

**UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES**

**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LÍNEAS CELULARES DE
LINFOMA DE RATÓN *M12. 1-A^K.C3F6* Y CÉLULAS DE
FIBROBLASTOS NORMALES *L-929***

TESIS

1942

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta

JULIETA LARA CASTILLO

Hermosillo, Sonora

Junio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de JULIETA LARA CASTILLO han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.

Dra. Judith Celina Tánori Córdova
Director de tesis

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Codirector de tesis

Dr. Ronaldo Herrera Urbina
Secretario

Dra. Eva Ramón Gallegos
Sinodal externo

Dr. Amir Maldonado Arce
Sinodal suplente

Esta tesis se realizó en los laboratorios del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, bajo la dirección de la Dra. Judith Celina Tánori Córdova, en laboratorios del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora con la codirección del Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras y en laboratorios del Departamento de Morfología del Instituto Politécnico Nacional con la orientación de la Dra. Eva Ramón Gallegos. Asimismo, los experimentos de microscopía electrónica fueron realizados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad de Sonora.

Parte de los recursos financieros para esta investigación fueron obtenidos del proyecto CONACyT I0003-105236.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por su apoyo económico durante el período 2011-2013. Agradezco al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales por el uso que hice de sus instalaciones y al personal docente que me permitió culminar mis estudios de maestría.

De manera muy especial agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Judith Tánori Córdova, por confiar en mí, por permitirme formar parte de su proyecto de investigación, por compartirme sus conocimientos, por asesorarme y dirigirme para concluir este trabajo.

Agradezco a la Dra. Eva Ramón, por hacer posible mi estancia en el Distrito Federal, por iniciarme en el conocimiento acerca del cultivo celular y por la paciencia con la que llevó a cabo el proceso. Agradezco al Dr. Carlos Velázquez por permitirme continuar mi trabajo de investigación en el Departamento de Ciencias Químico Biológicas, por instruirme en el área biológica, por sus correcciones y sugerencias siempre acertadas.

Agradezco a los miembros del comité de titulación: al Dr. Amir Maldonado y Dr. Ronaldo Herrera, por sus correcciones, comentarios y observaciones que contribuyeron a mejorar el escrito de este trabajo.

Agradezco a Ericka Rodríguez y Ramón Iñiguez, por su colaboración en el proyecto con las nanopartículas de plata y por la información proporcionada acerca del sistema. Aprovecho para agradecer a Ramón nuevamente por las fotografías en MET que permitieron la caracterización de las nanopartículas.

Agradezco al Dr. Rodrigo Meléndrez, por su disponibilidad para hacer uso del equipo de radiación ionizante en el Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora.

Gracias a mis compañeros del grupo de investigación Rafael y Jorge Mario, por brindarme su amistad, por su ayuda y consejos en los momentos difíciles. Gracias al resto de mis compañeros y amigos en el Departamento de Polímeros y Materiales por sus palabras de motivación. Gracias a mis compañeros de laboratorio por sus enseñanzas y por los momentos divertidos que pasamos.

Gracias a mis amigas por su comprensión y buenos deseos.

Gracias a mi mamá por alentarme a estudiar un posgrado, por su ayuda y apoyo incondicional. Gracias a mi papá y hermanos por su apoyo y comprensión; gracias al resto de mi familia.

Gracias a todo aquellos que no han sido incluidos, que colaboraron o participaron de una u otra manera en mi formación y la realización de este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	ix
RESUMEN EN INGLÉS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	6
I. ANTECEDENTES	
1.1 Nanotoxicidad.....	7
1.2 Cultivo celular.....	13
1.3 Espectroscopia UV-Visible.....	16
1.4 Microscopia electrónica de transmisión.....	18
1.5 Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución.....	19
II. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES	
2.1 Síntesis de nanopartículas de plata.....	23
2.2 Caracterización de nanopartículas de plata	
2.2.1 Espectroscopia UV-Visible.....	23
2.2.2 Microscopia electrónica de transmisión.....	23
2.3 Adecuación del sistema de partículas.....	24
2.3.1 Espectroscopia UV-Visible.....	25
2.3.2 Microscopia electrónica de transmisión.....	25
2.4 Esterilización de nanopartículas de plata.....	25
2.4.1 Microscopia electrónica de transmisión.....	26

2.5 Filtración de nanopartículas de plata.....	26
2.5.1 Microscopia electrónica de transmisión.....	27
2.6 Efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación de la línea celular <i>C3F6</i> y <i>L929</i>	
2.6.1 Efecto del disolvente sobre la proliferación de la línea celular <i>C3F6</i> y <i>L929</i>	28
2.6.2 Efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación de la línea celular <i>C3F6</i> y <i>L929</i>	28
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Síntesis de nanopartículas de plata.....	32
3.2 Caracterización de nanopartículas de plata	
3.2.1 Espectroscopia UV-Visible.....	33
3.2.2 Microscopia electrónica de transmisión.....	35
3.3 Adecuación del sistema de nanopartículas	
3.3.1 Caracterización durante el proceso de adecuación por espectroscopia UV-Visible.....	39
3.3.2 Caracterización en el proceso de adecuación por microscopia electrónica de transmisión.....	44
3.4 Esterilización de nanopartículas	
3.4.1 Microscopia electrónica de transmisión.....	50
3.5 Filtración de nanopartículas	
3.5.1 Microscopia electrónica de transmisión.....	54
3.6 Efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación de la línea celular <i>C3F6</i> y <i>L929</i>	60
CONCLUSIONES.....	75
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	76
REFERENCIAS.....	77
ANEXOS.....	82

LISTA DE FIGURAS

1. Mecanismo de toxicidad de las nanopartículas de plata.
2. Banda de resonancia de plasmon de superficie calculada para nanopartículas de plata en agua.
3. Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando el fruto de *Solanu xanthocarpum*.
4. Los 14 tipos de celdas unitarias o redes de Bravais.
5. Geometría en difracción de rayos X.
6. Diagrama de flujo de la metodología experimental.
7. Formación de nanopartículas de plata.
8. Espectro UV-Vis. del extracto de la planta *Rumex hymenosepalus*.
9. Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde.
10. Imágenes en MET de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde.
11. Distribución de tamaños de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde.
12. Imágenes en Microscopía Electrónica de alta resolución de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde⁴⁴.
13. Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: primer lavado.
14. Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: segundo lavado.
15. Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: tercer lavado.
16. Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: cuarto lavado.
17. Imágenes con MET del precipitado 1 durante el proceso de adecuación del sistema de nanopartículas de plata.
18. Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata del precipitado durante el proceso de adecuación del sistema. Primer lavado.
19. Imágenes en Microscopía Electrónica de alta resolución de nanopartículas del precipitado en el primer lavado durante el proceso de adecuación del sistema.
20. Imágenes con MET del precipitado 4 durante el proceso de adecuación del sistema de nanopartículas de plata.
21. Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata del precipitado durante el proceso de adecuación del sistema. Cuarto lavado.
22. Imágenes en Microscopía Electrónica de alta resolución de nanopartículas del precipitado en el cuarto lavado durante el proceso de adecuación del sistema.
23. Nanopartículas de plata después de su adecuación y después de su esterilización con radiación ionizante.
24. Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata después de su adecuación y después de su esterilización con radiación ionizante.
25. Imágenes tomadas en MET de alta resolución de las nanopartículas de plata después de su adecuación y después de haber sido esterilizadas con radiación ionizante.

26. Imágenes de las nanopartículas de plata después de filtradas con una membrana de 0.22 micras.
27. Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata después de filtradas con una membrana de 0.22 micras.
28. Imágenes tomadas en MET de alta resolución de las nanopartículas de plata después de filtradas con una membrana de 0.22 micras.
29. Imágenes en MET de las nanopartículas de plata después de haber sido sometidas a ultrasonidos por segunda vez y después filtradas con una membrana de 0.22 micras.
30. Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata después de someterlas a ultrasonidos por segunda vez y después de filtrarlas con una membrana de 0.22 micras.
31. Efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular *C3F6*.
32. Imágenes en el microscopio óptico del efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular *C3F6*.
33. Efecto de Nanopartículas de Plata sobre la línea celular *C3F6*.
34. Imágenes en el microscopio óptico del efecto de las nanopartículas de plata sobre la línea celular *C3F6*.
35. Efecto de Nanopartículas de Plata después de filtrarlas sobre la línea celular *C3F6*.
36. Imágenes en el microscopio óptico del efecto de las nanopartículas de plata filtradas con una membrana de 0.22 micras sobre la línea celular *C3F6*.
37. Efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular *L929*.
38. Imágenes en el microscopio óptico del efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular *L929*.
39. Efecto de Nanopartículas de Plata sobre la línea celular *L929*.
40. Imágenes en el microscopio óptico del efecto de las nanopartículas de plata sobre la línea celular *L929*.
41. Efecto de Nanopartículas de Plata después de someterlas a ultrasonidos por segunda vez y filtrarlas sobre la línea celular *L929*.
42. Imágenes en el microscopio óptico de las nanopartículas de Plata después de someter a ultrasonidos por segunda vez y filtrarlas sobre la línea celular *L929*.

RESUMEN

La tecnología a nanoescala, requiere el control y la manipulación de la materia desde uno a cien nanómetros. Debido a las características de los nanomateriales y debido al uso que ya se les está dando es importante conocer el efecto que los nanomateriales tienen sobre los organismos vivos.

En esta tesis se evaluó el efecto de nanopartículas (NPs) de plata, obtenidas a través de una síntesis verde, sobre la proliferación de células de linfoma de ratón *M12. I-A^K.C3F6* (*C3F6*) y células de fibroblastos normales *L929*, con el propósito de contribuir al conocimiento de los nanomateriales.

Las NPs fueron preparadas usando el extracto de la planta *Rumex hymenosepalus* como agente reductor y estabilizante, y nitrato de plata 0.01 M en agua desionizada como el agente precursor, en condiciones ambientales. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT). Las NPs de plata fueron caracterizadas usando espectroscopia UV-Vis y microscopia electrónica de transmisión (MET). Con el fin de evitar interferencias del extracto de la planta *R. hymenosepalus* en la reducción del reactivo MTT, se adecuó el sistema de nanopartículas para eliminar el extracto de la muestra. Después, las nanopartículas de plata fueron esterilizadas con radiación ionizante usando una fuente de cobalto, y para evitar aglomeraciones, las nanopartículas fueron filtradas con una membrana de 0.22 micras.

Las nanopartículas presentaron la banda de resonancia de plasmón alrededor de los 400 nm, tienen un diámetro promedio de 19 ± 16 nm y presentan las estructuras cristalográficas cúbica centrada en las caras y hexagonal. Los resultados de MET muestran que las partículas

coalescen, y aumentan el tamaño promedio en **5.6 nm** al ser sometidas a esterilización. El efecto de las NPs de plata sobre la proliferación celular para las células de linfoma de ratón *C3F6* y las células *L929* de fibroblastos normales, es dependiente de la concentración; las nanopartículas de plata a la concentración de 0.6% y mayores, inhiben la proliferación celular en un 80%. **Las nanopartículas de plata filtradas con una membrana de 0.22 micras inhiben la proliferación de las células *C3F6* a la concentración de 1.25% y mayores. Las nanopartículas de plata filtradas inhiben la proliferación de las células *L929* a la concentración de 2.5% y mayores; el efecto es dosis-dependiente.**

En cuanto a la manipulación de las nanopartículas, se encontró que no afecta al sistema de nanopartículas esterilizarlas con radiación ionizante, sin embargo, el añejamiento si provoca cambios en las nanopartículas. Las nanopartículas de plata tienen entonces un efecto inhibitorio en la proliferación de las células *C3F6* y *L929*.

ABSTRACT

Nanoscale technology requires control and manipulation of the material from one to a hundred nanometers. Due to the characteristics of nanomaterials and the use which is already giving to them is important to know the effect that nanomaterials have on living organisms.

In this thesis the effect of silver nanoparticles (NPs), obtained through a green synthesis, on cell proliferation of mouse lymphoma *M12. I-A^K.C3F6* (*C3F6*) and normal fibroblasts *L929* cells was evaluated, with the aim of contributing to the knowledge of nanomaterials.

NPs were prepared using the plant extract *Rumex hymenosepalus* as reducing agent and stabilizer, and 0.01 M silver nitrate in deionized water as the precursor agent at ambient conditions. Cell proliferation was determined by the reduction test bromide 3 (4,5 dimethyl-2-thiazoyl) -2,5-difeniltetrazólico (MTT). Silver NPs were characterized using UV-Vis spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM). To avoid interference of plant extract *R. hymenosepalus* in the reduction of MTT reagent, the nanoparticle system was adapted to remove the plant extract from the sample. Then, the silver nanoparticles were sterilized with ionizing radiation using a cobalt source and, to avoid overcrowding, nanoparticles were filtered with a 0.22 micron membrane.

The nanoparticles had a side plasmon resonance band around 400 nm, having an average diameter of 19 ± 16 nm and exhibit the crystallographic structures face centered cubic and hexagonal. TEM results show that particles coalesce, and the average size increases by 5.6 nm when nanoparticles are subjected to sterilization. The effect of silver NPs on cell proliferation for mouse lymphoma cells *C3F6* and normal fibroblast cells *L929*, turns out to be

the same; silver nanoparticles at the concentration of 0.6% and higher, inhibit cell proliferation by 80%. Filtered silver nanoparticles inhibit cell proliferation *C3F6* concentration of 1.25% and higher. Silver nanoparticles filtered with a 0.22 micron membrane inhibit the proliferation of *L929* cells at a concentration of 2.5% and higher; the effect is dose-dependent.

Summarizing, it was found that sterilizing with ionizing radiation does not affect significantly changes in the nanoparticles, and the silver nanoparticles have an inhibitory effect on the proliferation of *L929* cells and *C3F6*, the nanoparticles system changed its agglomeration state over time.

INTRODUCCIÓN

La tecnología a nanoescala requiere el control y la manipulación de la materia desde uno a cien nanómetros. Cuando los materiales son sintetizados a escala nanométrica, adquieren propiedades físicas y químicas diferentes de los materiales convencionales, de dimensiones más grandes^{1,2}. La introducción de nanopartículas en el diseño de materiales convencionales aumenta el desempeño o rendimiento en las aplicaciones industriales de los mismos³, por ejemplo como aditivos de plásticos, recubrimientos en superficies, protectores UV en los cosméticos. Por ello se dice que la nanotecnología se puede difundir a casi cualquier tipo de industria, incluyendo médica, plástica, energética, electrónica y aeroespacial.

La nanociencia y la nanotecnología ofrecen nuevas oportunidades para hacer materiales con mejor rendimiento para su uso en la industria, en la salud y en aplicaciones ambientales³. A medida que el uso de los nanomateriales se hace más común, resulta natural que estos materiales tengan el potencial de penetrar en el ambiente durante su producción, distribución, uso, disposición, o a veces durante el ciclo de vida de estos materiales³. El mercado anualmente utiliza para sus procesos industriales toneladas de nanomateriales en bruto, que van desde metales en tamaño nanométrico, partículas de óxidos metálicos hasta los nanotubos de carbono⁴. Este consumo y utilización de nanomateriales produce múltiples fuentes de liberación de los materiales al medio ambiente, ecosistema, agua y otras rutas de entrada al cuerpo humano de manera involuntaria. Por ejemplo, existe el riesgo de que los nanomateriales puedan hacer su trayectoria a través de sistemas de aguas, como sistemas de agua potable, sistemas de agua subterránea, lagos estuarios, etc.³; en la síntesis de nanomateriales a nivel industrial, puede

darse el contacto directo de las nanopartículas (NP's) con el humano, específicamente su piel, así, aumenta la probabilidad de que las nanopartículas entren al cuerpo fácilmente, vía respiratoria, gastrointestinal o dérmica⁵.

La nanotoxicología está emergiendo como una importante sub-disciplina de la nanotecnología. Se refiere al estudio de las interacciones de nanoestructuras con sistemas biológicos, poniendo especial atención en explicar la relación entre las propiedades físicas y químicas de las nanoestructuras con la inducción de respuestas biológicas tóxicas⁶. La toxicidad de los nanomateriales está frecuentemente ligada a su tamaño pequeño, porque las partículas más pequeñas tienen un área superficial reactiva mayor que las partículas más grandes, son químicamente más reactivas y producen un gran número de especies reactivas de oxígeno que incluyen radicales libres^{6,7}.

Las características de los nanomateriales y su interacción con los sistemas biológicos resulta interesante: a medida que los materiales disminuyen su tamaño, ciertas propiedades se vuelven dependientes de la escala, especialmente en partículas por debajo de los 20 nm de diámetro. Estas propiedades incluyen fuerzas capilares, efectos ópticos, punto de fusión, conductividad, potencial de ionización, afinidad electrónica, magnetismo, y más específicamente energía superficial y reactividad. Efectos similares a la superficie de la partícula, se sabe también, dependen de la disminución de la escala, como topología, porosidad, textura, alta densidad, etc. Debido a esto, la estructura de la superficie y composición, y su reactividad intrínseca, son las características dominantes de las propiedades de los nanomateriales. Los efectos superficiales deben ser considerados un único y muy importante conjunto funcional de nano-propiedades que requieren control y cuidado para el aprovechamiento o explotación de los nanomateriales^{4,7}.

Los nanomateriales han sido utilizados para la encapsulación y liberación de drogas, y estudios de diagnóstico. Avances en la nanotecnología han llevado a la introducción de muchos nanomateriales en estas áreas, entre ellos, las nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de plata encuentran uso en muchos campos, las mayores aplicaciones incluyen su uso como catalizador, como sensores ópticos, en la ingeniería textil, en electrónica, óptica, y muy importante en el campo médico como un agente bactericida y terapéutico. Los iones de plata son usados en la fabricación de compósitos para resinas dentales, recubrimientos en dispositivos médicos, recubrimientos bactericidas en filtros de agua, como agente desinfectante en spray, almohadas, respiradores, calcetas, toallas húmedas, detergentes, jabones, champús, pastas de dientes, lavadoras y muchos otros productos de consumo, como cemento óseo, y en muchas vendas para heridas⁸.

El problema con la mayoría de los métodos físicos y químicos en la producción de nanopartículas de plata es que son métodos muy caros y además involucran el uso de químicos tóxicos y riesgosos que pueden tener riesgos biológicos y ambientales potenciales⁸. La búsqueda de un método de síntesis más amigable al ambiente, y con el cual se puedan obtener nanopartículas a tarifas más baratas, ha llevado a la necesidad de producción biomimética de nanopartículas de plata donde métodos biológicos son usados para sintetizar las partículas^{8,9}. Las tres mayores fuentes para sintetizar nanopartículas de plata son: bacterias, hongos y extractos de plantas⁸. La biosíntesis de nanopartículas de plata es un enfoque de *abajo hacia arriba* que incluye reacciones de reducción y oxidación⁸. Son, en su mayoría, las enzimas microbianas o los fitoquímicos de la planta con propiedades antioxidantes o reductoras que actúan en los respectivos componentes y dan como resultado las nanopartículas deseadas. Generalmente, los componentes involucrados

en la preparación de nanopartículas usando métodos biológicos son el medio solvente para la síntesis, el ambientalmente amigable agente reductor y un agente estabilizante no tóxico⁸.

La mayor ventaja para usar extractos de plantas para la síntesis de nanopartículas de plata es que las plantas normalmente son fáciles de conseguir, son más seguras y no tóxicas en la mayoría de los casos, tienen una gran variedad de metabolitos que pueden llevar a cabo la reducción de iones de plata y éstos son más rápidos en llevar a cabo la síntesis que los microbios⁸.

El mecanismo considerado para este proceso es el de la reducción *planta-asistida* debido a los fitoquímicos. Los principales fitoquímicos involucrados son terpenoides, flavonas, cetonas, aldehídos, amidas y ácidos carboxílicos. Flavonas, ácidos orgánicos y quinonas son fitoquímicos solubles en agua que son responsables de la inmediata reducción de los iones. Estudios han revelado que xerofitas contienen emodina, una antraquinona que sufre tautomerización, liderando la formación de las nanopartículas de plata. Se ha sugerido que los fitoquímicos están involucrados directamente en la reducción de iones y en la formación de las nanopartículas de plata^{8,10}.

Desde un punto de vista químico, la síntesis de nanopartículas en solución (solución coloidal) requiere el uso de métodos, que facilitan un control preciso del tamaño y la forma, dando como resultado un conjunto de nanopartículas monodispersas. En general la síntesis de nanopartículas metálicas en solución es llevada a cabo por el uso de los siguientes componentes: 1) El metal precursor, 2) el agente reductor y 3) el agente estabilizante. El mecanismo de formación de la solución coloidal en la reducción de los iones de plata consiste en dos etapas: nucleación y crecimiento. La etapa de la nucleación requiere alta energía de activación mientras que la etapa del crecimiento requiere baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades de

estos procesos que pueden ser controlados a través del ajuste de parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, capacidad de reducción, etc.)¹¹⁻¹⁴.

Debido a las características descritas anteriormente de los nanomateriales y debido al uso que ya se les está dando es necesario estudiarles su distribución de tamaños, forma, estado de aglomeración, biopersistencia, durabilidad, solubilidad (en agua y en grasa), área superficial, porosidad, química de la superficie incluyendo composición, energía de la superficie, permeabilidad, carga, reactividad, especies adsorbidas y contaminación; estructura cristalina, propiedades físicas tales como densidad, conductividad eléctrica, dureza, deformabilidad, etc. Estos estudios son relevantes en las aplicaciones de los nanomateriales y son muy importantes para conocer la forma de manejarlos, transportarlos y almacenarlos. Además de esta caracterización, es importante conocer el efecto que los nanomateriales tienen sobre los organismos vivos. Uno de los primeros estudios que debe realizarse es el análisis de la toxicidad de los nanomateriales en líneas celulares de determinado tipo según sea la vía de interacción más importante o común con el organismo vivo.

Con el objetivo general de contribuir al conocimiento de los nanomateriales, en el presente estudio, se ha planteado evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de plata en líneas celulares de linfoma de ratón *M12. I-A^K.C3F6 (C3F6)* y de fibroblastos normales *L929*. La primera parte presenta la caracterización de las nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, en el proceso de adecuación de éstas para su posterior contacto en los sistemas biológicos, a través de técnicas de espectroscopía UV-Vis y Microscopía Electrónica de Transmisión. La segunda parte consiste en evaluar el efecto de las nanopartículas de plata ya adecuadas, en líneas celulares de linfoma de ratón *C3F6* y células de fibroblastos normales *L929*.

OBJETIVOS

Evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de plata en líneas celulares de linfoma de ratón *M12. I-A^K.C3F6 (C3F6)* y células de fibroblastos normales *L929*, con el propósito de contribuir al conocimiento de los nanomateriales.

Objetivos particulares:

- ✓ Adecuar el sistema de nanopartículas de plata para eliminar los reactantes del extracto de la planta *R. hymenosepalus*, centrifugando la muestra, y luego dispersándola por ultrasonido, a fin de evitar interferencias para su posterior contacto con las líneas celulares.
- ✓ Caracterizar las nanopartículas durante el proceso de adecuación del sistema, mediante UV-Vis y Microscopía Electrónica de Transmisión.
- ✓ Esterilizar las nanopartículas mediante radiación ionizante usando una fuente de cobalto.
- ✓ Determinar el efecto de la esterilización sobre las nanopartículas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.
- ✓ Evaluar la toxicidad de nanopartículas de plata en dos líneas celulares, una cancerosa de linfoma de ratón *C3F6* y en líneas celulares de fibroblastos normales *L929*.

I. ANTECEDENTES

1.1 Nanotoxicidad

Las propiedades físicas y químicas ya mencionadas de las nanopartículas las hacen atractivas para su uso en una gran variedad de campos como medicina, agricultura, en la industria, en la manufactura, y en sectores militares incluso. Aunque cientos de toneladas de nanopartículas entran al ambiente anualmente, se sabe poco acerca de sus interacciones con sistemas biológicos, y recientes estudios indican que algunas nanopartículas podrían no ser completamente benignas biológica y ambientalmente^{15,16}. De los muchos tipos de nanoproductos en actual uso, las pruebas de toxicidad deberían iniciar obviamente con aquellos que tienen el mayor alto riesgo de exposición ambiental^{7,15}.

Las aplicaciones industriales y actuales de los nanomateriales han sido ampliamente publicitadas, pero desde hace unos años han empezado a surgir preguntas acerca de su toxicidad. Ha surgido el interés en la nanotoxicidad motivada por la rápida expansión, manufactura y uso de los nanomateriales, y por el hecho de que las nanopartículas pueden ocasionar más daño, que las partículas correspondientes al mismo material, pero de mayor tamaño^{17,18}.

Investigaciones recientes destacan la preocupación de que las nanopartículas pueden afectar biológicamente procesos a nivel celular y sub-celular, dichos efectos pueden ser aumentados por la movilidad de algunas nanopartículas en el cuerpo^{7,18}.

