



**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISION DE INGENIERIA**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA**

**BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR  
CÉLULAS EPITELIALES HUMANAS.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA.**

**PRESENTA:**

**VIRIDIANA MARICELA FLORES MURRIETA.**

**HERMOSILLO, SONORA.**

**AGOSTO DEL 2015.**

# 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

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## APROBACION DEL JURADO

De la tesis presentada por:

**VIRIDIANA MARICELA FLORES MURRIETA**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
(Nombre del sinodal)

Presidente

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
(Nombre del sinodal)

Secretario

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
(Nombre del sinodal)

Vocal

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
(Nombre del sinodal)

Sinodal Externo

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

## **AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO**

Agosto de 2015.

Por la presente se hace constar que la estudiante VIRIDIANA MARICELA FLORES MURRIETA ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

**Dr. Jesùs Fernando Hinojosa**

**COORDINADOR**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA**

## RESUMEN

En esta tesis, se reportan los resultados de la biosíntesis de nanopartículas de plata, por células epiteliales humanas, *in vivo*, y por fibroblastos obtenidos de piel humana NF3 *in vitro*, después de tratarlas con una solución acuosa de nitrato de plata.

El primer indicio de la biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas, *in vivo*, es el cambio de color del tejido de piel usado, el cuál adquiere un color café oscuro después del tratamiento con la solución acuosa de nitrato de plata. En el caso de la biosíntesis de nanopartículas de plata por fibroblastos, las suspensiones acuosas e incoloras de estas células también adquieren un color característico después de añadirles la solución de nitrato de plata.

El tejido y las células epiteliales, antes y después de ser tratadas con la solución de nitrato de plata, *in vivo*, se observaron a través de un microscopio óptico. Las células epiteliales también se caracterizaron con espectrofotometría UV- visible, microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). El espectro UV-Vis de la suspensión de células de la piel tratadas con una solución acuosa 1 M de nitrato de plata, *in vivo*, muestra una banda de absorción centrada a 450 nm. La banda de absorción del espectro UV- Vis de la suspensión de fibroblastos tratados con una solución acuosa de 1 mM de nitrato de plata es más intensa, mejor definida y se encuentra centrada a 460 nm. En ambos casos, esta banda de absorción está asociada con la presencia de nanopartículas de plata y se debe al plasmón de resonancia de superficie de este metal.

En el estudio se utilizaron diferentes concentraciones de nitrato de plata, para ver cuál es la mínima concentración que las células pueden sintetizar de nitrato de plata sin que este resulte tóxico para las células.

Entre otros resultados también pudimos observar en el experimento *in vitro* la viabilidad de las células, o a que concentraciones de nitrato de plata estas seguían vivas.

## ABSTRACT

In this thesis we report the result of the silver nanoparticles biosynthesis, by epithelial human cells, *in vivo*, and by fibroblasts NF3 from human skin, *in vitro*, this after treat them with a silver nitrate acuous solution.

The first indicator of the biosynthesis of silver nanoparticles by epithelial human cells, *in vivo*, was the change of color in the used skin tissue, which gets a dark brown coloration after the acuouse solution of silver nitrate. Talking about the biosynthesis of silver nanoparticles by fibroblasts, the acuouse and clear suspentions of these cells also change their color after treat them with a silver nitrate solution.

The tissue and the epithelial cells, before and after treated with the silver nitrate solution, *in vivo*, where watched through an optical microscope. These epithelial cells were also characterized by UV- visible spectrophotometry, scanned electronic microscopy (SEM) and transmtion electronic microscopy (TEM). The UV-Vis spectrum of the epithelial cells trated with an acuous solution of 1M silver nitrate, *in vivo*, shows an absoption band centered at 450 nm. The absorption band of the UV-Vis spectrum of the treated fibroblasts with a 1 mM acuouos solution of silver nitrate suspention has more intensity, better definition and is centered at 460 nm. In both cases this absorption band is associated with the presence of silver nanoparticles and is because of the resonance plasmon of this metal surface.

During this investigation we used different concentrations of silver nitrate; to know which is the maximum concentration these cells can sintesize of silver nitrate without being toxic for the cells.

Among others results we could also watch in the *in vitro* experiment the viability of the cells, or in which silver concentrations of silver nitrate the cells continued alive.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo General.....	4
1.2.2 Objetivos Específicos.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata.....	5
2.2 Toxicidad de nanopartículas de plata en células.....	8
2.3 Aplicaciones de las nanopartículas de plata.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Materiales.....	15
3.2 Métodos.....	15
3.2.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas <i>in vivo</i> .....	15
3.2.2. Biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas <i>in vitro</i> .....	18
3.3 Técnicas de Caracterización.....	22
3.3.1 Espectrofotometría UV-Visible.....	22
3.3.2 Microscopía óptica.....	22
3.3.3 Microscopía electrónica de barrido.....	23
3.3.4 Microscopía electrónica de transmisión.....	24
3.3.5 Determinación de viabilidad celular.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> .....	26
4.2 Biosíntesis de nanopartículas de plata por fibroblastos humanos NF3, <i>in vitro</i> .....	49
4.3 Viabilidad de fibroblastos humanos NF3.....	56
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
5.1 Conclusiones.....	58
5.2 Recomendaciones.....	60
6. BIBLIOGRAFIA.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática del procedimiento para la biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas, <i>in vivo</i> , y la recuperación posterior del tejido de la piel tratado con la solución acuosa de nitrato de plata .....	17
2	Representación esquemática del procedimiento para cultivar las células de fibroblastos humanos NF3, <i>in vitro</i> .....	21
3	Micrografías ópticas estereoscópicas con magnificación 4X, tomadas con luz reflejada, de tejido epitelial cortado de la parte superior de un dedo índice humano y posteriormente inmerso en solución salina: a) sin tratamiento, y b) después de ser tratado durante 4 h, <i>in vivo</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata .....	27
4	Micrografías ópticas tomadas con luz reflejada (400 X) de células desprendidas de tejido epitelial humano e inmersas en una solución salina: a) sin tratamiento, y b) después de ser tratado durante 4 h, <i>in vivo</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata .....	29
5	Micrografías ópticas tomadas con luz reflejada (360 X) de células desprendidas de tejido de piel humana y adheridas a un portaobjetos de vidrio después de evaporar la solución salina: a) sin tratamiento y b) después de ser tratado durante 4 h, <i>in vivo</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata .....	31
6	Espectros UV-visible de: a) solución acuosa salina (0.9% NaCl), b) solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, c) células epiteliales humanas sin tratamiento con nitrato de plata, y d) células epiteliales humanas después de 4 h de tratamiento, <i>in vivo</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata .....	33
7	Micrografías electrónicas de transmisión de diferentes secciones de células epiteliales humanas tratadas durante 4 h, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, las cuáles muestran claramente la presencia de nanopartículas .....	35

8	Micrografías electrónicas de transmisión y barrido (STEM) de una sección de célula epitelial tratada durante 4h, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata: a) campo claro b) campo oscuro .....	37
9	Micrografía electrónica de transmisión y barrido (STEM), campo oscuro, de una sección de célula epitelial tratadas durante 4 h, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata. La distancia de la nanopartícula brillante en el centro de la imagen (señalada con la flecha) se analizó por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) .....	39
10	Espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS) del análisis elemental lineal de una de las nanopartículas más brillantes (indicada con la flecha) del centro de la micrografía STEM, campo oscuro, presentada en la Figura 9 .....	40
11	Micrografía electrónica de transmisión y barrido (STEM), campo oscuro, de una sección de célula epitelial tratada durante 4 h, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata. A la nanopartícula menos brillante en el centro de la imagen (índicada con la flecha) se le hizo un análisis lineal por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) .....	42
12	Espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS) del análisis lineal de una de las nanopartículas más grandes y menos brillantes (índicada con la flecha) en el centro de la micrografía STEM, campo oscuro, de una sección de célula de piel humana, tratada durante 4 h, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, presentada en la Figura 11 .....	43
13	a) Micrografía electrónica de transmisión y barrido de alta resolución (HRSTEM) de una nanopartícula de plata biosintetizada por células de piel humana después de reaccionar, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, b) patrón de difracción de esta nanopartícula obtenido mediante análisis de la micrografía HRSTEM por transformada de Fourier, c) imagen reconstruida de la micrografía HRSTEM mediante transformada de Fourier inversa de todos los puntos del patrón de difracción, d) imagen reconstruida de la micrografía HRSTEM mediante transformada de Fourier inversa de los dos puntos del patrón de difracción encerrados con un círculo, y e) perfil de los planos atómicos de la Figura 13d, dónde se indica la distancia interplanar de 2.36 Å .....	45

14a y b	Micrografías electrónicas de transmisión y barrido (STEM), campo oscuro, de nanopartículas de plata biosintetizadas por células de piel humana después de 4 h en contacto, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata .....	47
14c	Histograma correspondiente a la distribución de tamaños de las nanopartículas de plata, biosintetizadas por células de piel humana, <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> , después de 4 h en contacto con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata .....	48
15	Fotografía del medio de cultivo con fibroblastos humanos NF3 (células epiteliales). De izquierda a derecha: sin nitrato de plata, con 0.1 mM inicial de nitrato de plata y con 1 mM inicial de nitrato de plata .....	50
16	Espectros UV-visible de a) solución acuosa 1.0 mM de nitrato de plata, b) medio de cultivo sin fibroblastos con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata, c) medio de cultivo con fibroblastos después de ser incubados durante 36 h con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata .....	52
17	Micrografía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas biosintetizadas por fibroblastos humanos NF3, <i>in vitro</i> , con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata .....	54
18	a) Espectro de energía de dispersión de rayos X EDS de las nanopartículas biosintetizadas por fibroblastos humanos NF3 a partir de una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata que se muestran en la micrografía de la Figura 17, y b) resultado del análisis cuantitativo (% en masa) que se obtiene del espectro EDS de la micrografía que se presenta en la Figura 17 .....	55
19	Viabilidad de fibroblastos humanos NF3 en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones iniciales de nitrato de plata después de 24 h .....	57

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1 Introducción

La plata es de gran interés y ha sido investigada principalmente por sus propiedades antibacteriales, debido a esto muchos compuestos de plata han sido puestos a prueba, y en los últimos años con el auge de la nanotecnología se ha encontrado que al combinarse las propiedades de la plata con la nanotecnología, la plata que antes se utilizaba solamente como iones o sal, al hacerla nanopartículas se pudo demostrar que estas eran igualmente buenas o mejores en sus propiedades y además menos tóxicas. (1)

Debido a lo anterior es que se han descubierto muchas técnicas para la síntesis de nanopartículas de plata, entre ellas, por medios químicos, físicos, pero más importante biológicos, que además de ser más amigables con el medio ambiente también son más baratos y han demostrado que las nanopartículas resultantes son estables y de buen tamaño y dispersidad en la mayoría de los casos. (1)

Además usando técnicas biológicas para la síntesis de nanopartículas, podemos observar que estas técnicas son menos invasoras y tóxicas, lo cual es excelente si serán utilizadas en el área de la medicina, que es la principal aplicación de estas nanopartículas de plata. (1)

La integración de la nanotecnología con la biología y la medicina ha sido reconocida por ser una de las más grandes prioridades de ambas comunidades, la biomédica y la nanotecnológica, porque se ha encontrado que los nanomateriales sintetizados por el hombre tienen muchas aplicaciones potenciales en campos biomédicos, ya que en el caso de las nanopartículas, su tamaño es comparable al de las moléculas, y por lo tanto pueden penetrar la membrana de una célula biológica. En la integración de la

nanotecnología con la biología, un área de gran interés es la biosíntesis de nanopartículas metálicas. (1)

Entre otros inconvenientes de la síntesis de nanopartículas usando métodos químicos y físicos destacan que requiere altas presiones, energía y temperaturas, además de químicos tóxicos (2), que no son amigables con el medio ambiente, ni con el organismo (3). Por consecuencia los investigadores han usado síntesis biológicas, que proveen nanopartículas con buen control sobre la distribución de tamaño (4). Comparados con los métodos convencionales los métodos de bio-reducción han demostrado en años recientes ser costosamente efectivos y benignos para el medio ambiente además de altos productores de nanopartículas estables. Llevados por el creciente ímpetu de la química verde, esfuerzos considerables han sido dirigidos hacia la biosíntesis de nanopartículas inorgánicas como la plata (Ag). (3)

Aunque las técnicas físicas y químicas pueden producir grandes cantidades de nanopartículas con un tamaño y forma definidos en un corto periodo de tiempo, estas técnicas son complicadas, costosas, ineficientes y producen residuos tóxicos dañinos. Por consecuencia los investigadores han usado síntesis biológicas las cuales proveen de partículas con un buen control sobre el tamaño y distribución, en el rango de 30 a 50 nm. (4)

Actualmente se ha encontrado en la bibliografía mucha información sobre biosíntesis de nanopartículas, en este caso de Ag, por medios “verdes” ya sea por plantas, hongos y bacterias, pero ninguno por medio de células humanas, sólo información acerca de la toxicidad de las nanopartículas de plata en la células ya sea epiteliales o en algunos otros órganos del cuerpo humano. (1)

La biosíntesis de nanopartículas metálicas por las mismas células puede reducir muchos efectos secundarios, como citotoxicidad, y permitirá la preparación de estos materiales intracelular y extracelularmente. Por ejemplo, el uso de nanopartículas magnéticas en el campo biomédico es bien conocido y de gran interés. (1)

En medicina las nanopartículas de plata tienen una amplia aplicación, incluyendo ungüentos para la piel, y cremas conteniendo Ag para prevenir infecciones en quemaduras y heridas abiertas. (5)

En base a lo comentado anteriormente, en este trabajo se investigó la posibilidad de la biosíntesis de nanopartículas de plata por medio de células de la piel, más bien como una investigación básica, ya que se ha demostrado que células de seres vivos como plantas, bacterias, hongos, entre otros, sintetizan nanopartículas de plata, sin embargo, en nuestra búsqueda bibliográfica no encontramos estudios sobre células, ya con esto afirmativo, mas estudios pueden llevarse a cabo al respecto y proponer también sus aplicaciones.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo General

Investigar la biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas *in vivo* e *in vitro* en ausencia de agentes reductores y estabilizantes adicionales, y su caracterización.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas (*in vivo* e *in vitro*) a distintas concentraciones iniciales de nitrato de plata.
- Cultivo *in vitro* de células epiteliales humanas (fibroblastos).
- Caracterización del tejido y de las células epiteliales humanas usadas para la biosíntesis *in vivo* e *in vitro* de nanopartículas de plata, mediante microscopía óptica.
- Caracterización de las células epiteliales humanas/ nanopartículas de plata sintetizadas *in vivo* e *in vitro*, mediante espectroscopía UV-Vis.
- Caracterización de las células epiteliales humanas/ nanopartículas de plata sintetizadas *in vivo* e *in vitro*, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con células epiteliales humanas *in vivo* mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Investigar la viabilidad de las células *in vitro* en presencia de diferentes concentraciones de nitrato de plata.

## CAPÍTULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las nanopartículas reciben roles importantes en muchos aspectos como la entrega de medicamentos, diagnósticos, actividad antimicrobial y asuntos ingenieriles (2). Los métodos físicos y químicos convencionales, no son amigables con el medio ambiente debido al uso de solventes tóxico y aditivo, menos aún si las nanopartículas serán utilizadas con fines médicos. Comparado con los métodos convencionales los métodos de bioreducción han demostrado en años recientes ser efectivos en el costo y benignos para el medio ambiente además de altamente productores de nanopartículas estables. Llevados por el creciente ímpetu de la química verde se han dirigido esfuerzos considerables hacia la biosíntesis de nanopartículas inorgánicas como Ag. El procesamiento de nanopartículas por biosíntesis intracelular es generalmente fácil. (3)

#### **2.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata**

Las nanopartículas de plata pueden ser sintetizadas por varios medios, en la actualidad una forma sencilla y no costosa de sintetizar nanopartículas de plata es mediante los extractos de plantas, ya que debido a su gran cantidad de polifenoles, que son antioxidantes contenidos en las plantas, han probado ser una buena opción para la biosíntesis de nanopartículas de plata en una forma controlada de acuerdo a su tamaño, forma y sensibilidad. Muchas especies de plantas han sido utilizadas para la síntesis de las nanopartículas de plata entre ellas se encuentran, la biosíntesis de nanopartículas usando extracto de planta magrovia, que está probado tener actividad antibacterial, antiplasmodial y antiviral. Se observaron nanopartículas de plata en un espectro de alrededor de 400 nm de longitud de onda. (2)

Otra planta utilizada en la biosíntesis de nanopartículas de plata es el extracto de *Cacumen platyclady*. Los resultados indicaron que incrementar la concentración inicial

de  $\text{AgNO}_3$  y aumentar su temperatura a 30 o 60 °C incrementa el tamaño y la distribución de las nanopartículas de Ag (3). Otras especies de plantas han sido utilizados para sintetizar nanopartículas de plata que incluyen: alfalfa, hojas de aloe vera, café, té, *Carmelia sinensis*, hojas de *Cinnamomum camphora*, etc. la mayoría de las síntesis se dan a temperatura ambiente, resultando en bajos rangos de reacción y conversión de iones de plata a nanopartículas (3). Entre otros se reporta la biosíntesis de nanopartículas de plata usando extracto de hoja de Tulsi (*Ocimum sanctum*). Se probó su actividad antimicrobiana. Se observó que el extracto de hoja de Tulsi puede reducir iones de plata en nanopartículas de plata en 8 minutos de tiempo de reacción. Por lo tanto este método puede ser usado para biosíntesis rápida y amigable con el ambiente de nanopartículas de plata estables en el rango de tamaño de 4-30 nm y con actividad antimicrobial lo cual sugiere su posible aplicación en la industria médica. (5)

En otros experimentos se encontró la síntesis verde de nanopartículas de plata usando *Rosa damascena* un extracto de flor como reductor y agente estabilizante, este método es simple, barato y estable por largo tiempo, se puede hacer a temperatura ambiente y es amigable con la naturaleza (6). La síntesis de nanopartículas de plata altamente dispersas usando el extracto de la corteza de tallo de *Boswellia ovalifoliolata* como agente reductor. Después de la exposición de los iones de plata al extracto de la corteza, se observó una rápida reducción de los iones de plata para la formación de las nanopartículas de plata en la solución (7). Las hojas de te negro sirven en la síntesis de nanopartículas de plata dando diferentes formas como esferas, trapezoides, prismas y tubos, notando que los polifenoles son los causantes de la reducción de las nanopartículas, además estas nanopartículas fueron estables. (8)

Los extractos etanólicos de algunas plantas medicinales tales como *Phytolacca decandra*, *Gelsemium sempervirens*, *Hydrastis canadensis* y *Thuja occidentals* han probado ser buenos para sintetizar nanopartículas de plata provenientes de nitrato de plata, la actividad biológica y antibacterial de estas nanopartículas fueron probadas en células de melanoma de piel A375 y en *Escherichia coli* respectivamente. Estas plantas con sus propiedades medicinales al reducir las nanopartículas podrían ayudar en el

manejo de algunas enfermedades incluyendo el cáncer. Las nanopartículas mostraron diferentes niveles de potencia en su nivel anticancerígeno y antibacterial. (9)

El alga *Chlamydomonas reinhardtii* fue utilizado para la biosíntesis de nanopartículas de plata debido a sus proteínas óxido-reductoras. Las nanopartículas tuvieron forma redonda o rectangular, con diferentes tamaños. La mayoría de los organismos eucarióticos han sido reportados como probables para sintetizar nanopartículas, debido a sus proteínas. (10)

Entre otros medios biológicos de reducción de nanopartículas de plata se tiene que las nanopartículas de plata orgánicamente modificadas fueron preparadas por la ruta biosintética inducida por el látex principal compuesto de una planta medicinalmente importante, *Euphorbia nivulia*, la reducción y estabilización asistida por ciertos péptidos y terpenoides presentes dentro del látex. La formulación acuosa de látex formando nanopartículas de plata al ser completamente libre de químicos puede ser directamente usado para la administración de nanopartículas de plata en medicamentos (11). El látex de la planta *Euphorbia nivulia* es usado para la síntesis de nanopartículas de plata, la reducción y estabilización se da mediante los péptidos y terpenoides en el látex. La toxicidad de estas nanopartículas fue probada en células de pulmón humanas, que fueron tóxicas dependientes de la dosis, pero el látex solubiliza las nanopartículas en el agua lo cual ayuda en el transporte de las nanopartículas de plata a hacia tumores o células cancerígenas. (12)

Además de plantas la síntesis de nanopartículas también se puede realizar con otros seres vivos incluyendo Hongos. Se realizó la síntesis de nanopartículas de Plata con la utilización de estos, las nanopartículas fueron formadas al contacto con células de *penicillium* (13). También se sintetizaron nanopartículas de plata mediante el hongo *Fusarium oxysporum*, con lo cual se obtuvieron nanopartículas de plata de 20 -50 nm de diámetro. (14)

Pero no solo se ha encontrado que diferentes tipos de plantas u hongos son capaces de reducir la plata a nanopartículas, si no que las investigaciones han ido mas allá

encontrando que un cultivo libre de células supernatantes de cinco bacterias psicrófilas, *Pseudomona antártica*, *Pseudomona Proteolytica*, *Pseudomona meridiana*, *Arthrobacter kerguelensis* y *Arthrobacter gangotriensis* y dos bacterias mesófilas *Bacillus indicus* y *Bacillus cecembensis* han sido utilizadas para sintetizar nanopartículas de plata (15). El intervalo de tamaños de las nanopartículas de plata sintetizadas fue de 6 a 13 nm de diámetro y fueron estables por ocho meses en la oscuridad. La síntesis y estabilidad de las nanopartículas parece depender de la temperatura, pH o de las especies de bacterias. Esta investigación también demostró que las nanopartículas de plata tienen propiedades antibactericidas (15). Se demostró que la bacteria *Pseudomona stutzeri* AG259, aislada de una mina de plata es capaz de reducir iones plata a nanopartículas metálicas. (16)

En el laboratorio otras formas de reducción biológica han dado lugar a experimentos como este donde se sintetizaron nanopartículas con un diámetro en el intervalo de 10 -25 nm usando un método simple en el cual se agregó una solución de  $\text{AgNO}_3$  a una solución de micelas de ésteres de sacarosa conteniendo hidróxido de sodio a condiciones atmosféricas. Después de 24 horas se redujeron los iones de plata a nanopartículas, la solución de éster de sacarosa sirvió como agente reductor y el hidróxido de sodio como catalizador, las nanopartículas producidas fueron altamente estables. (17)

Con excepción del artículo publicado en 2011 por Larios-Rodríguez y col. (1), quienes reportaron la biosíntesis de nanopartículas de oro *in vivo* e *in situ* en la literatura no se encontró ningún otro reporte de biosíntesis de nanopartículas metálicas por este tipo de células humanas en estas condiciones.

## **2.2 Toxicidad de nanopartículas de plata en células**

Las nanopartículas de plata que son sintetizadas por medios biológicos han demostrado ser menos tóxicas para las células que las sintetizadas por medios químicos, además las células humanas son más resistentes a los efectos tóxicos de estas nanopartículas de plata que otras células de animales o plantas. (18)

Aunque las nanopartículas de plata son muy utilizadas en una gran variedad de ramas, poco es conocido sobre como afecta a las células humanas, el estudio demostró que las nanopartículas eran tóxicas dependiendo de su concentración y hubo citotoxicidad en las células madres mesenquimal humanas, pero también induce la activación de las células a concentraciones altas y no tóxicas. (19)

Hay varios experimentos con nanopartículas de plata, pero lo importante ahora es el efecto tóxico que tienen en el ambiente y en los seres vivos, por esto también los experimentos deben tener en cuenta esto, cuál será la repercusión de las nanopartículas de plata en los seres vivos, y si el daño es más que el beneficio. (20)

Se investigaron los efectos de las nanopartículas de plata en la piel usando la línea de células keratinocito HaCaT derivado de células humanas. Las nanopartículas de plata causaron una concentración y un decrecimiento dependiente del tiempo de viabilidad de las células. En este estudio no se encontraron evidencias de inducción de eventos necróticos. Se mostró que un tiempo relativamente corto de contacto de las nanopartículas de plata en células de la piel causa una larga duración en la inhibición del crecimiento de la célula, no asociado con la consistente internalización de nanopartículas de plata. (21)

También se han investigado las citotoxicidades de las nanopartículas de plata en las células humanas como en este trabajo donde se estudiaron tres nanopartículas de plata, SNP-5, SNP-20, SNP-50, de tres diferentes tamaños (5nm, 20nm y 50nm). Usando cuatro modelos de células humanas (AS49, SGC7901, HepG2 y MCF-7). Se analizó la morfología celular, la viabilidad celular, integridad de la membrana celular, estrés oxidativo y progresión de ciclo celular (14). En los experimentos normalmente se encontró que ocurría apoptosis para el 4-9% de las células expuestas (22). Apoptosis es un proceso celular altamente controlado que juega un papel muy importante en la regulación del tejido homeostático y controla el crecimiento fisiológico (23). Estas respuestas celulares fueron encontradas ser tamaño-dependientes. Los análisis mostraron que las nanopartículas más pequeñas lograban entrar a las células más fácilmente que las

más grandes, lo cuál puede ser causa de mayores efectos tóxicos. Estos descubrimientos pueden ayudar en el diseño de nanopartículas de plata para su aplicación. (22)

Ademas principalmente se investigó la eficacia clínica potencial de nanopartículas de plata por sus efectos antiinflamatorios. En la inflamación de las células epiteliales primarias nasales polyp fueron expuestas a *Alternaria alternata*, Der P1 y enterotoxina B staphylococal por 48 horas sin o con varias concentraciones de nanopartículas de plata. Se midieron las citotoxicidades y los efectos inflamatorios de las células epiteliales. Se encontró que la sobrevivencia de las células decreció significativamente a concentraciones de nanopartículas de plata que excedían las 10 ppm. Aunque las nanopartículas de plata son citotóxicas a altas concentraciones, a concentraciones seguras puede inhibir la inflamación de la célula. (24)

Se evaluó la toxicidad in vitro de nanopartículas de plata a dosis no citotóxicas en la línea de células de hepatoma humano, Hep62, basadas en el ensayo de viabilidad en células, examen micronuclear y análisis de ADN. Y se encontró que sólo se exhibe citotoxicidad a dosis más altas de 1.0 mg/l (25). En los estudios se demostró que las nanopartículas de plata fueron altamente citotóxicas para las células. Pero los efectos biológicos a dosis no citotóxicas de nanopartículas de plata como la carcinogénesis son aún desconocidos (25, 26). Fibroblastos de pulmon y células de glioblastoma humano han sido estudiadas a manera de su exposición a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, demostrando la entrada de estas por medio de endocitosis, las nanopartículas se encontraban principalmente en el citoplasma y núcleo de las células, exhibiendo inestabilidad cromosómica, las células normales se recuperaban, mientras que las células con cáncer paraban de reproducirse sin recuperarse. (27)

También en un estudio in vitro utilizando células HT-1080 and A431 realizado con la finalidad de obtener un antimicrobial en el tratamiento de infecciones en heridas, utilizando nanopartículas de plata esféricas, cuando las células fueron expuestas a las nanopartículas de plata estas no alteraron su morfología, pero a concentraciones mas altas de nanopartículas si se alteraba la forma de las células, lo cuál puede ser utilizado

en las concentraciones seguras del uso de nanopartículas de plata para fines médicos. Ya que hay concentraciones suficientemente altas para actuar como antimicrobial y aun así no afectar las células. (28)

Cuándo las nanopartículas de plata fueron sintetizadas por medio de un híbrido de nitrato de plata y sílica, éstas presentaron una gran capacidad antibacterial utilizando *S. aureus* y *Streptococcus pyrogens*, estos nanohíbridos se adherieron a cada bacteria sin entrar a la membrana celular y exámenes sobre la citotoxicidad demostraron que el contacto con los híbridos de nanopartículas de plata provocaba muerte celular de las bacterias por la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS). Lo cuál demuestra que estas nanopartículas son viables para la eliminación de bacterias resistentes a los medicamentos comerciales. (29)

Una matriz de nanofibra tratada con Polivinil Acohol (PVA) conteniendo nanopartículas de plata, su citotoxicidad fue estudiada con células humanas epiteliales normales keratina (NHEK) y fibroblastos (NHEF), en este experimento se observó que ambos el nitrato de plata y las nanopartículas de plata son citotóxicas para las células tratadas, sin diferencias significativas en el índice de toxicidad, pero las células NHEF fueron más sensibles hacia ambos iones y nanopartículas, que en el caso de las células NHEK. Además los iones de nitrato sobrantes tuvieron un efecto adverso en ambas líneas celulares. (30)

La plata ha sido reconocida por su utilización en la medicina, esta ha sido bien utilizada como tratamiento en la infección de úlceras, heridas abiertas y quemaduras, pero algunos estudios han revelado que debido a su citotoxicidad la plata retrasa el proceso de sanación de las heridas. (31)

Células de hepatoma humana fueron utilizadas para estudiar la citotoxicidad de nanopartículas de plata, demostrando también el rol del estrés oxidativo, al mismo tiempo se estudió la toxicidad de los iones de plata. Las nanopartículas de plata contenían una considerable cantidad de iones de plata. Las nanopartículas de plata se aglomeraban en el citoplasma y el núcleo de las células induciendo estrés oxidativo

intracelular. Las nanopartículas de plata también provocaban daño al ADN, pero la citotoxicidad de éstas así como el daño al ADN se pudieron prevenir con el uso del antioxidante *N*-acetylcysteine. Éste trabajo infiere que la citotoxicidad de las nanopartículas de plata es debido al estrés oxidativo y depende de los iones de plata. Se conoce poco del impacto de las nanopartículas en el ambiente y la salud humana. (32)

Las nanopartículas de plata pueden entrar al organismo por medio del sistema respiratorio, nanopartículas cubiertas con PVP e iones de plata fueron investigados en la línea celular alveolar A549. La toxicidad fue dependiente de la dosis en ambos casos, la citotoxicidad en ambos fue aminorada por el pretratamiento de las células con el antioxidante *N*-acetyl-cysteine. Las nanopartículas de plata pueden llevar a genotoxicidad inducida por ROS. (33)

Ciertas concentraciones de nitrato de plata tienen efectos citotóxicos en fibroblastos y en células endoteliales, lo cual hace lento el proceso de curación de heridas. En este estudio los fibroblastos dermales fueron expuestos a nitrato de plata, este inhibió la proliferación de las células y a una exposición prolongada de nitrato de plata hubo muerte de las células (34). Además el nitrato de plata también fue usado en el intestino de conejos para su experimentación (35). El efecto del cloruro de plata y iones de plata han sido estudiados en células mamarias, células de sangre y células madre mesenquimal (hMSCs). Resultando que el cloruro de plata es el menos citotóxico entre todas las formas de plata, pero también es dependiente de la concentración, y resultó que la reducción en la citotoxicidad es debida a los agregados de cloruro de plata que limitaba la biodisponibilidad de iones de plata. (36)

