

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



**TÍTULO.**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS  
DE PLATA “IN VIVO” EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:  
QFB. EVA GUILLERMINA PACHECO MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:  
Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ  
Dra. NINA BOGDANCHIKOVA**

TIJUANA, B.C., MÉXICO

Septiembre, 2016

Tijuana Baja California, a 19 de Septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Presidente en el examen de la Tesis titulada **EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA “IN VIVO” EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES** elaborada por la C. **Eva Guillermina Pacheco Martínez**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

---

Presidente

Tijuana Baja California, a 19 de Septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal en el examen de la Tesis titulada **EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA “IN VIVO” EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES** elaborada por la C. **Eva Guillermina Pacheco Martínez**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

---

Sinodal

Tijuana Baja California, a 19 de Septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Secretario en el examen de la Tesis titulada **EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA “IN VIVO” EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES** elaborada por la C. **Eva Guillermina Pacheco Martínez**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

---

Secretario

C.c.p. Archivo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



**TÍTULO.**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS  
DE PLATA "IN VIVO" EN DIFERENTES  
MODELOS ANIMALES.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:  
EVA GUILLERMINA PACHECO MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:  
Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ  
Dra. NINA BOGDANCHIKOVA**

TIJUANA, B.C., MÉXICO

Septiembre, 2016



## **I. DEDICATORIA**

La presente Tesis esta dedicada A mis padres, que me han acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de vida y que con sus consejos han sabido guiarme para culminar mi carrera profesional.

## II. AGRADECIMIENTOS

Primeramente te agradezco a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

Le agradezco a mi institución y a mis maestros que directa e indirectamente me han apoyado, gracias por su tiempo, por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

Me gustaría de igual manera agradecer a mi padre, Macario Pacheco Trejo, por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se puede lograr.

A mi madre, Ana Martínez Flores, por tu amor infinito y apoyo incondicional. Gracias por todo tu sacrificio en todos estos años y ayudarme a convertirme en lo que soy. Es un privilegio ser tu hija.

A mi otra mejor mitad, mi hermana Cexsy, quien representa mi mayor orgulloso, gracias por ser mí mejor amiga y mi fortaleza y no soltarme nunca de la mano.

A mi hermano Pacheco, por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento. Gracias por tus consejos tan acertados.

A mi director de tesis, el Dr. Horacio Almanza, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como haberme tenido la paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesis.

Agradezco el apoyo del Mtro. José Román Chávez, por compartirme su conocimiento y guiarme en el laboratorio, sin su ayuda no hubiera podido obtener estos resultados.

A mis compañeros de maestría Carolina, Carlos, Judith, Miguel, Francisco, Carlos y Daniel por su compañerismo y amistad en este largo trayecto.

### III. ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>Ag</b>	Plata
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de plata
<b>AK</b>	Amikacina
<b>AM</b>	Ampicilina
<b>CF</b>	Cefalotina
<b>CL</b>	Cloranfenicol
<b>cm</b>	centímetro
<b>CNyN-UNAM</b>	Centro de Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CXM</b>	Cefuroxima
<b>d. C.</b>	después de Cristo
<b>DC</b>	Dicloxacilina
<b>DEEq</b>	diámetro de esfera equivalente
<b>E</b>	Eritromicina
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>FHSA</b>	Ley Federal de Substancias Peligrosas de los Estados Unidos de Norteamérica
<b>g</b>	gramos
<b>GE</b>	Gentamicina
<b>kV</b>	kilo volt
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LEV</b>	Levofloxacina
<b>mL</b>	mililitro
<b>N/A</b>	No aplica
<b>NET</b>	Netilmicina
<b>NF</b>	Nitrofurantoína
<b>nm</b>	nanómetro
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>NPs-Ag</b>	Nanopartículas de plata
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PE</b>	Penicilina
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>RPBI</b>	Residuo Peligroso Biológico-Infecioso
<b>SSA</b>	Secretaria de Salud
<b>SCT</b>	Secretaria de Comunicaciones y Transporte
<b>SXT</b>	Trimetoprim-Sulfametoxazol
<b>TE</b>	Tetraciclina
<b>TEM</b>	Espectroscopia electrónica de transmisión
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias

**UV-Vis**  
**VEGF**  
**VIH-1**

Ultravioleta-visible  
Factor de crecimiento endotelial vascular  
Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

#### **IV. RESUMEN**

El desarrollo de la nanotecnología ha producido un gran número de productos comerciales basados en nanopartículas y el uso terapéutico en el área de la salud. El caso de las nanopartículas de plata para las cuales se ha reportado actividad antibacteriana así como actividad antiviral. Por lo anterior los estudios en animales para la evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de plata constituyen un campo de gran importancia para poder establecer su seguridad en el humano. Aunque las nanopartículas de plata parecen tener una aplicación promisorio como antimicrobiano debido a las propiedades de su composición, que le confieren la posibilidad de que su acción sobre las células del organismo humano provoquen efectos adversos, por lo que la evaluación de su posible toxicidad es necesaria para establecer su seguridad en caso del posible uso en el humano. Los atributos fisicoquímicos únicos de las nanopartículas de plata, hacen que éstas puedan producir condiciones químicas que inducen a un ambiente pro-oxidante causando un desequilibrio en el sistema energético dependiendo del potencial redox, provocando efectos biológicos adversos, que van desde la producción de procesos inflamatorias en la piel o la toxicidad aguda en modelos animales. El presente trabajo de investigación permitirá el conocimiento del efecto toxico de las nanopartículas de plata de tres formas distintas: i) Efecto inmediato sobre la irritación ocular en conejos, ii) Efecto de la irritación de piel de conejos, cobayos y humanos, iii) Se realizaran pruebas de toxicidad a dosis repetidas en ganado vacuno. Los datos que se obtengan en la investigación serán procesados y analizados estadísticamente con el software SPSS versión 21, utilizando el análisis de T de Student para muestras independientes. La importancia de este tipo de investigación es conocer los posibles efectos tóxicos de las nanopartículas de plata que podrían presentarse por la vía ocular, cutánea e intramuscular.

<b>V. ÍNDICE</b>	
<b>I. DEDICATORIA</b> .....	<b>7</b>
<b>II. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>8</b>
<b>III. ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>IV. RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>V. ÍNDICE</b> .....	<b>12</b>
<b>VI. INDICE DE TABLAS.</b> .....	<b>14</b>
<b>VII. INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>14</b>
<b>VIII.INDICE DE GRÁFICAS.</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>17</b>
1.1. Antecedentes.....	17
1.1.1. Nanociencia y Nanotecnología.....	17
1.1.2. Nanomateriales.....	17
1.1.3. Nanopartículas .....	18
1.1.4. Nanopartículas de plata.....	22
1.2. Justificación .....	28
1.3. Pregunta de investigación .....	28
1.4. Objetivos de investigación.....	28
1.4.1. Objetivo general.....	28
1.4.2. Objetivos específicos .....	28
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>29</b>
2.1. Metodología .....	29
2.1.1. Población .....	29
2.1.2. Diseño del estudio.....	30
2.2. Metodología .....	31
2.2.1. La obtención de las nanopartículas de plata. ....	31
2.2.2. Preparación de las nanopartículas de plata.....	31
2.2.3. Procedimientos para el estudio de irritación en piel de humano .....	33
2.2.4. Determinación de los índices de irritación ocular y dérmica de las nanopartículas de plata. ....	38
2.2.5. Prueba de Irritación ocular en conejo. ....	38
2.2.6. Prueba de sensibilización en piel de cobayos .....	42

2.2.7. Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno.....	44
2.2.8. Transporte de la muestra.....	44
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>46</b>
3. Resultados.....	46
3.1. Caracterización de las nanopartículas de plata.....	46
3.2. Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5%, 10% y 20% por espectroscopia electrónica de transmisión (TEM). .....	49
3.3. Resultados de la prueba de Irritación ocular en conejo.....	54
3.4. Resultados de la prueba de irritación en piel de humanos.....	57
3.5. Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno.....	62
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>64</b>
4. Discusión.....	64
4.1. Caracterización de las nanopartículas de plata.....	64
4.3. La prueba de irritación en piel de humanos.....	66
4.5. El resultado de evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno. ....	67
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>68</b>
5. Conclusiones.....	68
<b>CAPITULO VI.....</b>	<b>69</b>
6. Anexos.....	69
6.1. Aspectos Éticos y Legales.....	69
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>0</b>