A medida que disminuye el tamaño de la partícula, la relación entre la masa y el área superficial aumenta. Debido a esto se espera una mayor reactividad y toxicidad de las nanopartículas¹⁸⁻²⁰. Existen ya nanopartículas de una gran variedad de elementos, además se incorpora el uso de nanopartículas a procesos industriales de otros compuestos. Actuales aplicaciones de las nanopartículas van desde productos sanitarios para cubrir y proteger

heridas hasta bloqueadores solares y cosméticos, la industria del vestido, óptica y electrónica también utilizan la adición de nanopartículas en sus procesos^{18,21}.

A pesar de que los nanomateriales ya se utilizan en gran escala, entender por completo su toxicidad y los peligros a la salud es un campo poco desarrollado. De hecho, el impacto de los nanomateriales en sistemas biológicos usados en la medicina es frecuentemente ignorado²²⁻²⁴. Desde hace relativamente poco tiempo, los expertos han mostrado interés en llevar a cabo ensayos para conocer los efectos de las nanopartículas a nivel toxicológico y ambiental^{22,25}.

Algunas de las propiedades que hacen a los nanomateriales útiles, son las mismas que pueden causar riesgos a los humanos y al medio ambiente²⁵⁻²⁷. Por supuesto, debido a su tamaño pequeño, las nanopartículas pueden entrar a los tejidos animales o vegetales, y pueden pasar fácilmente a través de las membranas celulares^{25,28}. Las nanopartículas suspendidas en el aire pueden ser fácilmente inhaladas, llegando a los pulmones y causar cantidades significativas de daños celulares. La gran durabilidad de los nanomateriales elevan los problemas de su tiempo de residencia y destino final en el medio ambiente²⁵.

El Proyecto sobre Nanotecnologías Emergentes (pen) proporciona información objetiva e independiente acerca del desarrollo y comercialización de las nanotecnologías, en colaboración con investigadores, gobiernos, industrias, responsables políticos, organizaciones no gubernamentales, entre otros. Las nanopartículas de plata son las más comercializadas según la base de datos del Proyecto sobre Nanotecnologías Emergentes (www.nanotechproject.org)²⁹. Antes de implementar las diversas aplicaciones de las nanopartículas de plata, es necesario investigar el potencial riesgo de exposición, ocupación y consumo de los humanos, así como en el ambiente, del conjunto de nanopartículas²⁹.

Son pocos los estudios que analizan los efectos tóxicos de las nanopartículas y como cuantificar estos efectos tampoco resulta muy fácil. Actualmente, el entendimiento de cómo las nanopartículas de plata interactúan con los sistemas biológicos es limitado²⁹. No se sabe con certeza si la toxicidad de las nanopartículas de plata surge de su tamaño pequeño, o si la liberación de iones de plata es responsable de la toxicidad observada, o si es una combinación de ambos^{29,30}. Estudios previos demuestran que el mecanismo de la toxicidad de nanopartículas de plata involucra la ruptura de la cadena líder de respiración mitocondrial para la producción de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) que como consecuencia causa daño al ADN^{29,31,32}. Algunos estudios han demostrado que las nanopartículas de plata son genotóxicas *in vitro* e *in vivo*^{29,33}. Existe entonces una necesidad de identificar la toxicidad de las nanopartículas de plata, porque las nanopartículas podrían implicar riesgo, al que ya estamos expuestos, y es necesario contar con evaluaciones de su seguridad²⁹.

Aunque las nanopartículas de plata han sido descubiertas útiles para múltiples productos, y se utilizan ampliamente, el conocimiento sobre el impacto ambiental y biológico de las nanopartículas de plata es insuficiente³⁴⁻³⁶. Debido a la fuerte afinidad de la plata con el grupo redox reactivo y proactivo -SH, es posible que las nanopartículas de plata puedan plantearse como una amenaza al balance de la salud humana^{25,37}. La toxicidad de la plata ha sido determinada en varias líneas celulares, entre ellas células de hígado, teniendo como resultado un aumento en los niveles de estrés oxidativo³⁸; también se ha encontrado que las nanopartículas de plata inducen toxicidad en células germinales madre^{25,39}. Además, información básica sobre la toxicidad de las nanopartículas metálicas como la plata es necesaria para conocer sus interacciones con receptores celulares, proteínas intra y extra celulares, orgánulos y ADN²⁵.

Una mayor inquietud acerca de la toxicidad se deriva de la naturaleza reactiva-redox de algunos nanomateriales manufacturados y su conocida habilidad para atravesar fácilmente las membranas de ciertos orgánulos, tales como la mitocondria^{17,25,28}.

Las nanopartículas parecen localizarse en regiones intracelulares para llevar a cabo un reprogramamiento en el metabolismo de las células eucariotas⁶. La recepción de las nanopartículas por la célula se da mediante endocitosis y macropinocitosis (Figura 1); las nanopartículas entran a la célula a través de endocitosis, difusión o proteínas de membrana. La más alta concentración de iones de Ag^+ inhibe los iones de Ca^{2+} liberados desde el citoplasma, y el flujo de entrada y salida del calcio resulta en daño de la membrana mitocondrial, lo que da como consecuencia la producción de especies reactivas de oxígeno y la inhibición en la síntesis del ATP^{6,33,40}. Los autores sugieren que las células de cáncer pueden ser más susceptibles que las células normales. La generación de especies reactivas de oxígeno está relacionada con daño al ADN, especialmente porque termina afectando la replicación, morfología de los cromosomas y debido a eso, se inhibe la división celular^{6,40}.

El mecanismo de toxicidad de las nanopartículas de plata⁴⁰

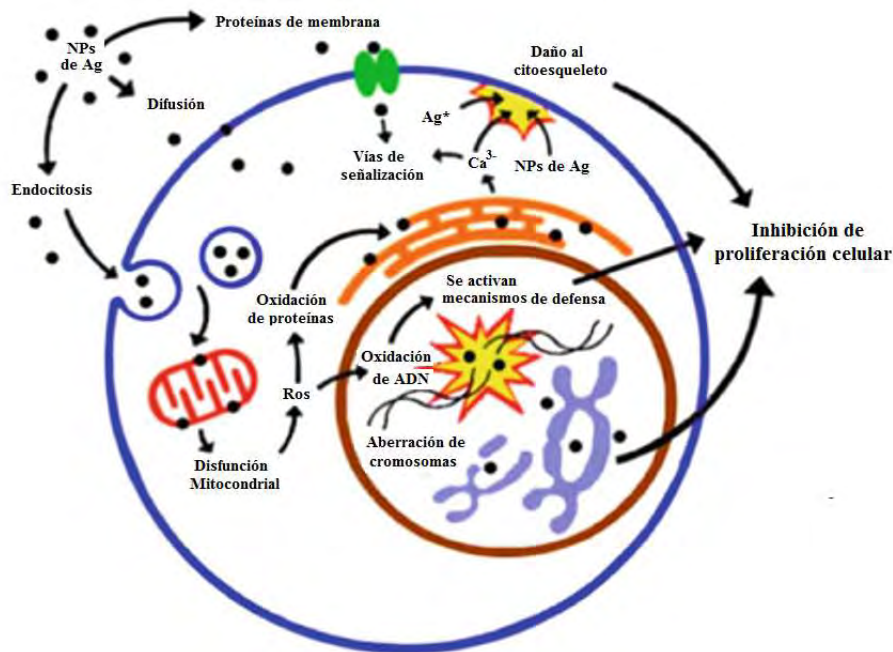


Figura 1. Las nanopartículas de plata generan la producción de especies reactivas de oxígeno. Las nanopartículas entran a la célula a través de endocitosis, difusión o proteínas de membrana, resultando en daño de la membrana mitocondrial, lo que da como consecuencia la producción de especies reactivas de oxígeno y la inhibición en la síntesis del ATP⁴⁰.

El desarrollo de nanopartículas metálicas que sean menos tóxicas se ha vuelto un propósito dentro de la nanotecnología en los últimos años. El primer reto sería llevar a cabo la síntesis pero de manera más amigable para el ambiente. Varios métodos físicos y químicos han sido usados para preparar nanopartículas de plata de diferentes formas y tamaños, tales como radiación UV, radiación por microondas, reducción química, métodos fotoquímicos, radiación electrónica y métodos sonoroeléctroquímicos⁴¹. Sin embargo, la mayoría de los métodos reportados involucran más de un paso, requerimientos de alta energía, con bajas conversiones de material, dificultad en la purificación y químicos riesgosos⁴¹. Además, la síntesis química de nanopartículas puede dar lugar a la presencia de algunos químicos tóxicos adsorbidos en la superficie que pueden tener efectos secundarios

en sus aplicaciones. La síntesis de nanopartículas por métodos verdes puede potencialmente eliminar este problema. Por eso, resulta importante desarrollar un proceso verde para la síntesis de nanopartículas⁴¹.

Como ya se mencionó anteriormente, la síntesis verde involucra ya sea microorganismos biológicos o extractos de plantas. La síntesis verde mejora los métodos químicos porque es amigable al ambiente, tiene menor costo y es fácilmente escalable para síntesis a gran escala. Generalmente, los métodos de síntesis verde involucran tres pasos principales, (1) selección del medio solvente (2) la selección del agente reductor benigno al ambiente, y (3) la selección de sustancias no tóxicas estabilizantes para las nanopartículas^{41,42}.

La síntesis de nanopartículas usando extractos de plantas puede ser ventajosa porque elimina el proceso de mantenimiento de los sistemas biológicos, y puede ser fácilmente escalado en la producción industrial porque no requiere de ambientes necesariamente asépticos o estériles⁴¹; pero la principal desventaja sigue siendo que la naturaleza química de las nanopartículas resultantes no está bien definida.

En este trabajo, se utilizaron nanopartículas de plata que fueron preparadas utilizando nitrato de plata como precursor en la síntesis y el extracto de la planta *R. hymenosepalus* como el agente reductor y estabilizante, en condiciones ambientales.

La planta herbácea *R. hymenosepalus* mide de unos 60 a 90 cm de altura, con hojas oval-lanceoladas y agudas, su borde es ondulado, y sus flores se dan en racimos de 30 cm de largo. Florece en los meses de marzo y abril. Crece en las zonas semiáridas. En México crece en la parte norte de Chihuahua, Coahuila y Sonora. La raíz contiene ácidos gálico, tánico y crisofánico, goma, almidón, sales minerales como acetato de calcio, sulfato y

nitrate de potasio. Dentro de las propiedades medicinales se le atribuye que evita la diarrea y calma las hemorragias intestinales desinfectando los intestinos⁴³.

La planta *R. hymenosepalus* también llamada Caña Agria, además ha sido investigada para evaluar su actividad inflamatoria en forma de té. La planta ha sido utilizada por la comunidad para tratar dolencias inflamadas, sin embargo a pesar de su amplio uso y aceptación, es poca la información disponible describiendo su mecanismo de acción⁴³. Se esperaría probablemente que nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto de la planta Rh tuvieran menos efectos tóxicos en sistemas biológicos, que otras sintetizadas con reactivos químicos, debido a las propiedades que se le suponen.

Aunque se ha empezado a estudiar la toxicidad de las nanopartículas, actualmente está aumentando el número de artículos científicos empleando ensayos *in vitro* para evaluar la toxicidad de los nanomateriales y su mecanismo de acción.

Una posible solución para la evaluación de la toxicología del nanomaterial parece ser utilizar varias líneas celulares de mamífero, para cuantificar viabilidad o proliferación celular.

1.2 El cultivo celular

La toxicología alternativa, suele utilizarse en principio por el alto costo de los estudios *in vivo* y la presión de las sociedades de protección de los animales de experimentación^{44,45}.

Dentro de los ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa utilizados para el registro de ensayos clínicos de una sustancia dada, se encuentran los ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos de interferencia con la estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia

celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, división celular^{44,46}.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado⁴⁴. A partir de esto, diferentes autores han desarrollado un conjunto de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando cultivos primarios de órganos aislados, así como líneas celulares establecidas⁴⁴. Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro y el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT)^{44,47}.

El método de reducción de MTT, resulta simple y se utiliza para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo, esto puede ser cuantificado gracias a la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables^{44,48}. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan, queda retenido en las células, pero puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas con isopropanol. En la reacción ocurre un cambio de coloración del amarillo al púrpura, así es cuantificada la cantidad de MTT reducido^{44,49}.

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa^{44,50}.

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad. El período de exposición de la sustancia de ensayo varia, puede ser durante períodos cortos (1-2 horas de tratamiento), o largos de 24 ó 72 horas. La D.O. (densidad óptica) de la solución se debe medir al concluir el tiempo de incubación a 550 nm utilizando un filtro de 620 nm como referencia⁴⁴.

Es necesario tener en cuenta que si el producto que se evalúa precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo⁴⁴.

La curva dosis respuesta debe ser calculada teniendo en cuenta el rango de concentración utilizado y el porcentaje de reducción del crecimiento celular⁴⁴.

Sin embargo, se sabe que células con una mitocondria inactiva son también capaces de producir la misma cantidad de formazan comparadas con las células de mitocondria activa^{51,52}. Muchas deshidrogenasas y flavinas oxidasas son capaces de reducir el MTT^{51,53-54}. Existen entonces, factores extracelulares que son capaces de reducir el MTT al producto formazan, entre ellos, los extractos de plantas⁵¹.

Para aplicar los ensayos de tetrazolios utilizando productos naturales para detectar su influencia en la viabilidad celular, es necesario tomar precauciones. Se recomienda llevar a cabo un premonitoreo en sistemas libres de células para examinar su actividad potencial reductiva antes de que cualquier experimento de cultivo se lleve a cabo. Cuando se confirma que la reducción ocurre, se pueden llevar a cabo procedimientos de lavado, y los resultados deberán ser interpretados cuidadosamente para evitar resultados falsos positivos⁵¹.

1.3 Espectroscopia UV-Visible

En la parte experimental del trabajo, dentro de la caracterización de las nanopartículas se presenta la técnica de espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis). La interacción de un campo electromagnético con nanopartículas de metales nobles (cobre, oro y plata) genera una oscilación coherente de la banda de conducción de electrones. Esta resonancia es conocida como plasmones de superficie. La resonancia de estos plasmones de superficie en el caso de las nanopartículas de metales nobles es muy intensa y ocurre en la parte visible del espectro electromagnético. Esto hace posible detectarlas con ayuda de un espectrofotómetro⁵⁵.

La banda de resonancia de plasmón de superficie de las nanopartículas de plata depende de su tamaño, forma, medio circundante dieléctrico, unión de los coloides y solutos adsorbidos, además es usada para seguir la evolución del tamaño de partícula, y para predecir el crecimiento y el mecanismo de formación de las nanopartículas⁵⁶. Las nanopartículas de plata de tamaños del orden de 2-100 nm, tienen un pico de absorción en el intervalo de 390 a 420 nm⁵⁵.

En la figura 2 se muestra la resonancia de plasmon de superficie calculada para un sistema coloidal de nanopartículas de plata en agua, con un radio de 18, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40 nm⁵⁶. En la figura 2 se observa que a medida que aumenta el tamaño de la partícula, el pico de la banda de resonancia de plasmón de superficie se desplaza hacia mayores longitudes de onda⁵⁶.

Banda de resonancia de plasmon de superficie calculada para nanopartículas de plata en agua.

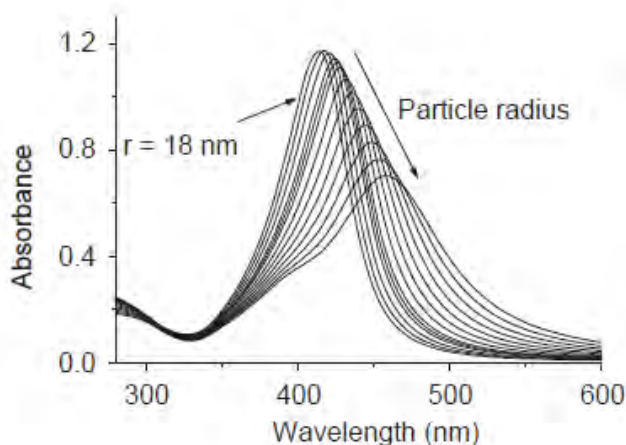


Figura 2. Las nanopartículas de plata presentan una fuerte banda de resonancia de plasmon de superficie en la región visible centrada en la longitud de onda entre 395 y 445 nm. La posición del pico del plasmon en la figura se desplaza a mayores longitudes de onda conforme aumenta el tamaño de la partícula⁵⁶.

En la figura 3 se observa la banda de resonancia de plasmon de superficie de nanopartículas de plata en agua desionizada, sintetizadas a partir de nitrato de plata 0.01 M y el extracto del fruto de la planta *Solanu xanthocarpum*. En la figura 3 se muestra el avance de la reacción a los 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, donde se observa que la intensidad del pico de absorción aumenta rápidamente conforme aumenta el tiempo de reacción de 10 a 30 minutos, debido a la formación continua de nanopartículas de plata en el sistema⁵⁷.

Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando el fruto de *Solanu xanthocarpum*

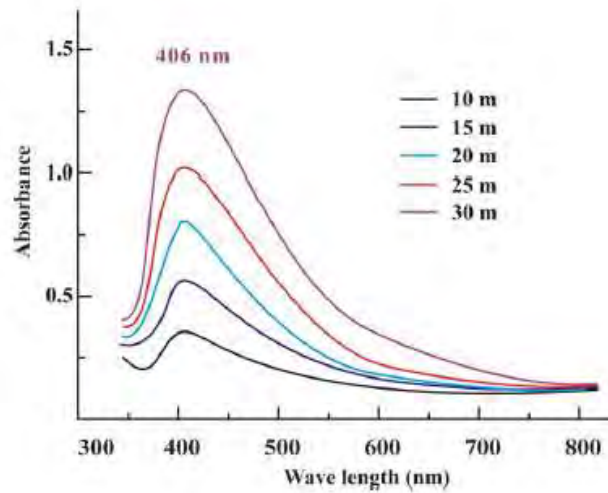


Figura 3. Efecto del tiempo en la síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando nitrato de plata y el fruto de *Solanu xanthocarpum*. Se requiere un tiempo óptimo para que la síntesis de nanopartículas de plata sea llevada a cabo de forma completa. En la figura se presentan la banda de resonancia de plasmón de superficie para 10, 15, 20, 25 y 30 minutos⁵⁷.

1.4 Microscopía electrónica de transmisión

Las nanopartículas sintetizadas en este trabajo se caracterizaron también por Microscopía Electrónica de Transmisión. Esta técnica se usa para conocer el tamaño y la forma de las nanopartículas, y cuando ésta información se combina con la banda de absorción de plasmón de superficie es posible llevar a cabo una caracterización más completa de las nanopartículas⁵⁶.

Ya obtenidas las imágenes de microscopía electrónica se puede cuantificar la distribución de tamaños de las nanopartículas. Para ello se construye un histograma de frecuencia contra diámetro; además, se puede calcular también el diámetro promedio y la desviación estándar, con lo que se puede estimar el grado de polidispersidad de la muestra. El índice de polidispersidad se define como la razón entre la desviación estándar y el diámetro promedio⁵⁵.

Una población de nanopartículas con un índice de polidispersidad bajo (< 0.05) se considera monodispersa. Grados de polidispersidad bajos son importantes en algunas aplicaciones de las nanopartículas⁵⁵.

1.5 Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución

Los metales, semiconductores, materiales cerámicos y algunos polímeros tienen una estructura cristalina en la cual los átomos tienen un orden de corto alcance o un orden de largo alcance; el arreglo atómico especial se extiende por todo el material. Los átomos forman un patrón repetitivo, regular, en forma de rejilla o de red. La red es un conjunto de puntos, que están organizados siguiendo un patrón periódico de forma que el entorno de cada punto en la red es idéntico. La red difiere de un material a otro en tamaño y forma, depende del tamaño de los átomos y del tipo de enlace entre ellos. La estructura cristalina de un material se refiere al tamaño, la forma y la organización de los átomos dentro de la red⁵⁸.

La celda unitaria es la subdivisión de la red cristalina que sigue conservando las características generales de toda la red. Se identifican 14 tipos de celdas unitarias o redes de Bravais agrupadas en 7 sistemas cristalinos⁵⁸. En la figura 4 se muestran los 14 tipos de redes de celdas unitarias o redes de Bravais.

Los 14 tipos de celdas unitarias o redes de Bravais.

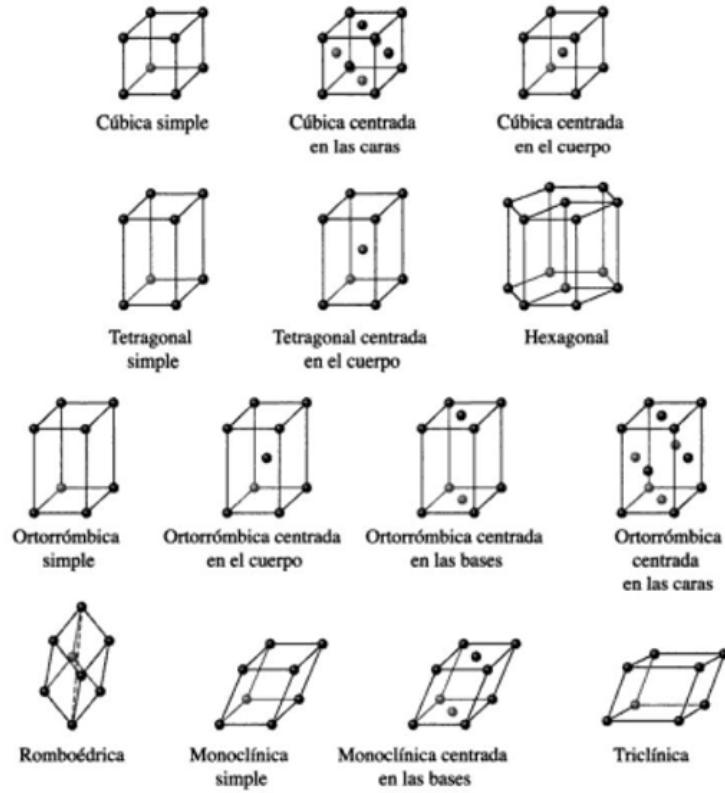


Figura 4. Los 14 tipos de celdas unitarias o redes de Bravais. Los puntos de la red están localizados en las esquinas de las celdas unitarias y, en algunos casos, en cualquiera de las caras o en el centro de la celda unitaria⁵⁸.

Los materiales que pueden tener más de una estructura cristalina se llaman alotrópicos o polimórficos⁵⁸. La plata en su forma a granel exhibe una estructura cubica centrada en las caras, ampliamente reportada, no siendo igual, para la estructura hexagonal de la plata.

Ciertas direcciones (x, y, z) en la celda unitaria son de particular importancia. Los índices de Miller para las direcciones son la notación abreviada de estas direcciones. Ciertos planos de átomos en un cristal también son significativos. Se utilizan los índices de Miller como una notación abreviada para identificar estos planos importantes. La distancia

entre dos planos de átomos paralelos adyacentes con los mismos índices de Miller se conoce como distancia interplanar⁵⁸.

Utilizando microscopia electrónica de transmisión de alta resolución, se pueden obtener imágenes de nanomateriales con un grado de amplificación tal que las posiciones de los átomos individuales en un arreglo cristalino son perceptibles⁵⁵.

Así, se pueden medir las distancias interplanares para caracterizar la estructura cristalina de la muestra analizada. Cuando los materiales ya son conocidos, las distancias interplanares experimentales se comparan con las reportadas en la literatura para diferentes materiales con el objetivo de identificar el tipo de arreglo cristalino y para corroborar que se tienen las distancias correctas⁵⁵.

La difracción de electrones genera patrones que también permiten identificar la estructura cristalina de los materiales. La difracción electrónica permite identificar partículas monocristalinas y policristalinas. En el caso de un monocristal cada punto del patrón de difracción corresponde a un conjunto de planos cristalográficos⁵⁵. Cuando los rayos x son dispersados por una red cristalina, como se muestra en la figura 5, se cumple la ley de Bragg. La ley de Bragg establece que $\lambda = 2d \sin \theta$, donde λ es la longitud de onda de la luz incidente, d es la distancia entre dos planos y θ es el ángulo de la luz incidente. Como se ve en la figura 5, dos rayos que interaccionan en dos planos cristalinos diferentes tienen una diferencia de camino óptico que depende del ángulo de incidencia. Conociendo el ángulo de incidencia y la longitud de onda incidente se puede calcular la distancia entre planos cristalinos del material aplicando la ley de Bragg.

Geometría en difracción de rayos X

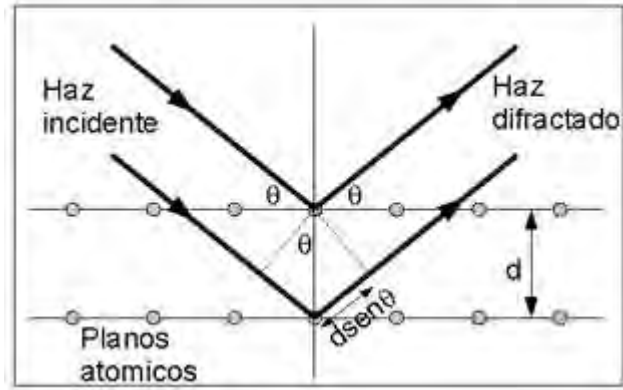


Figura 5. Sabiendo el ángulo de incidencia y la longitud de onda incidente se puede calcular la distancia entre planos cristalinos del material aplicando la ley de Bragg. La ley de Bragg establece que $\lambda = 2d \sin \theta$, donde λ es la longitud de onda de la luz incidente, d es la distancia entre dos planos y θ es el ángulo de la luz incidente

Una vez caracterizadas las nanopartículas de plata, por espectroscopia UV-Vis. y microscopía electrónica de transmisión, se presenta en el trabajo el efecto de nanopartículas de plata en líneas celulares de linfoma de ratón *C3F6* y fibroblastos normales *L929*, para ello se utilizó el ensayo de reducción de MTT.

II. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES.

Los reactivos utilizados en la metodología experimental, se presentan en el Anexo 1.

2.1 Síntesis de nanopartículas de plata

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas mediante un método previamente desarrollado y descrito por nuestro grupo de investigación^{55,59}. Las nanopartículas fueron preparadas usando el extracto de la planta *R. hymenosepalus* como agente reductor y estabilizante y nitrato de plata 0.1 M en agua desionizada como el agente precursor, a condiciones ambientales (anexo 2).

2.2 Caracterización de nanopartículas de plata

2.2.1 Espectroscopia UV-Visible.

Las nanopartículas de plata y el extracto de la planta *R. hymenosepalus* fueron caracterizados usando espectroscopia UV-Vis (equipo Perkin Elmer Lambda 20 spectrophotometer). Para medir los espectros, se utilizan celdas de cuarzo con 40 μ L de la suspensión nanopartículas y 3 mL de etanol absoluto.

2.2.2 Microscopia electrónica de transmisión

Se caracterizaron las nanopartículas de plata con Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), usando un Microscopio Electrónico de Transmisión con voltaje de operación de 200 kV y filamento de emisión de campo, modelo JEM 2010F, en todos los casos. Se depositaron 10 μ L de la suspensión de nanopartículas en una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono (300 Mesh). La muestra fue secada por vacío 24 horas antes de la observación.

Para todas las micrografías obtenidas con Microscopia Electrónica de Transmisión, se obtuvo la distribución de tamaños de las partículas, el diámetro promedio y el índice de polidispersidad. Así mismo se realizó la caracterización estructural de las nanopartículas de plata por Microscopia Electrónica de Transmisión de alta resolución (HRTEM), para todas las muestras.

2.3 Adecuación del sistema de partículas

Cuando se trabaja con extractos de plantas u otros compuestos, es recomendable llevar a cabo un monitoreo de la actividad potencial reductora del extracto, en sistemas libres de células. Se llevó a cabo éste monitoreo en placas de 96 pozos colocando únicamente medio de cultivo DMEM (ver anexo 3) con extracto en los pocillos. A las 24 y 48 horas se colocó el reactivo MTT. Después de 4 horas se leyeron las absorbancias para los pocillos, registrando absorbancias muy altas.

La obtención de absorbancias altas en el ensayo indica una alta reducción del reactivo MTT, llevada a cabo en este caso, por factores extracelulares presentes en el extracto y no por las enzimas mitocondriales.

Con el fin de evitar interferencias del extracto de la planta *R. hymenosepalus* en la reducción del reactivo MTT, se adecuó el sistema de nanopartículas tratando de eliminar el extracto de la muestra. Para de adecuar el sistema y eliminar el extracto de la planta, fue necesario realizar lavados a la muestra; para ello, la muestra fue centrifugada a 6000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 mL de agua desionizada, después se sometió a ultrasonido para dispersar por 10 minutos. El proceso se llevó a cabo 4 veces en total.

2.3.1 Espectroscopia UV-Visible.

Durante el proceso de adecuación del sistema de nanopartículas de plata, después de cada centrifugación y uso de ultrasonido se utilizó espectroscopia UV-Vis para caracterizar el sistema, con observación del comportamiento de la banda resonancia del plasmon de superficie de las nanopartículas de plata y de la absorción óptica de las moléculas del extracto. Para medir los espectros, se tomaron 40 μL de nanopartículas previamente suspendidas en agua desionizada y 3 mL de etanol absoluto, y para la celda de referencia se utilizó únicamente etanol absoluto.

2.3.2 Microscopia electrónica de transmisión

Se caracterizaron las nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación con Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), después de la primera centrifugación y uso de ultrasonido, y después de la cuarta (última centrifugación) y uso de ultrasonido.

2.4 Esterilización de nanopartículas

Para probar la esterilidad del sistema de nanopartículas de plata ya adecuado, se incubaron a 37 °C 100 μL de la suspensión de nanopartículas de plata con 1.5 mL de medio de cultivo DMEM (Anexo 2). A los 2 días, era observable la presencia de microorganismos en los tubos de ensayo.

Para evitar contaminación de los sistemas biológicos las nanopartículas fueron esterilizadas con radiación ionizante a través de una fuente de Cobalto 60 GammaCell 220, a 28 KGrays, dosis que resulta después de un tiempo de exposición de 7.51 horas. El proceso se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora (DIFUS).

2.4.1 Microscopia electrónica de transmisión

Con el fin de observar la morfología y distribución de tamaños se caracterizaron las nanopartículas de plata antes y después de su esterilización con radiación ionizante con Microscopia Electrónica de Transmisión.

2.5 Filtración de nanopartículas

Con la finalidad de evitar aglomeraciones de las partículas de plata, se decidió filtrarlas a través de una membrana de celulosa de 0.22 micras. Como el filtro se saturó debido a la alta concentración de partículas, se tomaron 10% de la suspensión de NPs de plata y 90% de medio de cultivo DMEM, para después usar un agitador tipo vórtex y filtrarlas con la membrana de 0.22 micras.

Para cuantificar el efecto de las nanopartículas de plata sobre las líneas celulares *C3F6* y *L929* y hacer comparaciones sobre las líneas celulares, se utilizaron nanopartículas de plata filtradas y sin filtrar con el ensayo de reducción MTT, para ambas líneas celulares.

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas, adecuadas, dispersadas y esterilizadas como se describe en las secciones 2.1, 2.3 y 2.4, para empezar a cuantificar primero sus efectos en la línea celular cancerosa *C3F6*. Aproximadamente después de 3 meses de haber sido sintetizadas se utilizaron las nanopartículas de plata para cuantificar sus efectos sobre la línea celular de fibroblastos normales *L929*. Debido a la observación de precipitados en el sistema de nanopartículas de plata, se sometieron a ultrasonido para dispersar y luego filtrar a través del filtro de celulosa 0.22 micras.

2.5.1 Microscopia electrónica de transmisión

Para conocer la morfología y distribución de tamaños de las nanopartículas de plata después del proceso de filtración, éstas se caracterizaron por Microscopia Electrónica de Transmisión.

2.6 Efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación de la línea celular *C3F6* y *L929*.

2.6.1 Efecto del disolvente sobre la proliferación de la línea celular *C3F6* y *L929*.

Para determinar el efecto que tiene el disolvente en la proliferación de la línea celular *C3F6* y *L929* se utilizó el ensayo MTT.

Se descongelaron las células (Anexo 4), se propagaron (Anexo 5) y se sembraron (Anexo 6 y 7) 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos, usando también pozos con solo medio de cultivo DMEM como controles de medio, y se incubaron. A las 24 horas se retiró el medio de cultivo de cada pozo y la placa se incubó nuevamente con la proporción por cada pozo al 0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20% de agua desionizada, y 99.4, 98.8, 97.5, 95, 90 y 80% de medio de cultivo DMEM respectivamente, durante 48 horas. Pasadas las 48 horas se realizaron observaciones microscópicas de los cultivos, y se adicionó el reactivo MTT (Anexo 8) por 4 horas más. Se leyó la absorbancia de las soluciones utilizando un lector de ELISA a 630 y 595 nm con el uso del software Gen 5. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, las diferencias entre las medias de los experimentos fueron analizadas con el modelo ANOVA de un factor o una vía, y el método Tukey con un nivel de significancia al 0.05 %.

2.6.2 Efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación de la línea celular *C3F6* y *L929*.

Conocida la concentración a la que el disolvente no inhibe la proliferación celular, se usó esta concentración como control de solvente y se utilizó el ensayo MTT para saber el efecto de las nanopartículas de plata sobre la línea celular *C3F6* y *L929*. Se sembraron 10,000 células por pozo (Anexo 7) en placas de 96 pozos usando controles de medio y de

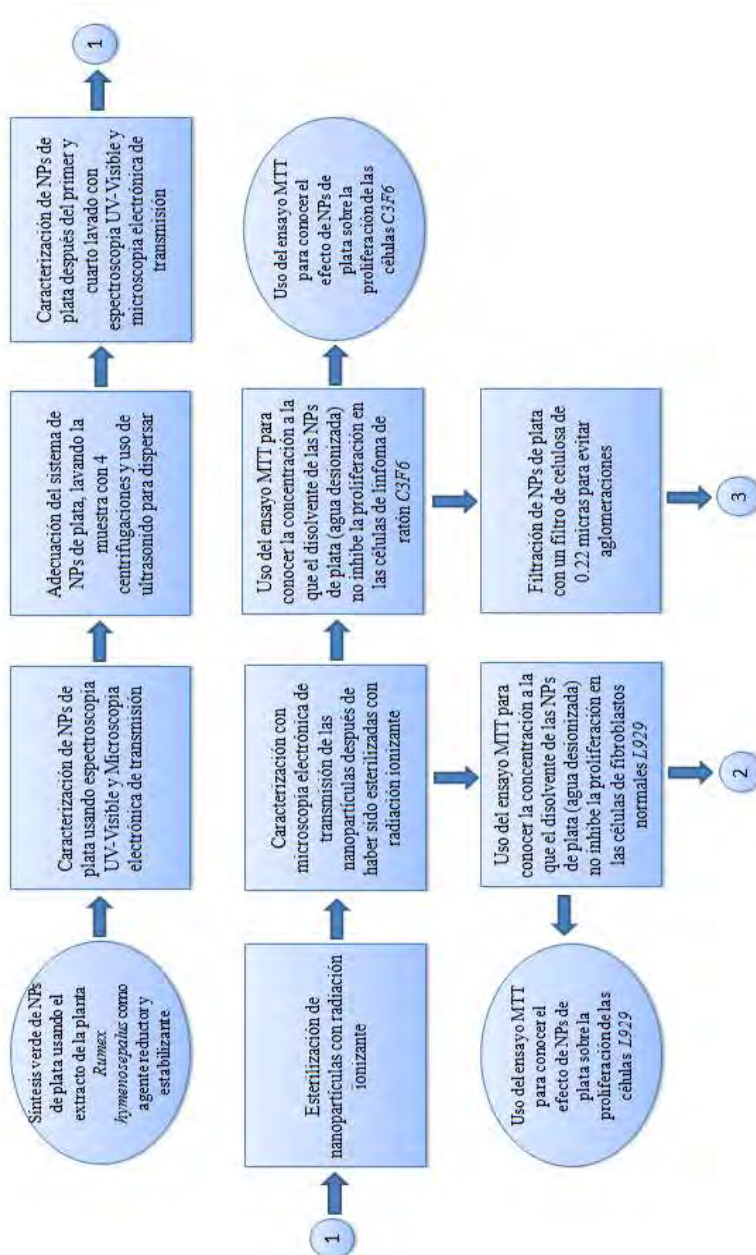
disolvente y se incubaron. Después de 24 horas, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y la placa con células *C3F6* se incubó nuevamente con las concentraciones al 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.5% de nanopartículas de plata y agua desionizada al 2.5% como control de disolvente, durante 48 horas, mientras que la placa con células *L929* se incubó a las concentraciones al 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5% de nanopartículas de plata y agua desionizada al 5% como control del disolvente. Pasadas las 48 horas se realizaron observaciones microscópicas de los cultivos, y se adicionó el reactivo MTT (10µL por pozo) por 4 horas más. Se leyó la absorbancia de las soluciones utilizando un lector de ELISA a 630 y 595 nm con el uso del software Gen 5.

Este mismo procedimiento se siguió para evaluar el efecto de las nanopartículas filtradas en DMEM al 10% con el filtro de celulosa de 0.22 micras sobre la proliferación de las células *C3F6*, y el efecto de las nanopartículas sometidas a ultrasonido por segunda vez y filtradas sobre la proliferación de las células *L929*.

Para el análisis de los resultados, estos se expresarán como porcentaje (%) de células vivas según la siguiente relación: $\% = (\text{D.O. de las células tratadas}) (100) / \text{D.O. de las células controles}^{44}$. Los datos fueron analizados en base al estudio estadístico Tukey, que compara las diferencias entre medias de un experimento, con un nivel de significancia al 0.05%.

En la figura 6 se muestra un diagrama de flujo con la metodología experimental descrita en el capítulo 2, pero de manera resumida.

Diagrama de flujo de la metodología experimental



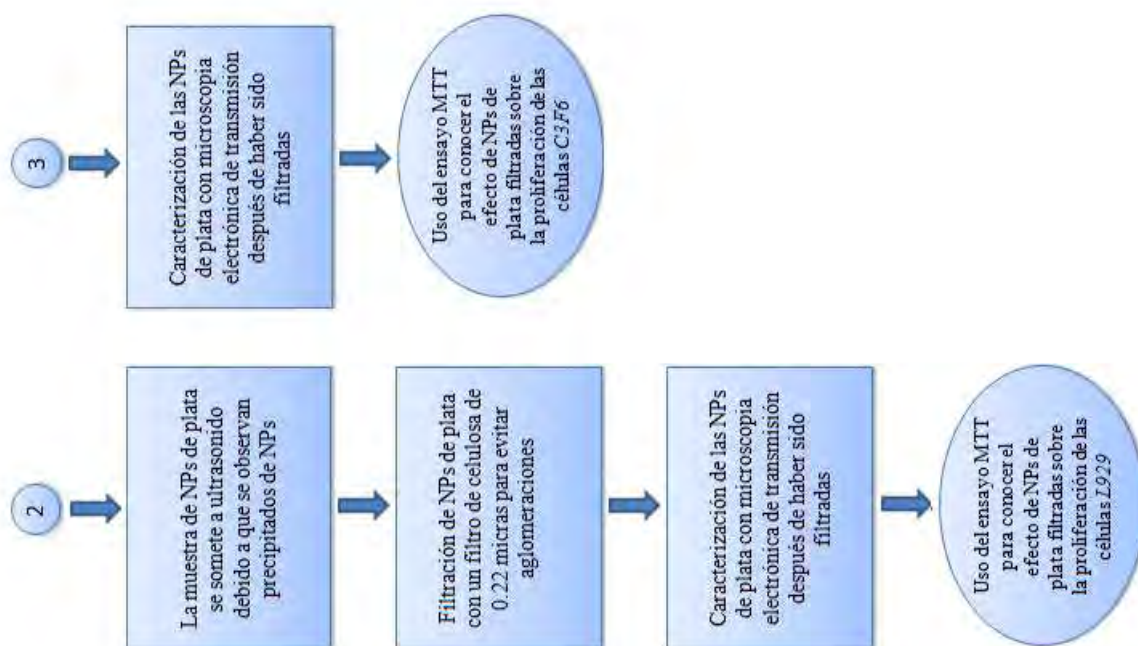


Figura 6. Procedimiento a seguir para conocer el efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación celular de las células C3F6 y L929. En el diagrama se muestra la metodología experimental de manera esquemática para conocer el efecto sobre la proliferación celular de las células C3F6 y L929.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Síntesis de nanopartículas de plata

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas a través de un método verde. Las nanopartículas fueron preparadas usando el extracto de la planta *R. hymenosepalus* como agente reductor y estabilizante, y nitrato de plata 0.1 M en agua ultrapura como el agente precursor, a condiciones ambientales.

La planta *R. hymenosepalus* es abundante en el norte de México y el sur de Estados Unidos. Los resultados de la síntesis resultan prometedores porque el extracto promueve la formación de las nanopartículas a temperatura ambiente, con una velocidad de formación rápida y sin químicos que puedan ser dañinos para la salud o el medio ambiente. El método es además fácil de llevar a cabo, y se realiza en un solo paso. Las nanopartículas de plata sintetizadas por este método representan un buen candidato para su uso en sistemas biológicos⁵⁹.

En la figura 7, se muestra que para todas las concentraciones de AgNO_3 : 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 mM (muestras b-f respectivamente; la muestra a no contiene nitrato de plata) las muestras cambiaron su apariencia visual brevemente después de la adición del extracto de la planta, indicando que una reacción de reducción se llevó a cabo. En la figura 7, se visualiza que inicialmente a las 24 horas, la mezcla de reacción fue un líquido ligeramente amarillo, a medida que la reacción procedió, a las 48, 72 y 96 horas, las soluciones tomaron un color anaranjado, rojo y café. Este comportamiento indica fuertemente la formación de las nanopartículas: el cambio de color es debido a la fuerte absorción de la luz visible debido a la excitación del plasmón de superficie de la nanopartícula^{55,59}.

Formación de nanopartículas de plata

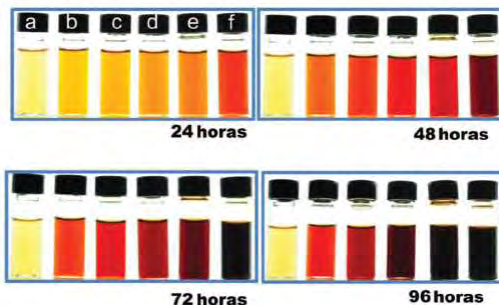


Figura 7. Para todas las muestras con AgNO_3 se observa un cambio de color. Para todas las concentraciones de AgNO_3 (2.5, 5, 7.5, 10 y 15 mM) las muestras cambiaron su apariencia visual brevemente después de la adición del extracto de la planta a las 24, 48, 72 y 96 horas, indicando que una reacción de reducción se llevó a cabo (la muestra a no contiene nitrato de plata)^{44,50}.

3.2 Caracterización de nanopartículas de plata

3.2.1 Espectroscopia UV-Visible.

Para caracterizar el extracto de la planta *R. hymenosepalus*, se utilizó espectroscopia UV-Vis. Se midió la absorción correspondiente a la banda de los compuestos presentes en el extracto a las 24 y 96 horas⁵⁵. En la figura 8 se observa la absorción óptica del extracto de la planta *R. hymenosepalus*, que se presenta a los 276 nm⁵⁵, también se observa que la intensidad de la absorción incrementa con el tiempo lo cual indica que la extracción de los compuestos del extracto continúa después de las 24h⁵⁵. Este resultado permite justificar que se extienda el tiempo de extracción por un período prolongado (15 días) para asegurar sea lo más óptima posible⁵⁵.

Espectro UV-Vis. del extracto de la planta *R. hymenosepalus*.

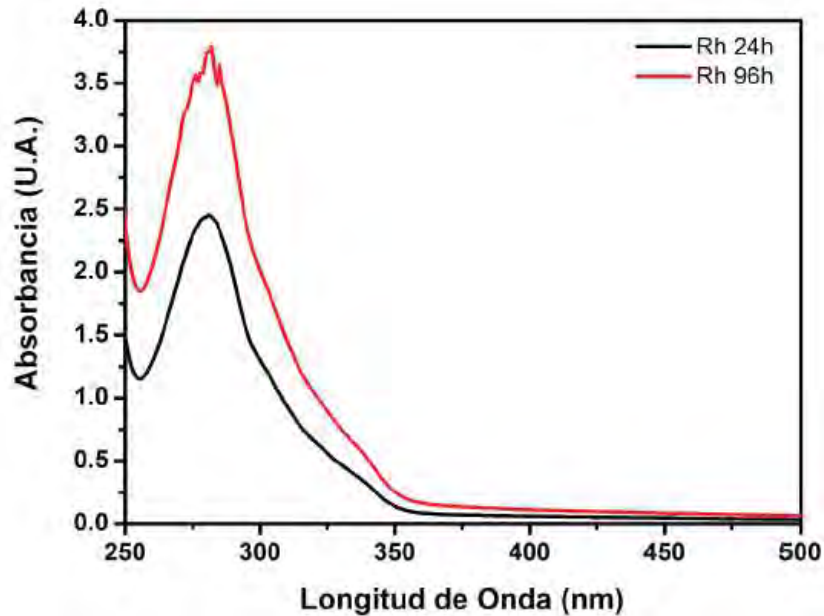


Figura 8. La absorción óptica para el extracto de la planta *R. hymenosepalus* se presenta alrededor de los 276 nm, en el espectro UV-Vis. Se midió la absorción correspondiente a la banda de los compuestos presentes en el extracto de la planta *R. hymenosepalus* a las 24 y 96 horas⁵⁵.

Para caracterizar las nanopartículas de plata generadas mediante la síntesis verde reportada⁵⁵, se utilizó espectroscopia UV-Vis. La reacción tomó un total de 96 horas. La figura 9 indica la presencia de la banda de resonancia de plasmón de superficie alrededor de los 400 nm en el espectro UV-Vis., característica, según la literatura, para la formación de nanopartículas de plata⁵⁶. A los 270 nm se observa la presencia del extracto de la planta *R. hymenosepalus*.

Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde.

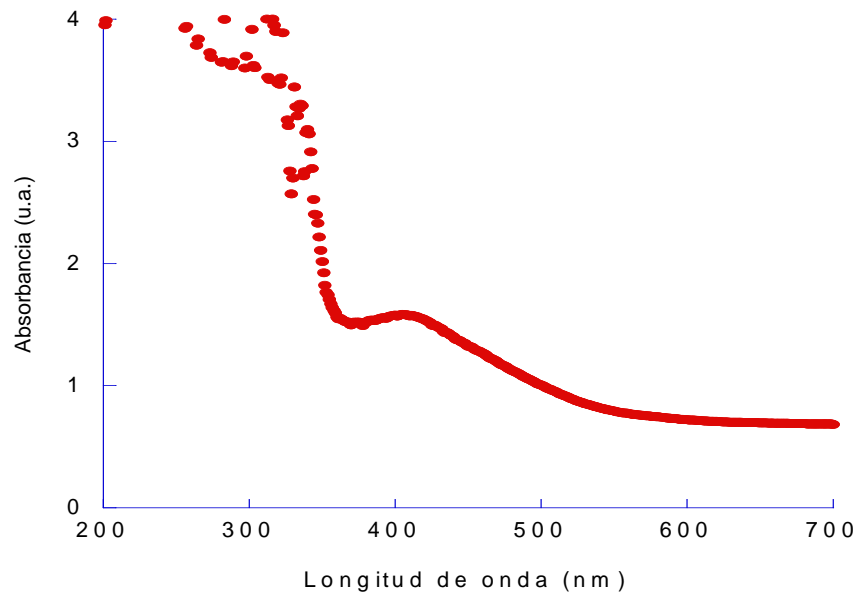


Figura 9. La banda de resonancia de plasmón de superficie para las nanopartículas de plata se presenta alrededor de los 400 nm. en el espectro UV-Vis. Nanopartículas de plata fueron sintetizadas; el extracto de la planta *Rumex hymenosepalus* actúa como agente reductor, y nitrato de plata 0.01 M en agua desionizada como el agente precursor.

3.2.2 Microscopia electrónica de transmisión

Con la finalidad de llevar a cabo una caracterización más completa, y observar morfología y tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas usando un método verde, se tomaron imágenes con MET. En la figura 10 se observa que a la misma escala coexisten dos poblaciones diferentes en tamaño de nanopartículas de plata, mientras que la morfología parece ser cuasi esférica para ambas poblaciones, además no se observa aglomeración de las nanopartículas.

Imágenes en MET de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde.