Las nanopartículas de plata tienen grandes propiedades, pero también tienen efectos secundarios como puede ser el daño a la salud y al medio ambiente, los posibles mecanismos de las nanopartículas de plata que llevan a su toxicidad son el estrés oxidativo, genotoxicidad y apoptosis. (37)

En un estudio se compararon nanopartículas de plata y iones de plata, con células madres mesenquimal humanas y células de la sangre y bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, demostrando que los efectos tóxicos fueron los mismos en ambos con diferentes concentraciones de iones de plata y nanopartículas de plata. con 0.5 – 5 ppm de iones de plata y 12.5-50 ppm de nanopartículas de plata. (38)

La genotoxicidad así como la mutagenicidad y cancerogenicidad de las nanopartículas de plata sigue siendo desconocida. (25, 39)

### **2.3 Aplicaciones de las nanopartículas de plata**

Desde tiempos remotos la plata ha demostrado ser un muy buen antibacterial, pero en sus presentaciones de metal, sales, y sulfatos normalmente afectan mas a las células, por esto las nanopartículas de plata han ganado más interés y esto es debido a que algunas bacterias han generado resistencia a los antibióticos, por lo tanto las nanopartículas de plata han emergido por su aplicación en la medicina, sirviendo como cubiertas en aparatos de medicina, nanogeles, nanoluciones, entre otros. El mecanismo de acción es aún desconocido. Entre sus aplicaciones se encuentran la preservación de los alimentos y el tratamiento del agua. (40)

En años recientes la plata es el nano- compuesto más utilizado comercialmente (33). Las nanopartículas de plata son usadas por sus propiedades antibacteriales, antivirales y antifungica (24). En medicina las nanopartículas de plata tienen una amplia aplicación, incluyendo ungüentos para la piel, y cremas conteniendo Ag coloidal para prevenir infecciones en quemaduras, heridas abiertas, agentes terapéuticos (5) y aparatos medicos recubiertos con plata que son generalmente introducidos en la sangre. (27, 36)

También son utilizadas para cosméticos (25, 27), artículos del hogar (27) y productos de cuidado para la salud para explotar su fuerte actividad antimicrobial (25). Por lo mismo hay preocupación debido a si es seguro usarlos, pero hasta el momento no hay regulaciones sobre esto y la toxicidad exacta de las nanopartículas de plata en células humanas animales o en el ambiente es aún desconocida. (27)

Otras aplicaciones de las nanopartículas de plata son por ejemplo, su uso en talcos desodorantes, cateters, cemento para los huesos, entre otras aplicaciones, las células epiteliales bronquiales humanas son utilizadas para investigar la distribución intracelular de plata, cambios en las especies de oxígeno reactivo (ROS) y los cambios en la respiración mitocondrial. Se encontró en un experimento por separado que  $H_2O_2$  remueve la plata de la metalotioneina que genera el ROS, lo cual genera daño en la célula. (41)

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

En este trabajo de investigación se utilizó Nitrato de Ag grado reactivo (marca Fermont), agua destilada.

La solución salina CS (Cloruro de Sodio) utilizada para conservar el tejido y las células epiteliales humanas utilizadas para la biosíntesis, *in vivo*, de nanopartículas de plata se adquirió de los laboratorios PISA y contiene 0.9% NaCl.

Las células epiteliales humanas que se usaron para la biosíntesis de nanopartículas de plata fueron fibroblastos humanos NF3 (Línea celular no transformada de fibroblastos humanos, Coriell Cell Repositories, USA). Estas células se mantuvieron en un refrigerador biológico a -80 °C.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas *in vivo*

La biosíntesis *in vivo*, de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas se llevó a cabo depositando sobre la piel de un dedo de la mano una gota de una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata. Se dejó reaccionar el nitrato de plata acuoso con la piel durante 4 horas en ausencia de la luz a temperatura ambiente (25°C). Al término de las 4 horas, éste tejido de la piel (epidermis) del dedo, el cuál adquirió un color café oscuro, es desprendido con mucho cuidado del dedo con un escalpelo, e introducido inmediatamente en una solución salina 0.9% NaCl. Después de 48 horas de que el tejido epitelial estuvo inmerso en la solución salina, la epidermis café oscuro fue separada de la dermis y depositada sobre un portaobjetos de vidrio. La secuencia de esta biosíntesis y la

recuperación del tejido epitelial después de ser tratado con la solución acuosa de nitrato de plata, se muestra esquemáticamente en la Figura 1.

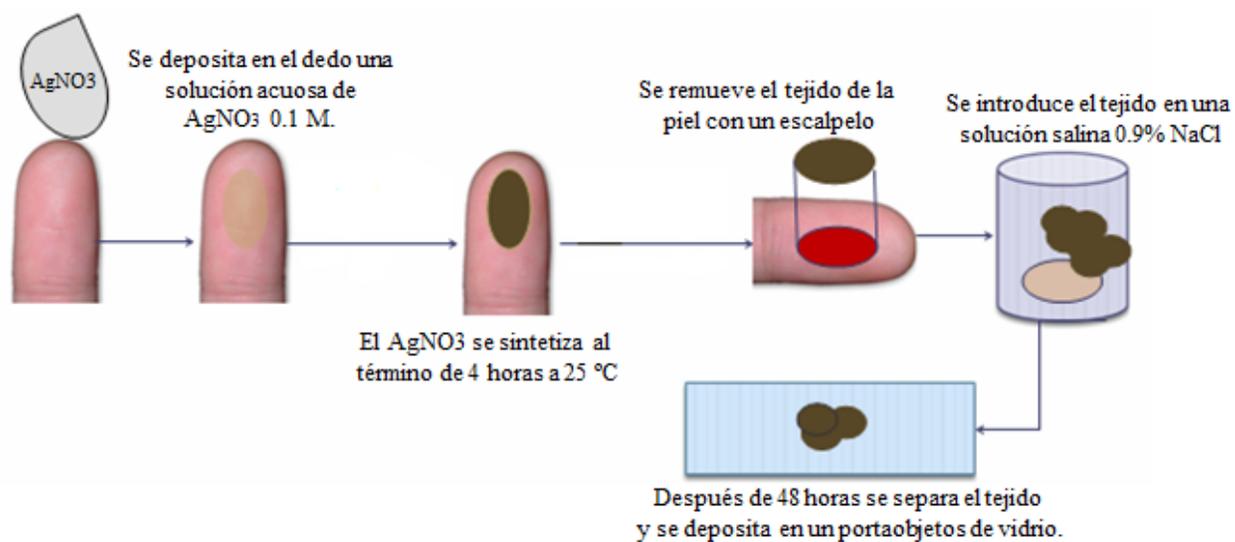


Figura 1. Representación esquemática del procedimiento para la biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas, *in vivo*, y la recuperación posterior del tejido de la piel tratado con la solución acuosa de nitrato de plata.

### **3.2.2 Biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas *in vitro***

La biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas, *in vitro*, la caracterización de los resultados de esta biosíntesis, así como la viabilidad de estas células tratadas con soluciones acuosas de nitrato de plata, se efectuaron en la Universidad Nacional de Singapur.

La preparación del medio de cultivo de fibroblastos humanos NF3 que se usaron para la síntesis de nanopartículas de plata, *in vitro*, así como su cultivo se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (ESCO). Estas campanas utilizan un flujo de aire limpio para evitar que los cultivos se contaminen con bacterias, especialmente del medio ambiente. Antes de utilizar la campana, se enciende la luz ultravioleta durante 3 min, para eliminar cualquier fuente de contaminación que pueda contener, e igualmente al finalizar de utilizar la campana se vuelve a encender la luz ultravioleta durante otros 20 minutos. Además, todo lo que se introduce dentro de la campana debe ser rociado con una solución acuosa de etanol 75% en volúmen, y se deben usar guantes de latex o de nitrilo.

El medio de cultivo de fibroblastos humanos se prepara de la siguiente manera: primero se toman 500 mL de medio modificado “Dulbecco’s eagles”, (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y a continuación se agregan 88 mL de suero fetal bovino (FBS, GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY), 6 mL de penicilina-estreptomina (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY), 6 mL de vitaminas (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY), y 6 mL de aminoácidos no esenciales (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY).

Primeramente se subcultivan las células en el medio preparado siguiendo el siguiente protocolo: 10 mL de medio de cultivo se agregan a un tubo falcon y enseguida se agregan los fibroblastos humanos NF3, los cuáles se mantuvieron en un tubo eppendorf en el congelador a -20 °C que teníamos en un tubo eppendorf en el congelador, con una pipeta, estas se dejan por un día en la incubadora (NUAIRE, DH, Auto flujo, Incubadora con chaqueta de aire y CO<sub>2</sub>), la cual esta a 37 °C y con 5% de CO<sub>2</sub> simulando la temperatura y condiciones del cuerpo humano.

Después de 24 horas de incubación de los fibroblastos humanos, éstos se observan a través de un microscopio óptico, para verificar que las células hayan crecido lo

suficiente para poder ser cultivadas. Cuando el frasco T (que se utiliza para el cultivo celular) contiene mas de 90% de células, se procede a cultivarlas. Se rocía el frasco T con alcohol 75%, para meterlo en la campana de flujo laminar y así evitar contaminación por bacterias, a continuación se retira el medio viejo del frasco T con una pipeta de 10 mL, luego se le agregan 5 mL de PBS (Phosphate buffered saline, GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY) al frasco T para limpiarlo de las células muertas o medio que quede en la superficie, se remueve el PBS y después se le agrega la Tripsina (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY), la cual remueve las células del fondo del frasco T, despegandolas para poder recolectarlas, son de 2 a 2.5 mL de Tripsina, se introducen a la incubadora en donde se quedan de 3 a 4 minutos, no mas porque la tripsina puede destruir las células. Al sacarla de la incubadora, se golpea gentilmente el tubo para despegar las células del fondo y se observa en el microscopio que las células se encuentren flotando, al llevar el frasco T de nuevo a la campana de flujo laminar se debe de rociar con etanol 75%, se agregan 5 mL del medio, para neutralizar la tripsina y se mezcla algunas veces para recolectar las células, a continuación se transfiere a un tubo falcon de 15 mL, para ponerlo en la centrifuga (Eppendorf, 5810) para separar las células del medio y la tripsina que contiene el frasco, la centrífuga se pone a trabajar a 21 °C, 1100 rpm por 3 min. De igual manera que antes cuando llevamos el tubo falcon a la campana de flujo laminar lo rociamos con etanol 75%, se remueve el medio del tubo falcon con una pipeta, teniendo cuidado de no eliminar el precipitado que queda de las células en el fondo, se golpea suavemente el fondo para despegar las células y se le agrega 5 mL del medio al tubo falcon y se mezclan las células. De la mezcla anterior se transfieren 2 mL a una caja Petri con 10 mL más de medio nuevo. En este caso utilizamos placas de seis, para el experimento, por lo tanto se distribuyen 2 mL del medio con células de la caja Petri en cada una de las placas, y se le agregan aparte 2 mL más del medio para completar los 4 en cada plaquita de la placa de 6. Se dejan incubar los fibroblastos humanos NF3 de 2 a 3 días hasta que las células en la placa tengan alrededor del 90 – 100% de confluencia, la cuál se evalúa observando en el microscopio óptico.

Después de 2 días ya que las células llenen el 90% de las placas se le agregan las diferentes concentraciones de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , Aldrich). Se tomó una placa como control, y se le agregaron concentraciones de 1 mM, 0.1 mM y 0.01 mM de nitrato de plata, repitiéndose las concentraciones 0.1 mM y el 0.01 mM como se muestra en la Figura. 2

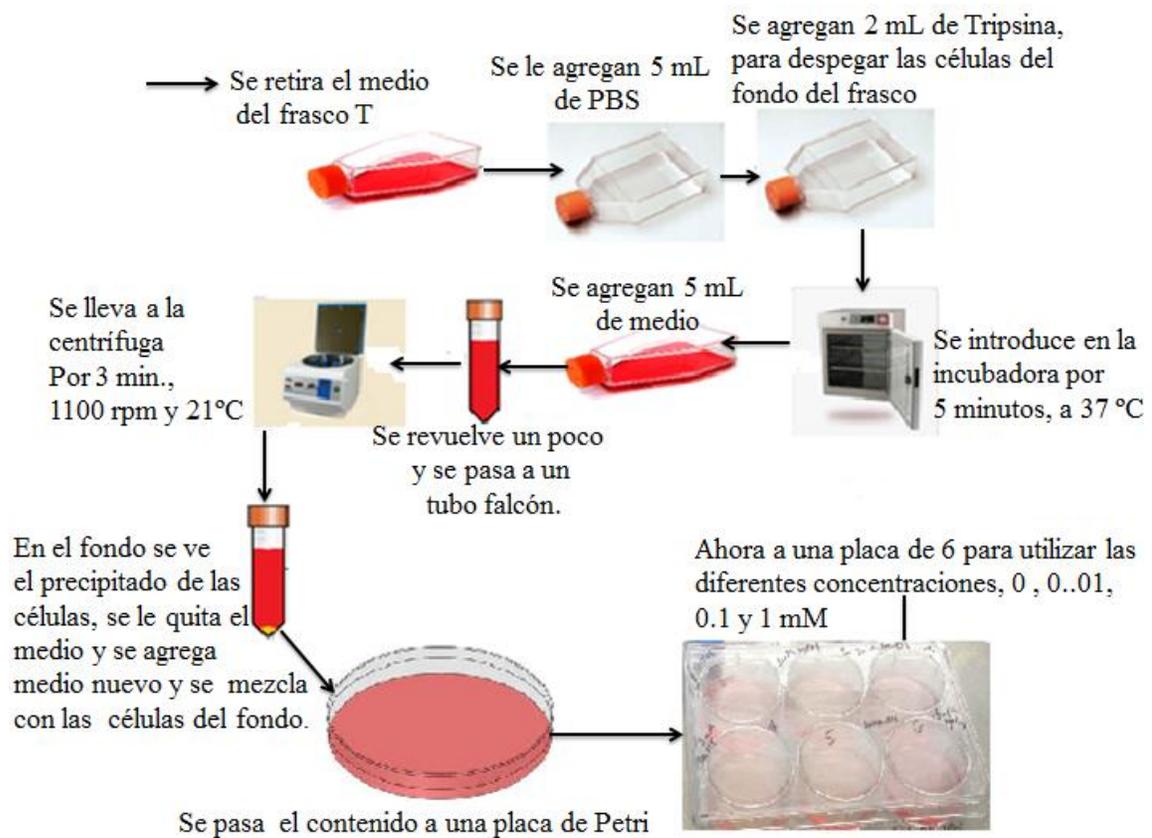


Figura 2. Representación esquemática del procedimiento para cultivar las células de fibroblastos humanos NF3, in vitro.

### **3.3 Técnicas de Caracterización**

#### **3.3.1 Espectrofotometría UV-Vis**

El espectro de absorción de las células epiteliales humanas sin tratamiento y tratadas con la solución acuosa de nitrato de plata se obtuvo con un espectrofotómetro UV-vis, marca Shimadzu. La muestra de células epiteliales/nanopartículas de plata de la experimentación *in vivo*, se obtuvo del tejido de piel de dedo humano mediante una técnica de desprendimiento de las células. Esta técnica consiste en depositar una pequeña muestra de tejido epitelial sobre un portaobjetos de vidrio y después cubrirla con otro portaobjetos de vidrio para luego presionarla y deslizar el portaobjetos hasta lograr el desprendimiento de las células epiteliales del tejido de piel. El portaobjetos con las células epiteliales adheridas se colocó en uno de los compartimientos del espectrofotómetro para obtener su espectro. El blanco en este caso fue la solución salina. El espectro de las células de fibroblastos humanos/nanopartículas de plata de los experimentos *in vitro* se obtuvo con muestras de células dispersas en el medio de cultivo. La celda utilizada para obtener estos espectros fue de cuarzo de 1 cm x 1 cm de base y 5 cm de altura, y se usó agua destilada como blanco.

