



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Físicas

Escuela Profesional de Física

**Interacción de nanopartículas de plata con medio de
cultura celular suplementado: impacto en la formación
de la biocorona**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Física

AUTOR

Cristofher Victor VIVAS PALOMARES

ASESOR

Mg. José Fernando MÁRQUEZ PACHAS

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vivas, C. (2023). *Interacción de nanopartículas de plata con medio de cultura celular suplementado: impacto en la formación de la biocorona*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Físicas, Escuela Profesional de Física]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Cristofher Victor Vivas Palomares
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47648757
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8995-9730
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	José Fernando Márquez Pachas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	21824638
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4704-8282
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Galo Patiño Camargo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09458366
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Erick Oscar Natividad Zevallos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	48035035
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Eduardo Becquer Carrasco Solis
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42100747
Datos de investigación	

Línea de investigación	No aplica.
Grupo de investigación	Fisiología Molecular y Microrreologia-LABM2
Agencia de financiamiento	Brasil. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) Brasil. Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP)
Ubicación geográfica de la investigación	Instituto de Física – USP. Rua do Matão, 1371- Butantã, São Paulo – SP, 05508-090. Latitud: 23°33'39.575" S; Longitud: 46°44'4.891" W
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Nano-materiales http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.10.01 Tecnologías que implican la manipulación de células, tejidos, órganos o todo el organismo http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.02



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FÍSICA

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN FÍSICA**

Siendo las 15:00 horas del lunes 14 de agosto del 2023, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Físicas (Auditorio 109), bajo la Presidencia del Dr. Galo Patiño Camargo (Presidente), Dr. Erick Oscar Natividad Zevallos (Miembro Titular), el Mg. José Fernando Márquez Pachas (Asesor) y el Mg. Eduardo Becquer Carrasco Solís (Miembro Suplente), se dio inicio a la Sesión Pública de Sustentación de Tesis para la Licenciatura en Física, mediante la Modalidad M1, del Bachiller:

CRISTOFHER VICTOR VIVAS PALOMARES

Dando lectura al Resumen del Expediente, el presidente del Jurado, invitó al Bachiller a realizar una exposición de la Tesis titulada: "Interacción de nanopartículas de plata con medio de cultura celular suplementado: Impacto en la formación de la biocorona"

Concluida la exposición del candidato y luego de las preguntas de rigor por parte del Jurado, el presidente, invitó al Bachiller y al público a abandonar momentáneamente la Sala de Sesión, para dar paso a la deliberación y calificación por parte del Jurado.

Al término de la deliberación del Jurado, el Dr. Galo Patiño Camargo, invitó al candidato y al público a pasar a la Sala de Sesión, para dar lectura al Acta de sustentación, en cuyo contenido se ha registrado la nota obtenida por el bachiller, la misma que ha sido de:

APROBADO CON HONORES
(MENCION)

18
(NÚMERO)

Dieciocho
(LETRAS)

Finalmente, el presidente del Jurado, propone al consejo de la Facultad que se le declare Licenciado en Física al Bachiller Cristofher Victor Vivas Palomares. Siendo las 16:30h. Horas, se levanta la Sesión.

Ciudad Universitaria, 14 de agosto del 2023

Dr. Galo Patiño Camargo
PRESIDENTE

Dr. Erick Oscar Natividad Zevallos
MIEMBRO

Mg. José Fernando Márquez Pachas
ASESOR

Mg. Eduardo Becquer Carrasco Solís
SUPLENTE



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Jose Fernando Marquez Pachas en mi condición de asesor acreditado con el Acuerdo del comité de Gestión N°044-EPF-FCF-23 de la tesis, cuyo titulo es ***Interaccion de nanoparticulas de plata con medio de cultura celular suplementado: Impacto en la formacion de la biocorana***, presentado por el bachiller Cristofher Victor Vivas Palomares para optar el título profesional de Licenciado en Fisica mediante la modalidad M1- por suste-tación de tesis profesional **CERTIFICO** que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Academicos de Investigación y Producción Intelec-tual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el do-cumento evaluado cuenta con el porcentaje de cuatro por ciento (4%) de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.

Firma del Asesor

DNI: 21824638

Nombres y apellidos del asesor: Jose fernando Marquez Pachas



Dedico este trabajo a mis padres, hermanos y abuela, por
todo el apoyo y cariño brindado.

Agradecimientos

A mis abuelos, por los sabios consejos que siempre me dieron desde pequeño.

A mis padres y hermanos, por el apoyo y comprensión.

A Fernando Marques, por el asesoramiento en este trabajo y por todo que me enseñó.

A los profesores: Antonio Bloise, Koeti Araki y Adriano Alencar por el apoyo en los periodos de máquinas.

A mis amigos de graduación, Luis, Rodrigo y Erick por buenos momentos durante estos años

A CAPES por el apoyo financiero para la adquisición de insumos básicos para la realización de este trabajo.

Índice

Lista de tablas	6
Lista de figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción	13
1.1- Las nanopartículas de plata y sus propiedades	13
1.2- Medio de cultura suplementado	15
1.3- Objetivos	17
2- Métodos Experimentales	18
2.1- Dispersión dinámica de luz (DLS)	18
2.2- Potencial zeta (ZP)	20
2.3- Dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS)	22
2.4- Absorción ultravioleta visible (UV-vis)	24
2.5- Cámara de Neubauer	26
3- Metodología	27
3.1- Materiales	27
3.2- Preparación de las muestras	27
3.3- Protocolo de preparación de muestras según el tipo de estudio	28
3.3- Métodos experimentales	31
3.3- Procesamiento estadístico de datos	33
4- Resultado y Discusión	34

4.1- Caracterización de las Nanopartículas de plata en medios de cultivo	34
4.2- Estudios de efectos citotóxicos de las bio-proteínas/AgNPs en las células	48
5- Conclusiones	53
Apéndice	55
Bibliografía	58

Lista de Tablas

Tabla 1: Valores del radio de la corona bio-proteica en (nm) obtenida para las diferentes concentraciones de AgNPs, tras 24 y 48 horas de incubación 47

Lista de Figuras

- Figura 1: Síntesis de nanopartículas de plata con estructuras diferentes: (A) pirámide, (B) dodecaedro, (C) esfera y (D) cilindro. Figura modificada de “Deamstime.com”. 13
- Figura 2: Figura esquemática del DMEM alta-glucosa (A), Suero fetal bovino (B) y del medio de cultura suplementado para células (C). 15
- Figura 3: Diagrama de un experimento de dispersión de luz dinámica 19
- Figura 4: Esquema de la distribución de cargas en la frontera de una partícula cargada 20
- Figura 5: Ilustración experimental de una medida de SAXS 22
- Figura 6: Ilustración experimental de la técnica de absorción UV-vis. 24
- Figura 7: Ilustración de cámara Neubauer 26
- Figura 8: Estrategia planeada para los estudios de caracterización de las AgNPs en DMEM, 10% SFB y DMEM+10%SFB. El número de réplicas por muestra fue repetido 3 veces, para garantizar una buena estadística. 29
- Figura 9: Tratamiento con las nanopartículas de plata en función de la concentración (, 25, 50, 75 y 100 μM) y de los intervalos de tiempo de cultivo (24 horas y 48 horas). El número de réplicas por muestra fue repetido 4 veces, para garantizar una buena estadística. 31
- Figura 10: Caracterización, con SAXS (A), DLS (B), UV-vis (C) y ZP (D), para el AgNPs-stock (250.3 μM), tras 24 y 48 h de incubación a 37 °C. 35
- Figura 11: Caracterización con DLS (A), ZP (B) y UV-vis (C) del suero fetal bovino diluido en agua ultra pura , después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C. 36
- Figura 12: Caracterización con DLS (A), y UV-vis (B) del DMEM diluido en agua ultra pura, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C 37
- Figura 13: Caracterización, con DLS (A), SAXS (B), ZP (C) y UV-vis (D), para el DMEM+10% SFB, tras 24 y 48 h de incubación a 37 °C. 38
- Figura 14: Caracterización con UV-vis (A), DLS (B), ZP (C) e imágenes de turbidez (D) para las diferentes concentraciones molares de plata, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C. Llave: Los resultados del stock -AgNPs y 10% SFB son mostrados en los mismo gráficos para fines de comparación 39
- Figura 15: Caracterización con UV-vis (A), DLS (B) e imágenes de turbidez (C) para las diferentes concentraciones molares de plata, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C. Llave: Los resultados del stock -AgNPs y DMEM son mostrados en los mismo gráficos para fines de comparación.
- Figura 16: Caracterización con UV-vis (A), SAXS (B), DLS (C), ZP (D) e imágenes de turbidez para las diferentes concentraciones molares de plata, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C. Llave: Los resultados del stock -AgNPs y DMEM+10%SFB son mostrados en los mismo gráficos para fines de

Figura 17: Modelos ilustrativos de la interacción de las AgNPs con las: (A) sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas del DMEM (puntos de color naranja, verde y púrpura), (B) proteínas albuminas, globulinas y hemoglobinas del SFB (estructuras de color rojo, verde, amarillo y celeste) y (C) la combinación de estos agregados biomoléculas/proteínas del DMEM+SFB. Los puntos de color celeste representan la solución de agua ultra pura, entretanto las líneas de color azul que se encuentran en la superficie de la nanopartícula, las moléculas de citrato utilizado como estabilizador.

46

Figura 18: (A) El número de células viables y (B) valores medios del área celular son mostrados en función de la concentración molar de AgNPs para las tres líneas de células tras 24 y 48 h de exposición. Los EC50 también son incluidos en este gráfico. Llave: el número de células viables fue obtenido en una cámara de Neubauer, y las áreas celulares a través de un microscopio invertido LEICA mc170HD y un escalímetro, asumiendo estas como discos superficiales

49

Figura 19: Modelo ilustrativo del proceso de internalización de las bio-prteina/AgNPs en las células a través de la interacción con las proteínas receptoras de la membrana celular.

51

Abreviaturas

AgNPs	Nanopartículas de plata
Bio-proteínas/AgNPs	Bio-nanopartículas de plata
FN1	Células fibroblastos
HUVEC	Células endoteliales
RAW	Células macrófagos
SFB	Suero fetal bovino
DMEM	Medio de cultura celular
DMEM+10% SFB	Medio de cultura celular suplementado

Resumen

El amplio y promisor potencial terapéutico de las nanopartículas de plata (AgNPs) hace con que estudiar sus efectos biológicos sea un tema relevante y actual para el campo biomédico. En este trabajo caracterizamos AgNPs con tamaños de 40 nm en medio de cultura suplementado con soro fetal bovino y estudiamos sus efectos citotóxicos en células que participan en la regeneración del tejido epitelial: fibroblasto, endoteliales y macrófagos. Fueron planeados exposiciones para las células de tipo dosis y tiempo dependientes. Los resultados de la caracterización revelan una fuerte interacción entre las AgNPs y biomoléculas del medio de cultura, llevando a la formación de una nueva entidad llamada “bio-proteína/AgNPs” que presenta variaciones de tamaño en función de la concentración y de tiempo, pero no del núcleo duro de las AgNPs. Abordando los aspectos de citotoxicidad de las bio-proteína/AgNPs, fueron observadas importantes alteraciones en las tres líneas celulares, con un decrecimiento sistemático en la población celular viable acompañado de cambios en las áreas celulares cuando la concentración de las bio-proteína/AgNPs aumenta.

Palabras claves: bio-proteína/AgNPs, Fibroblasto, Endoteliales, Macrófagos y Citotoxicidad.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have a wide range of therapeutic potential, which has led to the development of research on their biological effects, a current and relevant topic in biomedicine. In the current study, we described AgNPs with a 40 nm diameter in culture medium supplemented with bovine fetal serum and investigated their cytotoxic effects in particular cells that participate in tissue regeneration, such as fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. For cells, treatments were designed based on dosages and incubation durations. According to the results of the characterization, there was a significant interaction between the AgNPs and the medium's biomolecules, resulting in the creation of a new substance called "bio-protein/AgNPs" that exhibits size fluctuations as a function of concentration and duration but not of the hard core of AgNPs. Regarding the cytotoxicity of bio-protein/AgNPs, significant variations were observed in the three cell lines, including systematic degrowth in the viable cell population and cellular area alterations as the bio-protein/AgNP concentration increased..

Key words: bio-protein/AgNPs, Fibroblast, Edothelial, Macrophage and Citotoxicity .

Introducción

1.1 Las Nanopartículas de plata y sus propiedades

Debido a los recientes avances en producción de nanopartículas, es posible sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) de 40 mil hasta 5 mil átomos en un intervalo de tamaños que oscila entre 1 y 110 nm de diámetro a través de métodos biológicos, químicos y físicos (Naganthran et al, 2022). En general, se pueden producir nanopartículas de plata en una variedad de tamaños, formas, cargas superficiales y estructuras de núcleo (ver figura 1). (Loiseau et al., 2019). Estas propiedades morfo eléctricas de las nanopartículas son aprovechadas para realizar una variedad de tareas en los campos agrícola, industrial y médico (Dikshit et al., 2021).



Figura 1: Síntesis de nanopartículas de plata con estructuras diferentes: (A) pirámide, (B) dodecaedro, (C) esfera y (D) cilindro. Figura modificada de “Deamstime.com”.

Debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias, las nanopartículas de plata se utilizan en la industria médica como tratamientos terapéuticos (Xu et al., 2020). De acuerdo con Garcia-Alvares et al. (2018), las nanopartículas de plata

también presentan ventajas en el campo de transporte de fármacos en comparación con los transportadores convencionales.

1.1.1 Propiedad antitumoral

A pesar de estas propiedades, todavía hay discusiones sobre los efectos toxicológicos de las nanopartículas de plata. Por un lado, se han documentado efectos toxicológicos significativos en sistemas de modelos celulares *in vitro* (Castiglioni et al., 2014), y por otro lado, los hallazgos de la investigación actual indican que la citotoxicidad inherente de las AgNPs puede ser una herramienta útil para tratar células tumorales. En realidad, los efectos citotóxicos de las AgNPs pueden causar la muerte de células tumorales a través de la inactivación de proteínas y la regulación de vías de señalización, o pueden bloquear la metástasis de células tumorales inhibiendo la angiogénesis dentro de la lesión (Yang et al., 2016 y Castiglioni et al., 2014). En otro estudio, Nguyen y colegas demostraron que las nanopartículas esféricas de AgNPs con tamaño de 10.72 nm inhibieron la proliferación de células de cáncer de mama (MCF-7) y carcinoma hepatocelular (HepG2). Narasimha et al. también sintetizaron AgNPs de extracto de hojas de eucalipto para tratar líneas de células tumorales colorectal. Las nanopartículas de plata de forma esférica de 20 nm de tamaño aumentaron la expresión de genes apoptóticos y disminuyeron la expresión de marcadores antiapoptóticos en el ciclo celular.

Es demostrado que dependiendo de la biodistribución y captación celular de las nanopartículas de plata, diferentes efectos citotóxicos y eventos bioquímicos pueden ser inducidos (Nguyen et al., 2021 y Narasimha et al 2020). Por lo tanto, es crucial desarrollar nuevos métodos que faciliten una internalización más efectiva o simple de las nanopartículas de plata en las células.

1.1.2 Propiedad de formar la corona de proteína

Las nanopartículas de plata cuando entran en contacto con proteínas o biomoléculas, se adsorben rápidamente en las superficies de las nanopartículas, formando una corona de proteínas o biomoléculas dura. La nueva identidad de esta nanopartícula biológica se caracteriza por tener una afinidad única con las proteínas receptoras de las membranas celulares (Ma et al., 2020), utilizándose en los últimos años en estrategias de transporte de drogas dentro de las células (Mariam et al., 2016). Por ejemplo, se demostró que nanopartículas basadas en albumina se acumulan

fácilmente en tumores debido a la interacción de la albumina con la glicoproteína de la matriz extracelular que se sobre expresa en células cancerosas (Li et al., 2019). A pesar de estos grandes avances, estudios han mostrado que la adsorción de biomoléculas o proteínas pueden alterar las características físicas o químicas de las nanopartículas de plata como forma, tamaño, estado de aglomeración y estabilidad coloidal (Sasidharan et al., 2015). En consecuencia, cambios en la captación celular, localización intracelular, acumulo en tumores y toxicidad fueron relatados (Karmali and Simber, 2011). En ese escenario, es importante entender las interacciones que ocurren en la interface de la corona biomolecular.

1.2 Medio de cultura celular suplementado

El medio de cultura celular DMEM (Dulbecos Modified Enagle médium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) es un medio basal ampliamente usado para el crecimiento, proliferación y diferenciación de diferentes tipos de células (Yao et al., 2017). La albumina, es la mayor componente proteica en el suero fetal bovino y presenta importantes funciones fisiológicas tales como la regulación de la presión oncótica de la sangre, hormonas y fármacos contra el cáncer (Mariam et al 2016). En adición a la albumina, globulina y hemoglobina son también componentes del SFB y contribuyen aproximadamente un 35% de la proteína contenida en el SFB. En la familia de la globulina, γ -globulina es una de las más importantes proteínas en el suero, a cual esta activamente envuelta en los procesos de respuestas inflamatorias (Li et la., 2021). La hemoglobina es una proteína funcional importante para el transporte reversible de oxígeno y la regulación del pH de la sangre (Scheller et al., 2005).