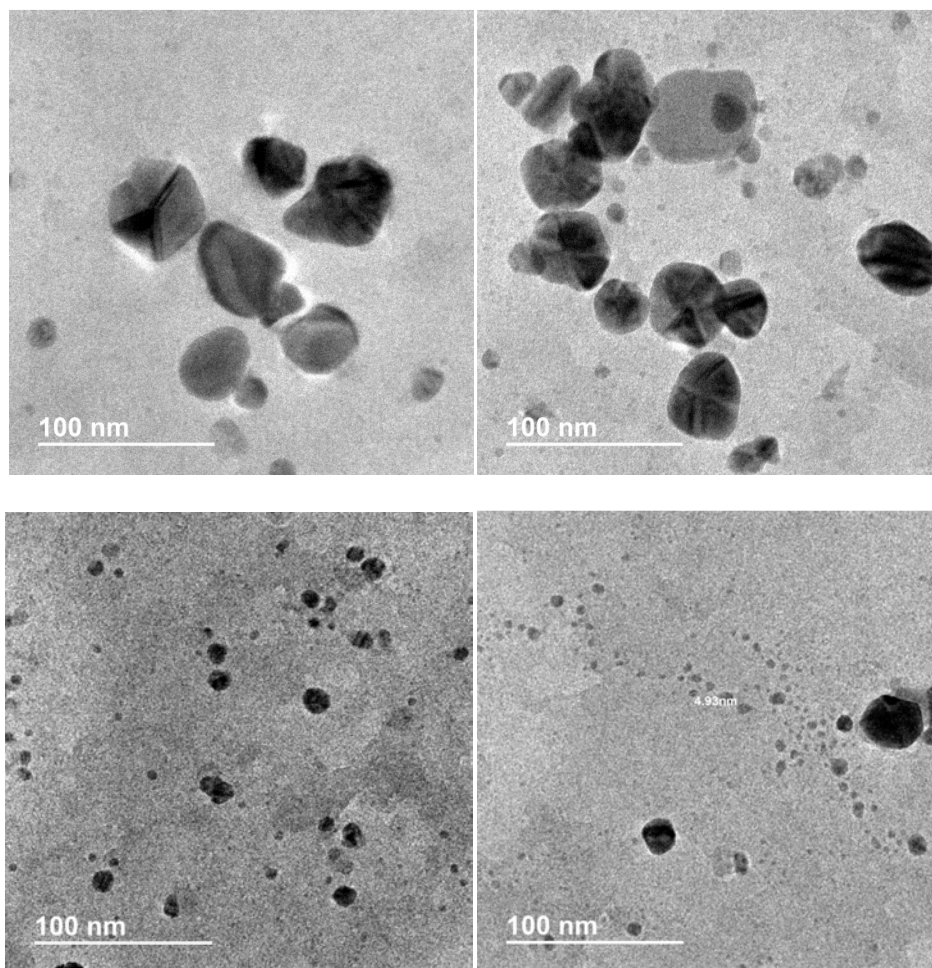


Figura 10. En la síntesis se forman dos poblaciones diferentes en tamaño de nanopartículas de plata. Las nanopartículas de plata sintetizadas utilizando un método verde fueron observadas con MET. En las micrografías se observan dos poblaciones diferentes en tamaño para las nanopartículas de plata.

Para conocer el tamaño promedio de las nanopartículas y su índice de polidispersidad se estudió la distribución de tamaños. Para eso se midieron los diámetros de las partículas con las imágenes obtenidas por MET. En la figura 11 se presenta la frecuencia para cada intervalo de nanopartículas medido. En total se midieron los diámetros de 210 partículas, el diámetro promedio es de 19.4 nm, con un diámetro mínimo de 3.5 y uno máximo de 89.9 nm. La desviación estándar fue de 16 y el índice de polidispersidad de 0.82. En la figura 11 se observa que la mayor población de nanopartículas se encuentra

entre los intervalos de 0 a 10 nm y 10.1 a 20 nm. Los altos valores en la desviación estándar e índice de polidispersidad se deben a la presencia de dos poblaciones de nanopartículas de plata en el sistema.

Distribución de tamaños de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde.

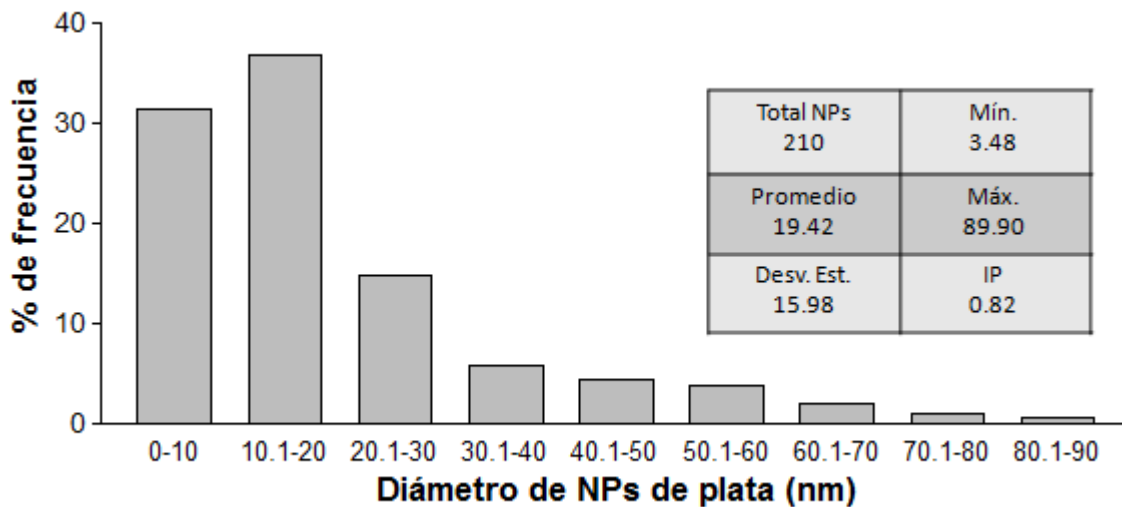


Figura 11. El sistema de nanopartículas sintetizadas usando una química verde presenta un alto grado de polidispersidad (0.82). A partir de las imágenes tomadas con MET se hizo la distribución de tamaños para las nanopartículas de plata. La gráfica presenta intervalos de tamaños que van de 10 en 10 nm y su frecuencia expresada en porcentaje. Los datos del recuadro son el total de partículas, el promedio, la desviación estándar, el diámetro mínimo, el diámetro máximo y el índice de polidispersidad.

El tamaño de las nanopartículas tiene un efecto en las interacciones de las nanopartículas con las células. Considerando la variedad de nanomateriales y la complejidad de las pruebas biológicas, resulta aún complicado llegar a conclusiones generales acerca de los nanomateriales; pero se sabe que existe un tamaño óptimo para un proceso de endocitosis exitoso, independientemente de la composición de la partícula, y ese tamaño puede variar dependiendo del tipo de célula. Sin embargo, las nanopartículas pequeñas tienen una mayor probabilidad de ser interiorizadas, por una recepción pasiva,

que las nanopartículas más grandes, y las nanopartículas pequeñas tienen una mayor probabilidad de causar respuestas celulares tóxicas⁶⁰. Específicamente la citotoxicidad de nanopartículas de plata aumenta conforme se reduce su tamaño⁶¹. El tamaño promedio de las nanopartículas de plata (19.4 nm) sintetizadas utilizando el extracto de la planta *R. hymenosepalus* resulta óptimo para ser utilizado en la interacción con sistemas biológicos.

Para caracterizar y analizar la microestructura de las nanopartículas de plata sintetizadas a través de un método verde, se analizaron imágenes en MET a alta resolución. En la figura 12 se muestran dos de las imágenes analizadas donde se encontraron las distancias interplanares de las micrografías; las distancias corresponden a la estructura cúbica centrada en las caras con las distancias 2.316 Å para el plano (1 1 1), 1.517 Å para el plano (2 2 0) y 1.159 Å (2 2 2); y las distancias para la estructura hexagonal de 2.405 Å para el plano (1 0 1), 2.275 Å (1 -1 2), 1.407 Å (1 1 0), 1.249 Å (0 0 8) y 1.149 Å para el plano (2 0 3)⁵⁵.

Imágenes en Microscopía Electrónica de alta resolución de nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde.

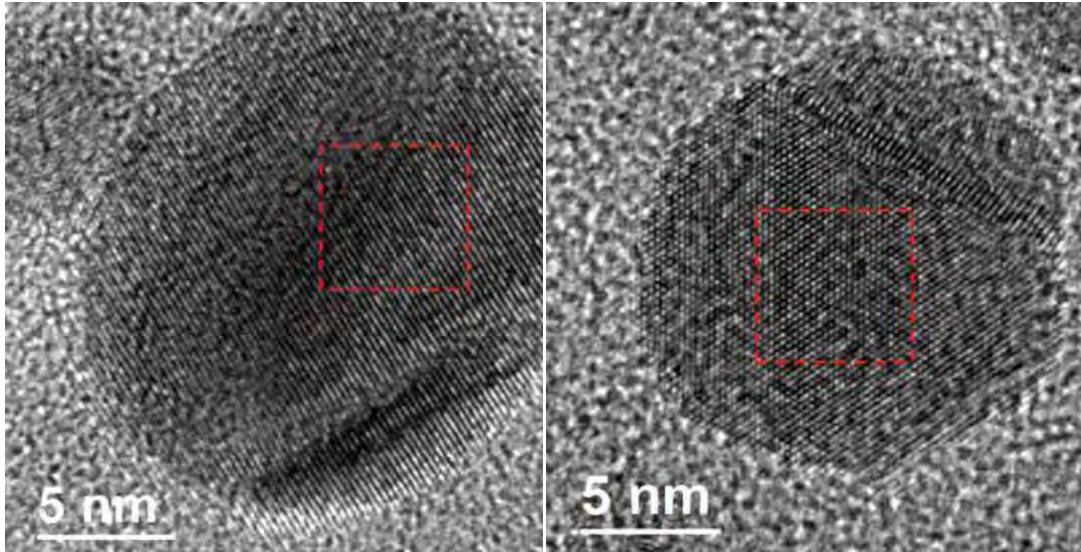


Figura 12. Se presenta la fase cubica centrada en las caras y la fase hexagonal en las nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde. Se tomaron imágenes con Microscopía de alta resolución para analizar la estructura de las nanopartículas obtenidas a través de una síntesis verde⁵⁵.

3.3 Adecuación del sistema de partículas

3.3.1 Caracterización durante el proceso de adecuación por espectroscopía UV-Visible.

Para eliminar la presencia del extracto de la planta *R. hymenosepalus*, se adecuó el sistema de nanopartículas de plata, para eso se centrifugó la muestra a 6000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 mL de agua desionizada, después se sometió a ultrasonidos por 10 minutos para dispersar. Se tomaron los espectros UV-Vis. para el precipitado y sobrenadante. En la figura 13 (a) se observa la presencia de la banda de resonancia de plasmón de superficie para las nanopartículas de plata alrededor de los 450 nm, y la presencia del extracto de la planta *R. hymenosepalus*

alrededor de los 270 nm, observándose un leve hombro en la gráfica. En la figura 13 (b) se observa la banda de resonancia de plasmon de superficie alrededor de los 410 nm de las nanopartículas de plata, que denota la persistencia de nanopartículas más pequeñas en el sobrenadante que en el precipitado al llevar a cabo el proceso de centrifugación, y la presencia del extracto, en el sobrenadante también alrededor de los 270 nm. El desplazamiento de la banda de resonancia de plasmón de superficie entre las gráficas del precipitado y el sobrenadante se debe al cambio de las características de la población de nanopartículas, influyendo también el extracto de la planta *R. hymenosepalus* si las moléculas rodean a las partículas de plata, todo esto en acuerdo a lo propuesto por Slistan y col. como se presentó en los antecedentes⁵⁶.

Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: primer lavado.

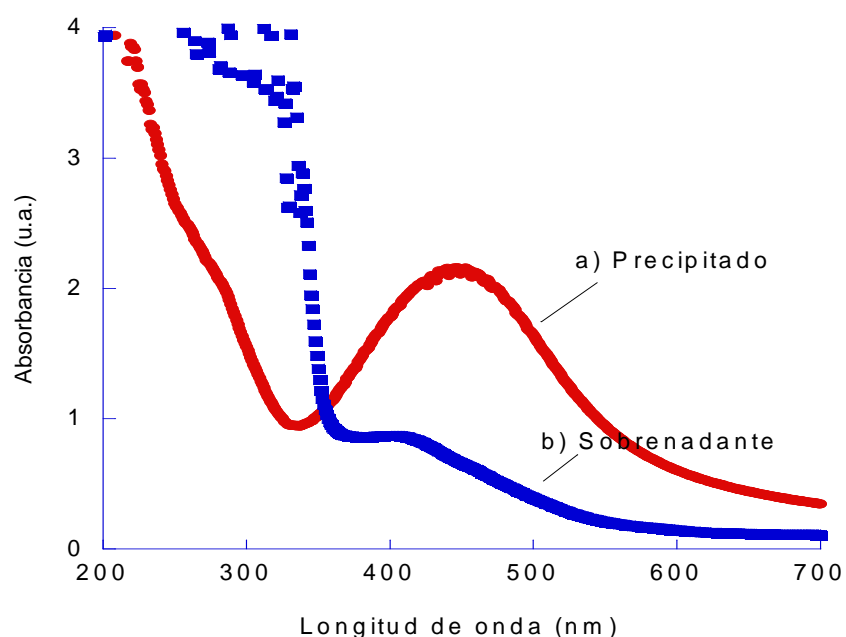


Figura 13. La centrifugación de nanopartículas durante el proceso de adecuación del sistema provoca la disminución de la presencia del extracto de la planta *R. hymenosepalus*. Las nanopartículas de plata sintetizadas a través de un método verde fueron centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua desionizada.

Se centrifugó la muestra a 6000 rpm durante 15 minutos por segunda vez, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 mL de agua desionizada, después se sometió a ultrasonido para dispersar por 10 minutos. Se tomaron los espectros UV-Vis. para el precipitado y sobrenadante. En la figura 14 se observa la banda de resonancia de plasmón de superficie para las nanopartículas de plata y la absorción óptica del extracto de la planta *R. hymenosepalus* (450 y 270 nm respectivamente). La absorción óptica del extracto de la planta en la figura 14 (b), es menor que la banda de absorción óptica de la figura 13 (b), esto indica que la mayor cantidad de extracto se eliminó en el primer lavado, ya que su presencia se observa en el sobrenadante principalmente (Figura 13 (b)).

Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: segundo lavado.

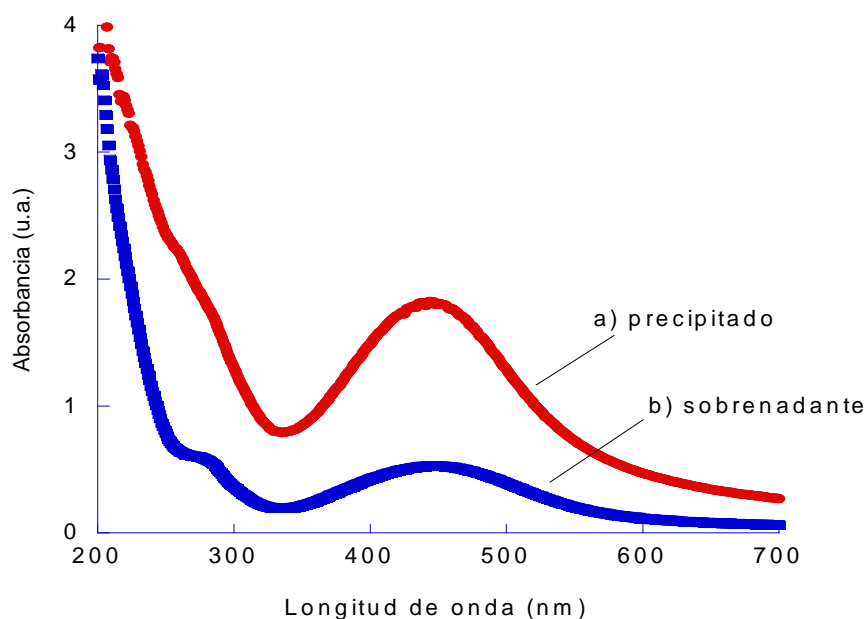


Figura 14. La segunda centrifugación de nanopartículas durante el proceso de adecuación del sistema disminuye en menor cantidad el extracto de la planta *R. hymenosepalus* comparada con el primer lavado. Las nanopartículas de plata sintetizadas a través de un método verde fueron centrifugadas por segunda vez a 6000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua desionizada.

Se centrifugó la muestra a 6000 rpm durante 15 minutos por tercera vez, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 mL de agua desionizada, después se sometió a ultrasonidos para dispersar por 10 minutos. Se tomaron los espectros UV-Vis. para el precipitado y sobrenadante. En la figura 15 se sigue observando la banda de resonancia de plasmón de superficie para las nanopartículas de plata y la banda de absorción óptica del extracto de la planta *R. hymenosepalus* alrededor de los 450 y 270 nm respectivamente, tanto para el precipitado como para el sobrenadante. En la figura 15 (b), la banda de absorción óptica del extracto, es de menor tamaño comparado con la figura 14 (b), lo cual indica que la cantidad de extracto eliminado está disminuyendo. Se observa también, que la banda de resonancia de plasmón de superficie de las nanopartículas de plata del precipitado después del tercer lavado (Figura 15 (a)) disminuye, por lo tanto, se sigue perdiendo material del sistema que se utilizará para el estudio, al tratar la muestra para eliminar el extracto.

Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: tercer lavado.

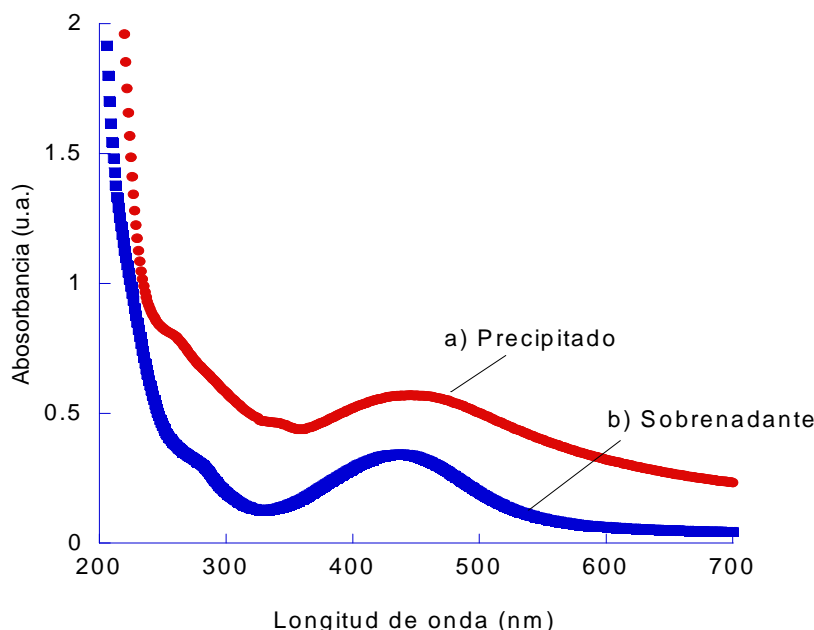


Figura 15. La tercera centrifugación de nanopartículas durante el proceso de adecuación del sistema disminuye la cantidad de nanopartículas. Las nanopartículas de plata sintetizadas a través de un método verde fueron centrifugadas por tercera vez a 6000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua desionizada.

Se centrifugó la muestra a 6000 rpm durante 15 minutos por cuarta vez, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 mL de agua desionizada, después se sometió a ultrasonido para dispersar por 10 minutos. Se tomaron los espectros UV-Vis. para el precipitado y sobrenadante. En la figura 16 (a) se observa la banda de resonancia de plasmon de superficie para las nanopartículas de plata alrededor de los 450 nm, y la presencia del extracto de la planta *R. hymenosepalus* alrededor de los 270 nm. En la figura 16 (a) se observa la presencia del extracto en menor cantidad comparado con la figura 9, lo cual indica que el procedimiento descrito en la sección 2.3, resulta viable para disminuir el extracto. En la figura 16 (b) ya no se observa la banda de absorción óptica para el extracto

de la planta *R. hymenosepalus*, indicando que una quinta centrifugación no resultaría viable, debido a que se ha eliminado en su mayor parte el extracto de la planta.

Espectro UV-Vis. de nanopartículas de plata durante el proceso de adecuación del sistema: cuarto lavado.

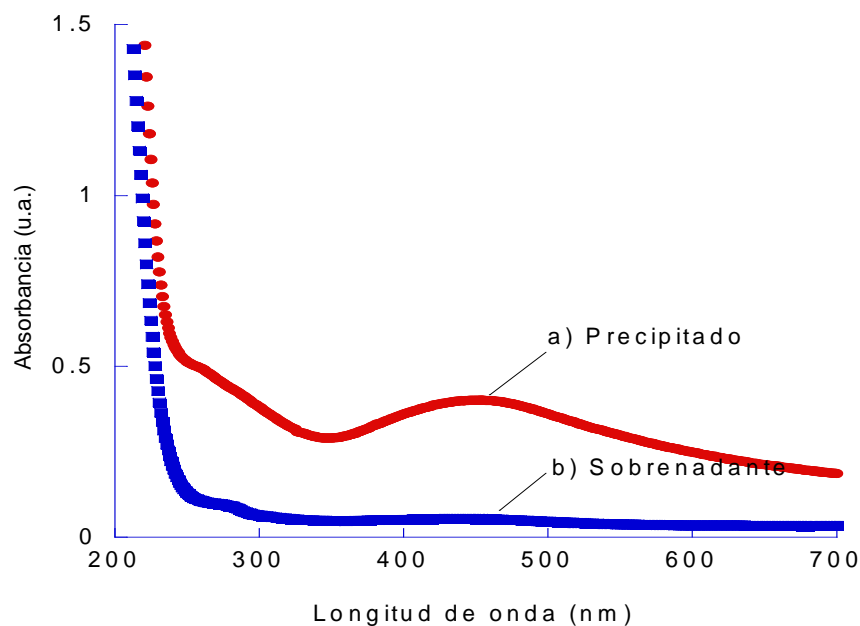


Figura 16. La cuarta centrifugación de nanopartículas durante el proceso de adecuación del sistema disminuye en muy poco la presencia del extracto de la planta *R. hymenosepalus*. Las nanopartículas de plata sintetizadas a través de un método verde fueron centrifugadas por cuarta vez a 6000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua desionizada.

3.3.2 Caracterización en el proceso de adecuación por microscopía electrónica de transmisión.

Para conocer el efecto sobre las nanopartículas durante del proceso de adecuación del sistema, se tomaron imágenes con MET del precipitado del primer lavado. En la figura 17 se observa que siguen existiendo las dos poblaciones diferentes en tamaño de nanopartículas de plata, mientras que la morfología después del primer lavado es la misma que antes de llevar a cabo el lavado, además no se observa coalescencia de nanopartículas.

Imágenes con MET del precipitado 1 durante el proceso de adecuación del sistema de nanopartículas de plata.

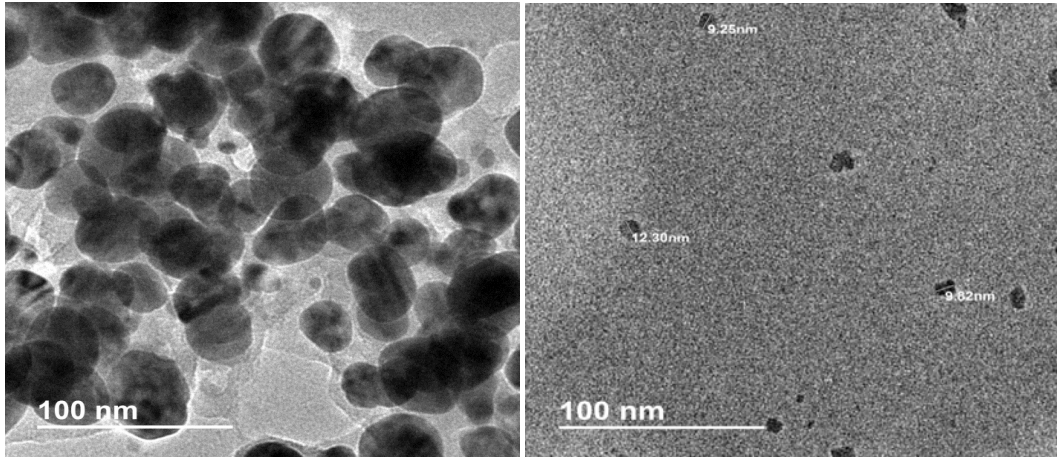


Figura 17. No se observan aglomeraciones y se distinguen dos poblaciones de nanopartículas de plata en el precipitado del primer lavado. Las nanopartículas de plata sintetizadas a través de un método verde fueron centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua desionizada. Se tomaron micrografías con MET del precipitado del lavado 1.

Se midieron los diámetros de las partículas con las imágenes obtenidas por MET. En la figura 18 se presenta la frecuencia para cada intervalo de nanopartículas medido. En total se midieron los diámetros de 383 partículas, el diámetro promedio es de 18.3 nm, con un diámetro mínimo de 1.4 y uno máximo de 70.4 nm. La desviación estándar fue de 15.3 y el índice de polidispersidad de 0.84. En la figura 18 se observa que la mayor población de nanopartículas se encuentra ahora entre los intervalos de 0 a 20 nm. El diámetro promedio después del primer lavado es muy similar al diámetro promedio antes de adecuar el sistema.

Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata del precipitado durante el proceso de adecuación del sistema. Primer lavado.