#### **3.3.2 Microscopía Óptica**

El tejido de la piel de dedo humano sin tratamiento y después de ser tratado, *in vivo* e *in situ*, durante 4 h con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, cortado de la piel, se observó a través de un microscopio óptico estereoscópico marca Olympus, modelo SZ5, y se obtuvieron las imágenes de este material biológico inmerso en una solución salina, a una amplificación de 4X mediante luz reflejada. Las células desprendidas del tejido epitelial, sin tratamiento, y después de ser tratado con solución acuosa de nitrato de plata, se observaron a través de un microscopio óptico marca Olympus, modelo CX31, y las imágenes de estas células inmersas en la solución salina se tomaron a una amplificación 400X con una cámara fotográfica marca Infinity 1, acoplada a este microscopio óptico.

Las células epiteliales desprendidas del tejido de la piel de dedo humano sin tratamiento y después de 4 h de ser tratado *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, adheridas a un portaobjetos de vidrio y secas, también se observaron a través de un microscopio óptico invertido marca Olympus, modelo IX71, a magnificaciones de 320X y 640X. Las micrografías obtenidas con los microscopios ópticos se tomaron con la finalidad de documentar las imágenes del material biológico usado en esta investigación para la biosíntesis de nanopartículas de plata, y los cambios que se presentan en el tejido y células epiteliales después de ser tratados con nitrato de plata acuoso.

### **3.3.3 Microscopía electrónica de barrido**

Esta técnica se utilizó para determinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas por las células de fibroblastos humanos, *in vitro*, así como su composición química mediante espectroscopía EDS. Se usó un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL, modelo 540, operado a un voltaje de aceleración de 25 kV. La muestra se tuvo que preparar explotando las células para poder liberar las nanopartículas ya que éstas no se podían observar si se encontraban dentro de la célula, debido a que solo se puede ver la superficie de la muestra, así que primeramente se procede a destruir las células agregando 5 gotas de cloro acuoso, y después se sometió la muestra a un proceso de sonicación en un ultrasonicador digital marca VWR International, por 30 minutos para hacer lisis en las células. A continuación se introduce la muestra en una centrífuga marca eppendorf modelo 5810R (Universidad Nacional de Singapur) y se centrifuga a 50 000 rpm, 10 °C y durante 1 hora. Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y se dispersó el precipitado en 1 mL de agua destilada. Se tomó una gota de esta suspensión y se depositó sobre un portaobjetos de vidrio. Una vez que la muestra se secó, ésta se depositó sobre el portamuestras del SEM y se sujetó con cinta de grafito con pegamento por ambas caras. Finalmente, esta muestra se cubre con una película de platino, para evitar interferencias del material (nanopartículas de plata) en el equipo. La composición química de esta muestra se obtuvo utilizando el aditamento EDS del microscopio electrónico de barrido, el cuál

permite también obtener el espectro EDS de la imagen que vemos en la pantalla del microscopio.

### **3.3.4 Microscopía electrónica de transmisión**

Las células epiteliales de dedo humano tratadas *in vivo* durante 4h con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata también se observaron a través de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) marca JEOL, modelo JEM-2010F operado a 200 kV, y de un microscopio electrónico de transmisión y barrido (STEM) marca JEOL, modelo JEM-ARM200F operado a 80 kV, los cuáles forman parte de la infraestructura del Laboratorio “Kleberg Advanced Microscopy Center” del Departamento de Física y Astronomía de la Universidad de Texas en San Antonio. La preparación de la muestra de células epiteliales/nanopartículas de plata se llevó a cabo depositando una gota de la solución salina conteniendo estas células/nanopartículas de plata sobre una rejilla de cobre cubierta con carbón Formvar. Las células epiteliales fueron posteriormente deshidratadas con etanol, repitiendo este procedimiento tres veces. El tamaño promedio de las nanopartículas de plata y la desviación estándar de la distribución de tamaños de estas nanopartículas se calculó mediante el análisis de sus imágenes obtenidas con el microscopio de transmisión. Con el análisis de estas imágenes también se construyó el histograma de la población de nanopartículas de plata. Cabe mencionar que este microscopio electrónico de transmisión cuenta con un detector para espectroscopía de energía de dispersión (EDS). El espectro EDS de las nanopartículas permite identificar los elementos químicos contenidos en la muestra. La caracterización cristalográfica de las nanopartículas de plata se hizo mediante el análisis de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.

### **3.3.5 Determinación de viabilidad celular**

Esta técnica se realizó solamente en el experimento *in vitro*, la cuál mide la viabilidad de las células tratadas con el nitrato de plata, es decir que porcentaje de éstas vive al ser expuesta a diferentes concentraciones de nitrato de plata, en el experimento *in vitro* las concentraciones utilizadas fueron 1 mM, 0.1 mM y 0.01 mM. Este ensayo es basado en

la cuantificación de la concentración de ATP (Trifosfato de adenosina, por sus siglas en inglés Adenosine triphosphate, usado como unidad para la transferencia de energía molecular). El procedimiento incluye agregar en una caja petri de 48 placas, las células de igual forma como se hizo en el cultivo celular, después agregar las distintas concentraciones que se quieren utilizar de nitrato de plata, y el control (sin nitrato de plata), para saber cual es la viabilidad de las células bajo estas condiciones. Después se agregan 100  $\mu$ L del reactivo “Cell-titer glow”, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en cada placa. Esta caja se introduce en el equipo, Biotek Synergy, Microplate reader (Universidad Nacional de Singapur), el cual mediante el software hace su trabajo, dando los resultados en la computadora sobre la viabilidad de las células en presencia de nitrato de plata.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1 Biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas *in vivo* e *in situ***

Cuando la piel de dedo humano se pone en contacto, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, ésta adquiere un color amarillo claro, el cuál se transforma en café oscuro después de 4 h. Estos cambios en el color de la piel humana se observan a simple vista. En la Figura 3 se presentan las micrografías ópticas estereoscópicas (tomadas con luz reflejada) del tejido epitelial cortado de la piel humana, sin tratamiento y después de ser tratado con 0.1 M de nitrato de plata acuoso e inmerso en una solución salina. Como se observa claramente en esta figura, el tejido epitelial original es de color blanco, mientras que el tejido epitelial tratado con la solución 0.1 M de nitrato de plata presenta un color café oscuro, el cuál es típico de algunas dispersiones acuosas de plata coloidal (42, 43). Este cambio en el color del tejido epitelial después de ser tratado con nitrato de plata acuoso indica, indirectamente, la formación de nanopartículas de plata, lo cuál a su vez sugiere que las células epiteliales son capaces de biosintetizar nanopartículas de plata sin necesidad de agregar un agente reductor adicional para los iones de plata. Estos resultados de biosíntesis de nanopartículas de plata, *in vivo* e *in situ*, por el tejido epitelial sugieren que este material biológico posee la habilidad de sintetizar nanopartículas de plata cuando se pone en contacto con una solución acuosa de nitrato de plata, ya que el color típico de suspensiones acuosas que contienen nanopartículas de plata va desde amarillo claro hasta una coloración café oscuro dependiendo de la concentración de nitrato de plata utilizado, del método de sintetización y de las sustancias utilizadas. (43)

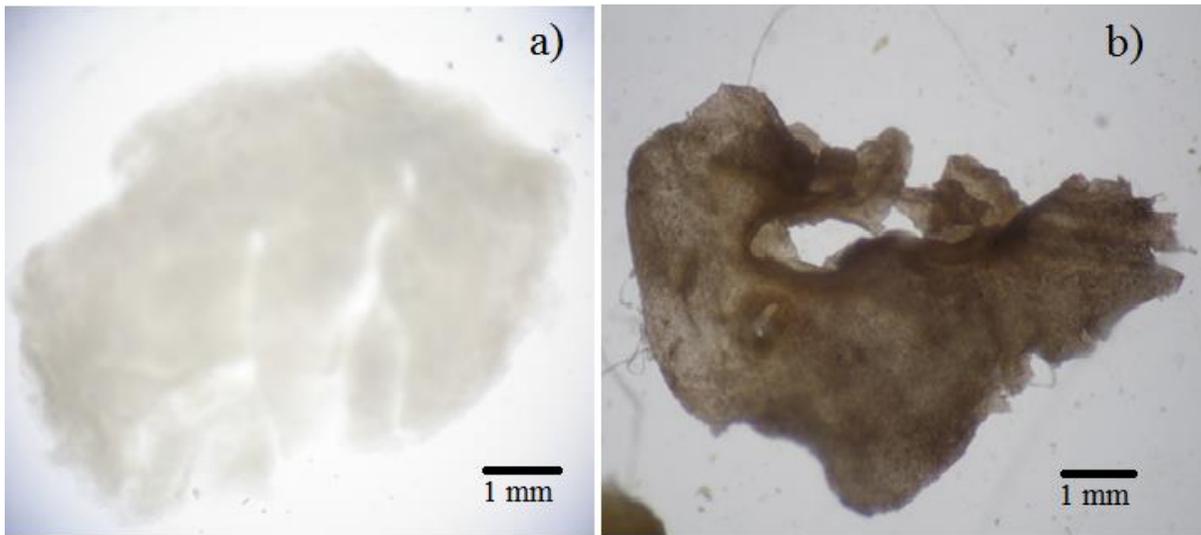


Figura. 1. Micrografías ópticas estereoscópicas con magnificación 4X, tomadas con luz reflejada, de tejido epitelial cortado de la parte superior de un dedo índice humano y posteriormente inmerso en solución salina: a) sin tratamiento, y b) después de ser tratado durante 4 h, *in vivo*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

Para observar las células de piel humana mediante microscopía óptica, el tejido epitelial cortado de la piel humana se sometió a un proceso de desprendimiento celular y las células desprendidas se dispersaron en una solución salina. La Figura 4 muestra las micrografías ópticas de las células desprendidas del tejido epitelial humano sin tratamiento (a) y después de ser tratado con 0.1 M de nitrato de plata acuoso (b) e inmersas en una solución salina. Estas imágenes, tomadas con una cámara adaptada a un microscopio óptico invertido usando luz reflejada, muestran la morfología de las células. En la Figura 4b, se observa que algunas secciones de las células tratadas con 0.1 M de nitrato de plata son de color café (marcadas con las flechas), lo cuál, de nuevo, indica indirectamente la presencia de nanopartículas de plata. Este color en algunas zonas de las células epiteliales tratadas con nitrato de plata acuosa es otro indicio de la biosíntesis de nanopartículas de plata por estas células.

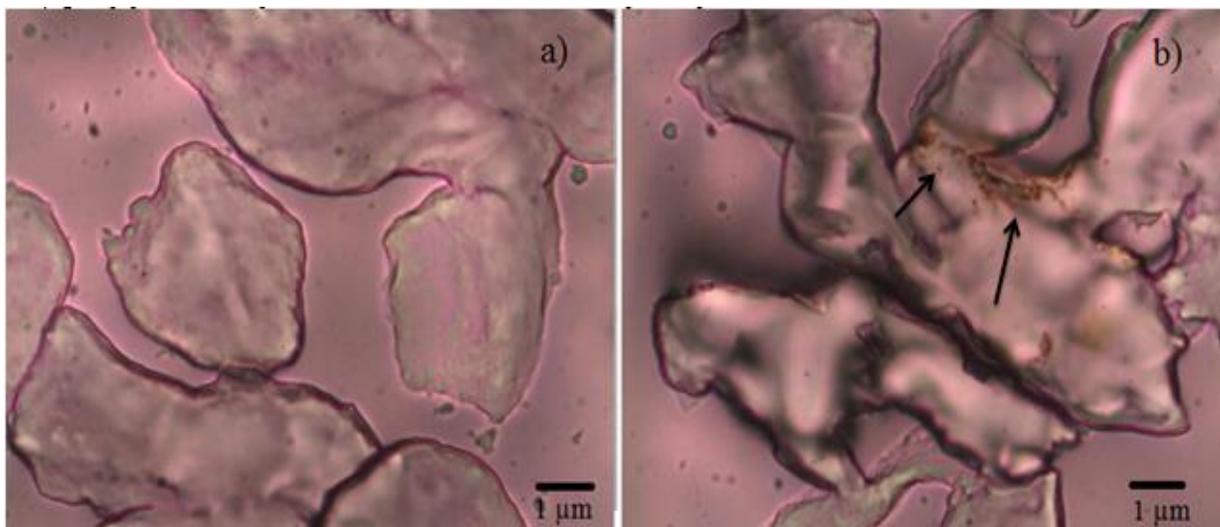


Figura 4. Micrografías ópticas tomadas con luz reflejada (400 X) de células desprendidas de tejido epitelial humano e inmersas en una solución salina: a) sin tratamiento, y b) después de ser tratado durante 4 h, *in vivo*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

La Figura 5 muestra las micrográficas ópticas de las células desprendidas del tejido epitelial humano sin tratamiento (a) y después de ser tratado *in vivo*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata (b), adheridas a un portaobjetos de vidrio después de que la solución salina donde se encontraban dispersas se evaporó. Como puede observarse en estas imágenes, la morfología de las células en seco es diferente a la que presentan cuando se encuentran dispersas en la solución salina (véase la Fig. 4). Además, en la parte inferior izquierda de la Fig. 5 b se pueden ver claramente dos células individuales, mientras que en la parte central se observa lo que pudiera ser un conjunto de células. En ambos casos, las células del tejido epitelial tratado con la solución de nitrato de plata presentan un color café, cuya tonalidad es mucho más intensa en el conjunto de células del centro de la micrografía. De nuevo, el color café de las células indica, indirectamente, la presencia de nanopartículas de plata, las cuáles son biosintetizadas por las células a partir de la solución acuosa de nitrato de plata. La intensidad del color café de las células no es la misma en todas las células, y esto puede estar relacionado con la población y el tamaño de las nanopartículas en cada célula. Como las células de la superficie de la piel son las que primero reaccionan con la solución acuosa de nitrato de plata, estas células tal vez contengan una concentración de nanopartículas y tamaños diferentes a las de las células internas de la piel (epidermis y dermis, respectivamente).