Figura 2: Figura esquemática del DMEM alta-glucosa (A), Suero fetal bovino (B) y del medio de cultura suplementado para células (C).

Actualmente, es bien sabido que las nanopartículas de plata pueden interactuar con la albumina, γ -globulina y hemoglobina del suero fetal para formar la corona de proteínas alrededor de las nanopartículas (Li et al., 2022). El mecanismo de interacción ha sido extensamente caracterizado en los últimos tiempos, mostrando espontaneas fuerzas hidrofobicas para el sistema AgNPs-albumina (Waghmare et al., 2018), enlaces de hidrógeno e interacciones de Vander Waals entre γ -globulina y AgNPs (Sharma et al., 2022), y procesos de unión impulsado por la entropía para hemoglobina-AgNPs (Zolghadri et al., 2009). A pesar de estas importantes caracterizaciones, estudios también mostraron que proteínas como el fibrinógeno pueden inducir estados de agregación no reversibles en las nanopartículas de plata (Abhilash, et al., 2015), revelando que tales modificaciones pueden causar reducción en la internalización de las nanopartículas dentro das células (Yan et al., 2013). Con respecto a la interacción entre las nanopartículas de plata y las biomoleculas y proteínas del DMEM suplementado con SFB, un estudio anterior ha mostrado la adsorción de proteínas del medio de cultivo a la superficie de la AgNPs para formar la proteína de corona (Hasen et al., 2015). Sin embargo, la estabilidad en el tiempo de las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs y la composición química de la corona son pobremente entendidas, así como el grado de internalización de AgNPs-DMEM/FBS en las células.

En este trabajo de licenciatura fueron evaluadas las propiedades morfo-eléctricas de las nanopartículas de plata en un ambiente nutricional comúnmente utilizado para el cultivo celular (DMEM+ 10%SFB) a diferentes concentraciones y tiempos de incubación, a través de experiencias de dispersión dinámica de luz (DLS), potencial zeta (ZP), dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) y de absorción Ultravioleta-visible (UV-vis). Finalmente en orden de corroborar el resultado biológico de este hallazgo, el grado de internalización del aglomerado corona biomoleculas-proteína/AgNPs fue estudiado en células que participan en la regeneración y reparación el tejido tales como células endoteliales micro vasculares humanas, células fibroblastos humanas y macrófagos murinos, a través de ensayos de citotoxicidad en Cámara Neubauer .

1.3 Objetivos

En esta tesis de licenciatura:

- Nuestro primer objetivo es demostrar la capacidad de las proteínas y biomoléculas del suero fetal bovino y medio de cultivo, respectivamente, para adherirse alrededor del núcleo duro de las nanopartículas de plata formando una bio-estructura compleja en 3D esquematizada aquí, pueda permitir una fácil y rápida internalización de las AgNPs dentro de las células.
- Nuestro segundo objetivo es encontrar un efecto de dosis dependientes de la biomoléculas-proteína/AgNPs en las células micros vasculares humanos, fibroblastos humanos y macrófagos murinos, demostrando que la citotoxicidad de las nanopartículas puedan ser usadas para controlar tasas de proliferación celular y entres otras propiedades celulares.

Métodos experimentales

Los principios físicos fundamentales de los métodos experimentales utilizados en este trabajo se presentan en este capítulo. Debido a la variedad de métodos utilizados, se presentarán aquí de manera breve y dirigida a nuestros estudios.

2.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de dispersión dinámica de luz está basada en el movimiento browniano y en la dispersión de luz por partículas, permitiendo así la evaluación de las dimensiones de partículas en suspensión, con aplicaciones tanto en la investigación como en la industria (Pecora, 2000).

El movimiento browniano de una partículas en suspensión resulta en el hecho de ella estar continuamente siendo bombardeada por las moléculas del medio solvente, las cuales están en constante agitación térmica (Person, 1905). El modelo aleatorio es el modelo probabilístico más sencillo que puede explicar el movimiento browniano de las partículas utilizando las leyes de difusión macroscópicas (Person, 1905). Con este modelo, el desplazamiento a través del espacio y tiempo de la partícula en difusión puede ser estudiada a partir de distribución binomial. Trabajos muestran que una distribución binomial puede convergir hacia una distribución normal gaussiana (Roque, 2016). Como resultado de esto, tenemos una función de probabilidad gaussiana de desplazamiento de partícula que relaciona los parámetros de posición (Δr), tiempo (τ) y difusión (D), como se muestra en la ecuación 1:

$$p(\Delta r, \tau) = \left(\frac{1}{4\pi D \cdot \tau} \right) \cdot e^{-\Delta r^2 / 4D \cdot \tau} \quad (1)$$

El valor de la difusión de la función de probabilidad gaussiana, puede ser encontrado a partir de la ecuación 2 de Stokes-Einstein (Carter, 2001), considerando partículas en movimiento browniano de forma esférica con diámetro (d),

$$D = \left(\frac{K_b T}{3\pi\eta d} \right) \quad (2)$$

donde (T) y (η) son la temperatura y viscosidad del medio, y (K_b) la constante de Boltzmann,

Experimentalmente la técnica de DLS consiste en la iluminación con un haz de luz visible incidente de vector de onda, \mathbf{k}_i , sobre una muestra compuesta por partículas en movimiento browniano, que irán a dispersar el haz de luz con vector de onda, \mathbf{k}_e , en un ángulo, θ . Ver figura 3.

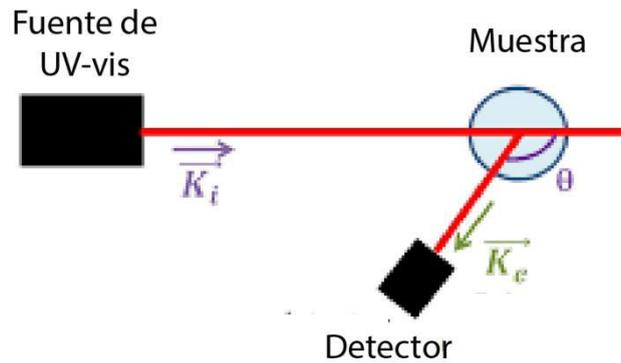


Figura 3: Diagrama de un experimento de dispersión de luz dinámica

Como se muestra, el constante movimiento de partículas en el tiempo, generaría cambios en el campo eléctrico dispersado. Con esto, la intensidad de la luz sufriría cambios en el tiempo. La correlación de la variación en la intensidad de luz dispersada proporcionará información sobre el coeficiente de difusión y del tamaño de la partícula, utilizando la ecuación 2 de Stokes Einstein.

Ese análisis es hecho por un correlador, que calcula la función de auto correlación de la intensidad de luz dispersada normalizada $g^{(2)}(\tau)$, la cual es calculada a partir de la función de probabilidad gaussiana (ecuación 1), mostrando así un decaimiento exponencialmente con una tasa, $\Gamma = Dq^2$, según la, ecuación 3.

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + e^{-2Dq^2\tau} \quad (3)$$

De este modo, fue calculado la tasa de relajación media, que, por su vez, puede ser relacionado al coeficiente de difusión, D . Una vez obtenido el coeficiente de difusión de los centros dispersadores, libre de interacciones con relación a los demás centros, es posible determinar el diámetro, d , asumidas esferas, de acuerdo con la ecuación de Stokes- Einstein.

2.2 Potencial zeta (ZP)

La técnica de potencial zeta ha sido ampliamente utilizado como un buen indicador de presencia de carga superficial, permitiendo fornecer informaciones como la estabilidad de suspensiones coloidales (Shimko et al., 2014).

En la frontera entre la camada móvil y la camada inmóvil, se encuentra la camada donde el potencial zeta (ζ) puede ser determinado y una densidad de carga puede ser inferido (ver figura 4) (Hotza, 1997).

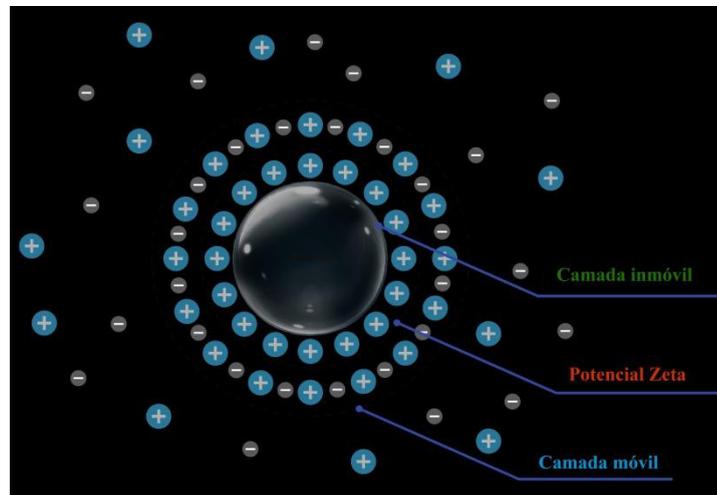


Figura 4 Esquema de la distribución de cargas en la frontera de una partícula cargada.

Experimentalmente, el potencial zeta es obtenido a partir de la movilidad electroforética (μ), (Wilson et al., 2010). El equipo es capaz de medir de la movilidad electroforética de partículas que se mueven en un campo eléctrico (E) a partir del cambio de frecuencia de la luz dispersada (Shimko et al., 2014). El cambio de frecuencia de luz dispersada ($\Delta\nu$) es relacionada con el módulo de la velocidad de desplazamiento que las partículas adquieren (v_d), como mostrado en la ecuación (4).

$$v_d = \left(\frac{2\pi \Delta\nu}{q \cos(\theta/2)} \right) \quad (4)$$

El módulo de velocidad de las partículas se relacionan con el modulo del campo eléctrico aplicado a través de la movilidad electroforética, según la expresión:

$$\mu = \frac{v_d}{E}. \quad (5)$$

El potencial zeta (ζ) es relacionado con la movilidad electroforética (μ), a través de la aproximación de Smoluchowski. En esta aproximación, se considera las partículas esféricas y que

su radio, es mucho mayor que la espesura de la doble capa formada. Con estas condiciones, el potencial zeta en la capa de cizallamiento puede ser encontrado según la ecuación 6 (para mayores detalles de la obtención del potencial, revisar el autor Hiemenz, 1960)

$$\zeta = \frac{\eta v_d}{\epsilon E}, \quad (6)$$

donde, v_d , es la velocidad relativa entre la partícula y el medio circundante, ϵ , la constante dieléctrica y, η , la viscosidad del solvente. En términos de movilidad electroforética, podemos cambiar la ecuación (6) para obtener la ecuación de Smoluchowski:

$$\mu = \frac{v_d}{E} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta}. \quad (7)$$

2.3 Dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS)

El método de rayos X bajos ángulos está basada en el análisis de dispersión de rayos X de un material a ángulos muy pequeños. Cualquier evento de dispersión es caracterizado por una ley recíproca entre tamaño de la partícula y el ángulo de dispersión (Glatter e Kratky, 1982). El SAXS ha sido ampliamente utilizado para estudios estructurales de proteínas y de macromoléculas biológicas (Schmidt, 1995).

En las experiencias de SAXS, un haz de rayos X que sale de la fuente del equipo atraviesa un monocromador responsable por seleccionar un pequeño intervalo de longitudes de onda de la orden de 0.1 nm aproximadamente. Entonces, el haz monocromático pasa por un colimador con un vector de onda, \mathbf{k}_0 , e interacciona con los electrones de la muestras haciendo con que los mismos oscilen sinodalmente. La radiación emitida de cada electrón es dispersada, siendo cancelada en algunas direcciones y en otras superpuestas (interferencia constructiva. Cuando las ondas interfieren constructivamente, la diferencia de fase entre los haces dispersados con vector de onda, \mathbf{k}_s , es considerada pequeña. Adicionalmente, la intensidad del haz detectado alcanza su valor máximo para un ángulo de dispersión, 2θ , conforme ilustra la figura 5.

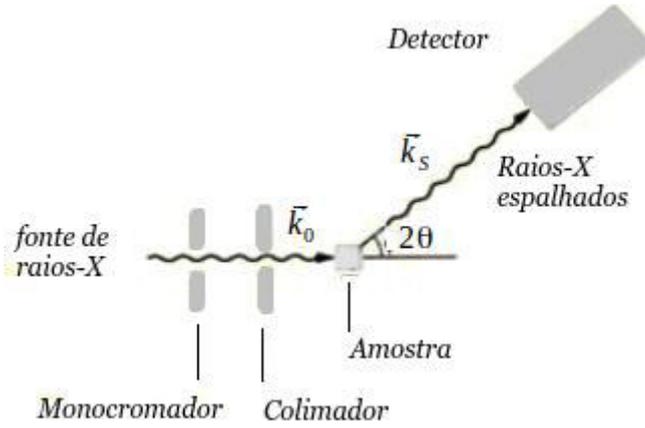


Figura 5: Ilustración experimental de una medida de SAXS

Ahora, introduciremos la densidad electrónica, $\rho(\vec{r})$, como el número de electrones por unidad de volumen y posición, \vec{r} , de una partícula que está fija en el espacio. Por lo tanto, la amplitud de dispersión total, $A(\vec{q})$, irradiada por los electrones, contenidas en la partícula de volumen, V , es dada por la transformada de Fourier de la densidad electrónica:

$$A(\vec{q}) = A_e \int_V \rho(\vec{r}) \cdot e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r}, \quad (8)$$

donde, A_e , denota la amplitud de dispersión de un electrón.

La intensidad de dispersión por la partícula, $I_0(\vec{q})$, puede ser mensurada por medio del producto de la amplitud por la amplitud compleja, $A(\vec{q})^*$, por lo tanto, la ecuación (8) se reduce a la ecuación (9).

$$I_0(\vec{q}) = I_e \int_V \rho^2(\vec{r}) \cdot e^{-i\vec{q} \cdot (\vec{r}-\vec{r}^*)} d\vec{r}. \quad (9)$$

Hasta ahora las consideraciones hechas fueron para una partícula fija en el espacio. No en tanto, en sistemas reales, las partículas no están fijas. Por lo tanto, debemos tomar a media sobre todas las orientaciones de la partícula. En el espacio recíproco esto es hecho tomándose la media sobre el ángulo sólido Ω , el cual lleva, $\langle e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \rangle_{\Omega} = \frac{\sin(qr)}{qr} dr$, (Debye, 1965) y la ecuación (9) se reduce a la forma:

$$I_0(\mathbf{q}) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \cdot \frac{\sin(qr)}{qr} dr, \quad (10)$$

Donde la función, $p(r)$, es llamada de distribución de pares de distancias que informa acerca de la estructura de las partículas a partir de la intensidad dispersada $I_0(\mathbf{q})$.

Hasta ahora, el modelo estudiado se centró en la dispersión de una sola partícula. La intensidad de dispersión de un sistema de partículas en solución aleatoriamente orientadas se escribe por la ecuación,

$$I(\mathbf{q}) = N \langle \mathbf{P}(\mathbf{q}) \rangle \cdot \langle \mathbf{S}(\mathbf{q}) \rangle \quad (11)$$

donde N es al número de partículas, y $\mathbf{P}(\mathbf{q})$ y $\mathbf{S}(\mathbf{q})$, son los factores de forma y estructura de la nanopartículas, respectivamente.

Si, el sistema fuere mono disperso, la forma de las partículas no cambia y $\mathbf{P}(\mathbf{q}) = I_0(\mathbf{q})$. Si el sistema fuere poli disperso, el factor de forma incluirá la media de todas las formas, tamaños y densidad electrónicos. Para sistemas diluidos (no interacción), $S(q)$ es aproximadamente uno, y la intensidad dispersada solo dependerá del factor de forma, $\mathbf{P}(\mathbf{q}) \approx I(\mathbf{q})$. Para sistemas concentrados, $S(q)$, debe ser llevado en cuenta, a fin de que la intensidad de dispersión sea perfectamente entendida.

2.4 Absorción Ultravioleta visible (UV-vis)

Hay dos formas en que la radiación electromagnética puede afectar a la materia: o se dispersa en su dirección de propagación y se altera como se explica en la sección 2.1; o se absorbe, transfiriendo energía a la materia. En el proceso de absorción de la radiación, la energía absorbida por la materia está relacionada con la frecuencia, ν , de esta radiación, a través de la relación, $E = h\nu$, donde h es la constante de Planck (Resnick, 1979).

De acuerdo con la mecánica cuántica, una transición electrónica ocurre cuando un electrón sale de un orbital de estado fundamental de energía, $E_1(\mathbf{r})$, y va para otro orbital desocupado de mayor energía, $E_2(\mathbf{r})$, a través de la absorción de un fotón con energía, $h\nu_a$.

$$E_1(\mathbf{r}) - E_2(\mathbf{r}) = h \nu_a \quad (12)$$

La transición electrónica ocurre en un tiempo corto, 10^{-15} segundos, durante el cual las posiciones nucleares no se alteran en cuanto los electrones asumen configuraciones de estado excitado.

Experimentalmente, la luz absorbida por una molécula puede ser encontrada a través de medidas de absorbancia en función de la longitud de onda de la luz incidente, conforme indicado en la figura 6. Lambert observó empíricamente, que es posible relacionar la absorbancia con la concentración de la muestra y el cambio per corrido por la luz dentro de la misma.