## **VI. INDICE DE TABLAS.**

**Tabla 1.** Análisis de la composición física de las nanopartículas de plata.

**Tabla 2.** Resultados de la prueba de Irritación ocular en conejo.

**Tabla 3.** Resultados de la prueba de irritación en piel de humanos.

**Tabla 4.** Resultados de la prueba de irritación en piel de conejos.

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de irritación en piel de cobayos.

**Tabla 6.** Resultados de la prueba de toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno.

## **VII. INDICE DE FIGURAS.**

**Figura 1.** Mecanismo de formación de NPs-Ag a partir de la reducción química en disolución de la sal  $\text{AgNO}_3$ .

**Figura 2.** Mecanismo de acción antibacteriana de NPs-Ag.

**Figura 3.** Mecanismos de citotoxicidad inducidos por nanopartículas metálicas

**Figura 4.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el brazo del voluntario.

**Figura 5.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el brazo del voluntario y aplicación de los parches adhesivos como micropore.

**Figura 6.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el otro brazo del voluntario.

**Figura 7.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el brazo del voluntario y aplicación de los parches adhesivos como micropore en los dos brazos.

**Figura 8.** Día 2.- Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata en el brazo del voluntario.

**Figura 9.** Día 3.- Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata en el brazo del voluntario.

**Figura 10.** Espectros de UV-Visible de Argovit de diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata producidas por Vector –Vita Ltd.

**Figura 11.** Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5% y 20%.

**Figura 12.** Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%.

**Figura 13.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 0.3% del lote B001077.

**Figura 14.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 3% del lote B001078.

**Figura 15.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 5% del lote B001079.

**Figura 16.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 10% del lote B001066.

**Figura 17.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 20% del lote B001067.

**Figura 18.** Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el ojo de conejo.

**Figura 19.** Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el ojo de conejo.

**Figura 20.** Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el ojo de conejo.

**Figura 21.** Conejo #2, Día 0, Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y aplicación de los parches adhesivos como micropore.

**Figura 22.** Conejo #2, Día 3, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata.

**Figura 23.** Conejo #5, Día 0, Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y aplicación de los parches adhesivos como micropore.

**Figura 24.** Conejo #5, Día 8, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata.

**Figura 25.** Cobayo #1, Día 1 Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y aplicación de los parches adhesivos como micropore.

**Figura 26.** Cobayo #1, Día 4, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata.

**Figura 27.** Cobayo #1, Día 9, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata.

### **VIII. INDICE DE GRÁFICAS.**

**Gráfica 1.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.3% de Argovit con el lote B001077.

**Grafica 2.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit con el lote B001078.

**Grafica 3.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit con el lote B001079.

**Grafica 4.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit con el lote B001066.

**Grafica 5.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit con el lote B001067.

## **CAPÍTULO I**

### **1.1. Antecedentes**

#### **1.1.1. Nanociencia y Nanotecnología**

El término “nanotecnología” fue usado por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi, quien señala así la capacidad de manejar materiales a nivel nanométrico. El rango de tamaño de mayor interés para la nanociencia y las nanotecnologías es de 10 nm o menos debido a que los materiales pueden realzar sus propiedades o adquirir otras formas diferentes. El ser humano ha usado las nanotecnologías durante siglos, por ejemplo nanopartículas de plata se han utilizado como pigmentos colorantes para cristales desde el siglo X d. C., dependiendo de su tamaño, las nanopartículas pueden parecer rojas, azules o doradas. La Nanotecnología es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica. <sup>(1)</sup> El significado del prefijo “nano” es una dimensión que equivale a  $10^{-9}$ , y se fija como unidad el metro, entonces un nanómetro corresponde a la mil millonésima parte del metro. <sup>(2)</sup> La nanotecnología integra disciplinas y ciencias como la Biología, la Biotecnología, la Química, la Física, entre otras, lo que ha incrementado la cantidad de proyectos, descubrimientos, avances científicos y tecnológicos. <sup>(2)</sup> Las aplicaciones de la nanotecnología van en aumento en distintos campos como la ingeniería, química, mecánica, electrónica, médica, etc., favorecen todas las actividades humanas. Una de ellas es la salud, que se presenta como un mercado potencial. <sup>(3)</sup>