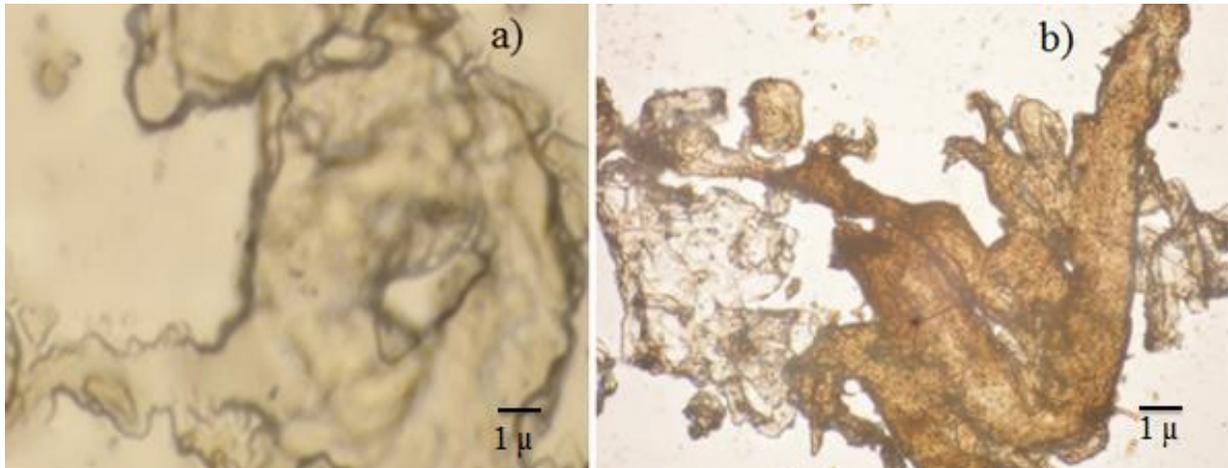


Figura 5. Micrografías ópticas tomadas con luz reflejada (360 X) de células desprendidas de tejido de piel humana y adheridas a un portaobjetos de vidrio después de evaporar la solución salina: a) sin tratamiento y b) después de ser tratado durante 4 h, *in vivo*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

Para corroborar que las células de la piel humana son capaces de reducir iones Ag (I) acuosos y demostrar si también se biosintetizan nanopartículas de plata cuando la piel humana se pone en contacto, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa de nitrato de plata, las células desprendidas de este tejido epitelial se caracterizaron por espectroscopía UV-visible. La Figura 6 presenta los espectros UV-visible de: a) solución acuosa salina (0.9% NaCl), b) solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, c) células epiteliales humanas sin tratamiento con nitrato de plata, y d) células epiteliales humanas después de 4 h de tratamiento, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata. En el caso de las células epiteliales, estas fueron adheridas a un portaobjetos de vidrio y su espectro se tomó en seco. En la Figura 5 se observa que los espectros de la solución salina y de la solución acuosa de nitrato de plata no presentan absorbancia significativa en el intervalo de longitud de onda entre 350 nm y 800 nm. El espectro de las células epiteliales sin tratamiento con nitrato de plata acuosa se caracteriza por un incremento en la absorbancia a medida que la longitud de onda disminuye, pero no presenta ninguna banda de absorción. La absorbancia del espectro de las células epiteliales tratadas con nitrato de plata también aumenta a medida que disminuye la longitud de onda y es mayor que la del espectro de las células sin tratamiento. Además, este espectro presenta claramente una banda de absorción centrada a 450 nm. Las nanopartículas de plata han demostrado absorción alrededor de los 400-480 nm cada vez que son puestas a prueba. Esta banda de absorción, característica de los espectros de dispersiones coloidales de plata, se debe a un fenómeno que se conoce como absorbancia del plasmón de superficie, el cuál está asociado con el color característico de estas dispersiones coloidales. Cuando se hace incidir un haz de luz sobre dispersiones coloidales de plata, esta energía luminosa crea oscilaciones en los electrones de conducción en la superficie de las nanopartículas lo cuál absorbe energía electromagnética (44). Las características de esta banda de absorción (posición, intensidad y ancho, por ejemplo) dependen de la forma y tamaño de las nanopartículas, de su distribución de tamaños, del medio que las rodea, de las sustancias adsorbidas en su superficie y de su grado de agregación o dispersión (45).

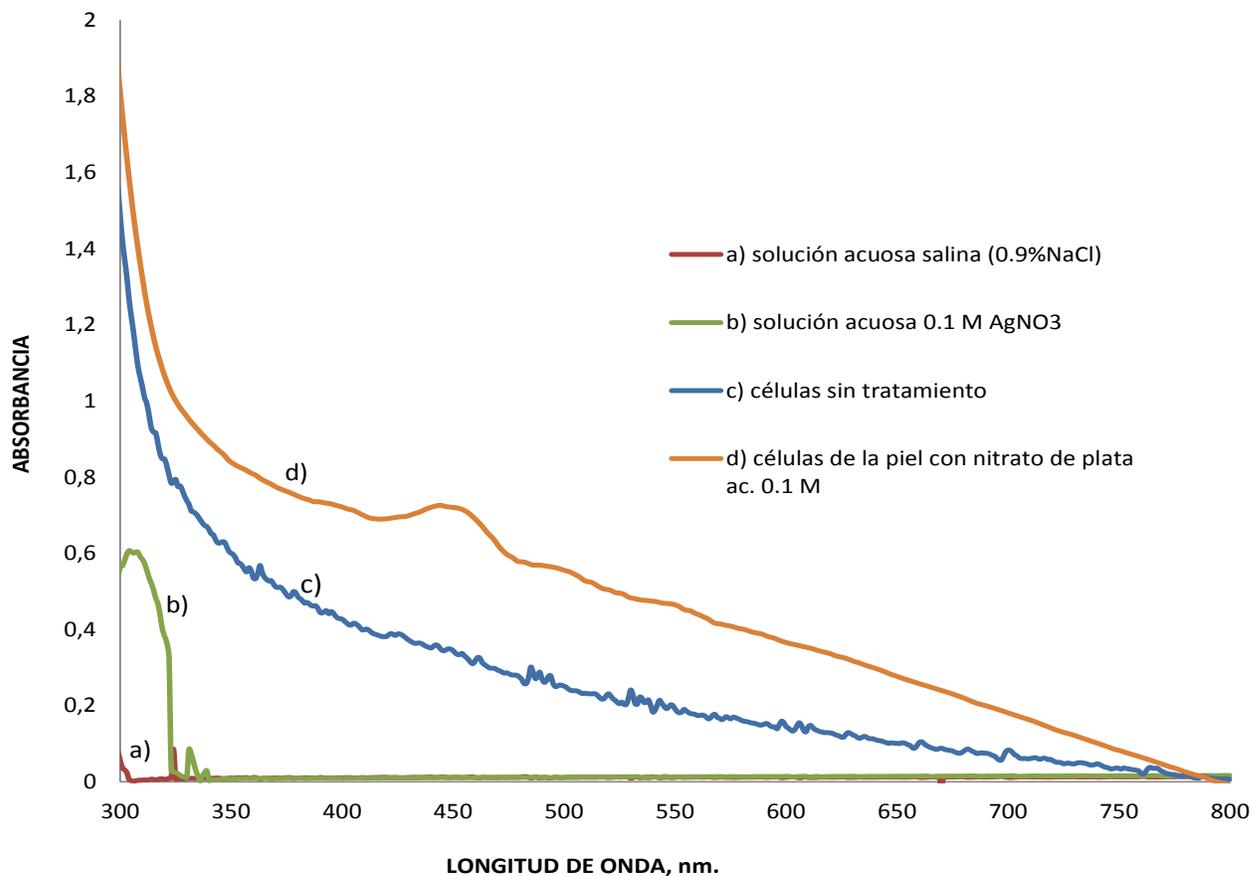


Figura 6. Espectros UV-visible de: a) solución acuosa salina (0.9% NaCl), b) solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, c) células epiteliales humanas sin tratamiento con nitrato de plata, y d) células epiteliales humanas después de 4 h de tratamiento, *in vivo*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

La Figura 7 muestra tres micrografías electrónicas de transmisión de diferentes secciones de células de piel humana tratadas, *in vivo* e *in situ*, con 0.1 M de nitrato de plata durante 4 h. En estas micrografías se puede ver claramente el límite de las células epiteliales y las nanopartículas biosintetizadas por estas células. También se observa que las nanopartículas presentan una gran variedad de tamaños, por lo que su distribución de tamaños es polidispersa. Aunque estas micrografías no revelan si las nanopartículas se encuentran en el exterior o en el interior de las células, los resultados de la biosíntesis de nanopartículas de oro por tejido de piel humana, *in vivo* e *in situ*, reportados por Larios-Rodríguez y colaboradores (1) indican que las nanopartículas se encuentran en el interior de las células epiteliales. Estos investigadores cortaron con un ultramicrotomo muestras de tejido de piel humana tratado, *in vivo* e *in situ*, con ácido tetracloroaurico acuoso, y observaron a través de microscopía electrónica de transmisión las secciones ultradelgadas de estas células epiteliales, logrando así ubicar a las nanopartículas de oro en el interior de las células.

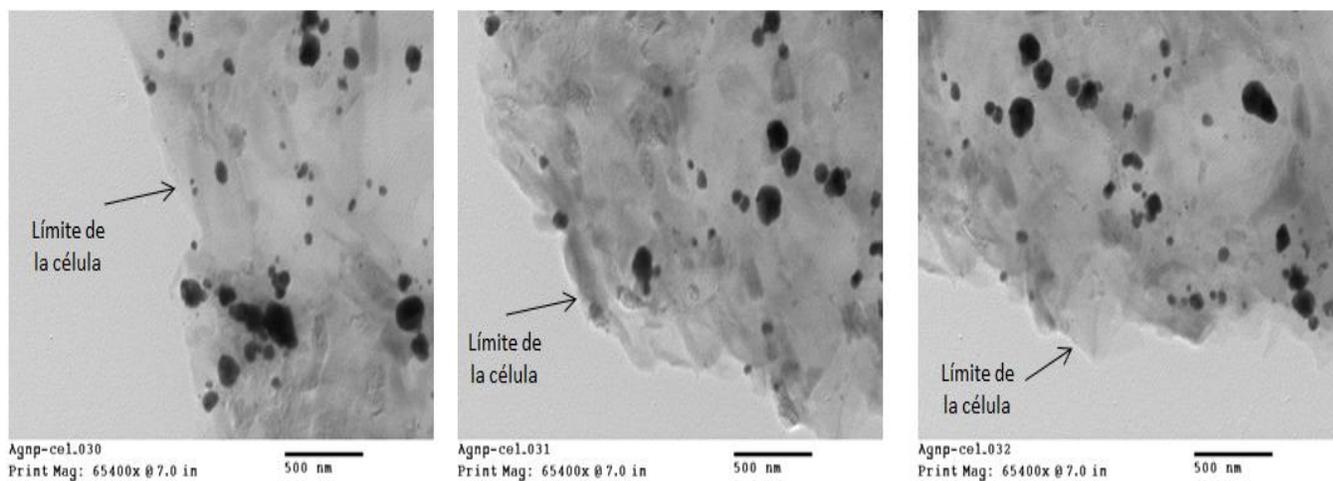


Figura 7. Micrografías electrónicas de transmisión de diferentes secciones de células epiteliales humanas tratadas durante 4 h, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, las cuáles muestran claramente la presencia de nanopartículas.

Las células epiteliales con nanopartículas también se observaron a través de un microscopio electrónico de transmisión y barrido (STEM) en condiciones de campo claro y campo oscuro, y las micrografías correspondientes obtenidas con este microscopio se presentan en la Figura 8. Las nanopartículas pequeñas y oscuras que se observan en la micrografía de campo claro (Figura 8a) se asocian a un material compuesto de un elemento químico con un número atómico grande, por lo que estas nanopartículas pudieran contener plata. En la micrografía de campo oscuro (Figura 8b) se observan 3 nanopartículas muy grandes y muchas nanopartículas más pequeñas y de mayor contraste. Bajo estas condiciones de observación las imágenes más brillantes se asocian con materiales de gran número atómico y las menos brillantes con materiales de números atómicos pequeños.

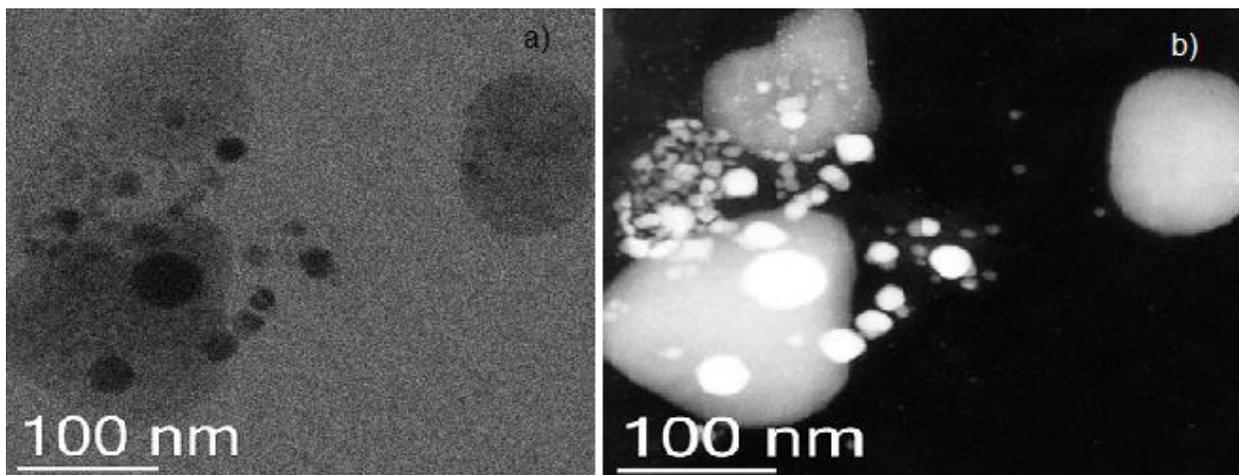


Figura 8. Micrografías electrónicas de transmisión y barrido (STEM) de una sección de célula epitelial tratada durante 4h, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata: a) campo claro b) campo oscuro.

Con la finalidad de identificar la composición de las nanopartículas pequeñas y brillantes que se observan en la micrografía STEM que se muestra en la Figura 8b, se seleccionó una de estas nanopartículas y se le hizo un análisis líneal con espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS). La Figura 9 reproduce una sección de la micrografía STEM de campo oscuro que se presenta en la Figura 8b, y en la Figura 10 el espectro EDS de la distancia de la nanopartícula de mayor contraste señalada con la flecha en esta micrografía (Figura 9). En este espectro (Figura 10) se observa claramente que los picos más intensos corresponden a los elementos plata y cobre. La señal del elemento cobre se debe a que la rejilla donde se soporta la muestra es de cobre. Por tanto, las nanopartículas pequeñas y brillantes que se observan en la micrografía STEM de campo oscuro son nanopartículas de plata biosintetizadas por las células de piel humana cuando se ponen en contacto *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

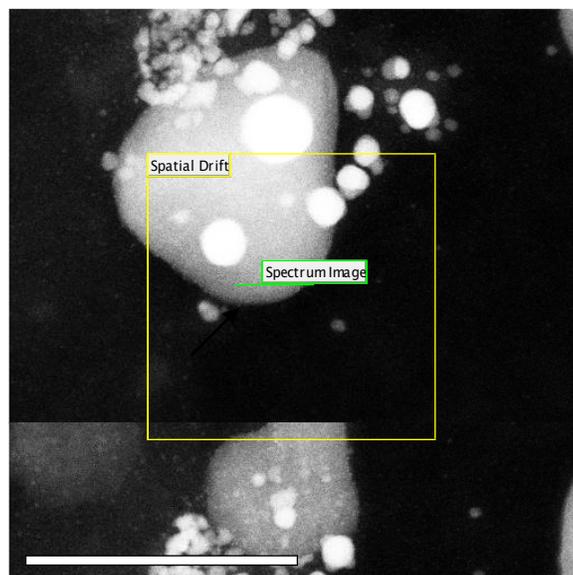


Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión y barrido (STEM), campo oscuro, de una sección de célula epitelial tratadas durante 4 h, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata. La distancia de la nanopartícula de mayor contraste en el centro de la imagen (señalada con la flecha) se analizó por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS).