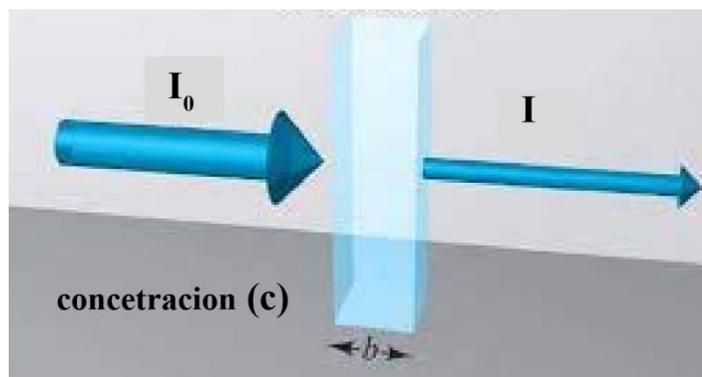


Figura 6: Ilustración experimental de la técnica de absorción UV-vis.

El diferencial de intensidad, dI , a lo largo del camino per corrido por la luz, puede ser escrito como,

$$dI(y) = -\epsilon C I(y) dy \quad (13)$$

donde, ϵ , es el coeficiente de absorción molar y C la concentración la muestra. Integrando la ecuación (13) para toda la extensión de la muestras, de 0 a b , encontramos que,

$$\ln\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right) = \epsilon C b. \quad (14)$$

La absorbancia se define como,

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right) \quad (15)$$

y convirtiendo para el logaritmo en la base 10, la ecuación (15), tenemos:

$$A(\lambda) = \left(\frac{\epsilon}{\log 10}\right) C d = \epsilon^* C b. \quad (16)$$

Por lo tanto, se encuentra la absorbancia como,

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}}\right) = \epsilon^* C b \quad (17)$$

donde, ϵ^* , es nuevamente el coeficiente de absorción molar (en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), C es la concentración (en $mol \cdot L^{-1}$) de especies absorbentes y, b , (en cm) es el camino óptico por donde la luz fue absorbida, o sea, la espesura de la muestra (Cantor et al., 1980).

2.5 Cámara de Neubauer

Existen dos métodos para evaluar la cantidad de células viables en un medio de cultivo celular. Como forma de cuantificación directa, el método más común es el conteo por cámara de Neubauer (Fiocruz et al., 2017); entretanto, la forma indirecta es hecha por la medición del metabolismo celular.

Para el conteo en cámara, las células deben estar totalmente individualizadas. Para esto, es necesario hacer una tripsinización previa. La cámara de Neubauer es una lámina de vidrio con divisiones que auxilian en el conteo, poseyendo 9 cuadrados que miden 1mm de área, como mostrado en la figura 7. Solamente los cuadrados externos son utilizados en el conteo de células.

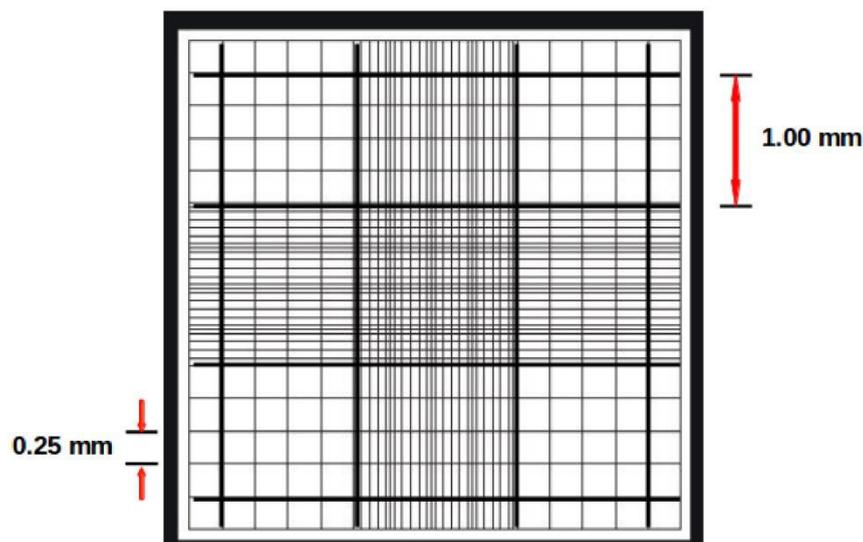


Figura 7: Ilustración de la cámara Neubauer

Para el conteo, es necesario colocar una laminilla de vidrio sobre la cámara, que servirá para contar la suspensión celular. El espacio formado entre la laminilla y la cámara es de 0.1 mm. De esta manera, el volumen determinado para cada cuadrado es equivalente a 0.1 mm^3 . La

concentración de células obtenidas, equivale a la suma del número de células contadas en los 4 cuadrantes dividido por 4 y multiplicado x 10^4 y m (factor de corrección de la cámara). La ecuación de abajo (18), resume el cálculo de la concentración celular,

$$N\left(\frac{cel}{ml}\right) = \left(\frac{c_1 + c_2 + c_3 + c_4}{4}\right) \cdot 10^4 \cdot m \quad (18)$$

donde, c_i , es el valor de conteo de células en un cuadrante.

Metodología

En este capítulo, serán presentados los materiales utilizados en el estudio, así como la descripción de las metodologías utilizadas en la preparación de las muestras, como la síntesis de las nanopartículas, cultivos celulares, etc .

3.1 Materiales

Medios de cultura: adquiridos de la Sigma-Aldrich (Missouri, United States)

- Duplecco modified eagle médium (DMEM)
- Suero fetal bovino (SFB) inactivado/estéril

Nanopartículas de plata: fue obtenida en colaboración con el Prof. Koeti Araki del Laboratorio de Química Supramolecular e Nanotecnología del Instituto de Química, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Células: adquiridas de la American Type Culture Collection (ATTC, Virginia, United States)

- Endoteliales micro vasculares humanas (HUVEC).
- Fibroblastos humano normal (FN1).
- Macrófagos murinos (RAW)

3.2 Preparación de las muestras

3.2.1 Preparación de medios de cultura

- ❖ La solución de medio de cultura stock DMEM, fue utilizada en su condición basal sin la adición de ningún solvente.
- ❖ La solución de medio de cultura 10% SFB, fue preparada a través de la dilución de 50 mL

de Suero fetal bovino en 450 mL de agua ultra pura padrón Milli-Q (18 MΩ.cm).

- ❖ La solución de medio de cultura DMEM suplementado con 10% SFB, DMEM+10% SFB, fue preparada a través de la dilución de 50 mL de Suero fetal bovino en 450 mL de DMEM

3.2.2 Preparación de las Nanopartículas de plata

Las dispersiones estables de AgNPs, fueron sintetizadas utilizándose una adaptación del método Turkevich (Turkevich et al., 1951). El método consiste en el reflujo de la sal de plata con ácido cítrico, el cual actúa como agente estabilizador, en solución acuosa.

En resumen, 4.25 mg de nitrato de plata (anhidro $\geq 99.999\%$ base de metales) fue solubilizado en 100 mL de agua ultra pura y calentada. En seguida, 1 mL de una solución de ácido cítrico con 0.5 mol. L^{-1} , fue adicionado a la solución de plata hirviente, y mantenido en agitación por 5 minutos. En seguida, el volumen final de la reacción fue dejado para enfriar a temperatura ambiente y en seguida filtrada a través de una jeringa membrana celulosa estéril de $0.2 \mu\text{m}$. Finalmente, la concentración real de la plata elemental fue de 27.3 mg/L ($250.4 \mu\text{M}$) de plata determinada por ICP-OES y almacenada en refrigeración a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3 Construcción del banco de células

El proceso de construcción del “banco celular” de las tres líneas celulares endoteliales, fibroblastos y macrófagos, consiste en el uso del protocolo de nuestro laboratorio (LabM2) (ver anexo 1). El uso de este protocolo nos dejó una cantidad de 25 vials, conteniendo cada vial aproximadamente 2×10^6 células, construyendo así, un banco celular que fue usado en nuestras experiencias.

3.3 Protocolo de preparación de muestras según el tipo de estudio

3.3.1 Para la caracterización de las AgNPs en medios de cultivo

La preparación de muestras para caracterizar las AgNPs en medio fisiológico de cultura celular, pasaron por dos controles.

- Dilución de la dispersión stock de AgNPs ($250.3 \mu\text{M}$). Volúmenes de la solución stock de

AgNPs fueron diluidas con los diferentes medios de cultivo DMEM, 10%SFB y DMEM+10%SFB, obteniéndose así diferentes concentraciones molares de plata como 25, 50, 75 y 100 μM (figura 8).

- Incubación en diferentes tiempos. Después de la obtención de las concentraciones, estas fueron alícuotadas adicionando 1.5 mL de la muestra en pozos de cultivo y en seguida colocadas dentro de la incubadora, utilizando las mismas condiciones de cultivo para células. Estas fueron dejadas incubadas por 24 y 48 h en una incubadora con 95% de aire previamente filtrado y con 5% de dióxido de carbono a 37°C. Después de la incubación para cada intervalo de tiempo, las experiencias de DLS, SAXS, ZP, UV-vis e imágenes de turbidez fueron realizadas (figura 8). La descripción de las metodologías experimentales utilizadas en cada experimento serán detalladas en la subsección 3.4.

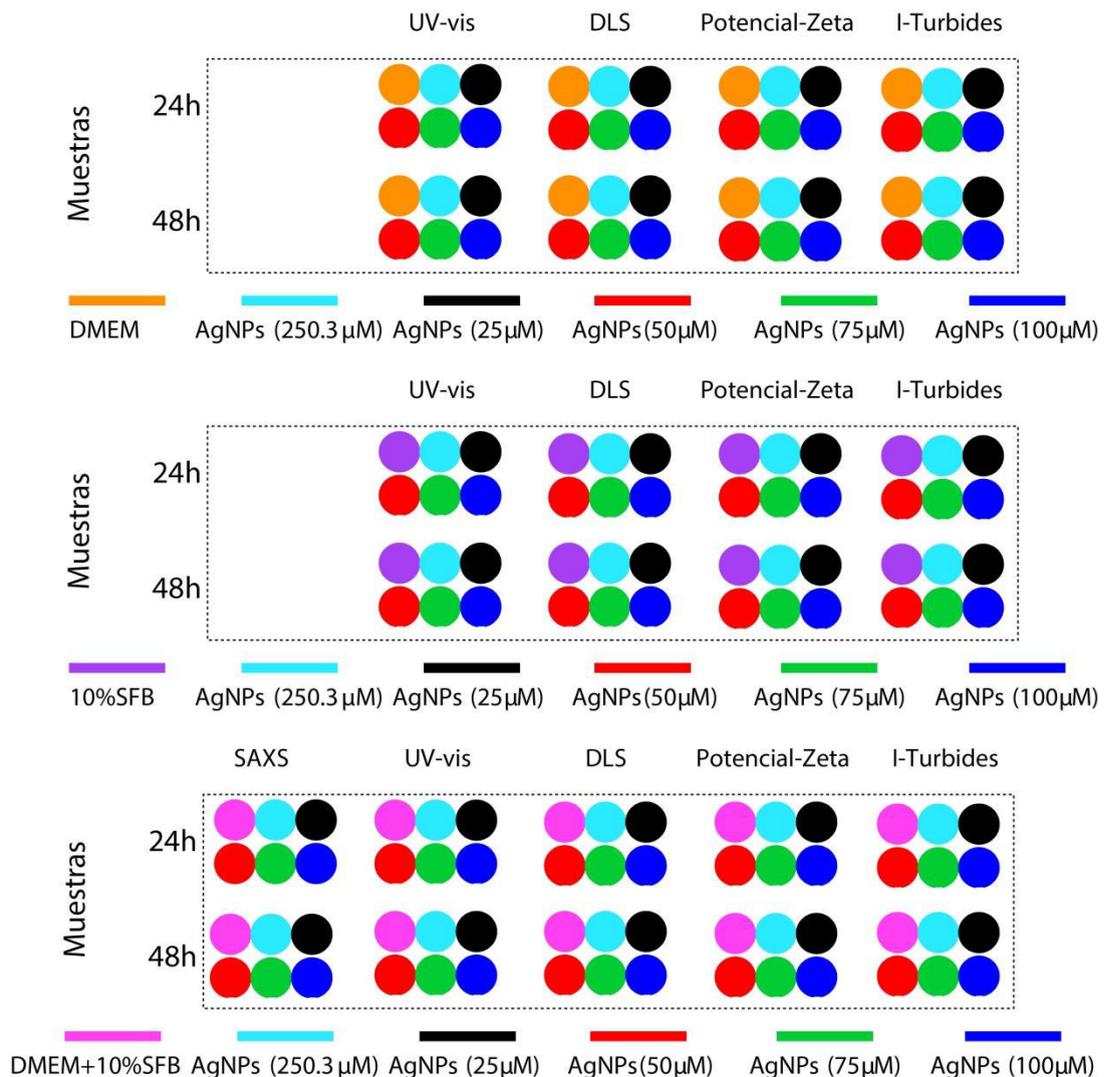


Figura 8: Estrategia planeada para los estudios de caracterización de las AgNPs en DMEM, 10% SFB y DMEM+10%SFB. El número de réplicas por muestra fue repetido 3 veces, para garantizar una buena estadística.

3.3.2 *Para estudiar los efectos citotóxicos de las AgNPs en las células*

Para satisfacer las demandas del experimento, las células endoteliales, los fibroblastos y los macrófagos pasaron por tres etapas diferentes.

- Descongelamiento de células. Las tres líneas celulares fueron descongeladas y colocadas en cultura nuevamente conforme descritos anteriormente (anexo 1). Al final de este proceso, las líneas celulares fueron contadas manualmente con el auxilio de le hemocito metro, obteniéndose stocks celulares con concentraciones de $\approx 4 \times 10^6$ cel/mL, en 2 mL de medio de cultura.
- Plaqueamiento de las células. Después de la obtención de los stocks celulares para cada línea, estas fueron paqueadas de acuerdo con la experiencia de viabilidad celular (citotoxicidad). La estrategia para estudiar los efectos las AgNPs en las células a través de conteo en cámara Neubauer, fue usar dos tablas de 24 pozos por línea de célula. La concentración de células y volumen total fue de $\approx 2 \times 10^5$ cel/mL, en 24 mL de medio de cultura. Cada pozo de cultivo fue re-suspendido con 0.5 mL de estas solución celular. Después del plaqueamiento, las líneas celulares permanecieron incubadas por 12 horas para adherirse a los pozos, antes de iniciar el tratamiento con las AgNPs.
- Tratamiento de las células con AgNPs. Después de las 12 horas de incubación, el medio de cultura usado fue retirado de las tablas, y en seguida alícuotas de 25, 50, 75 y 100 μ M de AgNPs, así como medio de cultura suplementado fresco (0 μ M) fueron adicionados, para el ensayo de citotoxicidad, formando así, las muestras indicadas por la figura 9. Después del tratamiento con las nanopartículas de plata, las líneas celulares permanecieron incubadas por 24 y 48 horas. Tras, la realización de los tratamientos para cada intervalo de tiempo, las medidas experimentales fueron hechas y los datos colectados. Este proceso será mejor detallado en la sección 3.4.

3.4.3 *Dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS)*

La recopilación de datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño se realizó con un equipo Xenocs XEUSSTM versión 2.0. La intensidad de dispersión se expresa en función del módulo de transferencia de impulso espacial recíproco, $q = 4\pi \frac{\sin(\theta)}{\lambda}$, donde 2θ es el ángulo de dispersión y la longitud de onda de la radiación. Las muestras se colocaron en un capilar de cuarzo (1,5 mm, 0,4 mL) y las mediciones se realizaron a 37°C. La radiación fue generada por una fuente de rayos X GENIX3DTM (borde Cu K, = 1,54 Å) con el haz enfocado por la óptica FOX2DTM. Los datos 2D se recopilaron en la instalación SAXS multiusuario de EMUSAXS, donde los datos de dispersión se normalizaron a escala absoluta utilizando agua como estándar principal. Los datos SAXS experimentales se modelaron utilizando el método de Transformación Indirecta de Fourier - IFT en una implementación ligeramente diferente. A partir del método IFT se obtiene la función de distribución de distancias de pares $p(r)$ y puede proporcionar una indicación directa de la forma y el tamaño promedio de las partículas.

3.4.4 *Absorción Ultravioleta visible (UV-vis)*

Los espectros de absorción óptica se registraron con un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-Vis (Santa Clara, CA). Las muestras se colocaron en una cubeta de cuarzo (0,4 × 1,0 cm, 0,5 mL), con una vía óptica de absorción de 0,4 cm. La temperatura se controló a 37°C con un termostato Carry Peltier y las mediciones se realizaron en el rango de 200 a 800 nm..

3.4.5 *Cámara de Neubauer*

La etapa de conteo de células, vivas o muertas, fue realizado en una cámara de Neubauer o hemocitometro modelo *OptikLabor*, Germany. El conteo de las células en las tablas de 24 pozos, está basado según el protocolo de conteo del Laboratorio (*LabM2*). Alícuotas de 50 µL de la solución de células con medio de cultura suplementado, así como las concentraciones de AgNPs, fueron recogidas y utilizadas para poblar la cámara de Neubauer. En seguida, fue realizada el conteo de células en los cuadrantes superior e inferior, obedeciendo la ecuación (14) mostrada en la sección 2.5.