#### **1.1.2. Nanomateriales**

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales (sean cerámicos, metales, semiconductores, polímeros o una combinación de estos), en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100 nm. Estos representan una transición entre moléculas y átomos y un material con dimensiones de sólido volumétrico. Se incluyen nanotubos, nanofibras y nanopartículas. Las nanopartículas son consideradas como partículas individuales

con un diámetro menor a 100 nm, lo que puede originar tanto cambios en las propiedades físicas (tamaño del área de superficie, carga de superficie, forma, tamaño, paso a través de barreras que se consideraban impermeables) y químicas (solubilidad, reactividad).<sup>(4)</sup>

### **1.1.3. Nanopartículas**

Las nanopartículas han existido por siglos, algunos ejemplos son las partículas de humo. En algunas civilizaciones antiguas ya se utilizaban por sus propiedades ópticas y medicinales. Las nanopartículas metálicas en particular se pueden citar en la cultura egipcia, la cual empleaba las nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener la salud. La civilización china, además de emplearlas con fines curativos las utilizaba como colorantes inorgánicos en porcelana. Un caso de gran interés es el vaso de Lycurgs, creado por los romanos en el siglo IV d.C. tiene una característica interesante, su color es verde si la luz es reflejada y cambia a rojo si la luz es transmitida a través de él. El análisis de este vaso muestra que está compuesto de una matriz de vidrio que contiene una pequeña cantidad de nanopartículas de oro y plata las cuales son responsables de éste fenómeno. Aun cuando se tenían antecedentes del uso de nanopartículas, no fue sino hasta 1857 cuando se realiza un estudio sistemático de la síntesis y propiedades de coloides de oro. Y desde esa época hasta la fecha se han logrado grandes avances en el conocimiento de las nanopartículas y se han desarrollado métodos para su síntesis con la finalidad de poder diseñar la forma, tamaño, cubierta, composición, entre otras propiedades y con esto controlar su comportamiento. La modificación del tamaño de los materiales en nanopartículas les confiere un cambio de propiedades según se reduce el tamaño, es decir algunos incrementan su actividad eléctrica y calórica, mejorándola; otros incrementan su resistencia y también pueden presentar diferentes propiedades magnéticas e incluso pueden cambiar de color y reflejo de la luz cuando se modifica su tamaño. Además presentan una mayor superficie en

relación a su masa, propiedad que les confiere una mayor capacidad de interacción con otros materiales y una mayor reactividad. <sup>(5)</sup>

#### **1.1.3.1. Síntesis de nanopartículas**

Las nanopartículas pueden ser divididas principalmente en dos grupos: **1)** nanopartículas lábiles, las cuales se desintegran en sus componentes moleculares (liposomas, nanosomas, micelas, etc.) y **2)** nanopartículas insolubles (dióxido de titanio, dióxido de sílica, óxidos metálicos, etc.) <sup>(6)</sup>

#### **1.1.3.2. Nanopartículas de utilidad clínica**

En la última década las nanopartículas han sido la clase de nanomateriales que por sus diversas propiedades han sido atractivas para el desarrollo comercial, por lo que se ha incrementado la fabricación en diversas industrias como la Mecánica, Biomédica, Farmacéutica, Cosmética, Alimenticia, Agrícola, Química, de la Construcción, Automotriz, Textil, del Caucho, la Aeronáutica, la Informática, la Computación, etc. Actualmente se están realizando una considerable cantidad de trabajos con nanopartículas de diferentes materiales, que por su utilidad terapéutica han alcanzado ensayos clínicos o incluso, en algún caso, han sido aprobadas para su utilización en humanos. <sup>(7,8)</sup> Todo ello ha sido posible por las propiedades que ofrecen estos sistemas para mejorar la seguridad y eficacia de numerosos fármacos. Entre las ventajas que aportan el uso de nanopartículas se pueden citar la capacidad para atravesar las barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinal, respiratoria y la barrera hematoencefálica, la capacidad para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción, para alcanzar compartimentos intracelulares y la capacidad para controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción. <sup>(9)</sup> Algunos ejemplos de la aplicación específica de las nanopartículas son el diagnóstico y el tratamiento de trastornos cardiovasculares en donde se sugiere el uso de nanopartículas para obtener imágenes moleculares y como parte de los