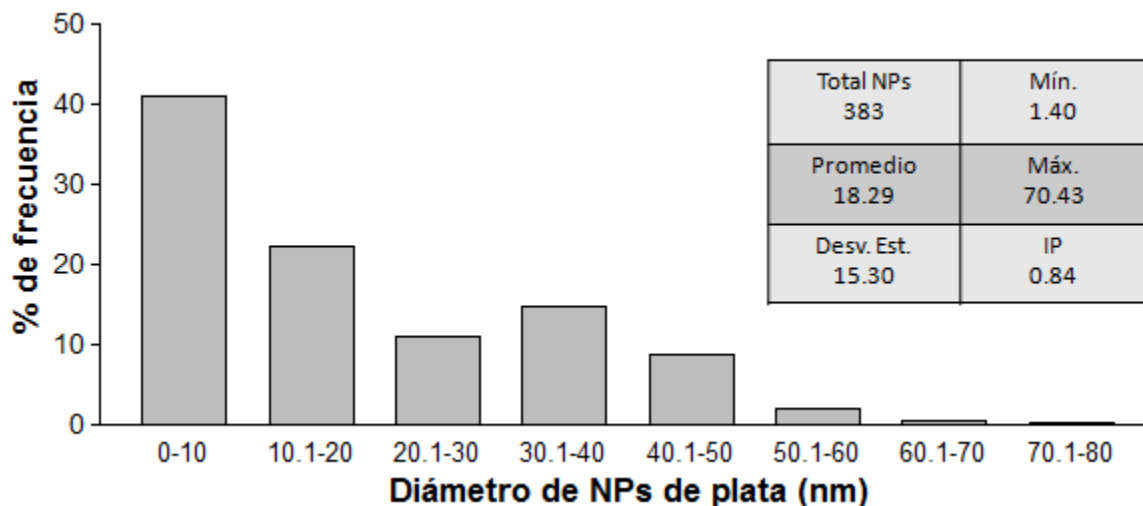


Figura 18. El tamaño promedio de nanopartículas de plata después del primer lavado en el proceso de adecuación del sistema se mantiene. A partir de las imágenes tomadas con MET se hizo la distribución de tamaños para las nanopartículas de plata del precipitado del primer lavado. La gráfica presenta intervalos de tamaños que van de 10 en 10 nm y su frecuencia expresada en porcentaje. Los datos del recuadro son el total de partículas, el promedio, la desviación estándar, el diámetro mínimo, el diámetro máximo y el índice de polidispersidad.

Para analizar la microestructura de las nanopartículas de plata después del primer lavado durante el proceso de adecuación del sistema, se analizaron imágenes en MET a alta resolución del precipitado 1. En la figura 19 se muestran dos de las imágenes analizadas, donde se encontraron las distancias interplanares de las micrografías; en promedio las distancias corresponden a la fase hexagonal. Las distancias son de 2.23600 Å para el plano (1 -1 2) y 1.99976 Å para el plano (1 0 3).

Imágenes en Microscopía Electrónica de alta resolución de nanopartículas del precipitado en el primer lavado durante el proceso de adecuación del sistema.

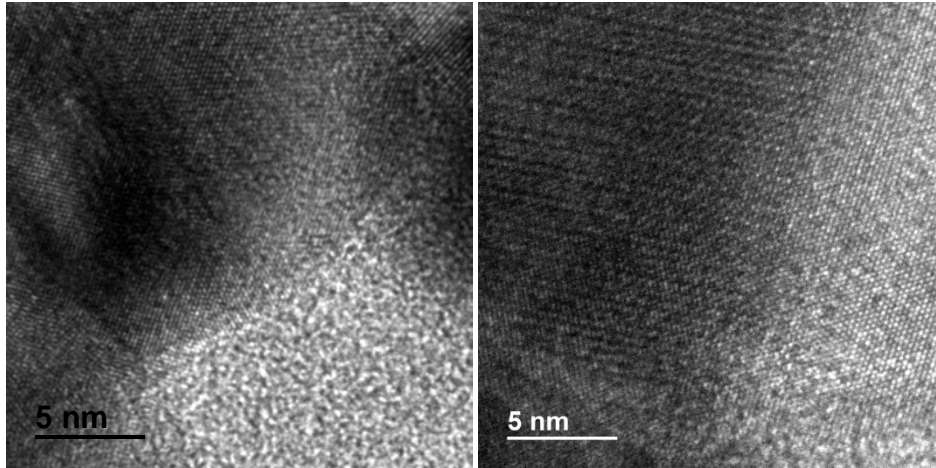


Figura 19. Se presenta la fase hexagonal en las nanopartículas de plata del precipitado después del primer lavado en el proceso de adecuación del sistema. Se tomaron imágenes con Microscopía de alta resolución para analizar la estructura de las nanopartículas después del primer lavado en el proceso de adecuación del sistema.

Durante el proceso de adecuación del sistema, también se tomaron imágenes con MET del precipitado del cuarto y último lavado. En la figura 20 se observan las dos poblaciones diferentes en tamaño de nanopartículas de plata anteriormente analizadas, y no se observa aglomeración de nanopartículas. La morfología de la nanopartículas después del cuarto lavado es similar a la morfología de las nanopartículas antes del proceso de adecuación, aparentemente, entonces, no se ve afectada la morfología por el proceso de adecuación.

Imágenes con MET del precipitado 4 durante el proceso de adecuación del sistema de nanopartículas de plata.

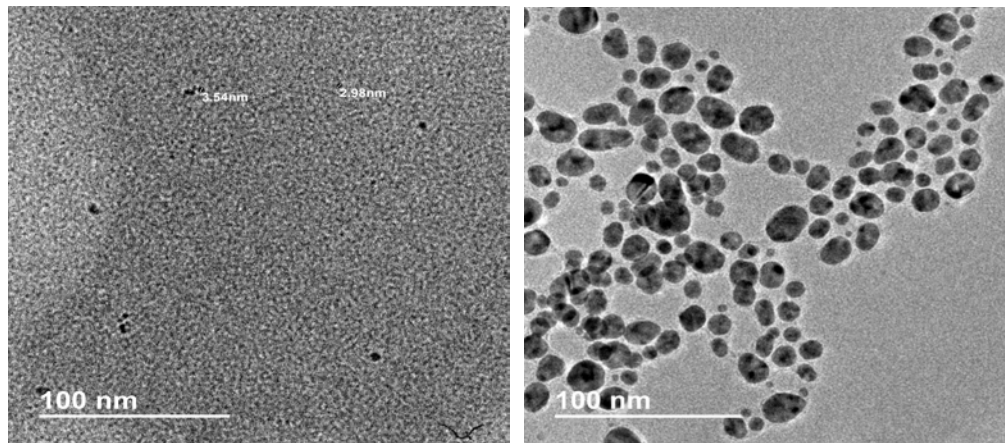


Figura 20. La morfología de las nanopartículas antes y después del proceso de adecuación del sistema es similar. Las nanopartículas de plata sintetizadas a través de un método verde fueron centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos por cuarta vez, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua desionizada. Se tomaron micrografías con MET del precipitado del lavado 4.

Se hizo una distribución de tamaños del precipitado del cuarto lavado en el proceso de adecuación del sistema. Para eso se midieron los diámetros de las partículas con las imágenes obtenidas por MET. En la figura 21 se presenta la frecuencia para cada intervalo de nanopartículas medido. En total se midieron los diámetros de 368 partículas, el diámetro promedio es de 13.3 nm, con un diámetro mínimo de 1.4 y uno máximo de 60.9 nm. La desviación estándar fue de 7.0 y el índice de polidispersidad de 0.53. En la figura 21 se observa que la mayor población de nanopartículas se encuentra ahora entre los intervalos de 5.1 a 20 nm. El diámetro promedio, la desviación estándar y por lo tanto el índice de polidispersidad disminuyeron con respecto a los mismos valores pero provenientes del precipitado del primer lavado, sin embargo los valores de la desviación estándar y el índice de polidispersidad sigue siendo altos.

Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata del precipitado durante el proceso de adecuación del sistema. Cuarto lavado.

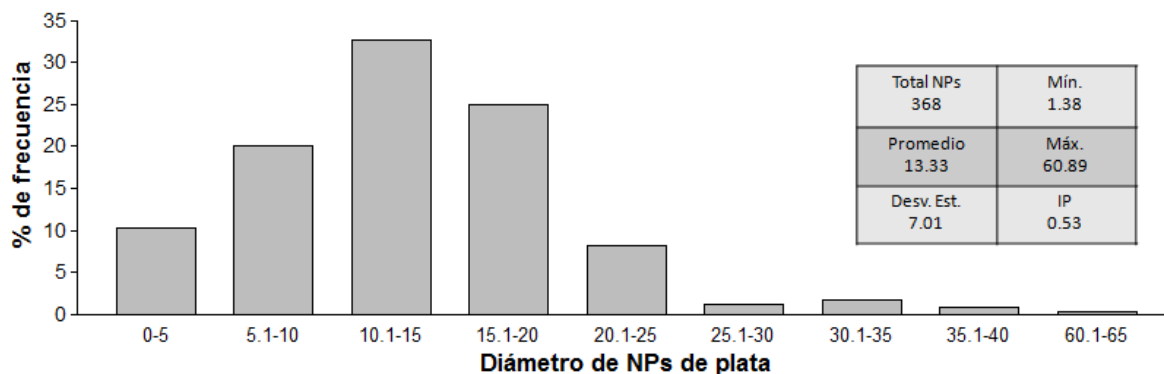


Figura 21. El tamaño promedio de nanopartículas de plata del precipitado después del cuarto lavado en el proceso de adecuación del sistema disminuye. A partir de las imágenes tomadas con MET se hizo la distribución de tamaños para las nanopartículas de plata del precipitado del cuarto y último lavado. La gráfica presenta intervalos de tamaños que van de 5 en 5 nm y su frecuencia expresada en porcentaje. Los datos del recuadro son el total de partículas, el promedio, la desviación estándar, el diámetro mínimo, el diámetro máximo y el índice de polidispersidad.

Después del cuarto lavado durante el proceso de adecuación del sistema, se analizaron imágenes en MET a alta resolución del precipitado 4. En la figura 22 se muestran dos de las imágenes analizadas, las distancias interplanares encontradas fueron de 2.35900 Å para el plano (1 1 1) y 2.04400 Å para el plano (2 0 0) para la fase cúbica centrada en las caras; mientras que para la fase hexagonal las distancias predominantes fueron las de 2.23573 Å para el plano (1 0 2); siguen entonces coexistiendo nanopartículas con estructuras cubica centrada en las caras y estructura hexagonal.

Imágenes en Microscopía Electrónica de alta resolución del nanopartículas del precipitado en el cuarto lavado durante el proceso de adecuación del sistema.

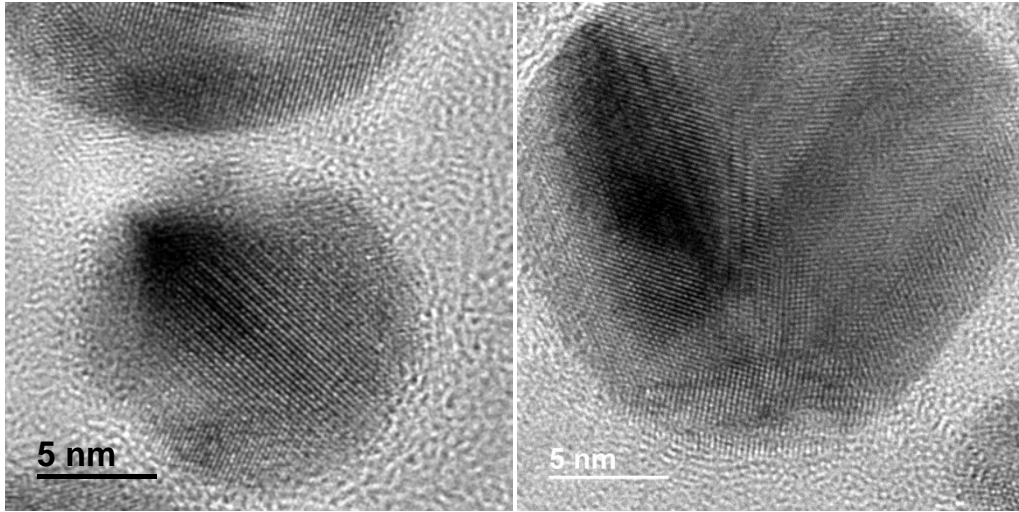


Figura 22. Se presenta la fase hexagonal y cúbica centrada en las caras en las nanopartículas de plata del precipitado después del cuarto lavado en el proceso de adecuación del sistema. Se tomaron imágenes con Microscopía de alta resolución para analizar la estructura de las nanopartículas después del cuarto lavado en el proceso de adecuación del sistema.

3.4 Esterilización de nanopartículas

3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión

Para saber si después de esterilizarlas se ve afectada la morfología o distribución de tamaños de las nanopartículas, se tomaron imágenes con MET. Las nanopartículas se esterilizaron después del proceso de adecuación con radiación ionizante a 28 KGy. En la figura 23 se observan las dos poblaciones de nanopartículas existentes, presentando una morfología muy similar antes y después de su esterilización. No se observan aglomeraciones de nanopartículas de plata en el sistema.

Nanopartículas de plata después de su adecuación y después de su esterilización con radiación ionizante.

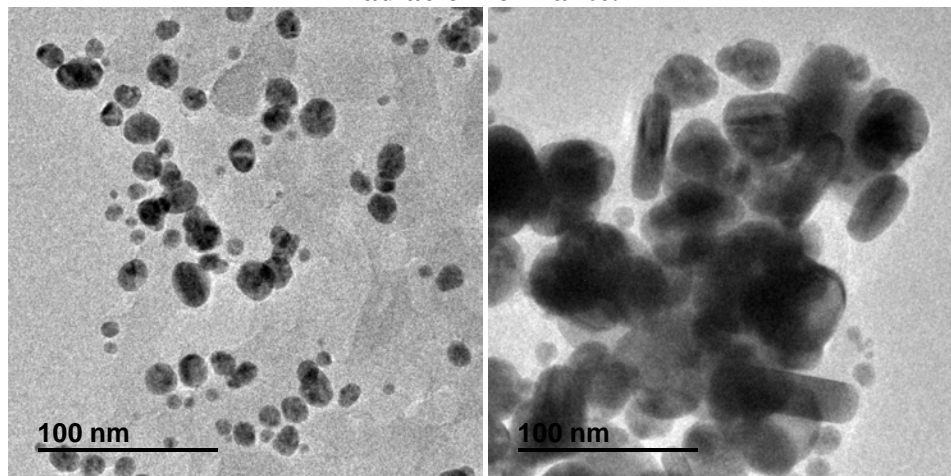


Figura 23. No se observan cambios morfológicos significativos en las nanopartículas de plata después de su esterilización con radiación ionizante. Después del proceso de adecuación del sistema, las nanopartículas fueron esterilizadas con radiación ionizante. Se tomaron imágenes con MET para su posterior análisis.

Como parte de la caracterización, se midieron los diámetros de las partículas después de haber sido esterilizadas con las imágenes obtenidas por MET. En la figura 24 se presentan la frecuencia para cada intervalo de nanopartículas medido. En total se midieron los diámetros de 300 partículas, el diámetro promedio es de 18.9 nm, con un diámetro mínimo de 3.1 y uno máximo de 71.3 nm. La desviación estándar fue de 10.5 y el índice de polidispersidad de 0.56.

Para las nanopartículas sintetizadas usando el extracto de la planta *R. hymenosepalus*, el diámetro promedio después de esterilizadas (18.9 nm) aumenta en comparación con el diámetro promedio para las nanopartículas antes de esterilizarlas (13.3 nm), así como la desviación estándar (10.5 vs. 7.0) y por lo tanto el índice de polidispersidad (0.56 vs. 0.53). Estos resultados sugieren un posible proceso de coalescencia debido a la radiación ionizante aumentando así el tamaño promedio de las nanopartículas de plata. Lo anterior podría sugerir que debido a la radiación ionizante las

nanopartículas coalescen y aumenta, así, el tamaño promedio de las nanopartículas de plata. Sin embargo, el muestreo estadístico es insuficiente para afirmar que los cambios observados son debidos a la radiación ionizante. Una complementación de los estudios por MET con estudios de la distribución de tamaños de las nanopartículas de plata en suspensión darían una idea más precisa de éstos cambios.

Estudios muestran que la esterilización de nanopartículas de plata usando radiación Gamma altera la morfología de las nanopartículas⁶². Después de la radiación Gamma, muchas partículas pierden su estructura cristalina y forman una combinación de agregados de partículas más pequeñas y de formas irregulares⁶²; estos efectos no parecen tener una relación dosis-respuesta con respecto a la radiación Gamma.

En realidad, se sabe poco acerca de la estabilidad de las nanopartículas de plata bajo los procesos de esterilización estándar, comúnmente usados en la industria de los alimentos, por ejemplo. Estos efectos requieren investigación, debido a que los efectos que se presentan como ventaja derivada del tamaño a nanoescala de las partículas de plata, podrían verse reducidos o eliminados, si la integridad de las partículas se ve amenazada cuando el producto es esterilizado⁶².

Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata después de su adecuación y después de su esterilización con radiación ionizante.

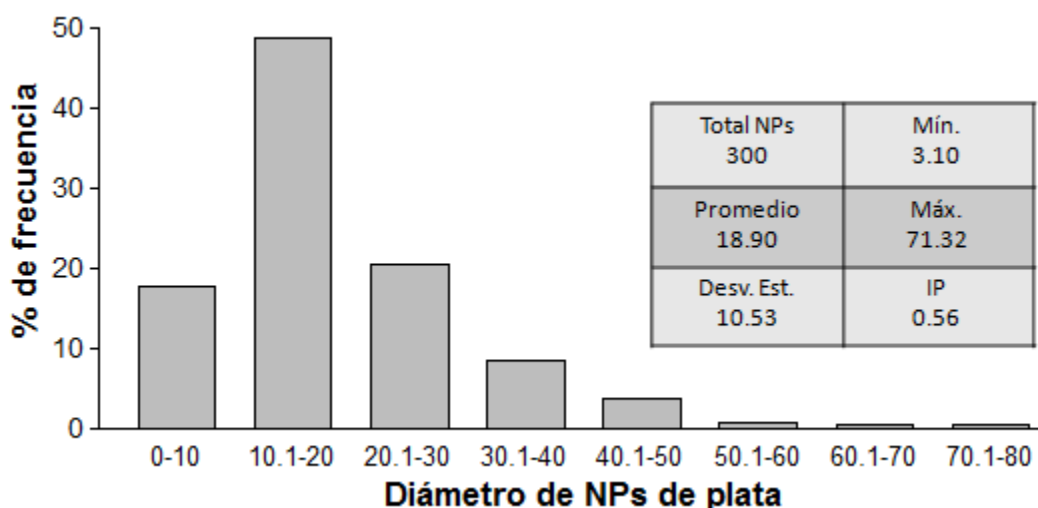


Figura 24. El tamaño promedio de nanopartículas de plata después de su adecuación y esterilización con radiación ionizante aumenta. A partir de las imágenes tomadas con MET se hizo la distribución de tamaños para las nanopartículas de plata después de su adecuación y esterilización con radiación ionizante. La gráfica presenta intervalos de tamaños que van de 10 en 10 nm y su frecuencia expresada en porcentaje. Los datos del recuadro son el total de partículas, el promedio, la desviación estándar, el diámetro mínimo, el diámetro máximo y el índice de polidispersidad.

Después de haber sido esterilizadas con radiación ionizante se analizaron imágenes en MET a alta resolución. En la figura 25 se muestran dos de las imágenes en las que se midieron las distancias interplanares en promedio de 2.04400 Å, correspondiente al plano (2 0 0) y la distancia 2.35900 Å correspondiente al plano (1 1 1), para la fase cúbica centrada en las caras. Para la fase hexagonal se encontraron las distancias de 2.23600 Å correspondiente al plano (1 -1 2), 2.23573 Å (1 0 2) y 1.99976 Å (1 0 3). La coexistencia de las dos estructuras cristalinas de las nanopartículas de plata, fase cúbica y fase hexagonal, presentes en el sistema se mantiene aún después de la exposición a radiación ionizante durante la esterilización a diferencia de lo encontrado en otros estudios donde se observan

cambios en la estructura cristalina de los nanomateriales al ser sometidos a esta radiación. Los diferentes ambientes en los que se encuentran las nanopartículas pudieran tener una influencia sobre la forma como la radiación ionizante afecta las nanopartículas.

Imágenes tomadas en MET de alta resolución de las nanopartículas de plata después de su adecuación y después haber sido esterilizadas con radiación ionizante.

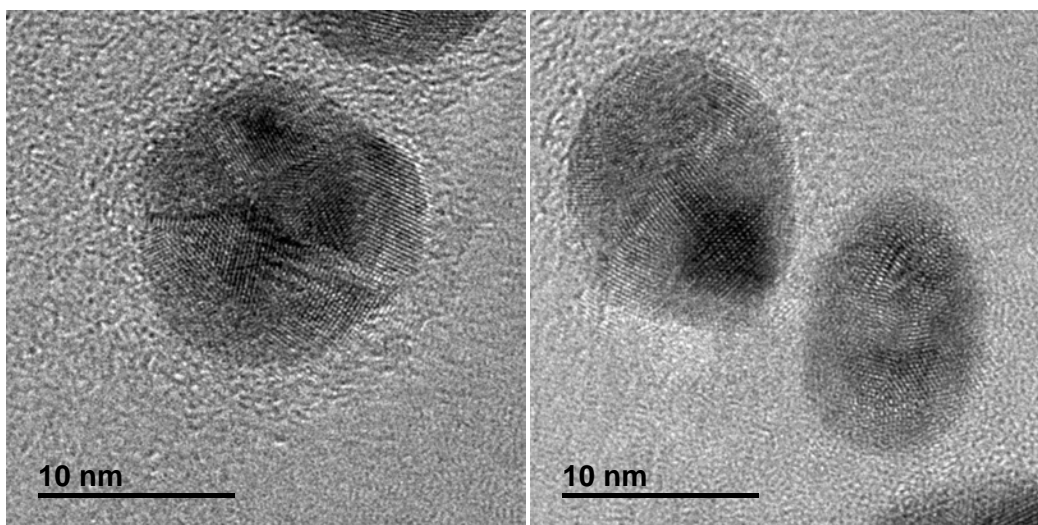


Figura 25. Se presenta la fase hexagonal y cúbica centrada en las caras en las nanopartículas de plata después de esterilizarlas con radiación ionizante. Se tomaron imágenes con MET de alta resolución para analizar la estructura de las nanopartículas después de haber sido esterilizadas con radiación ionizante. Se presentan dos de las imágenes analizadas.

3.5 Filtración de nanopartículas

3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión

Para evitar aglomeraciones en el sistema de nanopartículas de plata, después de haber sido esterilizadas, se filtraron las nanopartículas en una membrana de celulosa de 0.22 micras. Para llevar a cabo la filtración, las nanopartículas se disolvieron en medio de cultivo DMEM a una concentración al 10% y se hicieron pasar a través de una membrana

de celulosa de 0.22 micras. En la figura 26 se muestran imágenes tomadas en MET de la muestra; en las imágenes se observa que las nanopartículas de plata se encuentran bien dispersas, con aparentemente baja polidispersidad en tamaño.

Imágenes de las nanopartículas de plata después de filtradas con una membrana de 0.22 micras.

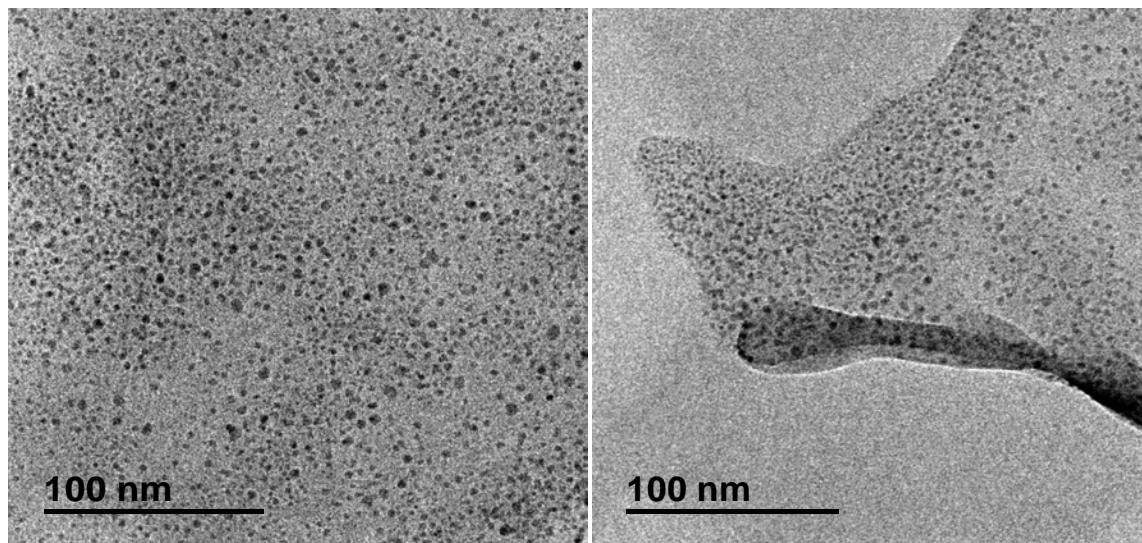


Figura 26. Después de filtrar las nanopartículas de plata a través de una membrana de 0.22 micras el sistema es más monodisperso. Se filtraron las nanopartículas de plata en medio de cultivo DMEM al 10%, a través de una membrana de 0.22 micras para evitar aglomeraciones.