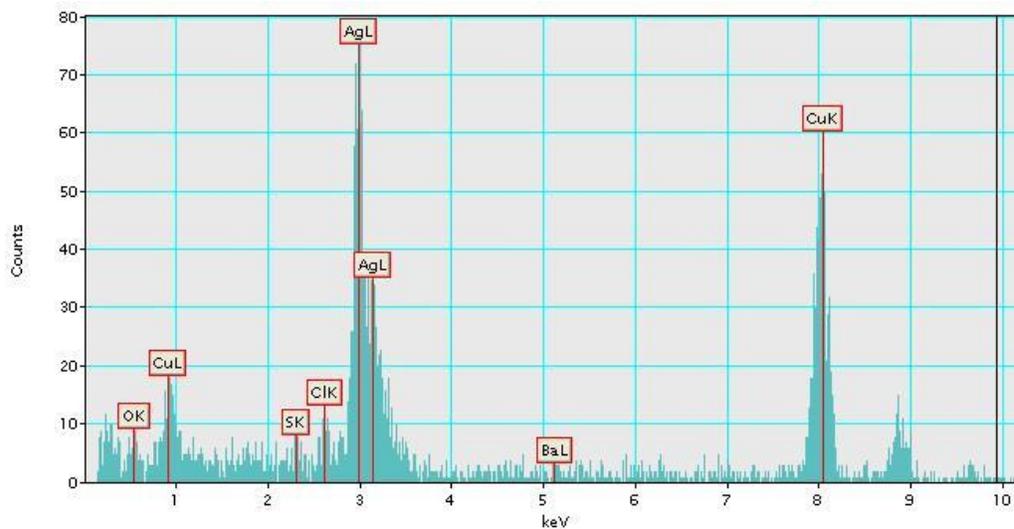


Figura 10. Espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS) del análisis elemental lineal de una de las nanopartículas de mayor contraste (indicada con la flecha) del centro de la micrografía STEM, campo oscuro, presentada en la Figura 9

También se llevó a cabo el análisis elemental líneal, por medio de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), a lo largo de una de las nanopartículas muy grandes y de menor contraste que se observan en las micrografías STEM de las Figuras 8, 9 y 11 con la finalidad de determinar su composición química. El espectro EDS que se presenta en la Figura 12 corresponde al análisis elemental a lo largo de la nanopartícula señalada con la flecha en la micrografía STEM en la Figura 11. En este espectro se observa claramente que los picos más intensos corresponden a los elementos Na y Cl. Por tanto, las nanopartículas muy grandes y menos brillantes seguramente son de NaCl, ya que las células epiteliales se mantuvieron inmersas en una solución salina (0.9% NaCl) después de ser desprendidas del tejido de la piel tratado con la solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

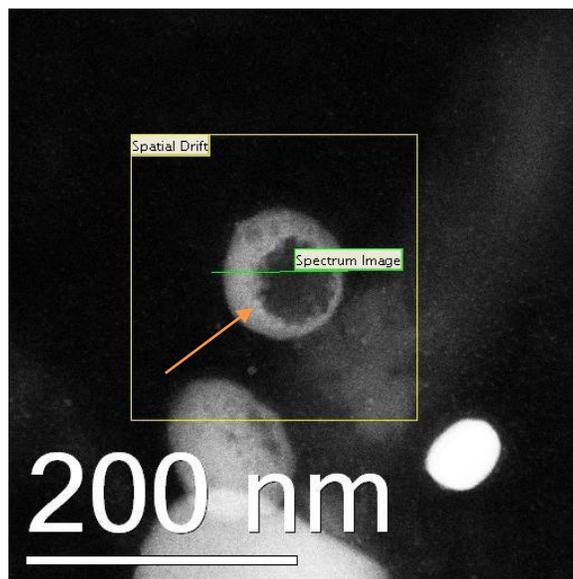


Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión y barrido (STEM), campo oscuro, de una sección de célula epitelial tratada durante 4 h, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata. A la nanopartícula de menor contraste en el centro de la imagen (índicada con la flecha) se le hizo un análisis líneal por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS).

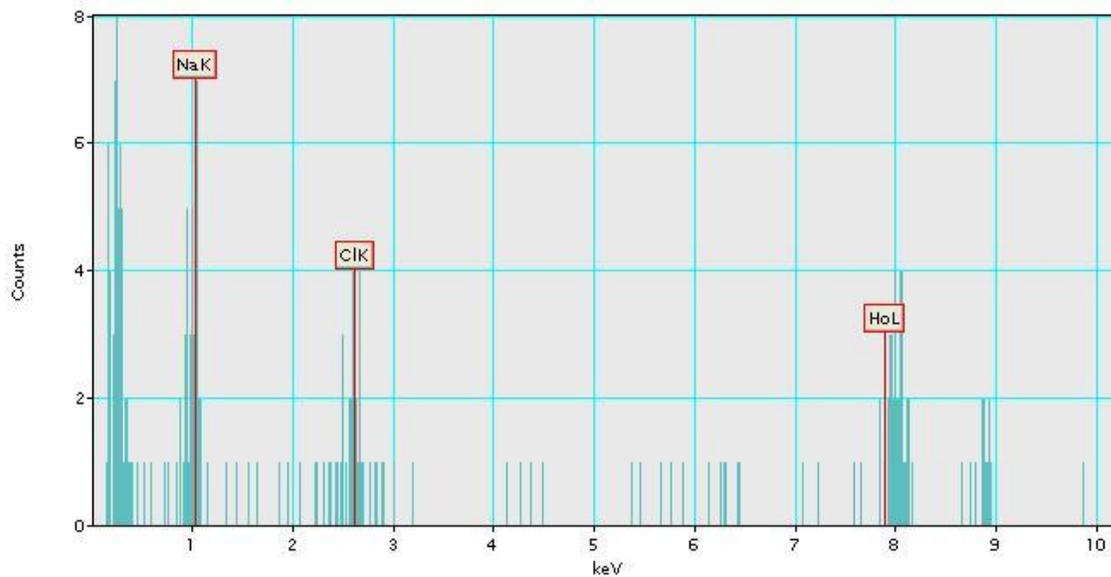


Figura 12. Espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS) del análisis líneal de una de las nanopartículas más grandes y de menor contraste (índicada con la flecha) en el centro de la micrografía STEM, campo oscuro, de una sección de célula de piel humana, tratada durante 4 h, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, presentada en la Figura 11.

La estructura cristalina de las nanopartículas de plata biosintetizadas por las células de la piel humana después de ser tratadas durante 4 h, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata se determinó mediante el análisis de la imagen de una de esas nanopartículas, obtenida con microscopía electrónica de transmisión y barrido de alta resolución (HRSTEM). La Figura 13a muestra la micrografía HRSTEM de una nanopartícula de plata, donde se observan claramente los planos atómicos y sus diferentes orientaciones cristalinas. El recuadro de esta figura (Figura 13b) muestra el patrón de difracción que se obtiene al digitalizar la imagen HRSTEM y efectuar una transformada de Fourier. A partir de este patrón de difracción, se efectúa una transformada de Fourier inversa (IFFT) incluyendo todos los puntos del patrón de difracción, con lo cual se logra reconstruir la imagen de la nanopartícula, la cual se presenta en la Figura 13c. En esta figura también se observan los planos atómicos y sus diferentes direcciones. Cuando solamente se incluyen los dos puntos encerrados con un círculo en la Figura 13b para reconstruir la imagen efectuando una transformada inversa de Fourier, se obtiene la imagen presentada en la Figura 13d. En esta figura también se aprecian claramente los planos atómicos, los cuales además son paralelos entre sí. Finalmente, el análisis de esta imagen permite realizar un perfil de planos atómicos, el cual se presenta en la Figura 13e. En esta figura se mide la distancia entre planos, y se obtiene una distancia de 2.36 Å, cuyo valor es casi igual a la distancia interplanar de los planos 111 de cristales de plata cúbicos centrados en las caras (2.355 Å) (46).

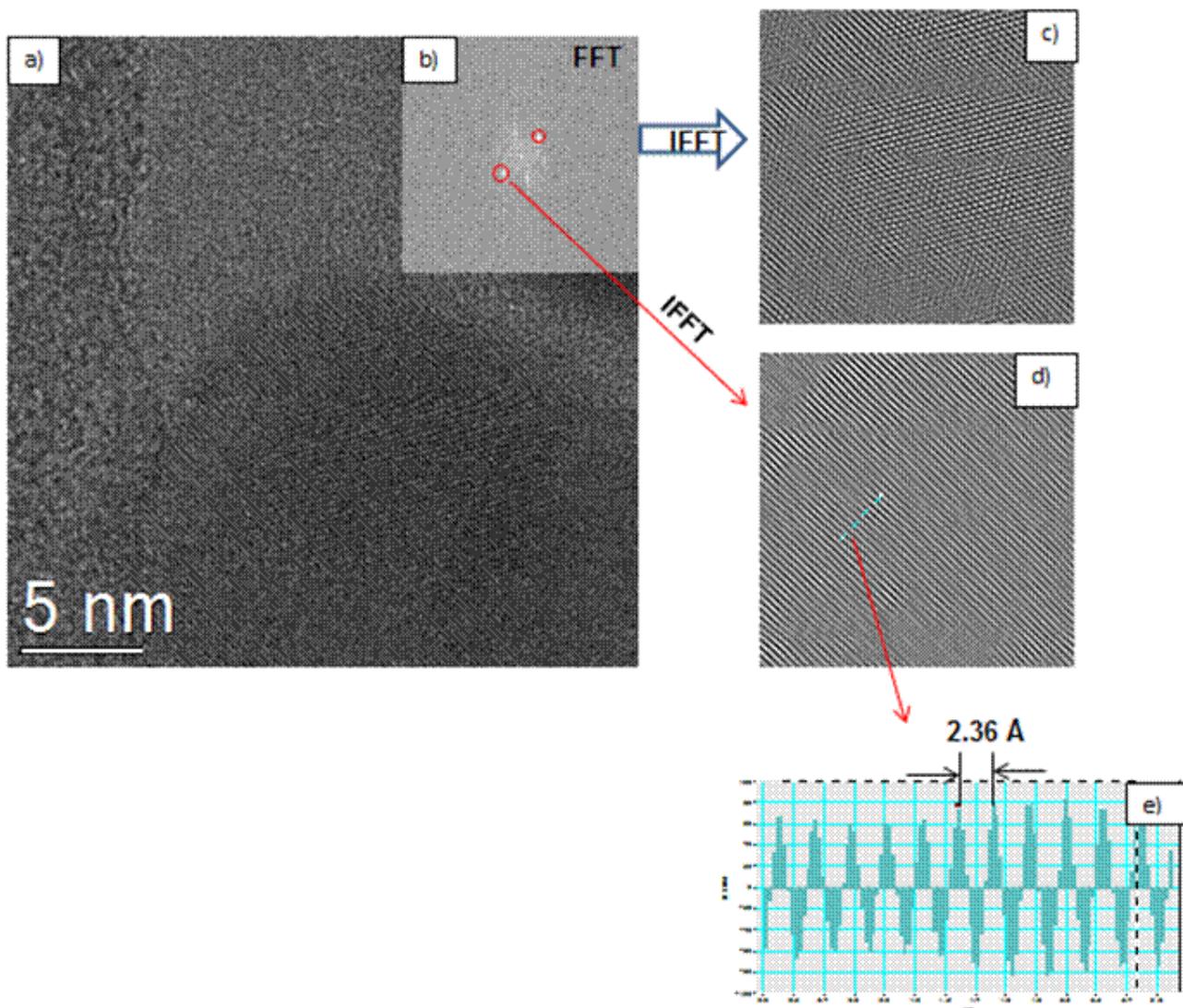


Figura 13. a) Micrografía electrónica de transmisión y barrido de alta resolución (HRSTEM) de una nanopartícula de plata biosintetizada por células de piel humana después de reaccionar, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata, b) patrón de difracción de esta nanopartícula obtenido mediante análisis de la micrografía HRSTEM por transformada de Fourier, c) imagen reconstruida de la micrografía HRSTEM mediante transformada de Fourier inversa de todos los puntos del patrón de difracción, d) imagen reconstruida de la micrografía HRSTEM mediante transformada de Fourier inversa de los dos puntos del patrón de difracción encerrados con un círculo, y e) perfil de los planos atómicos de la Figura 13d, dónde se indica la distancia interplanar de 2.36 Å.

Las Figuras 14a y 14b presentan dos micrografías electrónicas de transmisión y barrido (STEM), campo oscuro, de diferentes secciones de una célula de piel humana conteniendo nanopartículas de plata biosintetizadas por esta célula después de estar en contacto, *in vivo* e *in situ*, durante 4 h con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata. En estas micrografías las nanopartículas más brillosas son de plata, y se observa claramente los diferentes tamaños de estas nanopartículas y su distribución amplia de tamaños. El histograma que se presenta en la Figura 14c muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas de plata que se observan en las Figuras 14a y 14b. De este histograma se calculó el tamaño promedio de las nanopartículas, el cuál es de 32.7 nm, así como la desviación estándar, cuyo valor es de 19.7.

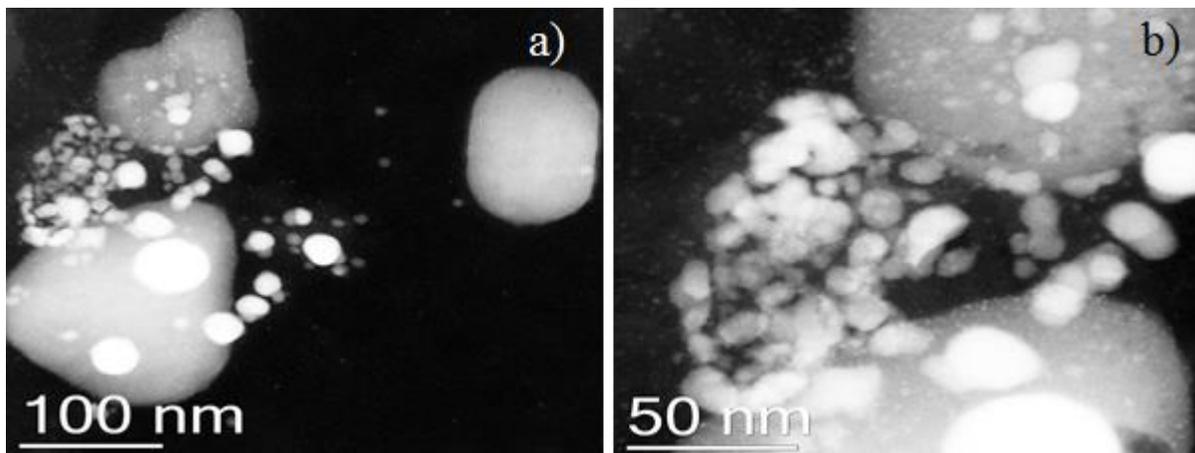


Figura 14 a y b. Micrografías electrónicas de transmisión y barrido (STEM), campo oscuro, de nanopartículas de plata biosintetizadas por células de piel humana después de 4 h en contacto, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

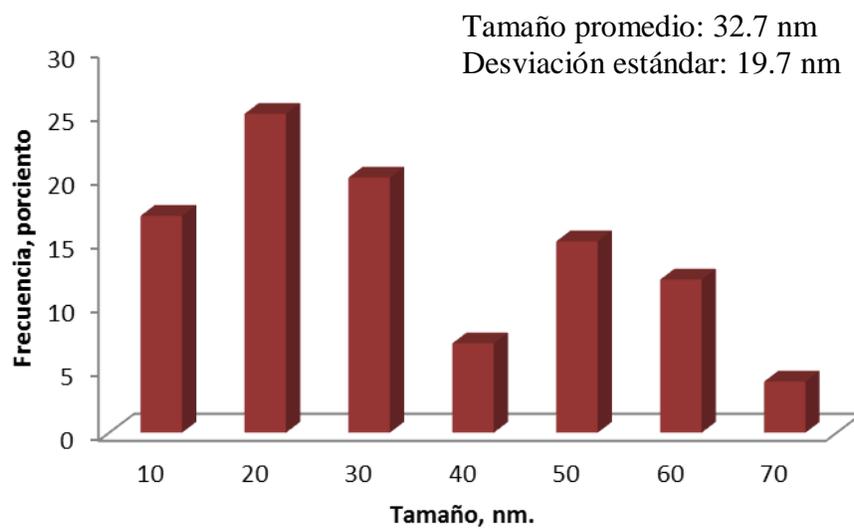


Figura 14c. Histograma correspondiente a la distribución de tamaños de las nanopartículas de plata, biosintetizadas por células de piel humana, *in vivo* e *in situ*, después de 4 h en contacto con una solución acuosa 0.1 M de nitrato de plata.