stents liberadores de fármacos. <sup>(10)</sup> De igual forma juegan un papel importante en los avances en oncología ya que se ha perfeccionado el diagnóstico molecular mediante su uso como medio de contraste para estudios de resonancia magnética, lo que ha facilitado la detección temprana de tumores y a la vez el desarrollo y mejoramiento de fármacos antineoplásicos. <sup>(7)</sup>

Las nanopartículas se producen a partir de diversos materiales orgánicos e inorgánicos (cerámicos, metales, polímeros) y en el área de la salud se ha dado particular importancia a la obtención de nanopartículas a partir de metales. En el 2007 Priyabrata Mukherjee y colaboradores reportaron que la unión de anticuerpos utilizados para el tratamiento de la leucemia linfocítica a nanopartículas de oro incrementaba la destrucción de las células malignas en comparación con los pacientes a los que solo se les administraba el anticuerpo además, se observó un aumento en la penetración a las células e incluso a algunos organelos. <sup>(8)</sup> En el 2010 Brown S. D. y colaboradores, prepararon un medicamento antineoplásico, el oxilplatino unido a la nanopartícula de oro, con lo cual se logró mejorar la liberación del fármaco y además se observó una mayor penetración en el tejido pulmonar. <sup>(7)</sup> De igual forma Cherukuri P. y *co/s.* en este mismo año usaron nanopartículas de oro unidas al anticuerpo monoclonal cetuximab y observaron una mayor penetración del complejo a las células, además de que al realizar la terapia con radiofrecuencia se observó un aumento en la efectividad en la destrucción de tumores por calentamiento (hipertermia) y una disminución en la citotoxicidad. <sup>(11)</sup>

Aquellas que tienen una estructura fibrosa podrían tener una mayor persistencia y acumulación en los pulmones y como consecuencia provocar inflamación y otras alteraciones, incluidos posibles efectos cancerígenos. <sup>(12)</sup> A pesar del uso de nanopartículas en el área de la salud y sus beneficios, existen reportes que indican que algunas nanopartículas que no son usadas en esta área, pero que están presentes en procesos industriales y que son manipuladas por humanos, han producido efectos tóxicos los cuales han sido demostrados mediante ensayos "*in vitro*" (líneas celulares) o "*in vivo*" (animales). Los efectos

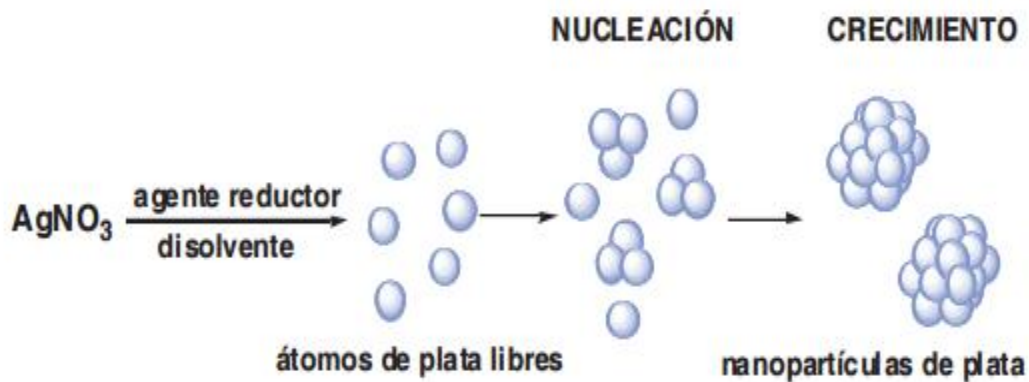
nocivos varían dependiendo del modelo biológico, las rutas de exposición, el diámetro de la nanopartícula y consisten en muerte celular, estrés oxidativo, reacciones inflamatorias, desarrollo de tumores, etc. <sup>(4)</sup>