3.5 Procesamiento estadístico de datos

Los datos están reportados como media \pm desviación estándar (DE) para la caracterización de las nanopartículas en medios de cultura celular y el grado de citotoxicidad de las AgNPs en las células. Todos los análisis estadísticos fueron presentados usando el *Student T-test* estableciendo el parámetro de significancia α en 95% ($p < 0.05$) para asumir las diferencias en los valores promedios, obtenidos del Software Minitab Statistical, versión 7 para Windows (licencia institucional, State college, PA)

Resultado y Discusión

Este capítulo presenta los resultados encontrados en esta tesis de licenciatura y las discusiones sobre ellos. Esta sección se dividió en dos partes. En la primera parte, caracterizamos las propiedades morfo eléctricas de las nanopartículas de plata en DMEM, 10% SFB y DMEM+10% SFB (sección 4.1). En la segunda parte, analizamos cómo las AgNPs afectaron las propiedades de las tres líneas celulares.

4.1 Caracterización de las Nanopartículas de plata en medios de cultivo

A pesar de que la citotoxicidad inherente de las AgNPs están siendo usados como agentes terapéuticos (Nguyen et al., 2021), recientes trabajos muestran que las mudanzas metabólicas en células relacionadas con efectos citotóxicos de AgNPs, son dependientes de las propiedades físicas de las AgNPs como tamaño, forma composición y estados de agregación (Palomares et al., 2023). Luego, es esperado que las diferentes soluciones de AgNPs en medios de cultura celular utilizados en este trabajo, las biomoléculas y proteínas del medio envueltas en la superficie de estas nanopartículas, provoquen cambios en las propiedades morfo eléctricas y, por lo tanto, en el comportamiento toxicológico y *uptake* celular. Fueron entonces realizados ensayos de caracterización de las AgNPs en medios de cultura, después de 24 y 48 h de incubación, a través de DLS, ZP, SAXS, UV-vis e imágenes de turbidez para la determinación de forma, diámetro medio y estabilidad de la nanopartículas en medios de cultura celular.

4.1.1 Caracterización del stock de AgNPs

Las nanopartículas de stock incubadas durante 24 y 48 h se caracterizaron mediante análisis SAXS, DLS, ZP y UV-vis, y los resultados se presentan en la Figura 10. Como se puede ver en la figura, el stock de AgNPs no muestra cambios sustanciales en sus características morfo eléctricas en función del tiempo de incubación. Los análisis de datos de SAXS, resumidos por las curvas $I(q)$ y $p(r)$, indicaron que la suspensión de stock está constituida por nanopartículas con forma esférica y radio promedio de $17,0 \pm 2,0$ nm (Fig. 1A). Las mediciones de DLS confirmaron este resultado que indica un diámetro hidrodinámico bien definido de $41,7 \pm 0,8$ nm y un valor de índice de

polidispersidad de tamaño en $0,14 \pm 0,01$, lo que sugiere nanopartículas de plata monodispersas (Fig. 1B). El potencial zeta negativo de $-33,6 \pm 0,7$ mV (Fig. 1C) es consistente con la alta estabilidad coloidal conferida por el citrato como agente estabilizador. Finalmente, el espectro UV-vis (Fig. 1D) reveló una fuerte absorción alrededor de 429 nm, que es característica de la absorción de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR) (Zhang et al., 2016).

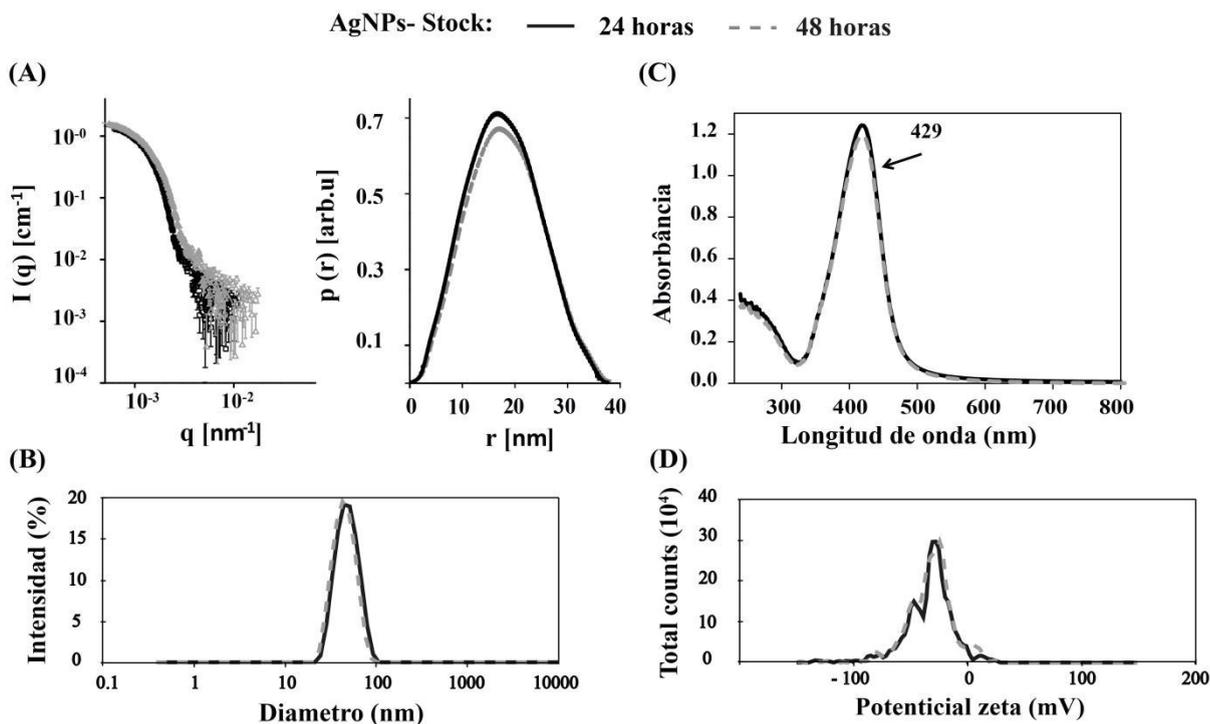


Figura 10: Caracterización, con SAXS (A), DLS (B), UV-vis (C) y ZP (D), para el AgNPs-stock (250.3 μM), tras 24 y 48 h de incubación a 37 °C.

4.1.2 Caracterización del suero fetal bovino

Los datos de DLS registrados después de 24 y 48 h de incubación (Figura 11A) de 10% de SFB en agua ultrapura (líneas moradas) presentaron una distribución de tamaño multimodal que va desde 1 a 1300 nm. Se detectaron picos alrededor de 51 y 300 nm presentando las intensidades más altas y otros dos a 5 y 1300 nm, pero con intensidades mucho más bajas. Los picos se ensancharon, lo que indica una distribución de tamaño más amplia. Este comportamiento es consistente con el alto valor de PDI de $0,70 \pm 0,40$, lo que sugiere la formación de aglomerados con alta polidispersidad, como se esperaba de las nanopartículas interconectadas por proteínas como la albúmina, la globulina y la hemoglobina (Sasidharan et al., 2015). La principal componente proteica del SFB es la albumina en comparación con las otras proteínas, y según, Sasidharan et al., 2015, está a presenta una distribución de tamaño bimodal. Por lo tanto, la albumina en conjunto con las globulinas y hemoglobina, contribuyen para la distribución de tamaño multimodal conforme

mostrado en nuestros resultados (Aurica Precupas et al., 2022).

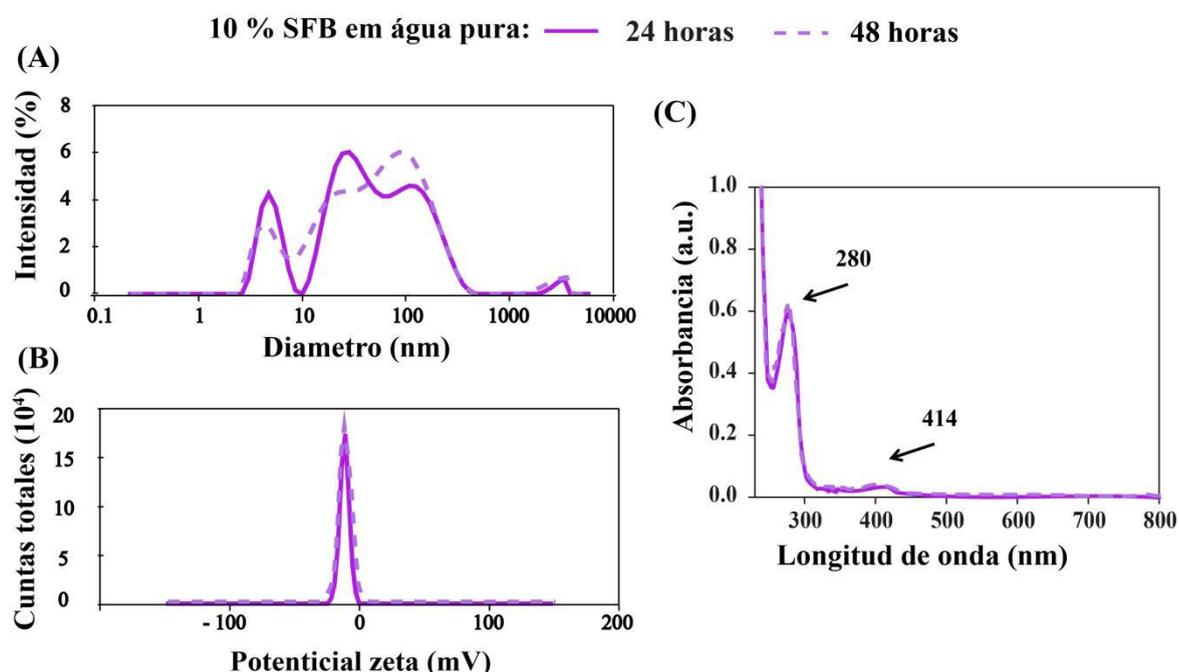


Figura 11: Caracterización con DLS (A), ZP (B) y UV-vis (C) del suero fetal bovino diluido en agua ultra pura , después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C.

La distribución de carga superficial del complejo proteico 10% SFB, figura 11-B, presenta un potencial de superficie zeta negativo con bajo desvío padrón estimado en -13.9 ± 2.6 mV tanto para 24 y 48 h de incubación. Además, los espectros UV-vis a las 24 y 48 h de incubación mostraron una fuerte absorbancia en torno a 280 nm, característica del triptófano presente en las proteínas (Xiangrong, et al., 2021), y otra de mucha menor intensidad a 414 nm que se puede atribuir a la banda de Soret del resto protoporfirina IX de hierro (II) en la hemoglobina (Bohemia et al., 2016).

4.1.3 Caracterización del DMEM

En comparación con los resultados anteriores, los resultados mostrados para DMEM, resumidos en la figura 12, indican un comportamiento morfo eléctrico distinto. En el caso de la morfología, el diámetro en función de la intensidad (figura 12-A), muestra diámetros medios en torno de 0.31 ± 0.03 nm tanto para 24 y 48 h de incubación.

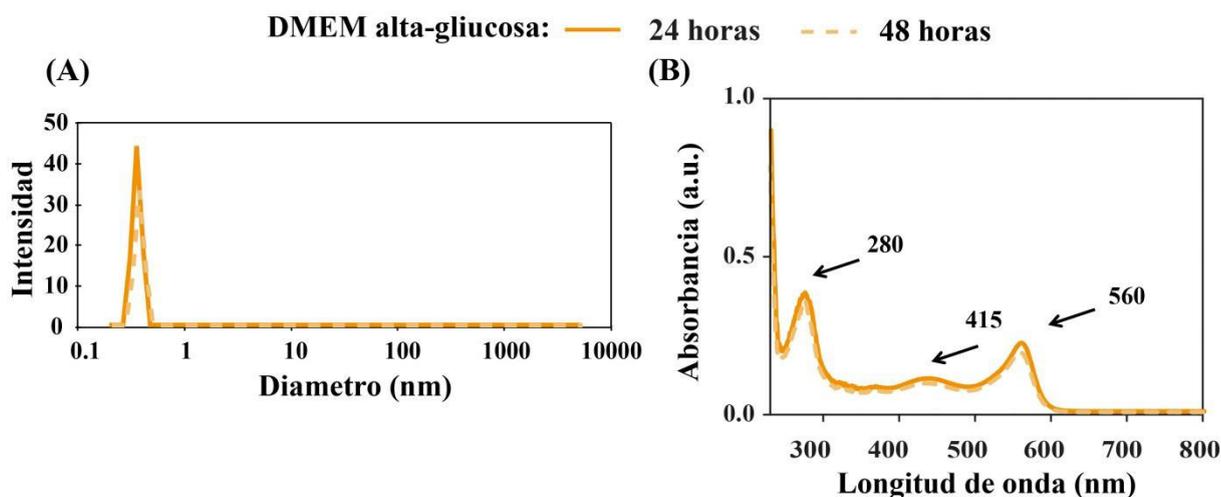


Figura 12: Caracterización con DLS (A), y UV-vis (B) del DMEM diluido en agua ultra pura, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C.

Medidas de potencial zeta el DMEM también fueron hechas, no obstante, los resultados no mostraron la existencia de potencial de superficie de carga. A través de estos resultados se puede inferir que los aminoácidos, sales inorgánicas y vitaminas presentes en DMEM, no interactúan uno con otros para formar complejos grandes, estando probablemente, distribuidos en el agua ultra pura como moléculas individuales. Los resultados de UV-vis del DMEM en figura 12-C, muestra bandas de absorbancia en 280 nm, característico del aminoácido triptófano, y menores en 415 y 560 nm correspondientes a la solución red fenol usado como indicador pH (Li et al., 2017)

4.1.4 Caracterización del DMEM suplementado con 10% SFB

Los resultados del DMEM suplementado con 10% SFB, DMEM+10% FBS (líneas rosas), mostró una interacción dinámica entre biomoléculas de DMEM y proteínas de SFB para formar aglomerados de bio-proteínas, que cambiaron sus características morfo eléctricas con el tiempo. Los resultados obtenidos de SAXS, resumidos por las curvas de SAXS, $I(q)$, y las funciones de distribución de distancias de pares, $p(r)$, en la Figura. 13B, indicaron que los aglomerados de bio-proteínas presentaron una evolución temporal en sus formas y tamaño, con promedio cambio de radio de $3,0 \pm 1,0$ nm después de 24 h a $5,0 \pm 0,5$ y $12,0 \pm 1,0$ nm después de 48 h. Los resultados de DLS confirmaron este comportamiento, mostrando una tendencia de diámetros promedio crecientes de la distribución de tamaño multimodal de aglomerados de proteínas de albúmina/globulina/hemoglobina para SFB diluido en agua ultrapura (línea morada, Figura 11A) en comparación con SFB diluido en DMEM (línea rosa, Figura 13A). Para 24 h, el grafico mostró los picos de mayor intensidad a 10 y 56 nm, y otro a 365 nm con mucha menor intensidad. Sin

embargo, los diámetros promedio de los picos de mayor intensidad aumentaron a 14 y 60 nm y la ZP negativa disminuyó a -7 mV (Figura 13C), lo que sugiere la formación de aglomerados de bio-proteínas menos estables coloidalmente y más polidispersos después de 48 h de incubación, como se confirmó por el valor PDI calculado a $0,90 \pm 0,02$.

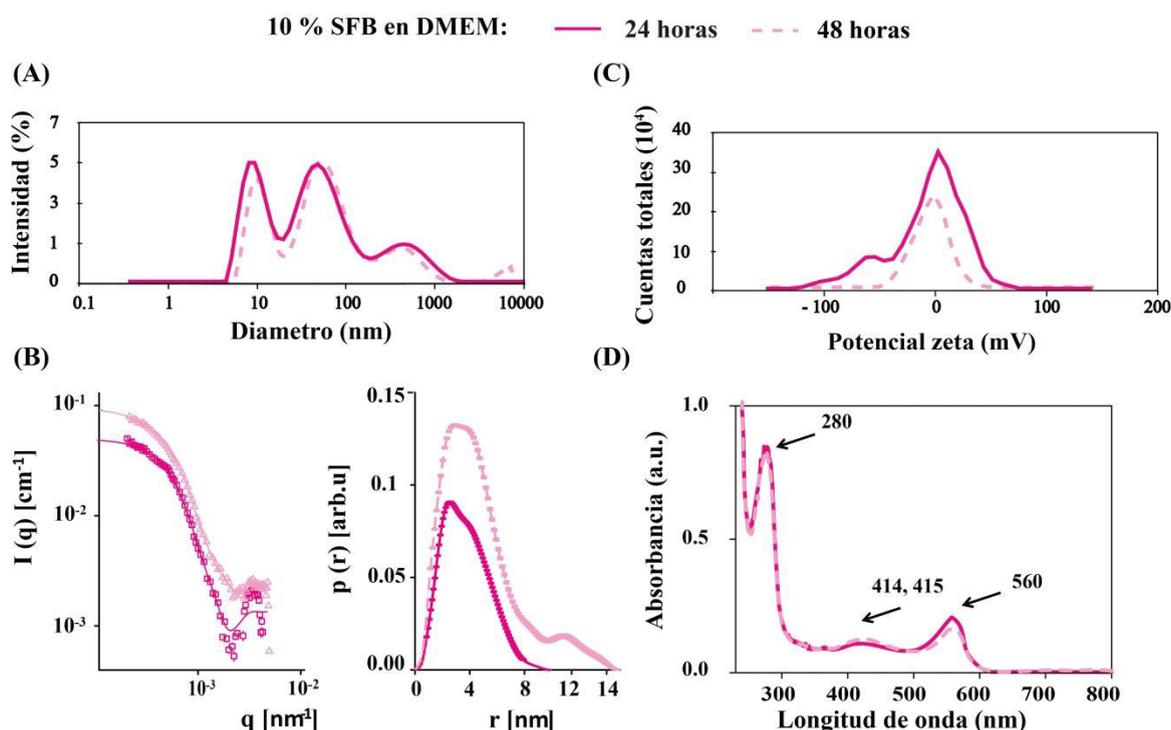


Figura 13: Caracterización, con DLS (A), SAXS (B), ZP (C) y UV-vis (D), para el DMEM+10% SFB, tras 24 y 48 h de incubación a 37 °C.