Para cuantificar cambios en el tamaño de las nanopartículas de plata después de filtrarlas a través de una membrana de 0.22 micras se calculó el diámetro promedio de las nanopartículas e índice de polidispersidad con las imágenes obtenidas por MET. En la figura 27 se presenta la frecuencia para cada intervalo de nanopartículas medido. Se midieron los diámetros de 301 partículas, el diámetro promedio es de 4.6 nm, con un diámetro mínimo de 2.3 nm y uno máximo de 7.9 nm. La desviación estándar fue de 1.0 y el índice de polidispersidad de 0.22. En la figura 27 se observa que la mayoría de la población de nanopartículas se encuentra en el intervalo de 3.1 a 6 nm. El diámetro

promedio disminuye en gran medida después de filtrar las nanopartículas de plata (de 18.9 nm a 4.6 nm), así como la desviación estándar y el índice de polidispersidad, probablemente debido al uso de la membrana, aun cuando ésta sea de 220 nm, ya que depende de la tortuosidad de los poros del filtro el que las nanopartículas puedan pasar. Otro aspecto a tomar en cuenta es la forma de realizar la toma de la alícuota conteniendo las nanopartículas ya que dependiendo del tamaño de las nanopartículas será la rapidez de sedimentación en la suspensión y esto puede influenciar una separación de la muestra por tamaños.

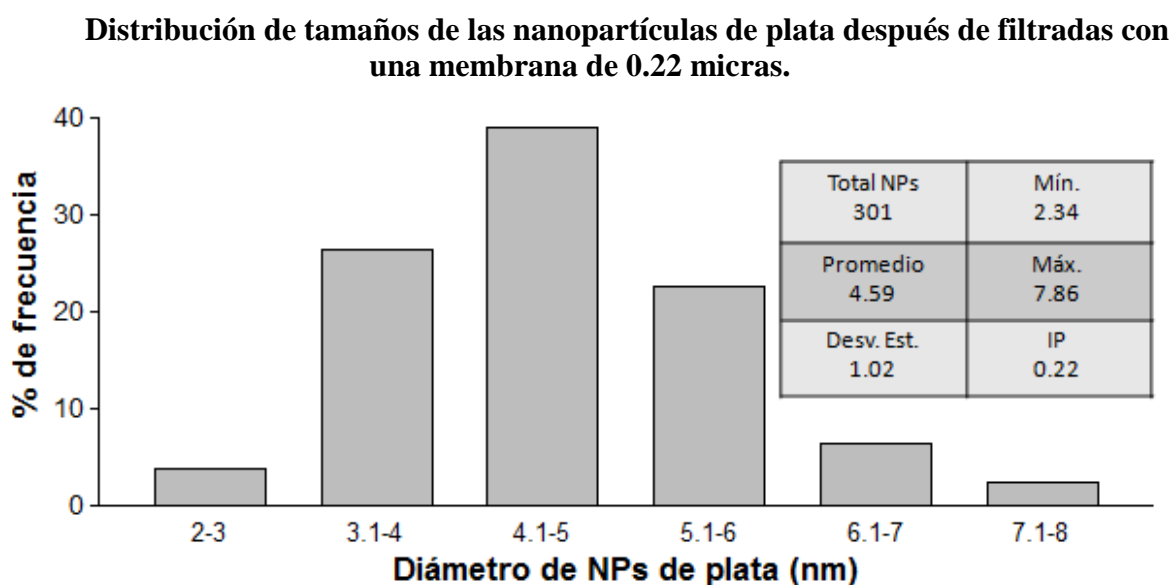


Figura 27. El diámetro promedio de nanopartículas de plata disminuye después de filtrar las nanopartículas a través de una membrana de 0.22 micras. A partir de las imágenes tomadas con MET se hizo la distribución de tamaños para las nanopartículas de plata después de hacerlas pasar a través de un filtro de 0.22 micras. La gráfica presenta intervalos de tamaños que van de 1 en 1 nm y su frecuencia expresada en porcentaje. Los datos del recuadro son el total de partículas, el promedio, la desviación estándar, el diámetro mínimo, el diámetro máximo y el índice de polidispersidad.

Después de haber sido filtradas a través de una membrana de 0.22 micras, se analizaron imágenes en MET a alta resolución de las nanopartículas de plata. En la figura 28 se muestran dos de las imágenes en las que se midieron las distancias interplanares en promedio de 2.0000 Å, correspondiente al plano (1 0 3), para la fase hexagonal.

Imágenes tomadas en MET de alta resolución de las nanopartículas de plata después filtradas con una membrana de 0.22 micras.

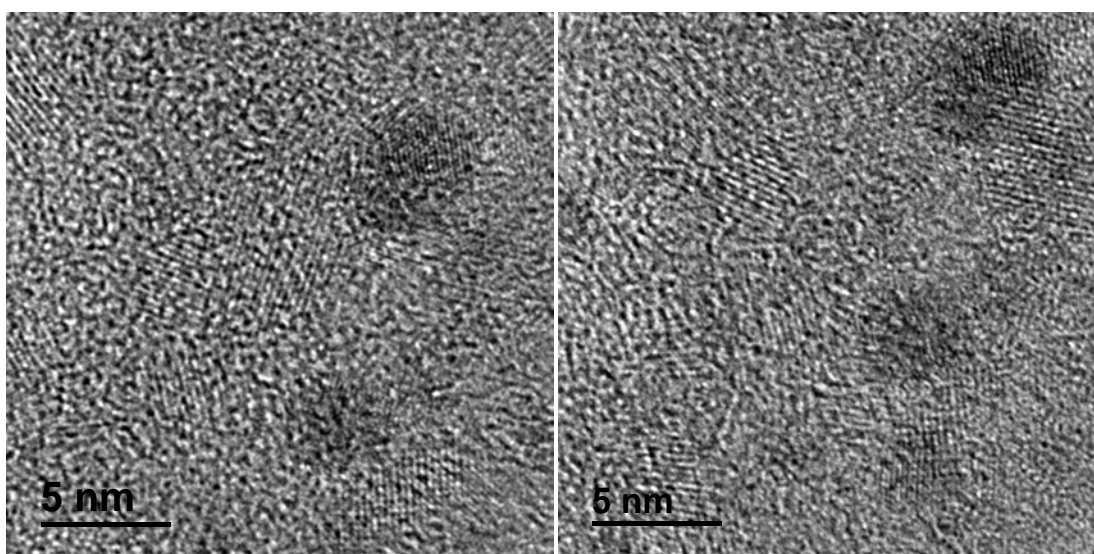


Figura 28. Se presenta la fase hexagonal en las nanopartículas de plata después de haber sido filtradas con una membrana de 0.22 micras. Se tomaron imágenes con MET de alta resolución para analizar la estructura de las nanopartículas después de haber sido filtradas a través de una membrana de 0.22 micras. Se presentan dos de las imágenes analizadas.

Después de 3 meses de haber sido sintetizadas y adecuadas ya para su uso con las líneas celulares, el sistema de nanopartículas de plata presentaba precipitados, por eso se sometió a ultrasonido por segunda vez y se filtraron las nanopartículas en una membrana de celulosa de 0.22 micras. Para llevar a cabo la filtración, las nanopartículas se disolvieron en medio de cultivo DMEM a una concentración al 10% y se hicieron pasar a través de una membrana de celulosa de 0.22 micras. En la figura 29 se muestran imágenes tomadas en

MET de la muestra; en las imágenes se observan varias poblaciones de tamaños de nanopartículas con alta polidispersidad en tamaño.

Imágenes en MET de las nanopartículas de plata después de haber sido sometidas a ultrasonidos por segunda vez y después filtradas con una membrana de 0.22 micras.

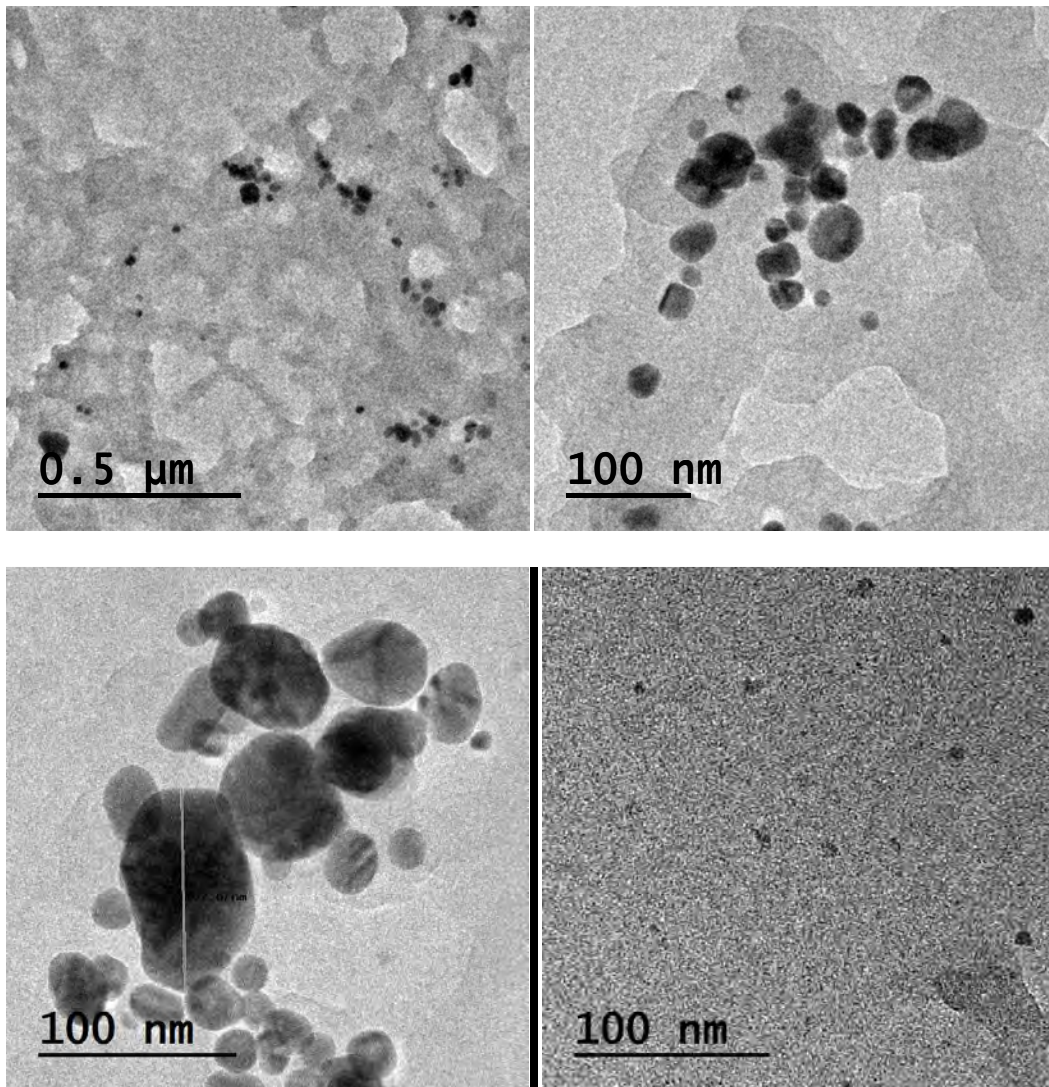


Figura 29. Después de someter a ultrasonidos por segunda vez y filtrar las nanopartículas de plata a través de una membrana de 0.22 micras el sistema es más polidisperso. Se sometieron a ultrasonidos por segunda vez y después se filtraron las nanopartículas de plata en medio de cultivo DMEM al 10%, a través de una membrana de 0.22 micras para evitar aglomeraciones.

Para cuantificar cambios en el tamaño de las nanopartículas de plata después de someterlas a ultrasonido por segunda vez y filtrarlas a través de una membrana de 0.22 micras, se calculó el diámetro promedio de las nanopartículas e índice de polidispersidad con las imágenes obtenidas por MET. En la figura 30 se presenta la frecuencia para cada intervalo de nanopartículas medido. Se midieron los diámetros de 194 partículas, el diámetro promedio fue de 19.7 nm, con un diámetro mínimo de 1.4 nm y uno máximo de 60 nm. La desviación estándar fue de 13.1 y el índice de polidispersidad de 0.67. Como la distribución del diámetro promedio (19.7 nm) aumentó cuando las nanopartículas de plata se volvieron a someter a ultrasonido y fueron filtradas, en comparación con el diámetro promedio (4.6 nm) de aquellas que únicamente fueron filtradas, se requiere mayor estudio del comportamiento de las nanopartículas sobre el efecto en ellas por los procesos a los que han sido sometidas, al estudio de su añejamiento, etc. Por ello se deben guardar, en la medida de lo posible, las mismas condiciones en los experimentos.

En el caso de nanopartículas metálicas, éstas tienden a formar películas en diferentes superficies: metálicas, poliméricas, cerámicas, etc., induciéndose procesos de coalescencia. Este fenómeno pudo presentarse en el añejamiento de las nanopartículas de plata las cuales habían sido desprovistas de la mayor parte de moléculas protectoras de su superficie (extracto). Una vez sometidas a ultrasonido parte de este material pudo desprenderse e incorporarse a la suspensión.

Distribución de tamaños de las nanopartículas de plata después de someterlas a ultrasonidos por segunda vez y después de filtrarlas con una membrana de 0.22 micras.

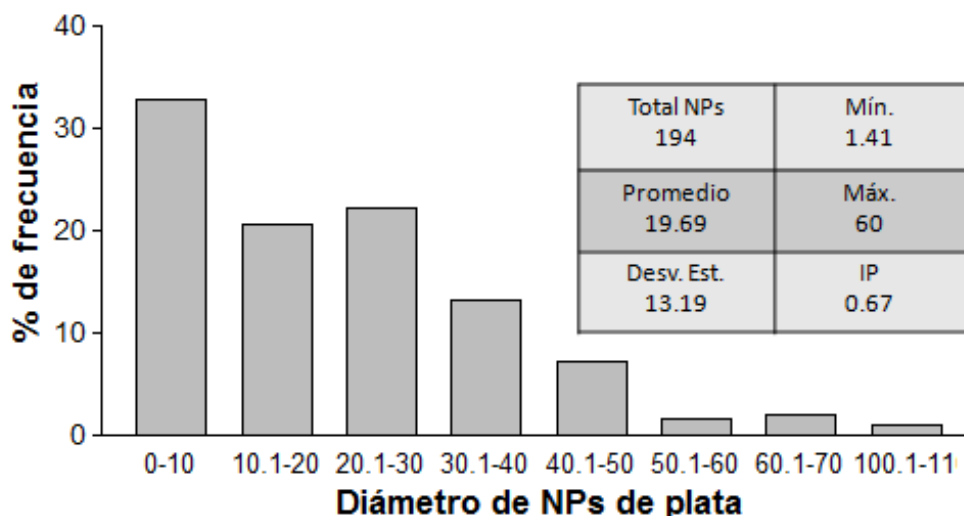


Figura 30. El diámetro promedio de nanopartículas de plata disminuye después de filtrar las nanopartículas a través de una membrana de 0.22 micras. A partir de las imágenes tomadas con MET se hizo la distribución de tamaños para las nanopartículas de plata después de hacerlas pasar a través de un filtro de 0.22 micras. La gráfica presenta intervalos de tamaños que van de 10 en 10 nm y su frecuencia expresada en porcentaje. Los datos del recuadro son el total de partículas, el promedio, la desviación estándar, el diámetro mínimo, el diámetro máximo y el índice de polidispersidad.

3.6 Efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación de la línea celular C3F6.

Como se explica en la sección 2.7, para evaluar si el disolvente (agua desionizada) utilizado para resuspender las nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, inhibe el crecimiento *in vitro* de células cancerosas, se incubó la línea celular de linfoma de ratón C3F6 con diferentes proporciones de agua desionizada (0.6, 1.2, 2.5, 5, 10 y 20%) y medio de cultivo DMEM (80, 90, 95, 97.5, 98.8 y 99.4 y 100% como control) durante 48 horas. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo MTT. En la figura 31 se observa que el agua desionizada a las concentraciones al 2.5% y menores no

inhiben la proliferación de las células cancerosas. En la figura 32 se muestran imágenes tomadas en el microscopio óptico a 40X después de las 48 horas de incubadas las células con agua desionizada a las concentraciones al 20, 10, 5, 2.5, 1.2 y 0.6% (a-f respectivamente). En la figura 32 no se ve una diferencia apreciable entre las diferentes concentraciones de agua desionizada.

Efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular *C3F6*.

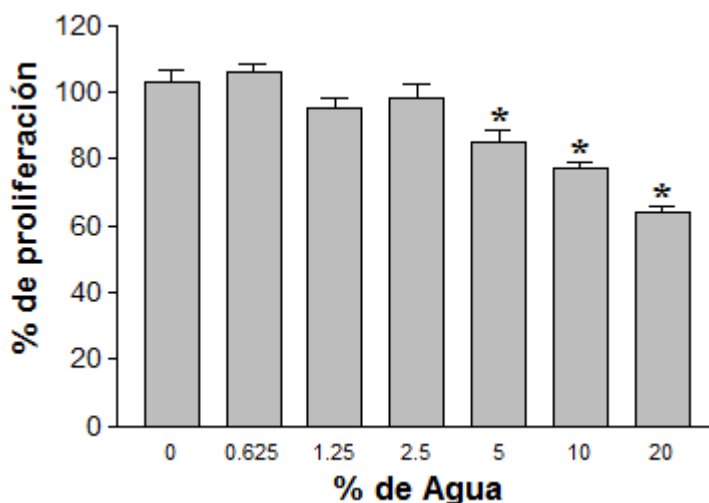


Figura 31. Agua desionizada a las concentraciones al 2.5% y menores no inhiben la proliferación celular. Agua desionizada se incubó por 48 horas con células de linfoma de ratón *C3F6*. Las concentraciones de agua desionizada utilizadas fueron al 0.6, 1.2, 2.5, 5*, 10* y 20*%. Como control se utilizaron células *C3F6* sin agua desionizada. El asterisco significa una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

Imágenes en el microscopio óptico del efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular C3F6.

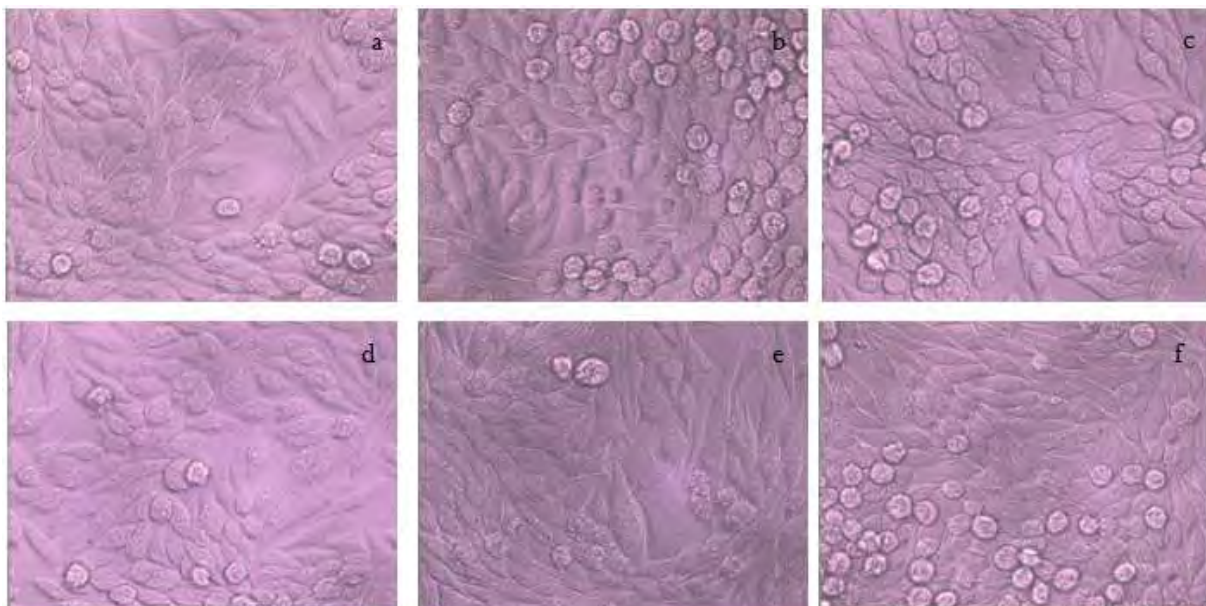


Figura 32. No se observa una diferencia apreciable en las imágenes en el microscopio óptico de las células C3F6 incubadas con agua desionizada. Agua desionizada se incubó por 48 horas con células de linfoma de ratón C3F6. Las concentraciones de agua desionizada utilizadas fueron al 20, 10, 5, 2.5, 1.2 y 0.6% (a-f respectivamente). Como control se utilizaron células C3F6 sin agua desionizada. Las imágenes fueron tomadas a 40X.

Con el propósito de evaluar si las nanopartículas de plata, inhiben el crecimiento *in vitro* de células cancerosas, se incubó la línea celular de linfoma de ratón C3F6 con diferentes concentraciones de nanopartículas (0.1, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.5%) durante 48 horas. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo MTT. En la figura 33 se observa que las nanopartículas de plata inhibieron significativamente ($p \leq 0.05$) la proliferación de las células cancerosas de una manera dosis-dependiente. Concentraciones de nanopartículas de 0.6% y mayores inhibieron casi completamente ($>90\%$) la proliferación celular. El solvente (agua desionizada a la concentración de 2.5%) utilizado para

resuspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células cancerosas.

Efecto de Nanopartículas de Plata sobre la línea celular *C3F6*.

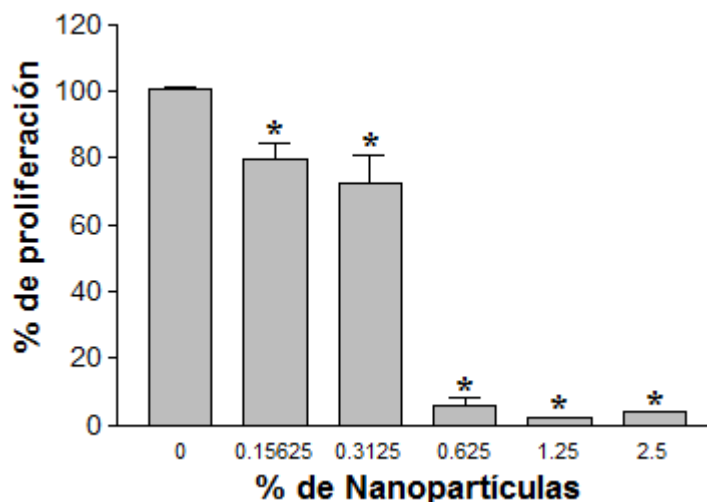


Figura 33. Nanopartículas de plata inhiben la proliferación celular de las células *C3F6*. Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, se incubaron por 48 horas con células de linfoma de ratón *C3F6*. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 0.1%, 0.3%, 0.6%, 1.2% y 2.5%. Como control se utilizó agua desionizada al 2.5%. El asterisco significa una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

Se tomaron fotografías con el microscopio óptico de las células *C3F6* a 40X con nanopartículas, correspondientes al experimento presentado en la figura 33. En la figura 34 se observa que las nanopartículas de plata presentan aglomeraciones, e inhiben la proliferación de las células cancerosas. Concentraciones de nanopartículas de 0.6% y mayores inhibieron casi completamente (>90%) la proliferación celular (fotografías a-c). El solvente (agua desionizada a la concentración de 2.5%) utilizado para resuspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células cancerosas (fotografía f). Estas observaciones coinciden con los resultados de la figura 33.

Imágenes en el microscopio óptico del efecto de las nanopartículas de plata sobre la línea celular *C3F6*.

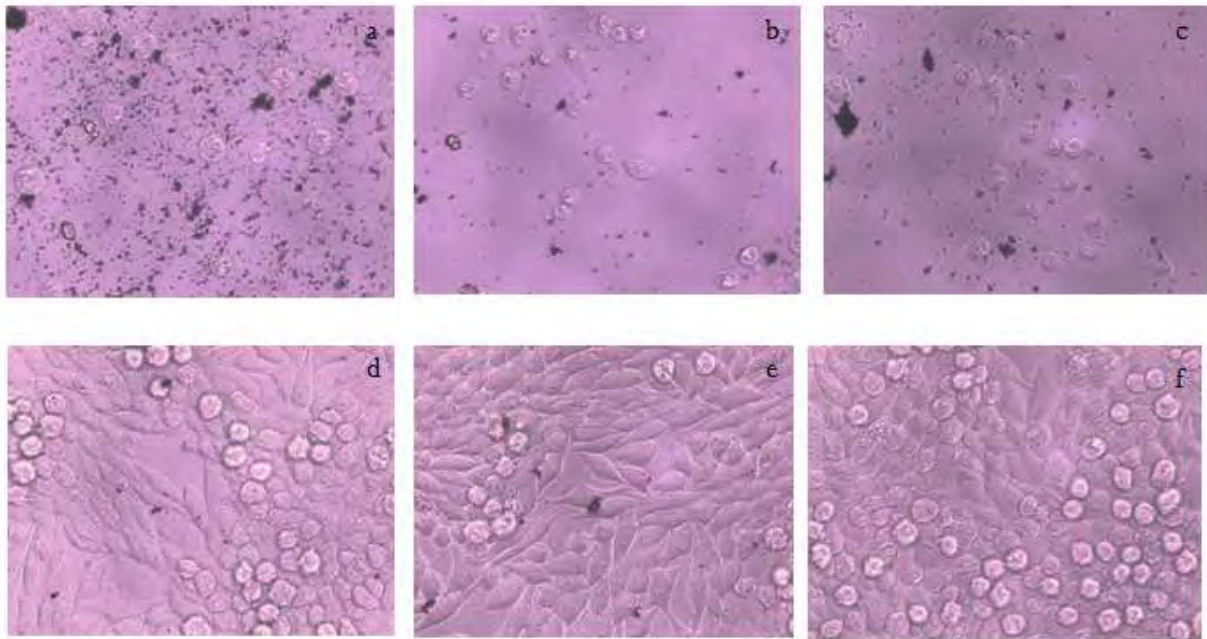


Figura 34. Nanopartículas de plata inhiben la proliferación celular de las células *C3F6*. Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, se incubaron por 48 horas con células de linfoma de ratón *C3F6*. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 2.5, 1.2, 0.6, 0.3 y 0.1% (fotos a-e respectivamente). Como control se utilizó agua desionizada al 2.5% (foto f). Las imágenes fueron tomadas a 40X.