Existen numerosos estudios hechos con diversos tipos de nanopartículas en los cuales se ha demostrado su toxicidad, esto no resulta sorprendente si dichas nanopartículas han sido fabricadas a partir de materiales con naturaleza tóxica, sin embargo otros estudios han demostrado que las nanopartículas son tóxicas por sí mismas mostrando toxicidad aguda o bien aumentando la toxicidad de algunos materiales, al respecto en un estudio realizado en ratones se observó que nanopartículas de carbono los hicieron más susceptibles a una endotoxina bacteriana. <sup>(13)</sup> En el 2007 Hussain y colaboradores realizaron un ensayo con células neuronales PC-12 las cuales fueron expuestas a nanopartículas de óxido de manganeso y los resultados mostraron que las nanopartículas penetraron la célula, disminuyeron la actividad mitocondrial y además provocaron depleción de la dopamina. <sup>(14)</sup> En ese mismo año Murdock C. y colaboradores expusieron la misma línea celular pero a nanopartículas de cobre y se observó que también éstas produjeron depleción de la dopamina. <sup>(15)</sup>

Bradich- Stolle y colaboradores expusieron queratinocitos de ratón a nanopartículas de dióxido de titanio, reportaron una disminución de la proliferación celular y además un aumento en la producción de estrés oxidativo. <sup>(16)</sup> Weaver y colaboradores reportaron que la administración vía subcutánea de nanopartículas de dióxido de titanio a ratones produjeron una respuesta inflamatoria aguda en el sitio de la inyección y un aumento en la circulación periférica de granulocitos como consecuencia de la respuesta inmune. <sup>(8)</sup> En estudios *in vitro* realizados con nanopartículas de oro se ha observado la captura de las nanopartículas dentro de los lisosomas. <sup>(17)</sup> Por otro lado en estudios realizados en ratones expuestos a nanopartículas de oro vía intraperitoneal y vía intravenosa, se observó la presencia de las nanopartículas en los lisosomas de macrófagos hepáticos. <sup>(18)</sup>

#### 1.1.4. Nanopartículas de plata

Uno de los metales nobles con el que se están sintetizando nanopartículas es la plata, por sus propiedades fisicoquímicas y debido a que la plata ha sido utilizada por sus propiedades antimicrobianas hace cientos de años, pues ha demostrado ser tóxica en contra de un amplio rango de microorganismos como los hongos, bacterias e incluso virus. Su aplicación como propuesta médica está documentada desde el año 750 d.C. En 1901 se publica el primer artículo que describe a la plata como un agente antibacteriano. <sup>(19)</sup> Posteriormente varias formas químicas de plata (sulfadiazina argéntica, nitrato de plata, acetato de plata y otras sales) fueron utilizadas en el tratamiento de enfermedades mentales, epilepsia, adicción a la nicotina, gastroenteritis y enfermedades venéreas como la gonorrea y sífilis. <sup>(9)</sup> La mayoría de los métodos de síntesis química de nanopartículas de plata se basan en reacciones de reducción de sales metálicas de plata. <sup>(20)</sup>