#### **4.2 Biosíntesis de nanopartículas de plata por fibroblastos humanos NF3, *in Vitro***

Los fibroblastos son las células de la dermis, responsables de la secreción de las fibras de elastina y de colágeno, así como de los glicosaminoglicanos que forman la matriz de apoyo de la dermis (47). Los fibroblastos son células jóvenes, activas, de abundante citoplasma, núcleo ovoide y pálido con finos granos de cromatina y nucléolo prominente. Son alargados fusiformes, a veces con largas prolongaciones que los hacen adquirir forma estrellada (48).

El medio de cultivo conteniendo células epiteliales humanas (fibroblastos NF3) es de color rosa pálido, cómo se aprecia en la muestra de la izquierda de la Figura 15. Cuando se agrega a este medio de cultivo una solución acuosa de nitrato de plata y se incuba durante 36 h se observa que con una concentración inicial de 1 mM de nitrato de plata el medio de cultivo adquiere un color amarillo claro, como se aprecia en la muestra de la derecha de la Figura 15. Este cambio de color del medio de cultivo indica que las células epiteliales reaccionaron con el nitrato de plata y muy probablemente biosintetizaron nanopartículas de plata, ya que algunas dispersiones de plata coloidal muestran color amarillo (42). Cuando la concentración inicial de nitrato de plata es 0.1 mM el medio de cultivo no cambia de color (véase la Figura 15), lo cuál sugiere que existe una concentración óptima a la cuál se aprecia a simple vista la reacción de las células epiteliales con el nitrato de plata. El color café claro del medio de cultivo que se hizo reaccionar con 1 mM de nitrato de plata, indica, indirectamente, la biosíntesis de nanopartículas de plata por los fibroblastos NF3 sin necesidad de agregar un agente reductor adicional para los iones  $Ag^+$ .

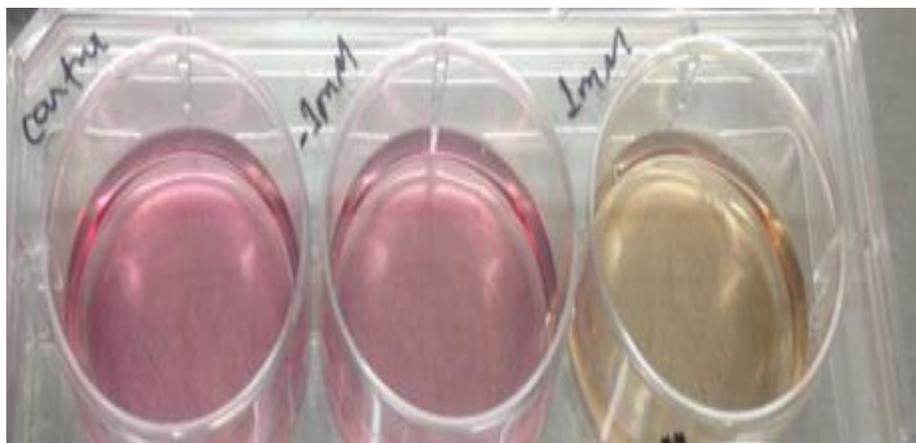


Figura 15. Fotografía del medio de cultivo con fibroblastos humanos NF3 (células epiteliales). De izquierda a derecha: sin nitrato de plata, con 0.1 mM inicial de nitrato de plata y con 1 mM inicial de nitrato de plata.

Para corroborar que los fibroblastos humanos NF3 también son capaces de reducir iones Ag (I) acuosos y demostrar si también estas células epiteliales, cultivadas *in Vitro*, biosintetizan nanopartículas de plata cuando se les agrega una solución acuosa de nitrato de plata, el cultivo celular en ausencia y en presencia de nitrato de plata se caracterizó por espectroscopía UV-visible. La Figura 16 presenta los espectro UV-visible de: a) solución acuosa 1.0 mM de nitrato de plata, b) medio de cultivo celular con una concentración inicial de 1.0 mM de nitrato de plata, c) fibroblastos en medio de cultivo celular sin nitrato de plata, y d) fibroblastos incubados en medio de cultivo celular después de 36 h de tratamiento con con una solución acuosa 1.0 mM inicial de nitrato de plata. En la Figura 16 se observa que con excepción del espectro de los fibroblastos en presencia de nitrato de plata, los otros espectros no presentan ninguna banda de absorción. Este espectro presenta claramente una banda de absorción bien definida e intensa, centrada a 450 nm. Como ya se mencionó, esta banda de absorción, característica de los espectros de dispersiones coloidales de plata, se debe a un fenómeno que se conoce como absorbancia del plasmón de superficie, el cuál esta asociado con el color característico de estas dispersiones coloidales. Las características de esta banda de absorción (posición, intensidad y ancho, por ejemplo) dependen de la forma y tamaño de las nanopartículas, de su distribución de tamaños, del medio que las rodea, de las sustancias adsorbidas en su superficie y de su grado de agregación o dispersión (45).

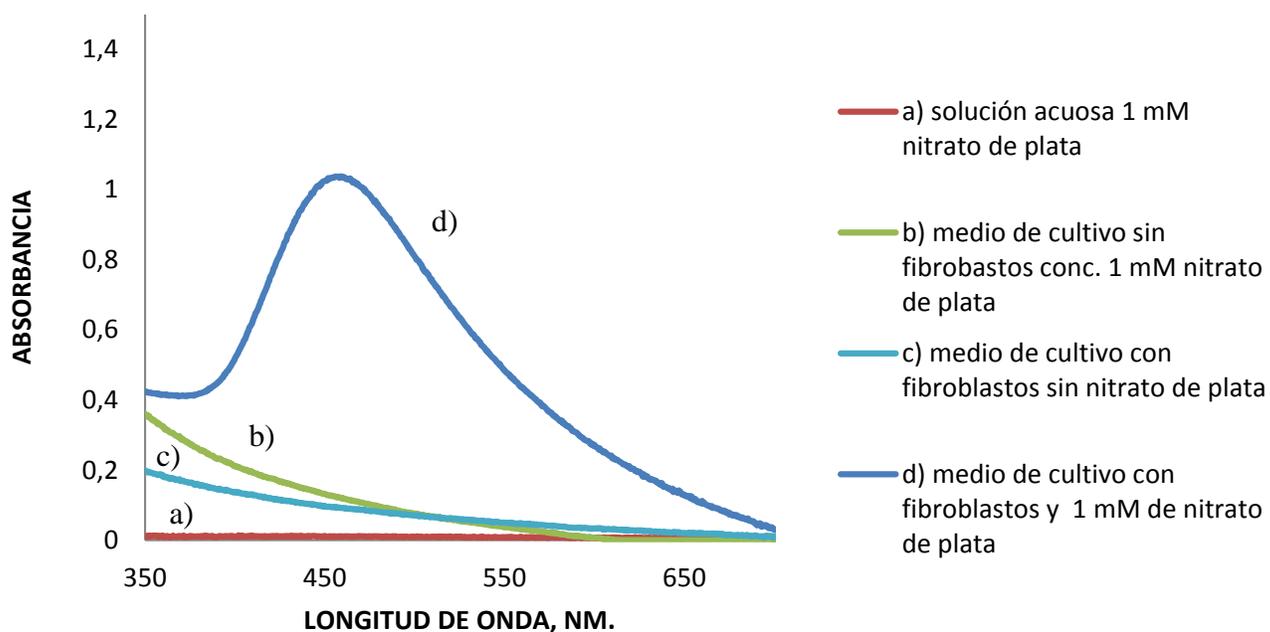


Figura 16. Espectros UV-visible de a) solución acuosa 1.0 mM de nitrato de plata, b) medio de cultivo sin fibroblastos con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata, c) medio de cultivo con fibroblastos sin tratamiento de nitrato de plata, d) medio de cultivo con fibroblastos después de ser incubados durante 36 h con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata.

La Figura 17 presenta una micrografía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas que se obtienen al lisiar los fibroblastos tratados con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata durante 36 h, y después centrifugar la suspensión celular. Esta micrografía muestra claramente las diferentes formas y tamaños de las nanopartículas biosintetizadas por los fibroblastos. Para determinar la composición química elemental de estas nanopartículas, se hizo un análisis por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) de la muestra que se presenta en la micrografía de la Figura 17. El espectro EDS correspondiente a este análisis se presenta en la Figura 18a. En este espectro se observan los picos que se asignan a la plata: el más intenso, localizado a 2.983 keV, otros dos de menos intensidad a 3.1 y 3.2 keV. Además, se identifican los picos de los elementos Na, Cl y Si. El Na y el Cl seguramente provienen del medio de cultivo, mientras que el Si se debe al portamuestras. Los resultados de este análisis químico cuantitativo (en % de masa), que se obtienen del espectro EDS correspondiente, se presentan en la Figura 18b. Estos resultados comprueban que las nanopartículas biosintetizadas por los fibroblastos humanos NF3 cuando se hacen reaccionar con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata, *in Vitro*, efectivamente son de plata.

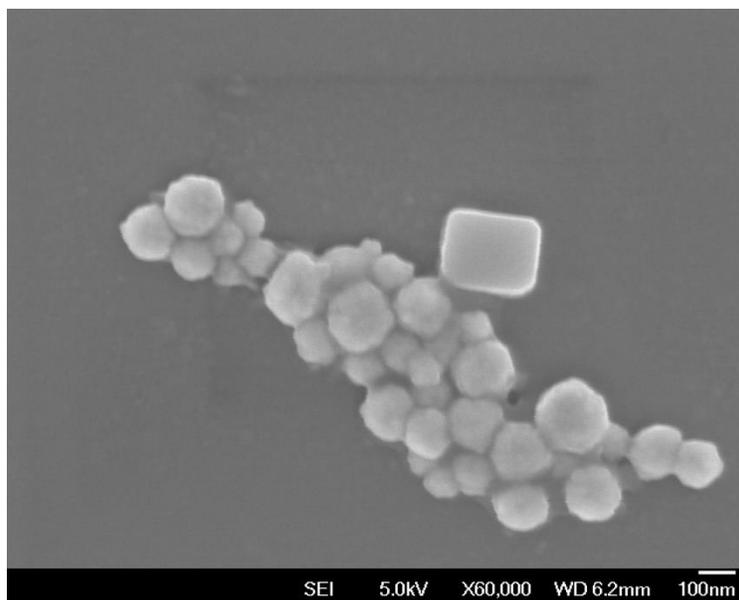


Figura 17. Micrografía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas biosintetizadas por fibroblastos humanos NF3, *in vitro*, con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata.

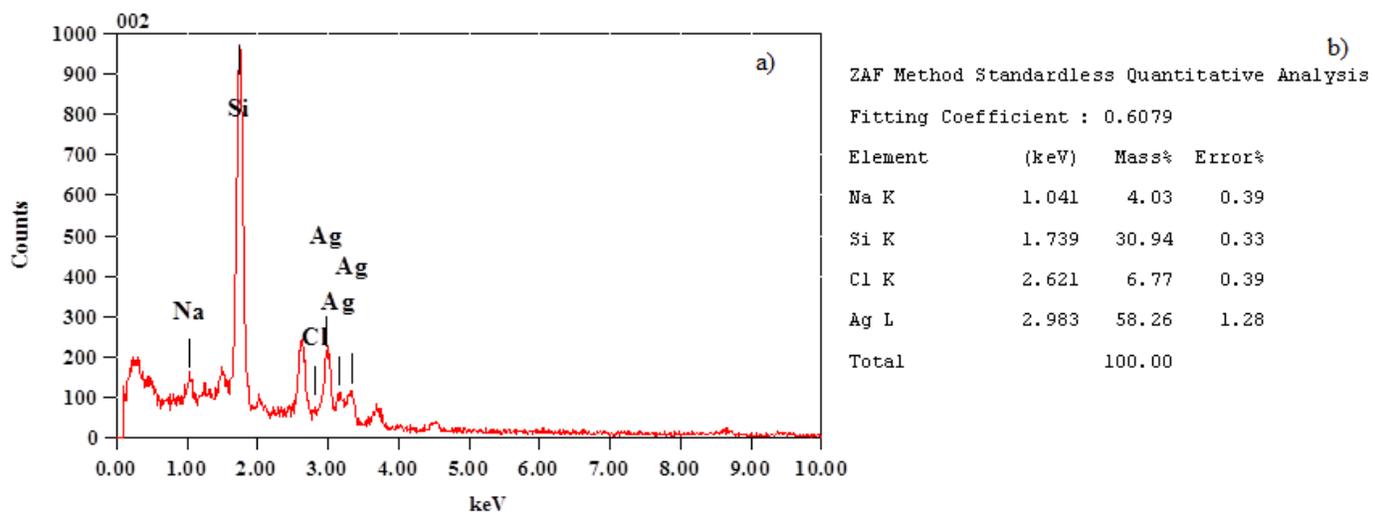


Figura 18 a). Espectro de energía de dispersión de rayos X EDS de las nanopartículas biosintetizadas por fibroblastos humanos NF3 a partir de una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata que se muestran en la micrografía de la Figura 17, y b) resultado del análisis cuantitativo (% en masa) que se obtiene del espectro EDS de la micrografía que se presenta en la Figura 17.

### **4.3 Viabilidad de fibroblastos humanos NF3**

Los resultados de viabilidad de fibroblastos humanos NF3 en ausencia y en presencia de tres diferentes concentraciones iniciales de nitrato de plata, después de 24 h, se presenta en la Figura 19. De acuerdo con estos resultados, la sobrevivencia de los fibroblastos NF3 que se hacen reaccionar con concentraciones iniciales de nitrato de plata 0.1 mM y 1.0 mM es muy pobre; menos del 20% si se toman como referencia los resultados de la prueba de control. Cuando la concentración inicial de nitrato de plata que se agrega al cultivo de fibroblastos NF3 es 0.01 mM, aproximadamente el 90% de éstas células epiteliales humanas sobreviven.

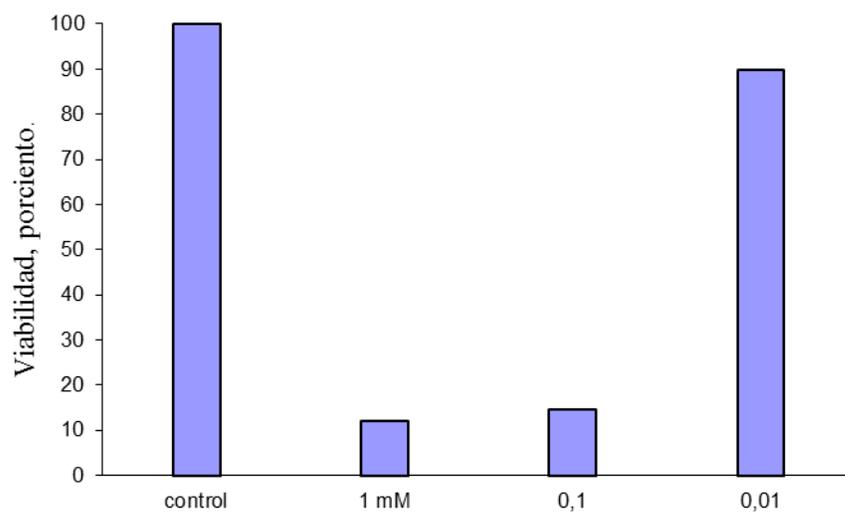


Figura 19. Viabilidad de fibroblastos humanos NF3 en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones iniciales de nitrato de plata después de 24 h.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Los resultados de este trabajo de investigación sobre la biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas permiten emitir las siguientes conclusiones.