Cuando se comparan con los resultados ZP de SFB diluido en agua ultrapura, estos resultados revelan la existencia de una distribución de carga positiva en el stock de DMEM que puede reducir las cargas negativas de SFB en las muestras de DMEM+10% FBS. La espectroscopia UV-vis (Figura 13D) mostró la superposición de absorbancia de las biomoléculas de DMEM y SFB, lo que indica aglomerados estables sin agregación en la muestra de DMEM suplementado.

4.1.5 Interacción AgNPs con proteínas del 10% SFB

El objetivo de las experiencias con DLS, potencial zeta, absorción UV-vis e imágenes de turbidez, resumidas en la figura 14, fue investigar la dinámica de interacción molecular cuando el de AgNPs stock se diluyó en 10% SFB para obtener concentraciones molares de plata de 25, 50, 75 y 100 μM , posteriormente incubados por 24 y 48 h.

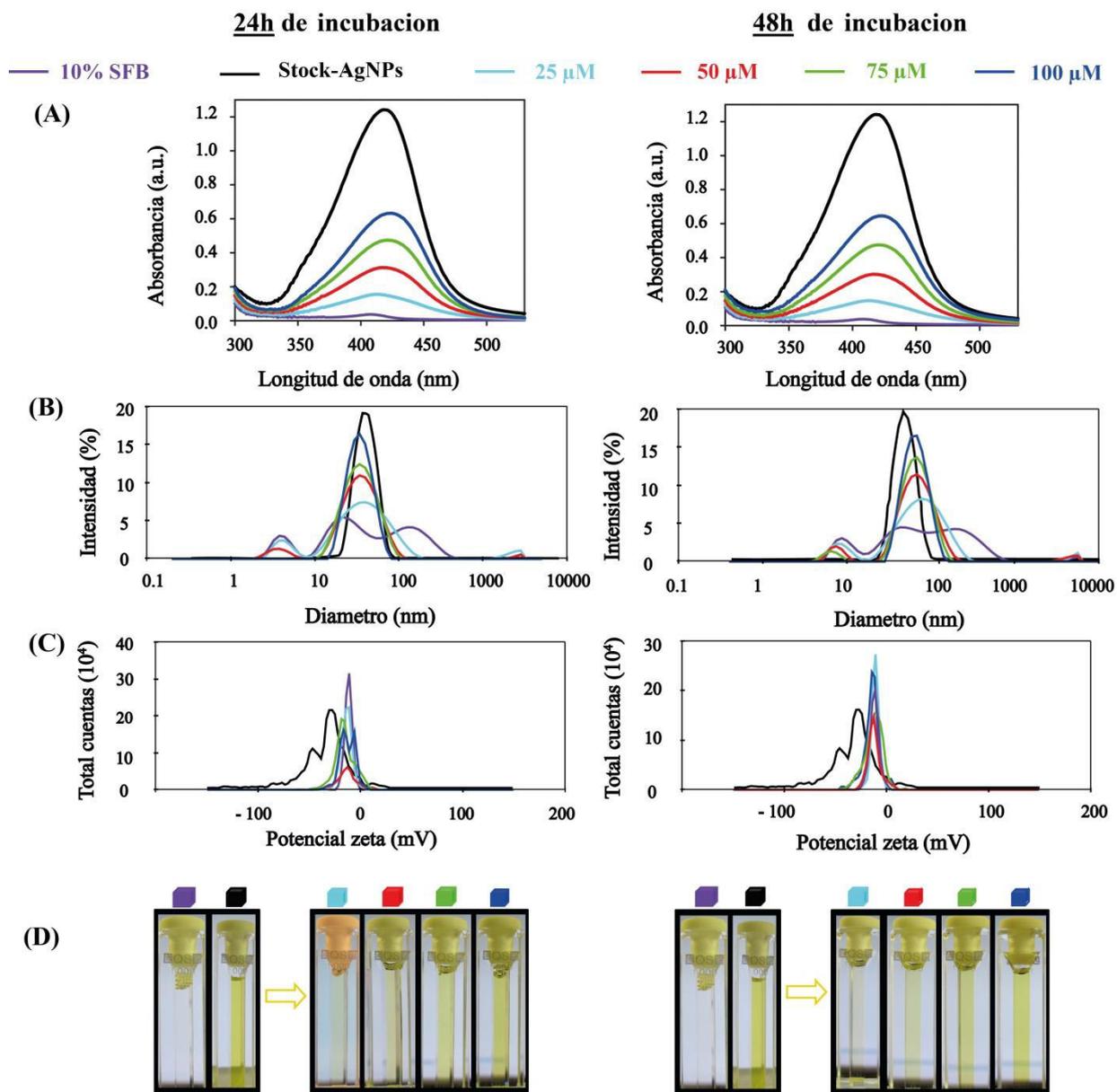


Figura 14: Caracterización con UV-vis (A), DLS (B), ZP (C) e imágenes de turbidez (D) para las diferentes concentraciones molares de plata, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C. Llave: Los resultados del stock -AgNPs y 10% SFB son mostrados en los mismo gráficos para fines de comparación.

Para 24 y 48 horas de incubación, la absorción de UV-vis para el stock-AgNPs y 10% SFB demostró anteriormente y ahora, figura 14-A, que el intervalo entre 300-500 nm es una banda característica de fuerte absorción por las nanopartículas de plata. Por lo tanto, los resultados analizados en esta región para soluciones de 25, 50, 75 y 100 μM reflejan básicamente la información de absorción de las AgNPs. Con el aumento de las concentraciones molares de las soluciones, pudimos ver que estas presentan absorción alrededor de 432 nm, indicando que no ocurre un desplazamiento hipsocrómico (desplazamiento al azul o rojo) de la banda característica de las nanopartículas en relación al stock-AgNPs (línea negra). La intensidad de absorción del sistema

en esta región aumentan con el aumento de la concentración de las AgNPs, hecho ya esperado una vez que hay mayor cantidad de nanopartículas en el SFB absorbiendo luz UV. Analizando los resultados de DLS, para las soluciones de AgNPs 25, 50, 75 y 100 μM por 24 y 48 h, presentados en la figura 14-B, podemos ver una distribución de tamaño multimodal similar al de 10% SFB (línea morada) que va desapareciendo con el aumento de la concentración de AgNPs para formar una distribución unimodal. La absorción de mayor intensidad que no presenta cambios de posición pero sí de intensidad, conforme mostrado para las cuatro concentraciones molares, va mascarando el patrón característico de distribuciones de diámetro de las nanopartículas de plata, las cuales presentan valores similares al stock-AgNPs entorno de 38.0 ± 2.5 nm para 24 h y 44.0 ± 2.8 nm para 48 h. Los resultados de ZP para 25, 50, 75 y 100 μM de plata, figura 14-C, muestran un perfil de potencial de superficie diferente en comparación al stock-AgNPs (línea negra), pero más similar con el 10% SFB en torno de -15.3 ± 1.3 mV para 24 h y -13.3 ± 2.4 mV para 48 h. Este resultado indica que en términos de proporción de carga los componentes proteicos del suero fetal bovino presentan una mayor proporción en relación a las nanopartículas de plata. A pesar de que la estabilidad de las AgNPs no puedan ser verificadas por las experiencias de potencial zeta, imágenes de turbidez tras 24 y 48 h de incubación, indican visualmente no haber cambio en el estado de agregación de los clústeres de iones de plata (figura 14-D).

Los resultados de UV-vis y DLS relativos a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100 μM , mostraron que las bandas de absorbancia UV-vis máximas y diámetros hidrodinámicos, no presentaron cambios significativos de desplazamiento en relación al encontrado para el Stock-AgNPs. Este comportamiento indica que los diámetros de los núcleos de las nanopartículas de plata permanecen monodispersos en 10% SFB mismo tras 24 y 48 horas de incubación, sugiriendo que las proteínas albumina, globulinas y hemoglobinas no están interactuando de una forma tal que estas puedan ser adsorbidas a la superficie de las nanopartículas de plata para formar la biocorona proteica.

Estabilizadores hidrofílicos para nanopartículas son de gran uso terapéutico por su alta solubilidad en agua (Fratoddi, 2018). No en tanto, estudios han reportado que la superficie hidrofílica de los ligantes como, por ejemplo el citrato, puede llevar a la formación de capas de agua alrededor de las nanopartículas, lo que tornaría inaccesible la adsorción de biomoléculas (Stonnik et al., 1995). De hecho, se ha mostrado una fuerte interacción entre la proteína albumina humana y el ácido lipoico, en lugar del citrato utilizado en la estabilización de nanopartículas de plata (Sasidharan et al., 2015). Por lo tanto, puede ser sugerido que la no interacción entre las AgNPs y las proteínas pueda ser debido a la propiedad hidrofílica del ligante citrato utilizado en este trabajo como estabilizador, sumado a la interacción repulsiva entre estos, ya que estas presentan

potenciales de superficie negativos en sus superficies.

4.1.6 *Interacción AgNPs con biomoléculas del DMEM*

El objetivo de las experiencias con DLS, potencial zeta, absorción UV-vis e imágenes de turbidez, resumidas en la figura 15, fue investigar la dinámica de interacción molecular cuando el de AgNPs stock se diluyó en DMEM para obtener concentraciones molares de plata de 25, 50, 75 y 100 μM , posteriormente incubados por 24 y 48 h..

Sorprendentemente, el color oscuro de la solución ya desde la primera concentración de 25 μM de AgNPs tras 24 h de exposición visto en la figura 15-c, indico que las biomoléculas del DMEM desencadenó una aglomeración rápida y grave tras la exposición con las nanopartículas de plata en suspensión. Los cambios en la absorción de resonancia plasmónica superficial y diámetro hidrodinámico característico de las nanopartículas de plata stock detectados por los resultados de UV-vis y DLS (Figura 15 a-b) mostro que, independientemente de la diferencia en la composición del material, la concentración molar o tiempo de incubación, las biomoléculas del DMEM indujo aglomeración en las nanopartículas de plata. En cuanto al potencial zeta, una vez más el aparato de medida no fue capaz de detectar ninguna carga de potencial superficial efectiva para este tipo de muestra.

La observación más llamativa observada fue que independientemente de la concentración o volumen, las biomoléculas del DMEM desencadenan una rápida e irreversible aglomeración con las nanopartículas de plata. Se ha sugerido durante mucho tiempo que aumentar la estabilidad coloidal se puede lograr mediante la adsorción de biomoléculas o proteínas en la superficie de nanopartículas, no en tanto, la agregación observada mediada por el DMEM en las AgNPs desafía la aplicación de esta hipótesis (Perera et al., 2021). Estudios previos han demostrado que la formación de la biocorona también depende de la concentración de proteínas, sus tasas de asociación y disociación (Gonzales-Garcia, 2022; Perera et al., 2021). Interesantemente, nuestros resultados muestran que ya en baja concentración o volumen de DMEM (100 μM de AgNPs) aglomeraciones fueron activadas para formar agregados pequeños y grandes de nanopartículas de plata. Similares observaciones fueron reportadas en la proteína fibrinógeno induciendo aglomeraciones en nanopartículas de plata, oro y nanotubos de carbono, indicando que esta podría ser debido a la conformación alargada y a la dimensión única de la molécula (Sasidhran, 2015). Por lo tanto, puede ser especulado que la agregación observada pueda ser debido a la individualidad y cargas positivas de las biomoléculas de DMEM, las cuales puedan estar siendo atraídas rápidamente a la camada

negativa de las AgNPs.

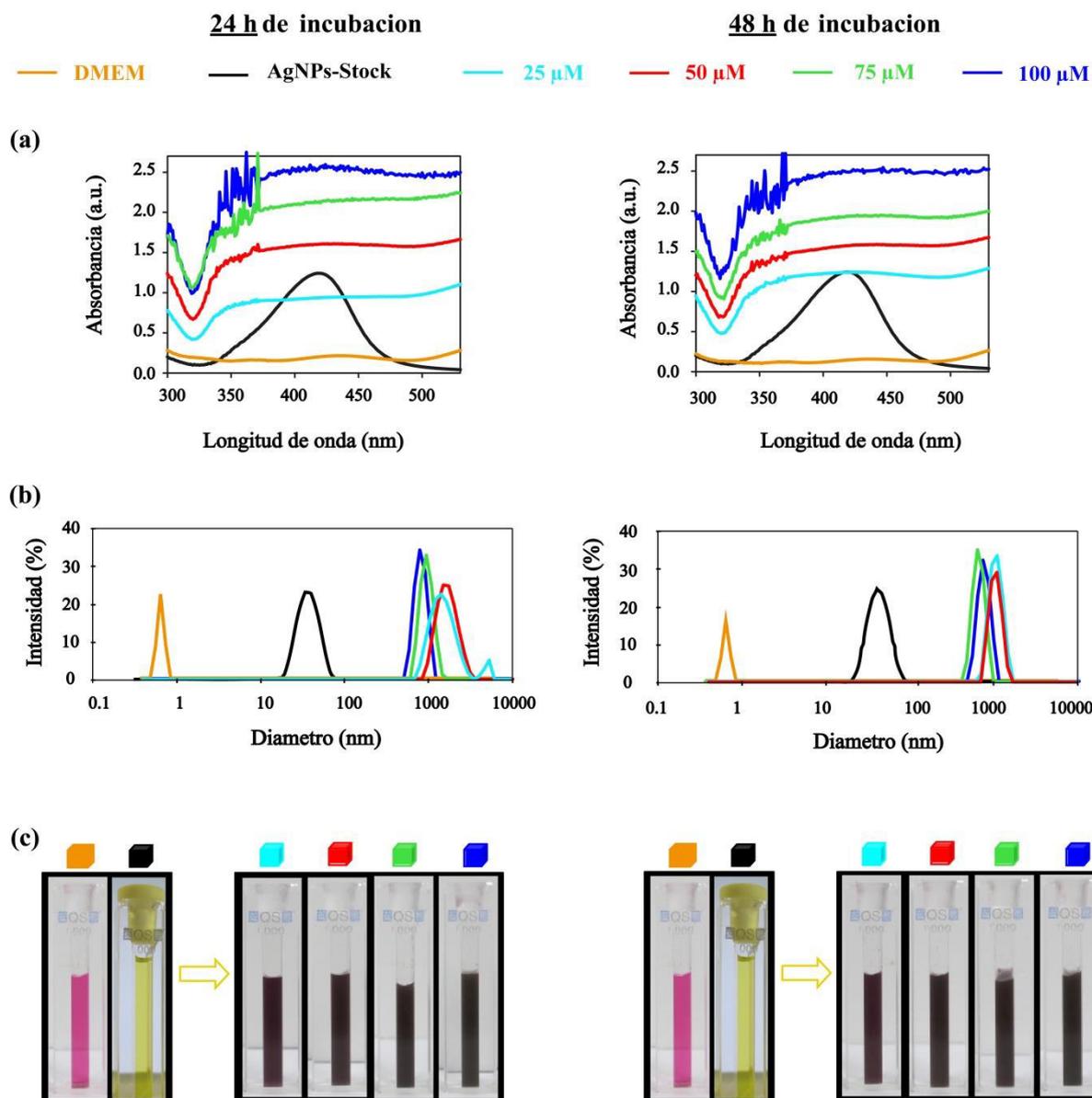


Figura 15: Caracterización con UV-vis (A), DLS (B) e imágenes de turbidez (C) para las diferentes concentraciones molares de plata, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C. Llave: Los resultados del stock -AgNPs y DMEM son mostrados en los mismo gráficos para fines de comparación.

1.7 Interacción AgNPs con bio-proteínas del DMEM suplementado con 10% SFB

Las nanopartículas almacenadas incubadas en DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v) a diferentes concentraciones molares y tiempos de incubación se caracterizaron mediante análisis SAXS, UV-vis, DLS y ZP, y los resultados se presentan en la Figura 16.