En la sección 2.6 se explica la filtración de nanopartículas. Para evaluar si las nanopartículas de plata después de filtradas con una membrana de celulosa de 0.22 micras, inhiben el crecimiento *in vitro* de células cancerosas, se incubó la línea celular de linfoma de ratón *C3F6* con diferentes concentraciones de nanopartículas (0.1, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.5%) durante 48 horas. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo MTT. En la figura 35 se observa que las nanopartículas de plata, filtradas con una membrana de 0.22 micras, inhibieron significativamente ($p \leq 0.05$) la proliferación de las células cancerosas de una manera dosis-dependiente. Concentraciones de nanopartículas de 1.2% y mayores

inhibieron casi completamente (>90%) la proliferación celular. El solvente (agua desionizada a la concentración de 2.5%) utilizado para resuspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células cancerosas.

Efecto de Nanopartículas de Plata después de filtrarlas sobre la línea celular *C3F6*.

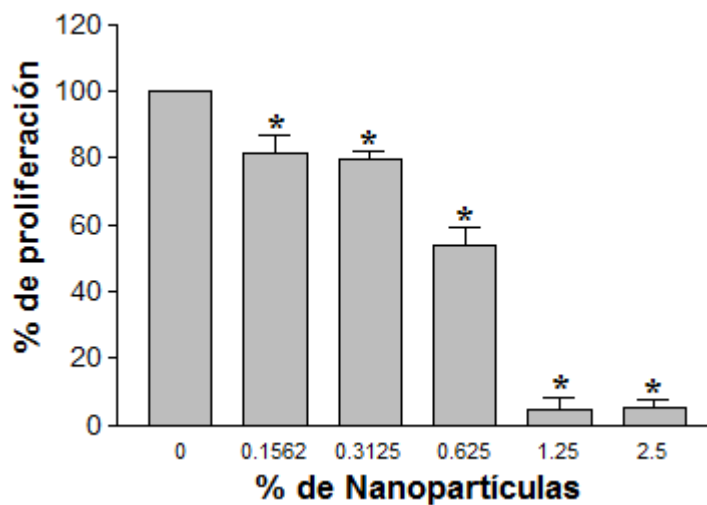


Figura 35. Nanopartículas de plata filtradas inhiben la proliferación celular de las células *C3F6*. Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, y filtradas con una membrana de celulosa de 0.22 micras se incubaron por 48 horas con células de linfoma de ratón *C3F6*. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 0.1*, 0.3*, 0.6*, 1.2* y 2.5%*. Como control se utilizó agua desionizada al 2.5%. El asterisco significa una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

Con el microscopio óptico se tomaron fotografías a 40X correspondientes a los experimentos de la figura 35, de las células *C3F6* con nanopartículas filtradas en una membrana de celulosa de 0.22 micras. En la figura 36 se observa que las nanopartículas de plata siguen afectando la proliferación de las células cancerosas. Concentraciones de nanopartículas de 1.2% y mayores inhibieron casi completamente (>90%) la proliferación celular (fotografías a,b). El solvente (agua desionizada a la concentración de 2.5%)

utilizado para resuspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células cancerosas (fotografía f). Aún cuando fueron filtradas, también se observa aglomeración de las nanopartículas de plata, mientras que en las imágenes con MET (Figura 26) no se presenta aglomeración.

Imágenes en el microscopio óptico del efecto de las nanopartículas de plata filtradas con una membrana de 0.22 micras sobre la línea celular C3F6.

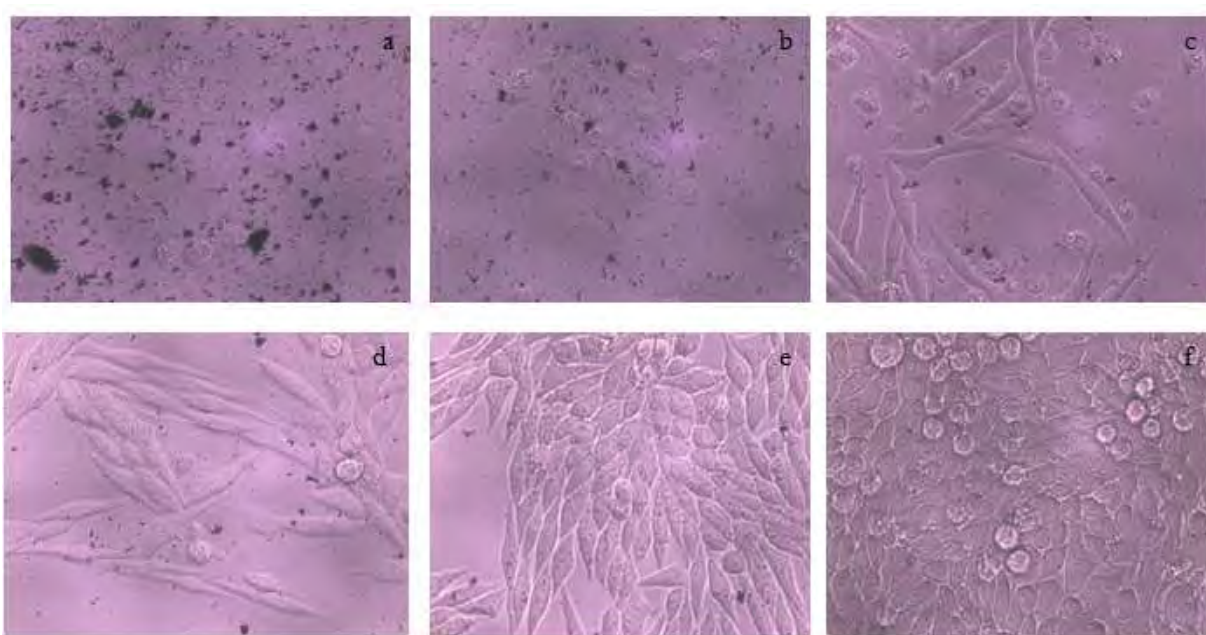


Figura 36. Nanopartículas de plata filtradas en una membrana de celulosa inhiben la proliferación celular de las células C3F6. Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, filtradas con una membrana de 0.22 micras se incubaron por 48 horas con células de linfoma de ratón C3F6. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 2.5, 1.2, 0.6, 0.3 y 0.1% (fotografías a-e respectivamente). Como control se utilizó agua desionizada al 2.5% (fotografía f). Las imágenes se tomaron a 40X.

Cuando se trabaja con nanopartículas es importante conocer su morfología, distribución de tamaños, área superficial, composición, recubrimiento superficial, estatus de agregación, reactividad, para llevar a cabo diferentes experimentos. Sin embargo, como se

observa en la figura 36, las nanopartículas podrían agregarse en medios de cultivo debido a la exposición a iones y proteínas diversas. La agregación ocurre cuando las fuerzas de atracción de Van der Waals entre las partículas son mayores que las fuerzas repulsivas electrostáticas producidas por la superficie de la nanoestructura. Primero la alta concentración de iones en el medio biológico pueden disminuir la longitud de Debye y las altas proteínas del medio pueden causar un remplazo de las moléculas asociadas a la superficie con las proteínas del medio. Esta desestabilización de la superficie causará agregaciones o aglomeraciones de las partículas en medios biológicos como sangre, saliva o medio de cultivo⁶³.

En la sección 2.8 se describe la metodología para evaluar si el disolvente (agua desionizada) utilizado inhibe el crecimiento *in vitro* de células normales; para eso se incubó la línea celular de fibroblastos normales *L929* con diferentes proporciones de agua desionizada (20, 10, 5, 2.5, 1.2, 0.6 y 0% como control) y medio de cultivo DMEM (80, 90, 95, 97.5, 98.8, 99.4 y 100% como control) durante 48 horas. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo MTT. En la figura 37 se observa que el agua desionizada a las concentraciones de 5% y menores no inhiben significativamente la proliferación de las células normales. En la figura 38 se muestran imágenes tomadas en el microscopio óptico a 40X después de las 48 horas de incubadas las células con agua desionizada, a las concentraciones al 20, 10, 5, 2.5, 1.2, 0.6% (fotografías a-f respectivamente) y 0% (fotografía g). En la figura 38 no se ve una diferencia apreciable entre las diferentes concentraciones de agua desionizada.

Efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular *L929*.

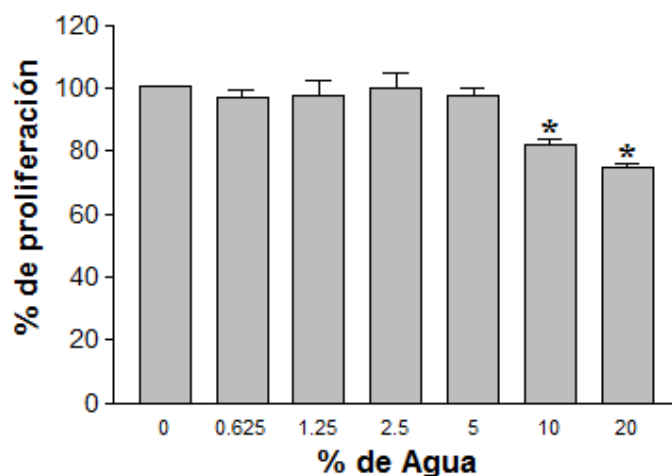


Figura 37. Agua desionizada a las concentraciones al 5% y menores no inhiben la proliferación celular. Agua desionizada se incubó por 48 horas con células de fibroblastos normales *L929*. Las concentraciones de agua desionizada utilizadas fueron al 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10* y 20%*. Como control se utilizaron células *L929* sin agua desionizada. El asterisco significa una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

Imágenes en el microscopio óptico del efecto del disolvente (agua desionizada) sobre la línea celular *L929*.

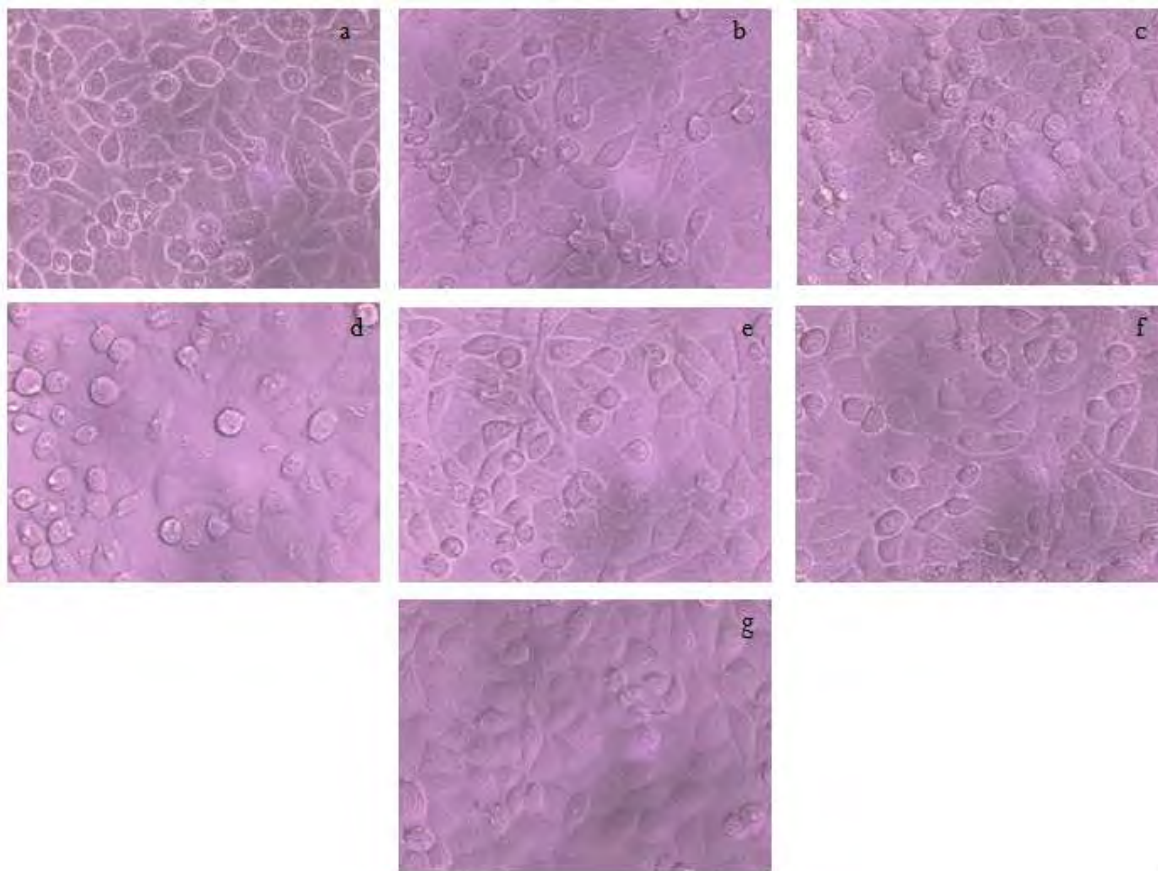


Figura 38. No se observa una diferencia apreciable en las imágenes en el microscopio óptico de las células *L929* incubadas con agua desionizada. Agua desionizada se incubó por 48 horas con células de fibroblastos normales *L929*. Las concentraciones de agua desionizada utilizadas fueron al 20, 10, 5, 2.5, 1.2 y 0.6% (fotografías a-f respectivamente). Como control se utilizaron células *L929* sin agua desionizada (fotografía g). Las imágenes fueron tomadas a 40X.

Para evaluar si las nanopartículas de plata afectan el crecimiento *in vitro* de células normales, se incubó la línea celular de fibroblastos normales de *L929* con diferentes concentraciones de nanopartículas (0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5%) durante 48 horas. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo MTT. En la figura 39 se observa que

las nanopartículas de plata inhibieron significativamente ($p \leq 0.05$) la proliferación de las células normales de una manera dependiente de la concentración. Concentraciones de nanopartículas de 0.6% y mayores inhibieron casi completamente ($>90\%$) la proliferación celular. Como se esperaba, el solvente (agua desionizada a la concentración de 5%) utilizado para suspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células normales.

Efecto de Nanopartículas de Plata sobre la línea celular *L929*.

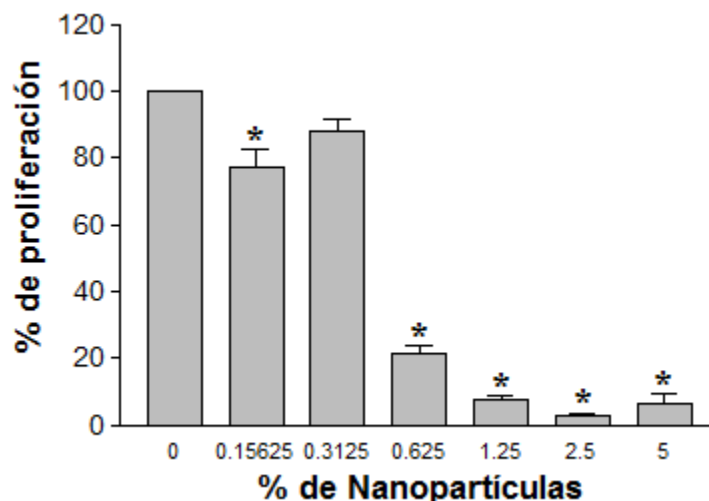


Figura 39. Nanopartículas de plata inhiben la proliferación celular de las células *L929*. Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, se incubaron por 48 horas con células de fibroblastos normales *L929*. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 0.1*, 0.3, 0.6*, 1.2*, 2.5* y 5%*. Como control se utilizó agua desionizada al 5%. El asterisco significa una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

Se tomaron fotografías de las células *L929* a 40X con nanopartículas correspondientes a los resultados presentados en la figura 39. En la figura 40 se observa que las nanopartículas de plata afectan la proliferación de las células normales. Concentraciones

de nanopartículas de 0.6% y mayores inhibieron casi completamente la proliferación celular (fotografías a-d). El solvente (agua desionizada a la concentración de 5%) utilizado para resuspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células normales (fotografía g). También se observa la aglomeración de nanopartículas de plata de manera diferente, a la aglomeración que se presenta en las células *C3F6*.

Imágenes en el microscopio óptico del efecto de las nanopartículas de plata sobre la línea celular *L929*.

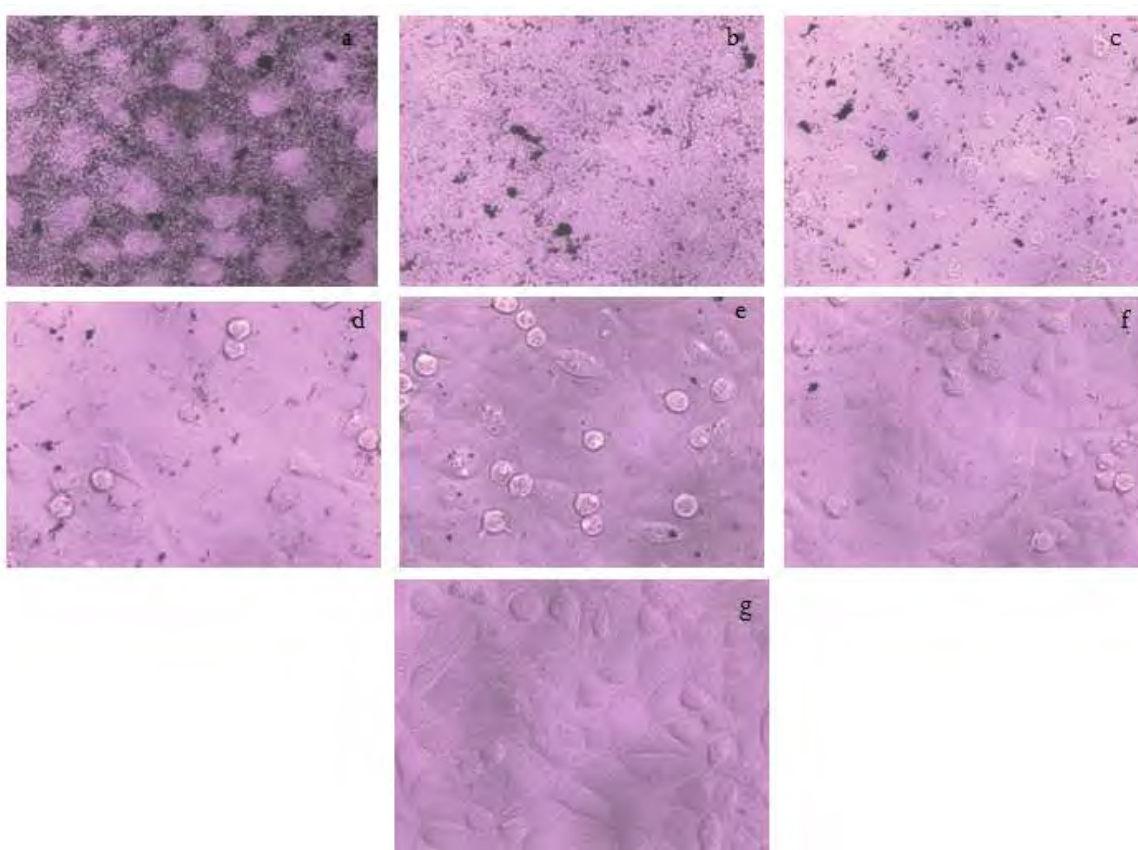


Figura 40. Nanopartículas de plata inhiben la proliferación celular de las células *L929*. Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, se incubaron por 48 horas con células de fibroblastos normales *L929*. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3 y 0.1% (fotografías a-f respectivamente). Como control se utilizó agua desionizada al 5% (fotografía g). Las imágenes fueron tomadas a 40X.

Después de 3 meses de haber sido sintetizadas, el sistema de nanopartículas presentó precipitados, por eso se sometieron a ultrasonido por segunda vez. Con el propósito de evaluar si nanopartículas de plata sometidas a ultrasonidos por segunda vez y después filtradas con una membrana de celulosa de 0.22 micras, afectan el crecimiento *in vitro* de células normales, se incubó la línea celular de fibroblastos normales *L929* con diferentes concentraciones de nanopartículas (0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5%) durante 48 horas. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo MTT. En la figura 41 se observa que las nanopartículas de plata, sometidas a ultrasonidos por segunda vez y filtradas con una membrana de 0.22 micras, si inhiben significativamente ($p \leq 0.05$) la proliferación de las células normales de una manera que depende de la concentración. Concentraciones de nanopartículas de 1.2% y mayores inhibieron más del 50% de la proliferación celular. El solvente (agua desionizada a la concentración de 5%) utilizado para resuspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células normales.

Sin embargo, ya no se puede comparar el comportamiento de las células *L929* con las células *C3F6* debido a que los experimentos no se hicieron bajo las mismas condiciones. Aparentemente las nanopartículas sufrieron cambios, o tal vez varía la cantidad de nanopartículas en el sistema. No se sabe que pudo ocurrir al someter a las nanopartículas a ultrasonido nuevamente después de tres meses, pero el resultado del efecto de partículas de plata sobre las células *L929* es importante, porque se llevaron a cabo estudios sobre la proliferación celular.

Efecto de Nanopartículas de Plata después de someterlas a ultrasonidos por segunda vez y filtrarlas sobre la línea celular *L929*.

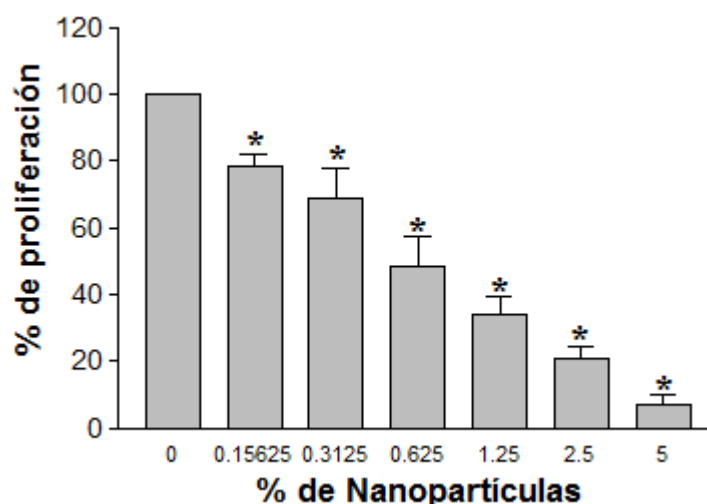


Figura 41. Nanopartículas de plata sometidas a ultrasonidos por segunda vez y filtradas inhiben la proliferación celular de las células *L929*. Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, sometidas a ultrasonidos por segunda vez y filtradas con una membrana de celulosa de 0.22 micras se incubaron por 48 horas con células de fibroblastos normales *L929*. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 0.1*, 0.3*, 0.6*, 1.2*, 2.5* y 5%*. Como control se utilizó agua desionizada al 5%. El asterisco significa una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

Se tomaron fotografías con el microscopio óptico de las células *L929* a 40X con nanopartículas sometidas a ultrasonidos por segunda vez y después filtradas en una membrana de celulosa de 0.22 micras. En la figura 42 se observa que las nanopartículas de plata si afectan la proliferación de las células normales. Concentraciones de nanopartículas de 1.25% y mayores inhibieron casi completamente la proliferación celular (fotografías a-c). El solvente (agua desionizada a la concentración de 5%) utilizado para resuspender las nanopartículas no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células cancerosas (fotografía g). En la figura 42 se observa aglomeración en las imágenes con el microscopio óptico.

Imágenes en el microscopio óptico de las nanopartículas de Plata después de someter a ultrasonidos por segunda vez y filtrarlas sobre la línea celular *L929*.

