejo de software, A. P. F-C., Y. G-P.; validación experimental, A. P. F-C., Y. G-P.; análisis de resultados, A. P. F-C., Y. G-P., D. A. L-R.; Manejo de datos, A. P. F-C., Y. G-P., J. M. V-L.; escritura y preparación del manuscrito, J. M. V-L., D. A. L-R.; redacción, revisión y edición, G. V-J., D. A. L-R.; administrador de proyectos, G. V-J., D. A. L-R.; adquisición de fondos, G. V-J., D. A. L-R. “Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.”

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el CONAHCyT, mediante el proyecto de ciencia de frontera “CF-2023-G-728” y el Programa de Apoyo a la Mejora en las Condiciones de Producción de los Miembros del SNII (PROSNI 2024, UdeG, D. A. L-R.).

Agradecimientos

Gutiérrez-Pinzón Y., agradece la beca de doctorado proporcionada por CONAHCyT (beca: 801469).

Conflicto de interés

“Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

Referencias

Abdelghani, G. M., Ahmed, A. Ben, & Al-Zubaidi, A. B. (2022). Synthesis, characterization, and the influence of energy of irradiation on optical properties of ZnO nanostructures. Scientific Reports, 12(1), 20016. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24648-x>

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Bala, N., Saha, S., Chakraborty, M., Maiti, M., Das, S., Basu, R., & Nandy, P. (2015). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Hibiscus subdariffa leaf extract: Effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, 5(7), 4993–5003. <https://doi.org/10.1039/c4ra12784f>
- Broadhurst, R. B., & Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(9), 788–794. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290908>
- Eldeeb, B. A., El-Raheem, W. M. A., & Elbeltagi, S. (2023). Green synthesis of biocompatible Fe₃O₄ magnetic nanoparticles using Citrus Sinensis peels extract for their biological activities and magnetic-hyperthermia applications. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46287-6>
- El-Saadony M. T., Fang G., Yan S., Alkafaas S. S., El Nasharty M. A., Khedr S. A., Hussien A. M., Ghosh S., Dladla M., Elkafas S. S., Ibrahim E. H., Salem H. M., Mosa W. F., Ahmed A. E., Mohammed D. M., Korma S. A., El-Tarabily M. K., Saad A. M., El-Tarabily K. A., Abu Qamar S F. (2024). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Biomedical Applications - A Review. *International Journal of Nanomedicine*. 19:12889-12937. <https://doi.org/10.2147/IJN.S487188>
- Gutiérrez-Pinzón, Y., Martínez-Preciado, A. H., Velázquez-López, J. M., Pech-Jiménez, C., Zúñiga-Mayo, V. M., Guevara-Martínez, S. J., & Velázquez-Juárez, G. (2025). Antimicrobial Potential of Nanomaterials Synthesized with Extracts from *Annona* Plants: A Review. *Antibiotics*, 14(8), 748. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14080748>
- Ifeanyichukwu, U. L., Fayemi, O. E., & Ateba, C. N. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles from pomegranate (punica granatum) extracts and characterization of their antibacterial activity. *Molecules*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194521>
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. In *Research in Pharmaceutical Sciences* (Vol. 9, Number 6).
- Kent, J. (Ed.). (2023). *The Future of Green Synthesis*. Nova Science Publishers. <https://doi.org/10.52305/YIWU6826>
- Khajuria, A. K., Negi, A., Bisht, N. S., Maurya, V., & Kandwal, A. (2019). Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles using root extract of *viola canescens* wall. Ex. Roxb. *Asian Journal of Chemistry*, 31(3), 551–554. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21738>
- Kobylinska, N., Klymchuk, D., Khaynakova, O., Duplij, V., & Matvieieva, N. (2022). Morphology-Controlled Green Synthesis of Magnetic Nanoparticles Using Extracts of ‘Hairy’ Roots: Environmental Application and Toxicity Evaluation. *Nanomaterials*, 12(23). <https://doi.org/10.3390/nano12234231>

<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1880>

- Kunjiappan, S., Chowdhury, R., & Bhattacharjee, C. (2014). A green chemistry approach for the synthesis and characterization of bioactive gold nanoparticles using *Azolla microphylla* methanol extract. *Frontiers of Materials Science*, 8(2), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s11706-014-0246-8>
- Lomelí-Rosales, D. A., Zamudio-Ojeda, A., Cortes-Llamas, S. A., & Velázquez-Juárez, G. (2019). One-step synthesis of gold and silver non-spherical nanoparticles mediated by Eosin Methylene Blue agar. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55744-0>
- Lomelí-Rosales, D. A., Zamudio-Ojeda, A., Reyes-Maldonado, O. K., López-Reyes, M. E., Basulto-Padilla, G. C., Lopez-Naranjo, E. J., Zuñiga-Mayo, V. M., & Velázquez-Juárez, G. (2022). Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Capsicum chinense* Plant. *Molecules*, 27(5). <https://doi.org/10.3390/molecules27051692>
- Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Ramesh, M., Anbuvaran, M., & Viruthagiri, G. (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136(PB), 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.105>
- Sangeetha, G., Rajeshwari, S., & Venckatesh, R. (2011). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin*, 46(12), 2560–2566. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.07.046>
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Haida, N., Kaus, M., Chuo, L., Siti, A. •, Mohd Bakhori, K., Hasan, H., Mohamad, D., Sirelkhatim, A., Mahmud, Á. S., Ann, Á. L. C., Bakhori, Á. S. K. M., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters* 2015 7:3, 7(3), 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Sun, S.-W., Lin, Y.-C., Weng, Y.-M., & Chen, M.-J. (2006). Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2–3), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.006>
- Vanathi, P., Rajiv, P., Narendhran, S., Rajeshwari, S., Rahman, P. K. S. M., & Venckatesh, R. (2014). Biosynthesis and characterization of phyto mediated zinc oxide nanoparticles: A green chemistry approach. *Materials Letters*, 134, 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.07.029>