Los resultados de UV-vis y SAXS para 25, 50, 75 y 100 μM después de 24 y 48 h de

incubación indicaron que las AgNPs presentaron valores similares al stock de AgNPs con una fuerte banda de absorbancia alrededor de 432 ± 3 nm y funciones $I(q)$ y $p(r)$ que mostró un radio de alrededor de $14,0 \pm 5,0$ nm (Figura 16A-B). Es bien sabido que SAXS y la espectroscopia UV-vis son herramientas adecuadas para investigar los mecanismos de formación y crecimiento de nanopartículas (Mourdikoudis et al., 2018). Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que el aumento sucesivo en el tamaño de las nanopartículas está asociado con una mayor dispersión $I(q)$ y cambios en los cambios hipsocrómicos (Garcia et al., 2020 y Paramelle et al., 2014). La constancia y similitud de los parámetros obtenidos en los experimentos para estas concentraciones en relación con el stock de AgNPs indican que el radio, o núcleo, de las AgNPs permanece monodisperso en DMEM suplementado. Por el contrario, el análisis de los picos de alta intensidad obtenidos en las mediciones de DLS revela una tendencia a aumentar el tamaño de las AgNPs en comparación con las de stock, enmascarando así el diámetro del núcleo de las nanopartículas. Como puede verse en esta Figura 16C, después de 24 h de incubación y concentraciones de 25 y 50 μM de AgNPs en DMEM+10 % SFB, el diámetro promedio de las nanopartículas tiende a aumentar en comparación con las nanopartículas estándar, respectivamente, a $90,8 \pm 11,0$ nm y $88,5 \pm 10,9$ nm. A concentraciones más altas, 75 y 100 μM , hubo una clara tendencia a disminuir el diámetro promedio (y la desviación estándar), pero permaneció mayor que las AgNPs estándar. El comportamiento morfológico a las 48 h reproduce la tendencia general encontrada para 24 h de incubación, siendo los diámetros medios de todas las mezclas mayores que las nanopartículas stock, comenzando por la menor concentración, $190,6 \pm 5,9$ nm para 25 μM , hasta la mayor, $78,0 \pm 1,7$ nm para 100 μM como se muestra en la figura 16C.

Las diferencias de tamaño observadas entre los resultados de DLS con respecto a los resultados de UV-vis y SAXS no están en desacuerdo, sino que revelan la presencia de un interesante mecanismo de crecimiento de nuevas "nanopartículas". UV-vis y SAXS están relacionados con el contraste de los electrones de conducción y la densidad de electrones entre las AgNPs y el medio de cultivo (Li y Lee, 2016, Zhang et al., 2016). Por tanto, dado que el contraste es mucho mayor para la plata que para las proteínas del medio de cultivo, UV-vis y SAXS detectan principalmente núcleos de AgNPs. Por otro lado, DLS cuantifica el coeficiente de difusión promedio de las partículas, y cuanto más grande es la partícula, más lenta es la difusión (Almatroudi, 2020). En este sentido, el aumento del diámetro hidrodinámico observado en DLS indica la acumulación de aglomerados de bio-proteínas del medio de cultivo alrededor de las nanopartículas, formando una "corona biomolecular" que crece en tamaño en función de la concentración molar. Los resultados de DLS también revelaron que el tamaño medio de estas coronas aumentó con el tiempo de incubación para cada concentración de AgNPs.

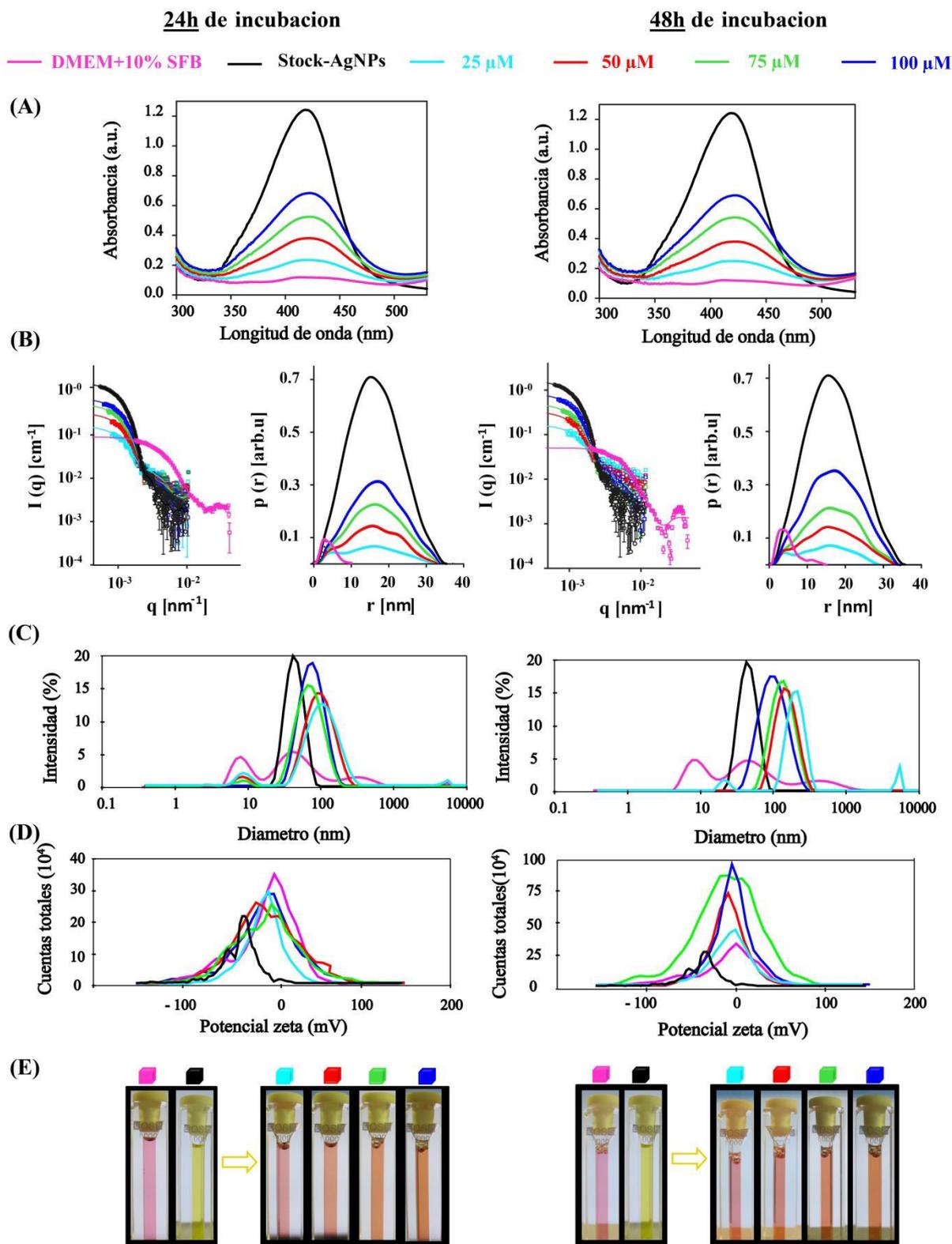


Figura 16: Caracterización con UV-vis (A), SAXS (B), DLS (C), ZP (D) e imágenes de turbidez para las diferentes concentraciones molares de plata, después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C. Llave: Los resultados del stock -AgNPs y DMEM+10%SFB son mostrados en los mismo gráficos para fines de comparación.

Con respecto a la estabilidad de esta nueva estructura, bio-nanopartícula, los valores bajos y constantes de potencial de superficie zeta similares al medio de cultura sugirió una baja estabilidad de las coronas formadas. No en tanto, los resultados de UV-vis, SAXS e imágenes de turbidez muestran un efecto contrario con agregados estables sin agregación tanto para 24 y 48 horas de incubación. Una posible explicación podría ser el efecto de proporción de cargas presentes en la bio-nanopartícula, tal que la solución DMEM+10% SFB presenta una mayor cantidad de cargas e relación a la AgNPs blindando así completamente la superficie de cargas negativas de la NP. Este blindaje es prácticamente constante en el tiempo conforme mostro los resultados de potencial zeta.

De los resultados encontrados para el DMEM/AgNPs, pudimos demostrar que las biomoléculas cargadas positivamente del DMEM (sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas) interactúan fuertemente con la superficie negativa de las AgNPs mudando la estabilidad coloidal de esta para un sistema que presenta agregación con la posterior floculación (figura 16-A) (Huang et al., 2016). En cuanto, para el agregado SFB/AgNPs, fue mostrado que independientemente de la composición proteica del SFB (albumina, globulinas y hemoglobina), estas no cambian la propiedades morfológicas del núcleo de las AgNPs, postulando que la propiedad hidrofílica del citrato presente en la superficie de las nanopartículas actúan como una cascara protegiendo la nanopartículas (figura 16-B) (Gonzales- Garcia et al., 2022). Interesantemente, los resultados de la dilución de las nanopartículas de plata con DMEM+10% SFB, mostraron la formación de coronas biomoleculares estables con el tiempo. Es sabido que estabilizadores hidrofílicos, como el citrato, pierden la propiedad de adsorber agua en condiciones con altas concentraciones de sales (Florin et al., 1984) como aquellos encontrados en el DMEM debido a la presencia de las sales orgánicas en su composición. Por lo tanto, es posible suponer que en la situación donde la solución DMEM+10% SFB es utilizada como solvente, las primeras moléculas en adherirse a las superficies de las AgNPs, formando una superficie química cargada positivamente, son posiblemente las diferentes sales inorgánicas presentes en el DMEM (camada de color naranja, figura 16-C). En seguida, esta nueva camada adsorbe las diferentes proteínas del suero fetal bovino y las otras moléculas encontrados en el DMEM a través de interacciones de origen no covalentes (figura 16).

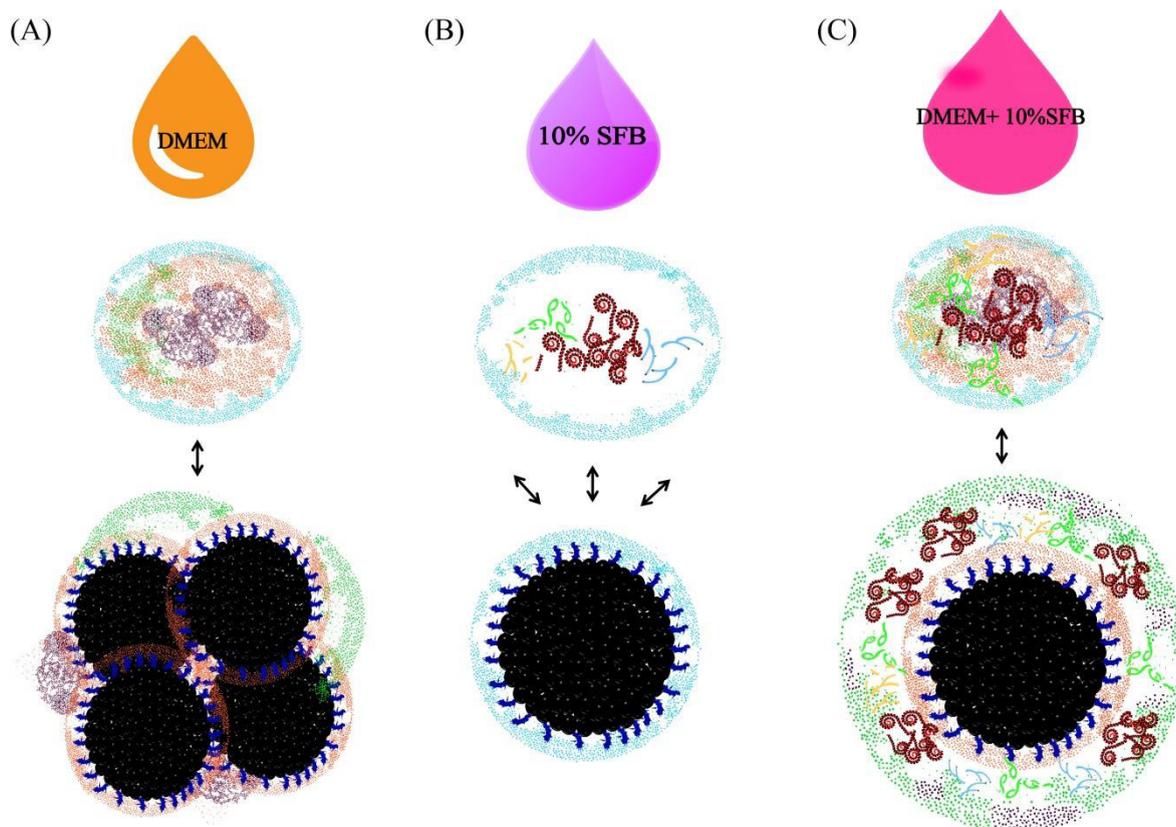


Figura 17: Modelos ilustrativos de la interacción de las AgNPs con las: (A) sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas del DMEM (puntos de color naranja, verde y purpura), (B) proteínas albuminas, globulinas y hemoglobinas del SFB (estructuras de color rojo, verde, amarillo y celeste) y (C) la combinación de estos agregados biomoléculas/proteínas del DMEM+SFB. Los puntos de color celeste representan la solución de agua ultra pura, entretanto las líneas de color azul que se encuentran en la superficie de la nanopartícula, las moléculas de citrato utilizado como estabilizador.

La albumina es la proteína en mayor cantidad encontrada en el SFB (aproximadamente 65% de la composición proteica total) y en conjunto con la γ -globulina, hemoglobina, trabajos mostraron que ella presenta la mayor cantidad de adsorción alrededor de las Np para formar la corona biomolecular (Xiangroung et la, 2021). Comparando los resultados de DLS y SAXS de nuestro trabajo, podemos estimar la espesura de la corona de bio-proteinas alrededor de las AgNPs, una vez que el radio del núcleo de las nanopartículas (17.0 ± 2.0 nm) más el radio del citrato (4.0 ± 1.0 nm) mantienen el mismo radio hidrodinámico medio de, $r_{(AgNPs)} = 21.0 \pm 0.4$ nm, durante todo el proceso de la formación de coronas. Podemos estimar esa espesura a partir de la diferencia entre los valores de radio hidrodinámicos de r_{AgNPs} y $r_{Bio-protein/AgNPs}$, según la ecuación (20)

$$\Delta r_{corona} = r_{Bio-prtein/AgNPs} - r_{AgNPs} \quad (20)$$

Estas capas biomoleculares presentan una reducción en sus respectivos valores de

espesura conforme aumentan las concentraciones de AgNPs, de 24.5 ± 3.1 nm hasta 7.8 ± 2.3 nm para 24 horas, y de 74.4 ± 3.0 nm hasta 18.2 ± 1.1 nm para 48 horas de incubación (ver tabla 1).

Tabla 1: Valores del radio de la corona bio-proteica en (nm) obtenida para las diferentes concentraciones de AgNPs, tras 24 y 48 horas de incubación.

AgNPs (μM)	Tiempo de incubación (h)	
	24	48
	Δr_{corona} (nm)	Δr_{corona} (nm)
25	24.5 ± 3.1	74.4 ± 3.0
50	23.4 ± 1.1	49.9 ± 2.1
75	7.8 ± 2.3	28.0 ± 1.8
100	9.6 ± 2.0	18.2 ± 1.1

Con los resultados obtenidos hasta ahora podemos introducir el concepto de un nano transportador de coronas basado en la interacción del AgNPs ($250.3 \mu\text{M}$) con un complejo de bio-proteínas no tóxicas usadas en el crecimiento celular, esto, es la solución de DMEM+10% SFB, las cuales se mostraron altamente compatibles en el sentido de no modificar la forma, tamaño, composición o estado de agregación del núcleo de las nanopartículas de plata, tanto para 24 y 48 horas de exposición en las diferentes concentraciones testadas. Además de eso, las bio-proteínas de coronas formadas presentaron una alta estabilidad sin agregación entre ellas con el tiempo, a pesar de que hayan aumentado el radio hidrodinámico e cada concentración. Es importante mencionar que el tipo de interacción entre los iones de carga negativa encontrada en la superficie de las nanopartículas con el complejo de bio-proteínas no serán abordados en esta tesis. No en tanto, recientemente hemos publicado un trabajo abordando este tema donde se puede concluir el binding entre estas dada básicamente a través de ligaciones hidrofóbicas.

En la siguiente sección serán presentados resultados del grado de internalización celular del modelo 3D bio-proteínas/AgNPs en las células endoteliales vasculares humanas, macrófagos

murinos y fibroblastos humanos, en las dosis de 25, 50, 75 y 100 μM , expuestos durante 24 y 48 h. Nuestro objetivo es demostrar que la citotoxicidad inherente de las bio-proteínas/AgNPs puede ser usado para controlar propiedades celulares.

4.2 Estudios de efectos citotóxicos de las bio-proteínas/AgNPs en las células

Los efectos citotóxicos inducidos por las bio-proteínas/AgNPs sobre las células endoteliales vasculares humanos, macrófagos murinos y fibroblastos humanos tras la exposición por 24 y 48 h, fueron avalados a través de ensayos de cámara de Neubauer y áreas celulares que generan resultados importantes sobre tasas de proliferación y alteraciones morfológicas. Los análisis del porcentaje de decrecimiento en la población celular para cada concentración en relación al control (ausencia de bio-proteína/AgNPs) proporcionan también una aproximación de la concentración efectiva (EC_{50}) capaz de matar 50% de células, que colaboro con la definición de regiones de letalidad.