Las células epiteliales humanas tienen la habilidad de biosintetizar nanopartículas de plata a partir de soluciones acuosas de nitrato de plata. Esta biosíntesis se puede llevar a cabo en piel humana, *in vivo* e *in situ*, y también con cultivos de fibroblastos humanos NF3, *in Vitro*. El primer indicio de la reacción de las células epiteliales humanas con nitrato de plata acuoso es la coloración café claro que adquiere la piel humana cuando se pone en contacto con una solución acuosa de nitrato de plata. En el caso de fibroblastos incubados en un medio de cultivo celular, éste medio también adquiere un color café claro casi amarillo al hacerse reaccionar con una solución de nitrato de plata. Como estos cambios en el color de la piel humana y del cultivo celular de fibroblastos cuando se hacen reaccionar con nitrato de plata son característicos de dispersiones coloidales de plata, ellos indican, indirectamente, la formación de nanopartículas de plata.

Micrografías ópticas del tejido de piel humana tratado con nitrato de plata acuoso y de las células epiteliales desprendidas de este tejido también revelan que estos materiales biológicos adquieren un color café claro.

Los espectros UV-Vis de células epiteliales humanas tratadas con una solución de nitrato de plata, *in vivo* e *in situ*, y los fibroblastos que se hicieron reaccionar, *in Vitro*, con una solución de nitrato de plata presentan una banda de absorción centrada aproximadamente a 450 nm. Esta banda de absorción, característica de los espectros de dispersiones coloidales de plata, se debe a un fenómeno que se conoce como absorbancia del plasmón de superficie

de las nanopartículas de plata. Por tanto, estos resultados confirman que las células epiteliales humanas tratadas con una solución acuosa de nitrato de plata biosintetizan nanopartículas de plata.

Micrografías electrónicas de transmisión de células epiteliales humanas tratadas, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa de nitrato de plata muestran claramente secciones de estas células donde también se observan nanopartículas. El análisis químico elemental a lo largo de una nanopartícula, el cual se hizo por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), revela, sin lugar a dudas que estas nanopartículas son de plata. Además, la digitalización de la micrografía de una de estas nanopartículas, obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido de alta resolución, demostró que la distancia entre algunos de sus planos atómicos es de 2.36 Å. Como esta distancia corresponde a la distancia entre planos (111) de plata, la cual cristaliza en el sistema cúbico centrado en las caras, estos resultados también comprueban que las nanopartículas biosintetizadas por las células de piel humana son de plata.

Las nanopartículas de plata biosintetizadas por las células de piel humana, *in vivo* e *in situ*, cuando se ponen en contacto durante 4 h con una solución 0.1 M de nitrato de plata tienen un tamaño promedio de 32.7 nm y una desviación estándar de 19.7 nm.

El análisis químico elemental por EDS de una micrografía electrónica de barrido que muestra nanopartículas biosintetizadas por fibroblastos cuando se hacen reaccionar, *in Vitro*, con una concentración inicial 1.0 mM de nitrato de plata, comprueba que estas nanopartículas son de plata.

Estos métodos de biosíntesis de nanopartículas de plata por células epiteliales humanas no requiere la presencia de reactivos químicos que funcionan como agentes reductores de iones Ag (I) o agentes protectores de las nanopartículas. Por tanto, los problemas asociados con la toxicidad de estos reactivos y sus efectos nocivos en las células se minimizan.

## 5.2 Recomendaciones

Para futuras investigaciones en este tema se proponen algunas recomendaciones:

Investigar el efecto de la concentración inicial de nitrato de plata en el tamaño promedio y distribución de tamaños de las nanopartículas de plata biosintetizadas, *in vivo* e *in situ*, por la piel humana.

Determinar el mecanismo de biosíntesis de nanopartículas de plata por células de piel humana cuando éstas se ponen en contacto, *in vivo* e *in situ*, con una solución acuosa de nitrato de plata.

Determinar si las nanopartículas de plata biosintetizadas por células de piel humana, *in vivo* e *in situ*, se localizan en el exterior o en el interior de las células.

Caracterizar por microscopía electrónica de transmisión los fibroblastos humanos NF3 después de hacerlos reaccionar con soluciones acuosas de nitrato de plata.

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

1. Larios-Rodriguez E, Rangel-Ayon C, Castillo S J, Zavala G, Herrera-Urbina R., Bio synthesis of gold nanoparticles by human epithelial cells, *in vivo*, Nanotechnology, 2011, Vol. 22, p. 35.
2. M. Gnanadesigan, M. Anand, M. Maruthupandy, V. Vijayakumar, S. Selvam, M. Dhineshkumar, AK. Kumaraguru, Biosynthesis of silver nanoparticles by using mangrove plant extract and their potencial mosquito larvicidal property, International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences, 2011, Vol. 10, pp. 799-803.
3. Jiale Huang , Guowu Zhan, Bingyun Zheng, Daohua Sun, Fenfen Lu, Yuan Lin, Huimei Chen, Zhouding Zheng, Yanmei Zheng, Qingbiao Li, Biogenic Silver Nanoparticles by *Cacumen Platycladi* Extract: Synthesis, Formation Mechanism and Antibacterial Activity, Industrial and Engineering Chemistry Research, 2011, Vol. 50, pp. 9095–9106
4. Ali Jebali, Fatemeh Ramezani, Bahram Kazemi, Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Geotricum sp*, Journal of Cluster Science, 2011, Vol. 22, pp. 225-232.
5. Garima Singhal, Riju Bhavesh, Kunal Kasariya, Ashish Ranjan Sharma, Rajendra Pal Singh, Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity, Journal of Nanoparticle Research, 2010, Vol. 13, pp. 2981-2988.
6. Mohsen Behpour, Maryam Khayatkashani, Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Rosa damascena* and its primary application in

- electrochemistry, *Physica E Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2011, Vol.4, pp. 97-104.
7. S.Ankanna, T.N.V.K.V.Prasad, E.K.Elumalai, N.Savithramma, Production of biogenic Silver Nanoparticles using *Boswellia ovalifoliolata* stem bark, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2011, Vol.5, pp. 369 – 372.
  8. Naznin Ara Begum, Samiran Mondal, Saswati Basu, Rajibul A. Laskar, Debabrata Mandal, Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts, *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2009, Vol.7, pp. 113-118.
  9. Sreemanti Das, Jayeeta Das, Asmita Samadder, Soumya Sundar Bhattacharyya, Durba Das, Anisur Rahman Khuda-Bukhsh, Biosynthesized silver nanoparticles by ethanolic extracts of *Phytolacca decandra*, *Gelsemium sempervirens*, *Hydrastis canadensis* and *Thuja occidentalis* induce differential cytotoxicity through G2/M arrest in A375 cells, *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2013, Vol. 101, pp. 325-336.
  - 10.Indu Barwal, Peeyush Ranjan, Suneel Kateriya and Subhash Chandra Yadav, Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles, *Journal of Biotechnology*, 2011, Vol. 9, pp. 1-12.
  - 11.Mayur Valodkar, Ravirajsinh N. Jadeja, Menaka C. Thounaojam, Ranjitsinh V. Devkar, Sonal Thakore, In Vitro toxicity study of Plant latex Capped silver nanoparticles in Human Lung Carcinoma cells, *Materials Science and Engineering C*, 2011, Vol. 31, pp. 1723-1728
  - 12.Mayur Valodkar, Ravirajsinh N. Jadeja, Menaka C. Thounaojam, Ranjitsinh V. Devkar, Sonal Thakore, *In vitro* toxicity study of plant latex capped silver nanoparticles in human lung carcinoma cells, *Materials Science and Engineering C*, 2011, Vol. 31, pp. 1723-1728.

- 13.I. Maliszewska, K. Szewczyk and K Waszak, Biological synthesis of silver nanoparticles, *Journal of Physics: Conference Series*, 2009, Vol. 146, pp. 1-6.
- 14.Nelson Durán, Priscyla D Marcato, Oswaldo L Alves, Gabriel IH De Souza, Elisa Esposito, Mechanistics aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains, *Journal of Nanobiotechnology*, 2005, Vol. 3, pp. 1-7.
- 15.S Shivaji, S. Madhu, Shashi Singh, Extracellular Synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria, *Process Biochemistry*, 2011, Vol. 46, pp. 1800-1807.
- 16.Rajesh R. Naik, Sarah J. Stringer, Gunjan Agarwal, Sharon E. Jones, Morley O. Stone, Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles, *Nature Materials*, 2002, Vol.1, pp. 169 - 172.
- 17.N.M Huang, H.N. Lim, S. Radiman, P.S. Khiew, W.S. Chiu, R. Hashim, C.H. Chia, Sucrose ester micellar-mediated synthesis of Ag nanoparticles and the antibacterial properties, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, Vol. 353, pp. 69-76.
- 18.Renata de Lima, Amedea B. Seabrac and Nelson Duránd, Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles, *Journal of Applied Toxicology*, 2012, Vol. 32, pp. 867-879.
- 19.Greulich C, Kittler S, Epple M, Muhr G, Köller M, Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs), *Langenbecks Arch Surg.*, 2009, Vol. 394, pp. 495-502.
- 20.Igor Linkov, Matthew E. Bates, Laure J. Canis, Thomas P. Seager & Jeffrey M. Keisler, A decision-directed approach for prioritizing research into the impact of nanomaterials on the environment and human health, *Nature Nanotechnology*, 2011, Vol. 6, pp. 784-787.

21. Caterina Zanette, Marco Pelin, Matteo Crosera, Gianpiero Adami, Massimo Bovenzi, Francesca Filon Larese, Chiara Florio, Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line, *Toxicology in Vitro*, 2010, Vol. 25, pp.1053-1060.
22. Wei Liu, Yuan Wu, Chang Wang, Hong C. Li, Thanh Wang, Chun Y. Liao, Lin Cui, Qun F. Zhou, Bing Yan, Gui B. Jiang, Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of Particle size, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2010, Vol. 4, pp.319-330.
23. Lauren A. Austin, Bin Kang, Chun-Wan Yen, Mostafa A. El-Sayed, Plasmonic Imaging of Human Oral Cancer cell Communities during Programmed cell death by Nuclear-Targeting Silver nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, Vol. 133, pp. 17594–17597.
24. S. Seung-Heon, Mi-Kyung Ye, The effect of nano-silver on the activation of nasal polyp epithelial cells by *Alternaria*, Der P1 and staphylococcal enterotoxin B, *International Immunopharmacology*, 2011, Vol. 11, pp. 1691-1696.
25. Koji Kawata, Masato Osawa, Satoshi Okabe, In Vitro Toxicity of Silver nanoparticles at Non cytotoxic doses to HepG2 Human Hepatoma cells, *Environmental Science and Technology*, 2009, Vol. 43, pp. 6046–6051.
26. Foldbjerg R., Dang D.A., Autrup H., Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549, *Arch. Toxicology*, 2010, Vol. 85, pp. 743-750.
27. P. V. AshaRani, M. Prakash Hande, Suresh Valiyaveetil, Anti-proliferative activity of silver nanoparticles, 2009, Vol. 10, p. 65.
28. S. Arora, J. Jain, J.M. Rajwade, K.M. Paknikar, Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies, *Toxicology Letters*, 2008, Vol. 179, pp. 93- 100.

29. Hong-Lin Su, Chih-Cheng Chou, Da-Jen Hung, Siou-Hong Lin, I-Chuan Pao, Jun-Hong Lin Fang-Liang Huang d, Rui-Xuan Dong, Jiang-Jen Lin, The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay, 2009, *Biomaterials*, Vol. 30, 5979-5987.
30. Ja Young Chuna,1, Hyun Ki Kangb,1, Lim Jeonga, Yun Ok Kanga, Ju-Eun Ohb, In-Sung Yeo, Sung Youn Jungb, Won Ho Parka, Byung-Moo Min, Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles, 2010, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 78, pp. 334-342.
31. Bishara S. Atiyeh, Michel Costagliola, Shady N. Hayek, Saad A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, *Burns*, 2007, Vol. 33, pp. 139-148.
32. Soohee Kim, Ji Eun Choi, Jinhee Choi, Kyu-Hyuck Chung, Kwangsik Park, Jongheop Yi, Doug-Young Ryu, Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicology in Vitro*, 2009, Vol. 23, pp. 1076-1084.
33. Rasmus Foldbjerg, Duy Anh Dang, Herman Autrup, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549, *Arch. Toxicology*, 2011, Vol. 85, pp. 743-750.
34. E. Hidalgo a, C. Domínguez, Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts, *Toxicology Letters*, 1998, Vol. 98, pp. 169-179.
35. Savas Demirbilek, Sema Uguralp, Necla Gurbu. Nurzen Sezgin, Hale Kırımlıog lu, The use of silver nitrate for chemical de-epithelialization and urothelialization of intestine in a rabbit model of augmentation cystoplasty, *Urol. Research*, 2003, Vol. 31, pp.236-241.

36. Shaokun Zhang, Chan Dub, Zaizhi Wang, Xinguang Han, Kun Zhang, Lihong Liu, Reduced cytotoxicity of silver ions to mammalian cells at high concentration due to the formation of silver chloride, *Toxicology in Vitro*, 2013, Vol. 27, pp. 739-744.
37. Soohee Kim and Doug-Young Ryu, Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues, *Journal of Applied Toxicology*, 2012, Vol. 33, pp. 78-89.
38. Christina Greulich, Dieter Braun, Alexander Peetsch, Jorg Diendorf, Bettina Siebers, Matthias Epple, and Manfred Koller, The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range, *RSC Advances*, 2012, Vol. 2, pp. 6981-6987.
39. P. V. AshaRani, Grace Low Kah Mun, Manoor Prakash Hande, Suresh Valiyaveetil, Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver nanoparticles in Human cells, *ACS Nano*, 2009, Vol. 3, pp. 279–290.
40. Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology Advances*, 2009, Vol. 27, pp. 76-83.
41. Takamitsu Miyayamaa, Yuta Araib, Noriyuki Suzukib, Seishiro Hirano, Mitochondrial electron transport is inhibited by disappearance of metallothionein in human bronchial epithelial cells following exposure to silver nitrate, *Toxicology*, 2013, Vol. 305, pp. 20-29.
42. T. Huang and X.-H. N. Xu, Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy, *J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 9867-9876.
43. Henglein, A., Colloidal silver nanoparticles: Photochemical preparation and interaction with O<sub>2</sub>, CCl<sub>4</sub>, and some metal ions, *Chem. Mater.*, 1998, 10, 444-450.
44. Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam A. V., Rutkowsky, S. A., Boritz, Ch., Synthesis and study of silver nanoparticles, *J. Chem. Edu.*, 2007, 84(2), 322-325.

45. Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J.F., Ávalos-Borja, M., Castellón-Barraza, F.F., Posada-Amarillas, A., Assessment of growth of silver nanoparticles synthesized from an ethylene glycol-silver nitrate-PVP solution, *Physica E* 25, 2005, 438-448.
46. William D. Callister Jr., *Material Science and Engineering an Introduction*, seventh edition, John Wiley & Sons, 2007, 40-46.
47. <http://www.vichy.es/espa%C3%B1a/laboratorios-vichy/fibroblasto-1cmp156.aspx>
48. <http://www.telmeds.org/atlas/histologia/celulas-y-sustancia-intercelular-del-tejido-conectivo/fibroblastos-y-fibrociitos/>