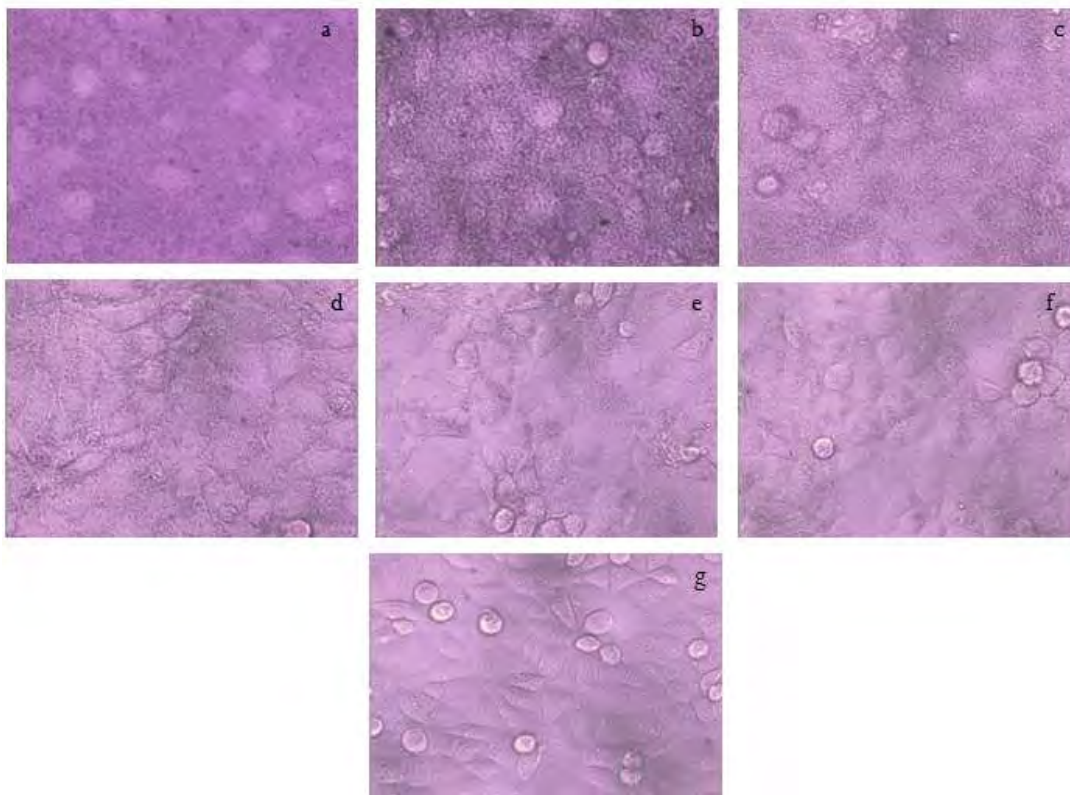


Figura 42. Nanopartículas de plata sometidas a ultrasonidos por segunda vez y filtradas en una membrana de 0.22 micras inhiben la proliferación celular de las células *L929*.

Nanopartículas de plata obtenidas a través de una síntesis verde, filtradas con una membrana de 0.22 micras se incubaron por 48 horas con células de fibroblastos normales *L929*. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3 y 0.1% (fotografías a-f respectivamente). Como control se utilizó agua desionizada al 5% (fotografía g). Las imágenes fueron tomadas a 40X.

Para entender el comportamiento de los nanomateriales es importante investigar las transformaciones físicas y químicas a las que las nanopartículas se someten cuando están en ambientes acuosos; son pocos los estudios que hablan acerca de eso. De estos estudios se sabe que, el tamaño, la carga o la agregación de las nanopartículas son características que deben ser consideradas para predecir el comportamiento de las nanopartículas en la salud humana y el medio ambiente.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron nanopartículas de plata a través de un método verde, el extracto de la planta *Rumex hymenosepalus* actuó como el agente reductor arrojando un sistema de nanopartículas viable para el uso en sistemas biológicos.

Se desarrolló una ruta de adecuación y monitoreo del sistema de nanopartículas derivado de la síntesis descrita consiguiendo un sistema viable para estudios de citotoxicidad in vitro. Durante la manipulación de las nanopartículas en este proceso se logró, de forma aledaña, una separación de las partículas del sistema hacia la obtención de una distribución de tamaños con menor polidispersidad y recuperación de la población de menor tamaño en el sistema.

En este estudio se exploró por primera vez la factibilidad de esterilizar las nanopartículas de plata obtenidas por esta síntesis verde con radiación ionizante de forma exitosa porque no provoca cambios significativos en el sistema.

Las nanopartículas cambian su estado original de aglomeración con respecto al tiempo, estudiar esas transformaciones es crítico para contribuir en su completa caracterización.

En cuanto a la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de fibroblastos normales *L929*, se observó que existe un efecto a partir de 0.6% y para valores mayores, las nanopartículas inhiben significativamente la proliferación de dichas células.

En el caso de la línea celular de linforma de ratón, *M12. I-A^K.C3F6*, las nanopartículas de plata inhibieron su proliferación a partir de 0.6 % y para valores mayores.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

En relación con el presente trabajo de tesis, las líneas de investigación de interés serían:

- Estudiar la manera en que las nanopartículas de plata se pueden cuantificar experimentalmente, especialmente cuando son sometidas a varios tratamientos en los que se pierde material del sistema y debido a que la concentración puede no ser homogénea en la suspensión. Esto con vistas a apoyar los cálculos necesarios para la medición de dosis y reporte de las mismas, tanto para uso en terapia oncológica como en las normas de seguridad de exposición a nanomateriales con potencial toxicidad.
- Estudiar el proceso de agregación y aglomeración de las nanopartículas posterior al contacto con medios de cultivo o sistemas biológicos.
- Estudiar el mecanismo en el que las nanopartículas causan la muerte celular.

REFERENCIAS

1. Hussain, S.M.; Javorina, A. K.; Schrand A. M.; Duhart H. M.; Ali S. F.; Schlager J. *J. Toxicological Sciences* **2006**, 92(2),456-463.
2. Prabhu B. M.; Ali S. F.; Murdock R. C.; Hussain S. M.; Srivatsan M. *Nanotoxicology* **2010**, 4(2), 150-160.
3. Elsey S.; Grassian V. H. *J. Nanopart. Res.* **2010**, 12, 1945-1948.
4. Jones, C.; Grainger, D. W. *Adv Drug Deliv Rev.* **2009**, 61(6), 438–456.
5. Hoet, P. H.; Bruske Hohlfeld I., Salata O. V. *J Nanobiotechnol.* **2004**, 2, 12–27.
6. Gupta I.; Duran N; Rai M. *Nano-Antimicrobials* **2012**, (18), 525-548
7. Nel A, Xia T, Maedler L, Li N *Science* **2006**, 311, 622–627.
8. Sukumaran, P.; Eldho, K. *International Nano Letters* **2012**, 2, 32-42.
9. Kalishwaralal, K.; Deepak, V.; Ramkumarpandian, S.; Nellaiah, H.; Sangiliyandi, *G. Mater. Lett.* **2008**, 62, 4411–4413.
10. Jha, A.K.; Prasad, K; Prasad, K.; Kulkarni, A.R. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, 73, 219–223.
11. Burda, X.; Chen, R.; Narayanan, M.A. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1025-1102.
12. García, Barrasa J.; López de Luzuriaga J. M.; Monge M. *Cent. Eur. J. Chem.* **2011**, 7-19.
13. Cushing, B.L.; Koleschineko, V.L.; O'Connor, C.J. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3893-3946.
14. Evanoff, D.D. Jr.; Chumanov, G. *ChemPhysChem.* **2005**, 6, 1221-1231.
15. Long C. T.; Saleh N.; Tilton R. D.; Lowry G. V.; Veronesi B. *Enviromental Science & Technology.* **2006**, 40:14, 4346-4352.
16. Oberdörster, E. *Environ. Health Perspect.* **2004**, 112, 1058-1062.

17. Colvin, V.L. *The Nat Biotechnol.* **2003**, 21(10), 1166–1170.
18. Stefanescu D. M.; Khoshnan A.; Patterson P. H.; Hering J. G. *J Nanopart.* **2009**, 11, 1957-1969.
19. Oberdorster G. *Int Arch Occup Environ Health* **2001**, 74, 1–8.
20. Kreyling W. G.; Semmler-Behnke; Moller W. *J. Nanoparticle Research* **2006**, 8, 543-562.
21. Oberdorster G.; Oberdorster E.; Oberdorster J. *Environ Health Perspect* **2005**, 113(7), 823–839.
22. Linkov I.; Satterstrom K.; Corey L. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine.* **2008**, 4, 167-171.
23. Kagan V. E.; Bayir H.; Shvedova A. A. *Nanomedicine* **2005**, 1, 313-316.
24. Moghimi S. M.; Hunter A. C.; Murray J. C. *FASEB J.* **2005**, 19, 311-30.
25. Carlson C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; Braydich Stolle, L. K.; Hess K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J. *American Chemical Society. J. Phys.* **2008**, 112, 13608–13619.
26. Brown, D. M.; Wilson, M. R.; MacNee, W.; Stone, V.; Donaldson, K. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, 175, 191–199.
27. Muller, M.; Mackeben, S.; Muller-Goymann, C. C. *Int. J. Pharm.* **2004**, 274, 139–148.
28. Foley, S.; Crowley, C.; Smaih, M.; Bonfils, C.; Erlanger, B. F.; Seta, P.; Larroque, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 294, 116-119.
29. Youn Jung, K., Ik Yang¹, S.; Jae Chun R. *Toxicol.* **2010** 6, 119-125.
30. Lubick, N. *Environ Sci Technol.* **2008** 42, 8617.
31. Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M. *Toxicol Lett.* **2008** 179, 93-100.

32. Foldbjerg, R. *Toxicol Lett.* **2009**, 190, 156-162.
33. AshaRani, P. V.; Mun, G. L. K.; Hande, M. P; Valiyaveettil, S. *ACS Nano* **2009**, 3, 279-290.
34. Alt, V.; Bechert, T.; Steinrucke, P.; Wagener, M.; Seidel, P.; Dingeldein, E.; Domann, E.; Schnettler, R. *Biomaterials* **2004**, 25, 4383–4391.
35. Lok, C. N.; Ho, C. M.; Chen, R.; He, Q. Y.; Yu, W. Y.; Sun, H.; Tam, P. K.; Chiu, J. F.; Che, C. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12, 527–534.
36. Panacek, A.; Kvitek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizurova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 16248–16253.
37. Hussain, S.; Meneghini, E.; Moosmayer, M.; Lacotte, D.; Anner, B. M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, 1190, 402– 408.
38. Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J. *Toxicol. In Vitro* **2005**, 19, 975–983.
39. Braydich-Stolle, L.; Hussain, S.; Schlager, J. J.; Hofmann, M. C. In Vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.* **2005**, 88, 412–419.
40. Asharani P. V.; Hande M. P.; Valiyaveettil S. *BMC Cell Bio* **2009**, 10, 65-79.
41. Ying, Loo Y; Woei Chieng, B.; Nishibuchi, M.; Radu S. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, 7, 4263–4267.
42. El-Shishtawy, R. M; Asiri A.M.; Al-Otaibi M.M *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, 79(5), 1505–1510.
43. Hernández Magaña, R.; Jorda Mireya, G. *Plantas Medicinales* Editorial Pax. Méx., 1981. p. 46.

44. Arrencibia Arrebola D. F.; Rosario Fernández L. A.; Curveco Sánchez D. L. *Retel* **2003** 40-52.
45. Combs, R.D. *Alternatives to Laboratory Animals* **2002**, 30, 151-165.
46. Repetto, M. *Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición; **2002**; p.303-305.
47. Fentem, J.H. *Human Experimental Toxicology* **1994**, 13 (2), 445-449.
48. Shayne, G.C. *General and applied toxicology* **1999** Grove's dictionaries Inc, USA, 1999. p.178-182.
49. Eisenbrand, G.; Pool Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B. J.; Boobis, A. *Food Chem Toxicol.* **2002**, 40(2), 193-236.
50. Jiménez N; González M.; Fernández C; López J. *Biomecánica* **2007**, 15(1), 63-71.
51. Bruggiser, R.; Jundt G.; Schaffner W.; Tullberg-Reinert H.; Von Daeniken K. *Planta Med.* **2001**, 445-448.
52. Loveland B. E.; Johns T. G.; Mackay I. R.; Vaillant F.; Wang Z. X.; Herzog P. J. *Biochemistry International.* **1992**, 27, 501-510.
53. Altman F. P. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.* **1976**, 9, 1-56.
54. Burdon R.H.; Gill V.; Rice-Evans C. *Free Radical Research Communication.* **1993**, 18, 369-380.
55. Rodríguez León E. Tesis de Doctorado, Universidad de Sonora. Junio, 2013.
56. Slistan Grijalva A.; Herrera Urbina R.; Rivas Silva J. F.; Ávalos Borja M.; Castellón Barraza F. F.; Posada Amarillas A. *Physica E* **2004**, 104-112.
57. Amin M.; Anwar F.; Ramzan Saeed Ashraf Janjua M.; Awais Iqbal M.; Rashid U. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**. 13, 9923-9941.
58. Askeland, D. *Ciencia e Ingenieria de los Materiale*; International Thomson Editores: México D.F., 1998; Capítulo 3.
59. Rodríguez León E.; Iñiguez Palomares R.; Navarro R. E.; Herrera Urbina R.; Tánori J.; Iñiguez Palomares C.; Maldonado A. *Nanoscale Research Letters.* **2013**, 8, 318-327.

60. Shang L.; Nienhaus K.; Nienhaus G. E. *Journal of Nanobiotechnology* **2014**, 12(5), 1166-1170.
61. Hussain S. M.; Hess K. L.; Gearhart J. M.; Geiss K. T.; Schlager J. J. *Toxicol. In Vitro* **2005**, 19, 975-983.
62. Zheng J.; Clogston J. D.; Patri A. K.; Dobrovolskaia M. A.; McNeil S. E. *Nanomedic Nanotechnol.* **2011**, 1-6.
63. Albanese A.; Chan W. *ACS NANO*. **2011**, 7, 5478-5489.
64. Stebounova L.; Guio E.; Grassian V. *J. Nanopar Res.* **2011**, 13, 233-244.

ANEXO 1

Reactivos utilizados en la metodología experimental.

Síntesis de NPs de plata

- Raíces de *R. hymenosepalus* de Comercial Zazueta Hermosillo, Sonora.
- Etanol (99%) de Sigma-Aldrich.
- Nitrato de Plata (99%) de Sigma-Aldrich.
- Agua Ultrapura de Milli Q System, Millipore.

Espectroscopia UV-Visible.

- Etanol Absoluto de Sigma-Aldrich.

Adecuación del sistema de partículas

- Agua Ultrapura de Milli Q System, Millipore.

Filtración de nanopartículas

- Filtro de membrana de celulosa de 0.22 μm y 47 mm de Sigma-Aldrich.
- Medio Mínimo Esencial modificado por Dubelco (DMEM) con 4500 mg/L de glucosa y L-glutamina, sin bicarbonato de sodio, para cultivo celular de Sigma-Aldrich.
- Suero fetal bovino para cultivo celular esterilizado por filtración de Sigma-Aldrich.
- Solución estabilizada con 10,000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomycin/mL BioReagent de Sigma Aldrich esterilizada por filtración para cultivo celular.
- Solución de piruvato de sodio 100 mM esterilizada por filtración BioReagent de Sigma-Aldrich, para cultivo celular.
- Solución de L-Glutamina 200 mM esterilizada por filtración BioXtra de Sigma-Aldrich, para cultivo celular.

- Monohidrocloreuro de L-Arginina BioReagent para cultivo celular de Sigma-Aldrich.
- L-Asparagina BioReagent para cultivo celular de Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de Sodio BioReagent de Sigma-Aldrich para cultivo celular.
- Agua Ultrapura de Milli Q System, Millipore.

Efecto de nanopartículas de plata sobre la proliferación de la línea celular *C3F6* y *L929*.

- Filtro de membrana de celulosa de 0.22 μm y 47 mm de Sigma-Aldrich.
- Medio Mínimo Esencial modificado por Dubelco (DMEM) con 4500 mg/L de glucosa y L-glutamina, sin bicarbonato de sodio, para cultivo celular de Sigma-Aldrich.
- Suero fetal bovino para cultivo celular esterilizado por filtración de Sigma-Aldrich.
- Solución estabilizada con 10,000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL BioReagent de Sigma Aldrich esterilizada por filtración para cultivo celular.
- Solución de piruvato de sodio 100 mM esterilizada por filtración BioReagent de Sigma-Aldrich, para cultivo celular.
- Solución de L-Glutamina 200 mM esterilizada por filtración BioXtra de Sigma-Aldrich, para cultivo celular.
- Monohidrocloreuro de L-Arginina BioReagent para cultivo celular de Sigma-Aldrich.
- L-Asparagina BioReagent para cultivo celular de Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de Sodio BioReagent de Sigma-Aldrich para cultivo celular.

- Solución de Tripsina-EDTA al 0.25% con rojo de fenol BioReagent esterilizada por filtración de Sigma-Aldrich.
- Azul de tripano BioReagent de Sigma-Aldrich para cultivo celular.
- MTT (98%) de Sigma-Aldrich.
- Fosfato de Sodio Monobásico NaH_2PO_4 (99%) de Sigma-Aldrich.
- Fosfato de Sodio dibásico anhidro Na_2HPO_4 (99%) de Sigma-Aldrich.
- Cloruro de Sodio (99%) de Sigma-Aldrich.
- Agua Ultrapura de Milli Q System, Millipore.

ANEXO 2

Síntesis de NPs de Plata usando el extracto de la planta *R. hymenosepalus* como agente reductor.

Para la preparación del extracto, se compraron raíces cortadas secas de la planta *R. hymenosepalus* en una tienda local (Comercial Zazueta, Hermosillo, Son.), con 15 gramos de *R. hymenosepalus* en un frasco, se agregaron 100 mL de una solución de etanol/agua 70:30 en volumen. El frasco se almacenó a la temperatura del laboratorio (25°C) por varios días para que se llevara a cabo el proceso de extracción, cambiando el color de un rojo ligero a un café más oscuro. Después de 15 días ya no hubo cambio de coloración, y la extracción se consideró como completa. La muestra después fue filtrada y se utilizó como agente reductor^{55,59}.

Para la síntesis de nanopartículas de plata se preparó una solución de AgNO₃ 0.1 M en agua desionizada, diferentes volúmenes de esta solución fueron mezclados con 200 µL de extracto de *R. hymenosepalus*. Después, el volumen total de cada muestra fue ajustado a 4 mL agregando la cantidad necesaria de agua desionizada para obtener muestras con diferente concentración de AgNO₃: 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 mM. El proceso de reducción se llevó a cabo por 96 horas^{55,59}.

Las nanopartículas utilizadas para evaluar el efecto sobre la proliferación celular de las células *C3F6* y *L929*, fueron las que se sintetizaron con una concentración de AgNO₃ de 10 mM.

ANEXO 3

Preparación de Medio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM)

Los medios de cultivo están constituidos por un medio nutriente mínimo tamponado e isotónico que contiene sales inorgánicas, una fuente de energía y aminoácidos, además de varios suplementos.

El medio basal de Eagle (BME) es uno de los medios definidos como originales. Se utiliza normalmente para células adherentes. Posteriormente se han desarrollado otros medios a partir del BME, como el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el que consiste en medio BME con una mayor cantidad de vitaminas y aminoácidos y se emplea para una amplia gama de líneas celulares de mamífero.

Para preparar un litro de medio de cultivo DMEM se pesaron los reactivos que se muestran en la tabla 1, se afora a 1 L con agua destilada y se ajusta el pH de 7.2 a 7.4. Después el medio se filtra usando una membrana de 0.22 μm , y se deja una prueba de esterilidad por 3 días*. Si a los 3 días no se observa formación de microorganismos se puede entonces utilizar el medio.

Tabla 1. Componentes para preparar 1 L de DMEM complementado al 5% de suero fetal bovino.

Reactivo	Cantidad
DMEM	13.37 g
L-arginina	0.116 g
L-asparagina	0.036 g
NaHCO ₃	2 g
Piruvato de Sodio	10 mL
Glutamina	7.5 mL
Penicilina	10 mL
Suero	Al 5%

*La prueba de esterilidad del medio de cultivo consiste en tomar en un tubo estéril 3 mL aproximadamente de medio de cultivo preparado e incubar a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de O₂ por 3 días; si a los 3 días no se observan microorganismos en el microscopio óptico se puede utilizar el medio de cultivo preparado.

ANEXO 4

Descongelación de la línea celular

Para descongelar las líneas celulares que se utilizaron para realizar los experimentos, se descongelan los criotubos a temperatura ambiente, para después transferir el contenido celular a un tubo de centrifuga, al cual se le agrega una cierta cantidad de DMEM, y se centrifuga de 1700 rpm por 7 minutos. Luego de la centrifugación se decanta el sobrenadante del tubo, y el botón celular se resuspende en 8 o 10 mL de DMEM complementado, se transfiere el contenido a una botella de cultivo lista para incubar a 37 °C.

ANEXO 5

Propagación de las líneas celulares

El objetivo de los cambios de medio es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y de células muertas. En los cultivos adherentes, el medio puede eliminarse directamente mediante aspiración y reemplazarse por el fresco.

Para cambiarles el medio de cultivo a las botellas, es necesario primero observarlas al microscopio, para después decantar el medio por el lado contrario a la monocapa, colocar el volumen determinado de medio fresco, igualmente por el lado contrario, e incubar el cultivo a 37 °C.

ANEXO 6

Tripsinización

Las líneas celulares que crecen adheridas a un substrato, se pueden despegar de éste en forma de suspensión celular mediante el uso de tripsina (proteasa), que digiere proteínas celulares implicadas en la adhesión celular al soporte.

Para llevar a cabo la tripsinización, una vez decantado el medio de cultivo de la botella, se agregan 7 mL de Tripsina-EDTA, y se observa al microscopio hasta que las células cambien su morfología normal a redondas; se le dan unos ligeros golpecillos a la botella para terminar de despegar las células, se agrega medio de cultivo DMEM complementado con suero fetal bovino, se homogeniza y se transfiere a un tubo de centrifuga, que se centrifuga a 1700 rpm por 7 minutos; el sobrenadante se decanta, para agregar nuevamente DMEM complementado, y esa cantidad distribuirla en 2 o 3 botellas más grandes de cultivo. A esas botellas se les agrega DMEM complementado y se incuban a 37 °C.

ANEXO 7

Siembra celular

El azul de tripano es un colorante que se utiliza para ensayos de viabilidad; permite reconocer células vivas de células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no pueden colorearse debido a que las células no dejan pasar a través de la membrana al colorante, por lo tanto el azul de tripano no se absorbe; pero si atraviesa la membrana de las células muertas. Debido a eso, las células muertas se observan de un color azul en el microscopio; como las células vivas son excluidas de la tinción, este método también es llamado método de tinción por exclusión.

La Cámara de Neubauer es un instrumento utilizado para contar las células en un medio líquido, que puede ser un cultivo celular por ejemplo.

Para contar las células, se tomaron dos alícuotas (una para cada lado de la cámara) de 500 μL de la suspensión celular, y se hizo una dilución de 15 μL de azul de tripano y 15 μL de la suspensión celular; se homogenizó la mezcla y se tomo un volumen que cubriera la cuadrícula de la cámara; después de 3 minutos, aproximadamente, se realiza el conteo. En el microscopio vertical se cuentan el número de células presentes en los cuadrantes de las esquinas y se calcula un promedio. Este promedio se multiplica por el factor de la cámara y por el factor de dilución (en este caso 2), tal como lo muestra la ecuación 1.

$$\# \frac{cel}{mL} = \frac{n}{v} = (n)(10^4)(FD) \quad (1)$$

Donde:

C = concentración de células por mL

n = promedio de las células contadas en los 4 cuadrantes de las esquinas.

v = volumen ocupado por la suspensión celular en un solo cuadro de la cuadrícula, así el volumen es $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3$ o 10^{-4} mL

F.D. = factor de dilución

Contadas las células, se toman el volumen necesario de la suspensión celular y se disuelve en una cantidad de DMEM con el fin de tener una concentración de 200,000 células por mL, que corresponde a las 10,000 células por pozo.

ANEXO 8

Preparación de reactivo MTT

El reactivo MTT se usa a una concentración de 5mg/mL. Para preparar 20 mL de reactivo, se pesan 100 mg de las sales de tetrazolio, y se afora a 20 mL con una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS).

PBS (1X)

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) es una solución amortiguadora de pH utilizada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos.

Para la solución reguladora de fosfatos PBS se pesan 0.19 g de NaH_2PO_4 , 1.2 g de Na_2HPO_4 y 8.5 g de NaCl , después se disuelven en agua desionizada y se afora a 1000 mL.

ANEXO 9

Participación en eventos académicos con investigación desarrollada durante la formación de maestría

- X Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales, Hermosillo Sonora México, del 5/Marzo/2013 a 8/Marzo/2013. “Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de nanopartículas de plata en las líneas celulares *HepG2* de hepatocarcinoma y células *HaCaT* de queratinocitos humanos como control”.

- XVIII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales, Hermosillo Sonora México, del 20/Noviembre/2013 a 22/Noviembre/2013. “Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de plata en las líneas celulares de linfoma de ratón *C3F6*”.

Estancias de Investigación.

- Estancia de investigación en el Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México Distrito Federal, del 6/Agosto/2012 a 19/Diciembre/2012; trabajando en el proyecto “Evaluación de la Citotoxicidad de nanopartículas de plata en líneas celulares de Hepatocarcinoma *HepG2* y de queratinocitos humanos como control”.