Analizando los gráficos de número de células viables en función de la concentración de plata por 24 y 48 horas, resumidos en los ensayos de cámara Neubauer (figura 17-A), podemos ver que a medida que la concentración molar de plata aumenta en el medio de cultura suplementado, una disminución sistemática en la población celular viable de las líneas endoteliales, macrófago y fibroblastos es dado. Para las tres líneas celulares los valores de aproximados de EC_{50} fueron 75 μM y 50 μM , para 24 y 48 horas, respectivamente, resultando en un porcentaje de decrecimiento en la población celular, N_{cells} , de aproximadamente 45-57 % en comparación al caso control al considerar ambos tiempos de incubación (ver figura 17-A). Por otro lado, podemos observar una tendencia general de, $\text{EC}_{50_{24 h}} > \text{EC}_{50_{48 h}}$, confirmando la dependencia del tiempo como un factor importante de citotoxicidad

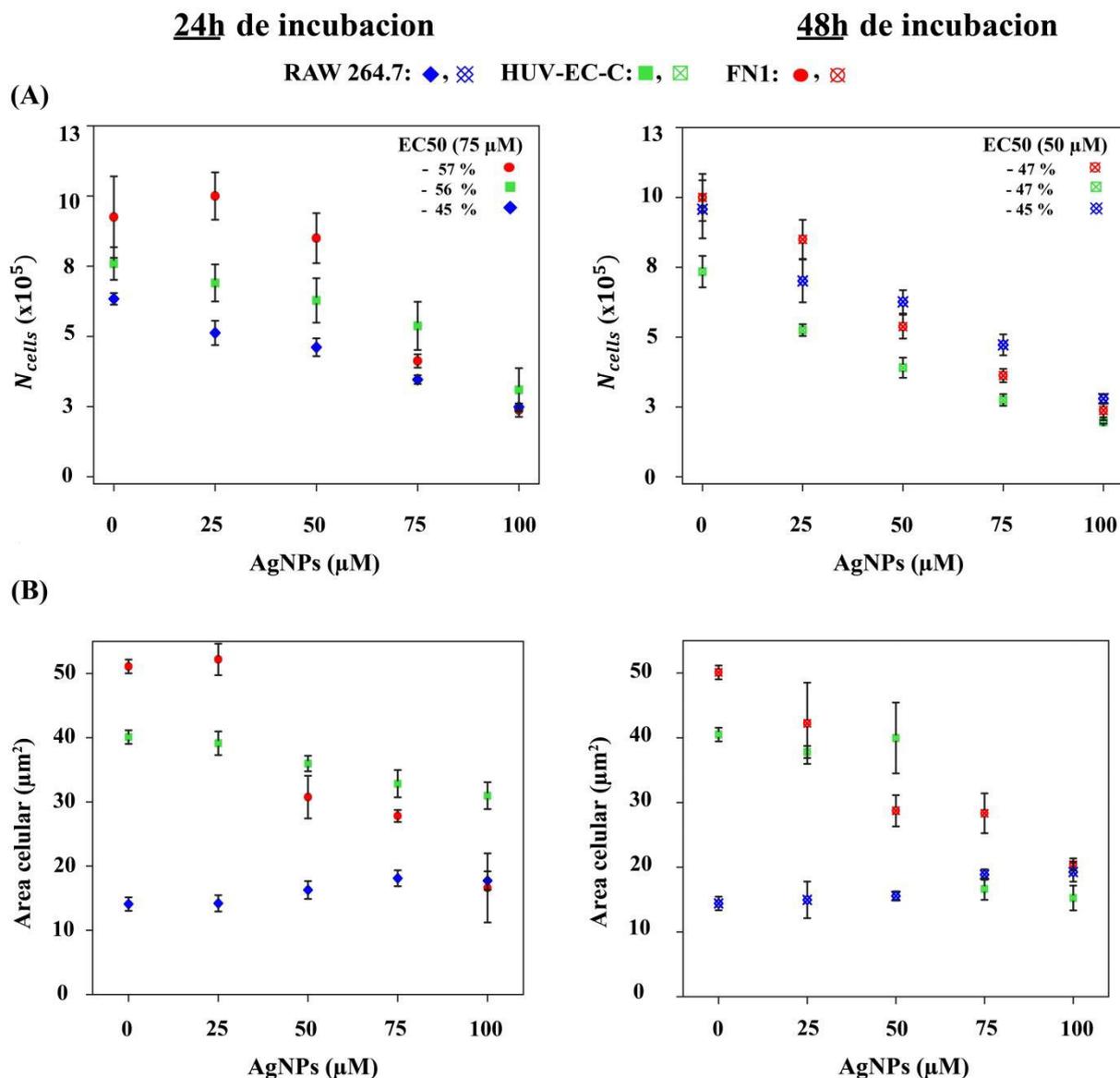


Figura 18: (A) El número de células viables y (B) valores medios del área celular son mostrados en función de la concentración molar de AgNPs para las tres líneas de células tras 24 y 48 h de exposición. Los EC50 también son incluidos en este gráfico. Llave: el número de células viables fue obtenido en una cámara de Neubauer, y las áreas celulares a través de un microscopio invertido LEICA mc170HD y un escalímetro, asumiendo estas como discos superficiales.

Con base a los EC50, fueron definidos las regiones toxicidad. La primera región, llamada baja letalidad, fue definida uniformemente para las tres líneas celulares como aquella en que las concentraciones de $[AgNPs] < 75 \mu M$ en 24 h y $[AgNPs] < 50 \mu M$ en 48 h, resultando en una disminución de poblaciones celulares entre 5 a 40 % en relación al control (ver la figura suplementar 1 y 2 en apéndice). La segunda región, denominada de alta letalidad, fue definida para dosis mayores que las anteriores, resultando en una disminución media de las células entre 59-95 % en relación al control (figura suplementar 1 y 2).

Adicionalmente, de la figura 17-B, podemos ver que, en media, las áreas celulares superficiales calculado para las tres líneas de células, tienden a decrecer en función de la concentración y del tiempo de la citotoxicidad de las NPs. Por otro lado, esos valores obtenidos para la línea macrófago, tienden a presentar un ligero aumento cuando las concentraciones de AgNPs y tiempo de tratamiento aumenta

A pesar de este trabajo no realizar experiencias específicas para definir el mecanismo que desencadena la citotoxicidad de las AgNPs, estudios indican que este tiene su origen en el proceso de internalización o *uptake* de las bio- nanopartículas por las células (Nguyen et al., 2021), lo que nos posibilita proponer la siguiente explicación: una vez que las bio-AgNPs son siempre las mismas utilizadas en todas las líneas celulares, esto es, ellas son caracterizadas conteniendo la misma cantidad de nanopartículas de plata y con la misma espesura de la corona biomolecular para cada concentración molar en DMEM suplementado (ver tabla 1 y figura suplementar 1 y 2), entonces podemos esperar que la influencia de estas bio-estructuras sea de poseer afinidades específicas de sus proteínas receptoras sobre las proteínas de la membrana celular de las células (Cui et al., 2021), como mostrado en la figura 18. Así, las alteraciones observadas en los parámetros celulares de proliferación y área celular presentados pueden estar asociados a la citotoxicidad de las AgNPs a través del mecanismo de ingestión de las células y de la liberación posterior de iones de plata dentro del citosol que desencadenaría el mecanismo citotóxico identificado como siendo de tipo de dosis y tiempo dependientes (ver figura 18).

Las características morfo-eléctricas de las bio-proteínas/AgNPs relacionadas al tamaño, formato casi esférico, bien como el potencial de superficie levemente negativo y constante, son variables importantes que parecen definir el grado de internalización de las bio-proteínas/AgNPs para el interior de las células justificándose como factores-calves en estudios citotóxicos (Park et al., 2011). Los datos obtenidos de la sección 4.2 demostraron que para concentraciones entre el intervalo de $75 \leq [\text{AgNPs}] \leq 100 \mu\text{M}$, donde las bio-proteínas/AgNPs presentan radios de coronas menores (tabla 1), en general, estas tienden a ser internalizados más fácilmente por las células que las de espesura mayores, desencadenando mayores cambios en las células viables como en la proliferación y área celular. El tiempo de incubación también parece afectar las células a través de la citotoxicidad, una vez que los porcentajes de células viables son bastante reducidos en 48 h en comparación con 24 h, por lo menos, x 10 menores en cada concentración (ver figura suplementar 1 y 2). A pesar de que las bio-AgNPs presentaron un aumento de la espesura o volumen de la corona con el tiempo (tabla 1), este efecto podría ser explicado por el mayor tiempo de interacción entre las bio-AgNPs con las proteínas receptoras de la membrana celular, también favoreciendo la mayor ingestión de las nanopartículas por las células. No en tanto, debemos también considerar que un

mayor tiempo de incubación, implica en el agotamiento de las componentes del medio de cultura celular.

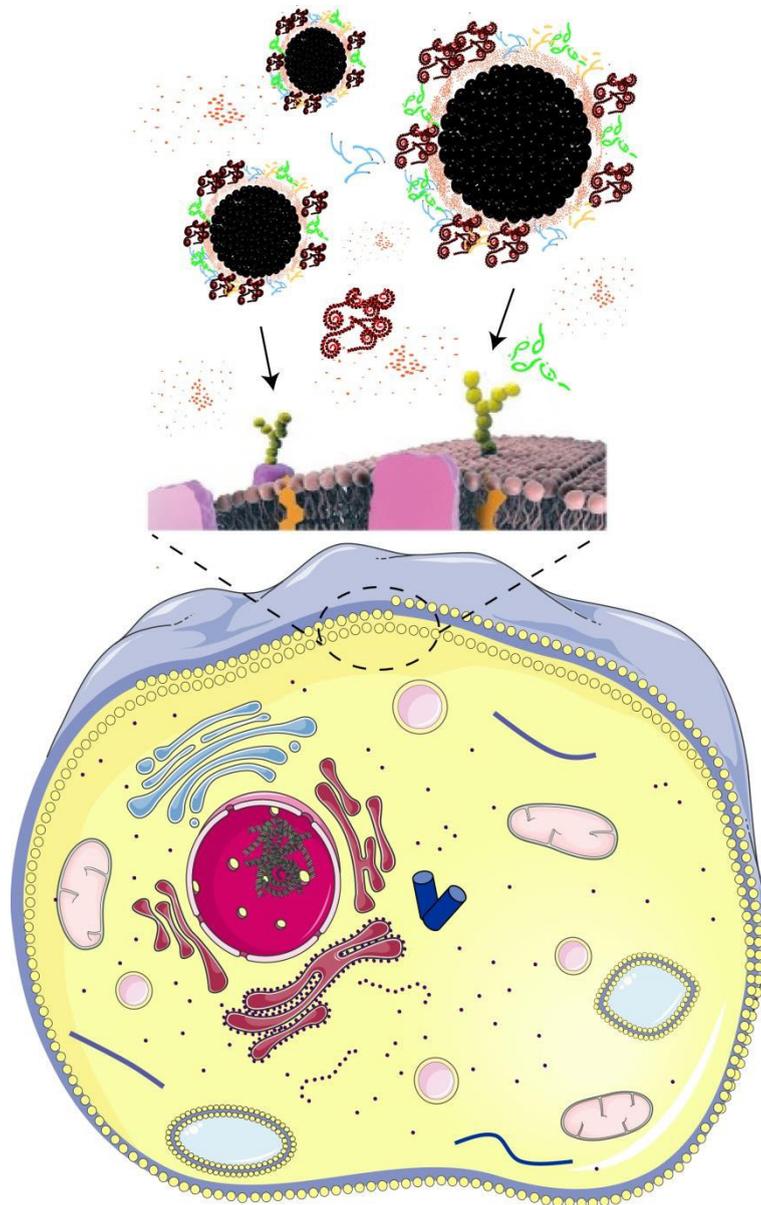


Figura 19: Modelo ilustrativo del proceso de internalización de las bio-proteínas/AgNPs en las células a través de la interacción con las proteínas receptoras de la membrana celular.

Demostramos anteriormente que las líneas celulares endotelial vascular y fibroblasto presentaron cambios diferentes en sus áreas celulares en comparación con la línea macrófago. Este comportamiento es una situación esperada ya que cada línea de célula resiste contra los efectos citotóxicos de las NPs de diferente manera. Por ejemplo, de un punto de vista metabólico, Palomares et al., 2023, mostraron que la exposición de nanopartículas de plata en células fibroblasto y endotelial presentaron alteraciones en la vía glicolítica, entretanto, cuando estas fueron sometidas

en células macrófagos, esta no fue alterada, presentando muerte celular por altos niveles de especie reactivos de oxígeno (*reactive oxygen species, ROS*) (Palomares, et al 2023).

Concluyendo esta discusión, vamos volver a discutir las definiciones de regiones de letalidad citotóxica, baja y alta, parametrizados por el decrecimiento porcentual celular en EC50. Como pudo ser visto, las líneas celulares presentaron intervalos de dosis distintos para tiempos diferentes tal que están perdiendo la mitad de su población celular viable. A partir de este punto para atrás (dosis inferiores), las chances de que estas líneas celulares inmortalizadas puedan restablecer la confluencia celular es viable, ya que condiciones de cultivo celular libre de nanopartículas sean dadas. A pesar de este trabajo no aborden esta cuestión en específico, la argumentación actual permanece plausible y, por lo tanto, podemos usar esas definiciones de regiones de citotoxicidad descritas anteriormente. Esas clasificaciones, en principio, nos podría ayudar en el control de diferentes caracterizaciones hechas a las células a través del potencial citotóxico de las bio-proteínas/AgNPs. Por ejemplo, puede ser usado para regular la proliferación celular, la morfología, metabolismo, etc, cuando pensamos en abordar una enfermedad tumoral, un proceso inflamatorio o una remodelación durante una cicatrización de herida cutánea (Palomares, et al 2023).

Conclusiones

En este trabajo, investigamos las propiedades morfo eléctricas de las nanopartículas de plata en DMEM suplementado con 10% SFB, así como el efecto citotóxicos en tres líneas de células endotelial vascular, macrófago y fibroblasto, expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs por 24 y 48 horas. Para alcanzar nuestros objetivos, ensayos de ZP, UV-vis, SAXZ, Imágenes de turbidez y DLS; fueron utilizados para caracterizar las nanopartículas de plata, entre tanto, los aspectos citotóxicos fueron estudiadas con ensayos de proliferación y área celular en Cámara Neubauer. En general, nuestro resultados de caracterización mostraron que la incubación de las AgNPs en el medio de cultura suplementado, esto es, DMEM+10% SFB establece una fuerte interacción entre las componentes orgánicas que resulta en la formación de coronas biomoleculares alrededor de las nanopartículas, formando así una nueva entidad estable en el tiempo que presenta variaciones en el tamaño del complejo bio-proteína/AgNPs generando en función de la concentraciones de plata, pero no del núcleo duro de la nanopartícula. Abordando los aspectos de citotoxicidad de las bio-proteína/AgNPs en 24 y 48 horas de incubación, importantes cambios fueron observados en las tres líneas celulares, con un decrecimiento sistemático en la población de células viables, acompañado de cambios morfológicos de áreas celulares, cuando el número de nanopartículas aumenta y el diámetro de la corona biomolecular decrece en la solución del medio de cultura suplementado. Adicionalmente, a través de eso datos se pudo inferir que la línea celular macrófago se mostró más resistente a estos cambios en relación a las otras líneas celulares. Regiones de citotoxicidad llamadas baja y alta fueron obtenidas a partir de los análisis de EC50, las cuales fueron dependientes de la dosis y tiempo de incubación de las estructuras bio-proteínas/AgNPs.

Para finalizar, tenemos como perspectiva hacer un estudio prospectivo de exposición con nanopartículas de plata en pieles artificiales, desenvueltos a través de técnicas de co-cultivo en 3D. Eventualmente, estos tejidos pueden ser estudiados en su forma natural o tras pasar por un proceso de corte provocado artificialmente.

Apêndice

ANEXO 1: PROTOCOLO DE CULTIVO CEULAR

1. Limpieza de flujo laminar:

- Prender los rayos UV del flujo laminar durante 20 minutos
- Limpiar el flujo laminar con gaza estéril l y alcohol 70%
- Colocar la puntera de vidrio ene el segador de material biológico y abrir la válvula de aspiración

2. Separar lo materiales de trabajo:

- Calentar el medio de cultura suplementado, PBS y tripsina a 37C

3. Inicio de cultivo:

- Retirar la botella de cultura T75 de la incubadora y llevar para el flujo laminar
- Aspirar e medio de la botella de cultura T25
- Adicionar 7 mL de PBS para lavar las boetllas
- Observar en el microscopio si las células se desprendieron
- Adicionar 4 mL de medio en la bottela y transferir el contenido para el tubo falcon de 15 mL
- Llevar el tubo de falcon para la centrifugadora por 3 min a 1300 rpm
- Aspirar cuidadosamente para no desmanchar la película de células formada por la centrifugación
- Adicionar 2 mL de medio de cultura en el tubo falcon
- Homogenizar el medio y las células
- Retirar 0.2 mL del medio más células para hacer el conteo en la cámara de Neubahuer
- Tras el conteo, adicionar medio en el tubo falcon hasta 5 mL y trasferir el pool de células mas medio apara una garrafa de cultura T25 y colocar en la incubadora.

ANEXO 2: FIGURA SUPLENTRAR 1

Linhagem	AgNPs (μM)	Tempo de incubação						
		24 horas						
		N_{AgNPs} ($\times 10^{10}$)	V_{AgNPs} ($\times 10^{-3} \mu\text{m}^3$)	N_{cell} ($\times 10^5$)	A_{cell} (μm^2)	viáveis cells (%)	EC50 (μM)	Zona
FN1	0	0	0	9.3	51.1	100		no letal
	25	0.5	0.38	10.0	52.2	108 \uparrow +8%		no letal
	50	1.0	0.35	8.5	40.7	91 \downarrow -10%		subletal
	75	1.5	0.10	4.1	27.1	44 \downarrow -56%	78.5	referência
	100	2.0	0.12	2.4	16.6	26 \downarrow -74%		letal
	185	3.7	n.i	1.5	n.i	16 \downarrow -84%		letal
HUV-E-C	0	0	0	8.0	40.1	100		no letal
	25	0.5	0.38	6.9	39.1	86 \downarrow -14%		subletal
	50	1.0	0.35	6.3	35.9	78 \downarrow -22%		subletal
	75	1.5	0.10	3.4	32.8	43 \downarrow -57%	60.0	referência
	100	2.0	0.12	3.0	30.9	37 \downarrow -63%		letal
	185	3.7	n.i	0.8	n.i	10 \downarrow -90%		letal
RAW 264.7	0	0	0	6.3	14.1	100		no letal
	25	0.5	0.38	5.1	14.9	81 \downarrow -19%		subletal
	50	1.0	0.35	4.6	15.5	73 \downarrow -27%		subletal
	75	1.5	0.10	3.5	18.8	55 \downarrow -45%	72.9	referência
	100	2.0	0.12	2.5	19.2	39 \downarrow -61%		letal
	185	3.7	n.i	0.1	n.i	2 \downarrow -98%		letal

Figura suplementar 1: Resumen general del análisis de datos estadísticos de enfoques univariados, que muestra el porcentaje de reducción de células viables y la zona o región de letalidad para células fibroblasto, endotelial y macrófago expuestas a diferentes concentraciones molares de plata por 24 h.

ANEXO 2: FIGURA SUPLENTRAR 2

Linhagem	AgNPs (μM)	Tempo de incubação						
		48 horas						
		N_{AgNPs} ($\times 10^{10}$)	V_{AgNPs} ($\times 10^{-3} \mu\text{m}^3$)	N_{cell} ($\times 10^5$)	A_{cell} (μm^2)	viáveis cells (%)	EC50 (μM)	Zona
FN1	0	0	0	10.0	50.1	100		no letal
	25	0.5	4.12	8.5	42.2	85 ↓ -15%		subletal
	50	1.0	1.30	5.3	28.7	53 ↓ -47%	50.0	referência
	75	1.5	0.46	3.6	28.3	36 ↓ -64%		letal
	100	2.0	0.16	2.3	20.4	23 ↓ -77%		letal
	185	3.7	n.i	0.7	n.i	7 ↓ -93%		letal
HUV-E-C	0	0	0	7.3	40.5	100		no letal
	25	0.5	4.12	5.2	39.7	71 ↓ -29%		subletal
	50	1.0	1.30	3.9	37.8	53 ↓ -47%	49.6	referência
	75	1.5	0.46	2.7	16.6	36 ↓ -64%		letal
	100	2.0	0.16	1.9	15.25	26 ↓ -74%		letal
	185	3.7	n.i	0.3	n.i	4 ↓ -96%		letal
RAW 264.7	0	0	0	9.5	14.4	100		no letal
	25	0.5	4.12	7.0	14.2	73 ↓ -27%		subletal
	50	1.0	1.30	5.3	16.2	55 ↓ -45%	53.5	referência
	75	1.5	0.46	4.7	18.1	49 ↓ -51%		letal
	100	2.0	0.16	2.8	17.7	29 ↓ -71%		letal
	185	3.7	n.i	0.1	n.i	1 ↓ -99%		letal

Figura suplementar 2: Resumen general del análisis de datos estadísticos de enfoques univariados, que muestra el porcentaje de reducción de células viables y la zona o región de letalidad para células fibroblasto, endotelial y macrófago expuestas a diferentes concentraciones molares de plata por 48 h..

Bibliografía

- [1] Aurica Precupas, Anca RL, Andreea N, Daniel GA, Vlad TP. 2022. Bovine hemoglobin thermal stability in the presence of naringenin: Calorimetric, spectroscopic and molecular modeling studies, *Journal of Molecular Liquids*, Volume 361, 119617, ISSN 0167-7322.
- [2] Almatroudi A. 2020. Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sci.* 15(1):819–39.
- [3] Beer. 1852. Determination of the absorption of red light in colored liquids. In J. C. Poggendorff (Ed.), *Annalen der physik und chemie* (pp. 78–88). J.A. Barth.
- [4] Bhomia R, Trivedi V, Coleman NJ, Mitchell JC. 2016. The thermal and storage stability of bovine haemoglobin by ultraviolet-visible and circular dichroism spectroscopies *J. Pharm. Anal.*, 6 (4) , pp. 242-248.
- [5] Castiglioni S, Caspani C, Cazzaniga A, Maier JA. 2014. Short- and long-term effects of silver nanoparticles on human microvascular endothelial cells. *World J. Biol. Chem.* 5(4):457–64.
- [6] Carter AH. 2001. *Classical and Statistical Thermodynamics* Prentice-Hall, Inc. New Jersey. ISBN 0-13-779208-5.
- [7] Cantor CR, Schimmel PR. 1980. Part II: Techniques for study of biological structure and function. New York: W.H. Freeman and Company.
- [8] Cui T, Ma Y, Yang J-Y, Liu S, Wang Z, et al. 2021. Protein corona-guided tumor targeting therapy via the surface modulation of low molecular weight PEG. *Nanoscale.* 13(11):5883–91.
- [9] Dikshit PK, Kumar J, Das A.K, Sadhu S, Sharma S, et al. 2021. Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations. *Catalysts*, 11, 902.
- [10] Dykman LA, Khlebtsov NG. 2011. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae.* 3(2):34–55.
- [11] Donsker M D. 1952. Justification and extension of Doob's heuristic approach to the Kolmogorov–Smirnov theorems». *Annals of Mathematical Statistics.* 23: 277–281.

- [12] De Paoli SH, Diduch LL, Tegegn TZ, Orecna M, Strader MB, et al. 2014. The effect of protein corona composition on the interaction of carbon nanotubes with human blood platelets. *Biomaterials*. 35(24):6182–94.
- [13] Feigin LA, Svergun D I. 1987. Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering, Plenum Press, New York, pp. 335.
- [14] Fiocruz AEA, Guimaraes ACR. 2017. Conceitos e Metodos para a Forma,cao de Profissionais em Laboratorios de Saude - Volume 2 Capitulo 5: Cultivo celular. Escola Polit´ecnica de Sa´ude Joaquim Venancio.
- [15] Fratoddi I. 2017. Hydrophobic and hydrophilic au and ag nanoparticles. breakthroughs and perspectives. *Nanomaterials (Basel)*. 8(1).
- [16] Florin E, Kjellander R, Eriksson JC. 1984. Salt effects on the cloud point of the poly(ethylene oxide) + water system *J. Chem. Soc., Faraday Trans. , 80*, 2889– 2910.
- [17] Garcia-Alvarez R, Hadjidemetriou M, S´anchez-Iglesias A, Liz-Marz´an LM, Kosta- ´relos K. 2018. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale*. 10(3):1256–64.
- [18] Glatter O, Kratky O. 1982. Editors. *Small Angle X-ray Scattering*. London: Academic Press.
- [19] Gonzalez-Garcia LE, MacGregor MN, Visalakshan RM, Lazarian A, Cavallaro AA, et al. 2022. Nanoparticles surface chemistry influence on protein corona composition and inflammatory responses. *Nanomaterials (Basel)*. 12(4).
- [20] Garcia P., Prymak O, Grasmik V, Pappert K, Wlysses W, Otubo L, et al. 2019. An in situ SAXS investigation of the formation of silver nanoparticles and bimetallic silver–gold nanoparticles in controlled wet-chemical reduction synthesis. *Nanoscale Advances*.
- [21] Hansen, A.F. Thünemann, Characterization of silver nanoparticles in cell culture medium containing fetal bovine serum., *Langmuir*. 31 (2015) 6842–6852.
- [22] Hiemenz P C. 1986. Principles of colloid and surface chemistry , New York: Marcel Dekker. 815 p.
- [23] Huang K, Hu Y, Yu C, Boerhan R., Jiang G. 2016. Charged surface groups of nanoparticles and the adsorbed proteins codetermine the fate of nanoparticles upon interacting with cells. *RSC Adv.*, 2016,6, 58315-58324.
- [24] Hulkoti NI, Taranath TC. 2017. Influence of physico-chemical parameters on the fabrication of silver nanoparticles using *Petrea volubilis* L. stem broth and its antimicrobial efficacy. *Int*

J Pharm Sci Drug Res. 2017;9:72.

- [25] Helmlinger J, Sengstock, Christina GH, et al. 2016. Silver nanoparticles with different size and shape: Equal cytotoxicity, but different antibacterial effect. RSC Adv.
- [26] Jaiswal, P.M. Dongre, Biophysical interactions between silver nanoparticle-albumin interface and curcumin., J. Pharm. Anal. 10 (2020) 164–177.
- [27] Jafelicci M.J, Laudemir CV. 1999. Artigo: O Mundo dos Coloides. Quimica Nova na Escola. n. 9.
- [28] Karmali PP, Simberg D. 2011. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. Expert Opin. Drug Deliv. 8(3):343–57.
- [29] Loiseau A, Asila V, Boitel-Aullen G, Lam M, Salmain M, Boujday S. 2019. SilverBased Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. Biosensors (Basel). 9(2).
- [30] Lategan KL, Walters CR, Pool EJ. 2019. The effects of silver nanoparticles on RAW 264.7. Macrophages and human whole blood cell cultures. Front Biosci (Landmark Ed). 24:347–65.
- [31] Li Z, Zhanh P, Kan Q . Insight into the preformed albumin corona on *in vitro* and *in vivo* performances of albumin-selective nanoparticles. Asian J Pharm Sci. 2019 Jan;14(1):52-62.
- [32] Li, X. Wang, H. Liu, Y. Peng, Y. Yan, T. Ni, Mechanism evaluation of the interactions between eight flavonoids and γ -globulin based on multi-spectroscopy, J. Mol. Struct. 1225 (2021) 129291.
- [33] Li, W. Guo, R. Xu, Z. Song, T. Ni, The interaction mechanism between gold nanoparticles and proteins: Lysozyme, trypsin, pepsin, γ -globulin, and hemoglobin., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 272 (2022) 120983.
- [34] Li Z, Shen W, Liu X, Liu R. 2017. Efficient unimolecular photoinitiators for simultaneous hybrid thiol-yne–epoxy photopolymerization under visible LED light irradiation. Polymer Chemistry 8, 1579–1588.
- [35] Li T, Senesi AJ, Lee B. 2016. Small Angle X-ray Scattering for Nanoparticle Research. Chem. Rev. 116(18):11128–80.
- [36] Lytle DA, Rice EW, Johnson CH, Fox KR. 1999. Electrophoretic mobilities of Escherichia coli 0157:H7 and wild-type Escherichiacolistrains. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3222–3225.
- [37] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological

- impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(38):14265–70.
- [38] Naganthran A, Verasoundarapandian G, Khalid FE, Masarudin MJ, Zulkharnain A, et al. 2022. Synthesis, characterization and biomedical application of silver nanoparticles. *Materials (Basel)*. 15(2):
- [39] Nguyen VP, Le Trung H, Nguyen, T.H.; Hoang, D.; Tran, T.H. 2021. Synthesis of biogenic silver nanoparticles with eco-friendly processes using *Ganoderma lucidum* extract and evaluation of their theranostic applications. *J. Nanomater.* 2021, 6135920.
- [40] Ma Y, Hong J, Ding Y. 2020. Biological behavior regulation of gold nanoparticles via the protein corona. *Adv. Healthc. Mater.* 9(6):e1901448.
- [41] Mariam J, Sivakami S, Dongre PM. 2016. Albumin corona on nanoparticles - a strategic approach in drug delivery. *Drug Deliv.* 23(8):2668–76.
- [42] Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK. 2018. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale*, 10 , 12871 —12934.
- [43] Morters, Peter, Peres, Yuval. 2008. *Brownian Motion*.
- [44] Palomares CVV, Barreto YB, Bexiga NM, Toma SH, Julival dos Santos J, Araki K, et al. Metabolic profiling of murine macrophages exposed to silver nanoparticles at dose and time dependencies. *Part Part Syst Charact.* 2023 Jan 6;2200191.
- [45] Palomares CVV, Jennifer Adriane Santos, Yan Borges Barreto et al. Biochemical response of human endothelial and fibroblast cells to silver nanoparticles, 08 November 2022, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2227171/v1>].
- [46] Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, et al. 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 32(36):9810–17.
- [47] Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig DG. 2014. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*. 139(19):4855–61
- [48] Pearson RM, Juettner VV, Hong S. 2014. Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Front. Chem.* 2:108.
- [49] Pearson K. 1905. The Problem of the Random Walk. *Nature*. 72, 294
- [50] Perera, Y.R.; Xu, J.X.; Amarasekara, D.L.; Hughes, A.C.; Abbood, I.; Fitzkee, N.C. Understanding the Adsorption of Peptides and Proteins onto PEGylated Gold Nanoparticles.

- [51] Pecora R. 1964. Doppler Shifts in Light Scattering from Pure Liquids and Polymer Solutions. *Chem. Phys.*, 40, 1604.
- [52] Pecora R. 2000. Dynamic Light Scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2:123-131.
- [53] Roque A. 2016. Apuntes-Aula 2. Biofísica II – FFCLRP – USP. 5910187.
- [54] Sasidharan A, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. 2015. Gold and silver nanoparticle interactions with human proteins: impact and implications in biocorona formation. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.*
- [55] Sharma, S. Sarmah, A.S. Roy, K.S. Ghosh, Multispectroscopic studies on the molecular interactions between bovine γ -globulin and borohydride-capped silver nanoparticles., *Luminescence*. 37 (2022) 1200–1207.
- [56] Shimko A, Povolotckaia A, Mikhaylova A. 2014. Center for optical and laser materials research. Supported by OITSPSU. Saint Petersburg State University
- [57] Scheller, N. Bistolos, S. Liu, M. Jänchen, M. Katterle, U. Wollenberger, Thirty years of haemoglobin electrochemistry., *Adv. Colloid Interface Sci.* 116 (2005) 111–120.
- [58] Smith LM, Sanders Jz, kaizer RJ, Hughes P, Dodd C. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:667.
- [59] Stolnik S, Illum L, Davis S S. 1995. Long circulating microparticulate drug carriers *Adv. Drug Delivery Rev*, 16, 195– 214.
- [60] Turkevich J, Stevenson PC, Hillier JA. 1951. study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55.
- [61] Tak YK, Pal S, Naoghare PK, Rangasamy S, Song JM. 2015. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci. Rep.* 5:16908.
- [62] Vequi-Suplicy CC, Coutinho K, Teresa Lamy M. 2015. New Insights on the Fluorescent Emission Spectra of Prodan and Laurdan. *Springer Science New.*
- [63] Waghmare, B. Khade, P. Chaudhari, P. Dongre, Multiple layer formation of bovine serum albumin on silver nanoparticles revealed by dynamic light scattering and spectroscopic techniques, *J. Nanopart. Res.* 20 (2018).
- [64] Xu L, Wang Y-Y, Huang J, Chen C-Y, Wang Z-X, Xie H. 2020a. Silver nanoparticles:

Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*. 10(20):8996–9031.

- [65] Xiangrong Li, Xuezheng W, Hongyi L, Yunhui Y, Tianjun N. 2021. Mechanism evaluation of the interactions between eight flavonoids and γ -globulin based on multi-spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1225, 129291, ISSN 0022-2860.
- [66] Yang T, Yao Q, Cao F, Liu Q, Liu B, Wang X-H. 2016. Silver nanoparticles inhibit the function of hypoxia-inducible factor-1 and target genes: insight into the cytotoxicity and antiangiogenesis. *Int. J. Nanomedicine*. 11:6679–92.
- [67] Yan, K.T. Gause, M.M.J. Kamphuis, C.-S. Ang, N.M. O'Brien-Simpson, J.C. Lenzo, E.C. Reynolds, E.C. Nice, F. Caruso, Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines., *ACS Nano*. 7 (2013) 10960–10970.
- [68] Yao, Y. Asayama, Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues., *Reprod. Med. Biol.* 16 (2017) 99–117.
- [69] Zanette C, Pelin M, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, et al. 2011. Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicol In Vitro*. 25(5):1053–60.
- [70] Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 17(9).
- [71] Zolghadri, A.A. Saboury, A. Golestani, A. Divsalar, S. Rezaei-Zarchi, A.A. Moosavi-Movahedi, Interaction between silver nanoparticle and bovine hemoglobin at different temperatures, *J. Nanopart. Res.* 11 (2009) 1751–1758.