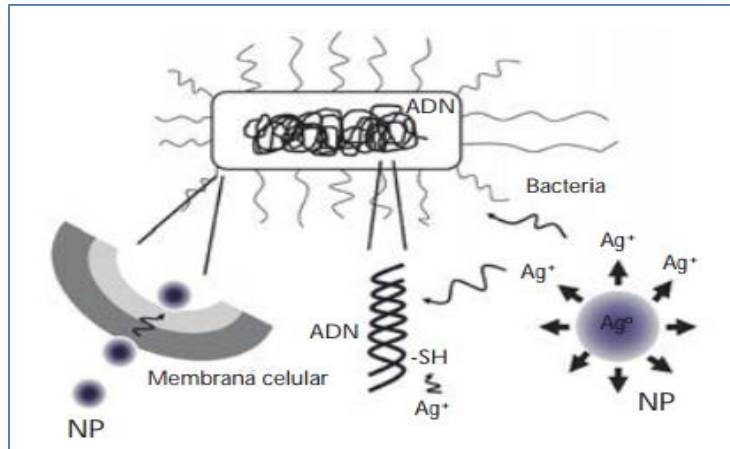
**Fig.1.** Mecanismo de formación de NPs-Ag a partir de la reducción química en disolución de la sal  $\text{AgNO}_3$ . (Mongue, 2009)

#### **1.1.4.1. Aplicaciones de las nanopartículas de plata (NPs-Ag)**

La plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, etc. En la civilización griega utilizaban la plata para cocinar y mantener la seguridad del agua. La plata ha ganado interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. <sup>(21)</sup>

#### **1.1.4.2. Mecanismos de acción antibacteriana de las NPs-Ag**

La plata ha sido utilizada desde la antigüedad, principalmente para la desinfección del agua. A partir del siglo XVII se describe como producto medicinal y a finales del siglo XIX se introduce la solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares en el recién nacido. En la década de los 20's la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos aprueba soluciones de plata iónica como agentes antibacterianos. Las nanopartículas de plata se pueden adherir a la membrana celular, alterando la permeabilidad celular y funciones respiratorias de la célula, no solo interactúan con la superficie de la membrana, si no que penetran al interior de la bacteria. El efecto bactericida de las NPs-Ag puede ser un sinergismo de los siguientes mecanismos: **1)** el material estabilizante y las NPs-Ag desestabilizan la membrana bacteriana y alteran su permeabilidad, provocando un daño irreversible. **2)** Las NPs-Ag se internalizan en la bacteria con facilidad debido a su tamaño diminuto. **3)** Las NPs-Ag en su trayecto van liberando iones de plata que funcionan como un reservorio del agente bactericida alterando el citoplasma. **4)** Los iones de plata enlazan con grupos sulfhidrilos de biomoléculas y con compuestos fosforosulfurados como el ADN inactivando a la bacteria. Estos mecanismos pueden darse simultáneamente. <sup>(22)</sup>



**Fig.2.** Mecanismo de acción antibacteriana de NPs-Ag (Leyva-Gómez, 2013).

En el 2005, Morones y cols demostraron el efecto bactericida de las NPs-Ag (1 y 10 nm) sobre *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhi*.<sup>(19)</sup> En ese mismo año, Elechiguerra y cols evaluaron el efecto de las NPs-Ag contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y demostraron su interacción con el virus posiblemente por interacción con los residuos de sulfuro de las glicoproteínas presentes en la envoltura viral, lo que impide su unión con la célula huésped.<sup>(24)</sup> En el año 2010 Lara y cols investigaron el posible mecanismo de acción de las NPs-Ag en contra del VIH-1, y sus resultados fueron similares a los obtenidos por Elechiguerra y además concluyeron que debido a que las nanopartículas actúan en contra del virus en una etapa temprana del ciclo de replicación podrían evitar el desarrollo de resistencia del virus.<sup>(25)</sup>

Con base a este mecanismo de acción, Yacamán y cols plantearon la posibilidad del uso de NPs-Ag en un preparado de uso vaginal con el fin de evitar el contagio con este virus y/o combatir sus efectos. También se ha sugerido que las NPs-Ag podrían ser usadas para combatir el virus de papiloma humano.<sup>(26)</sup> El efecto bactericida de las NPs-Ag ha sido demostrado en diversos microorganismos como *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* observando una inhibición en la reproducción bacteriana penetración de las nanopartículas al núcleo y donde

destruyen el ADN. <sup>(25)</sup> En el 2007, Siddhartha y cols reportaron la actividad antibacteriana de NPs-Ag, en relación dosis-dependiente y que la actividad antibacteriana fue mayor en contra de bacterias gram negativas que en gram positivas. <sup>(26)</sup>

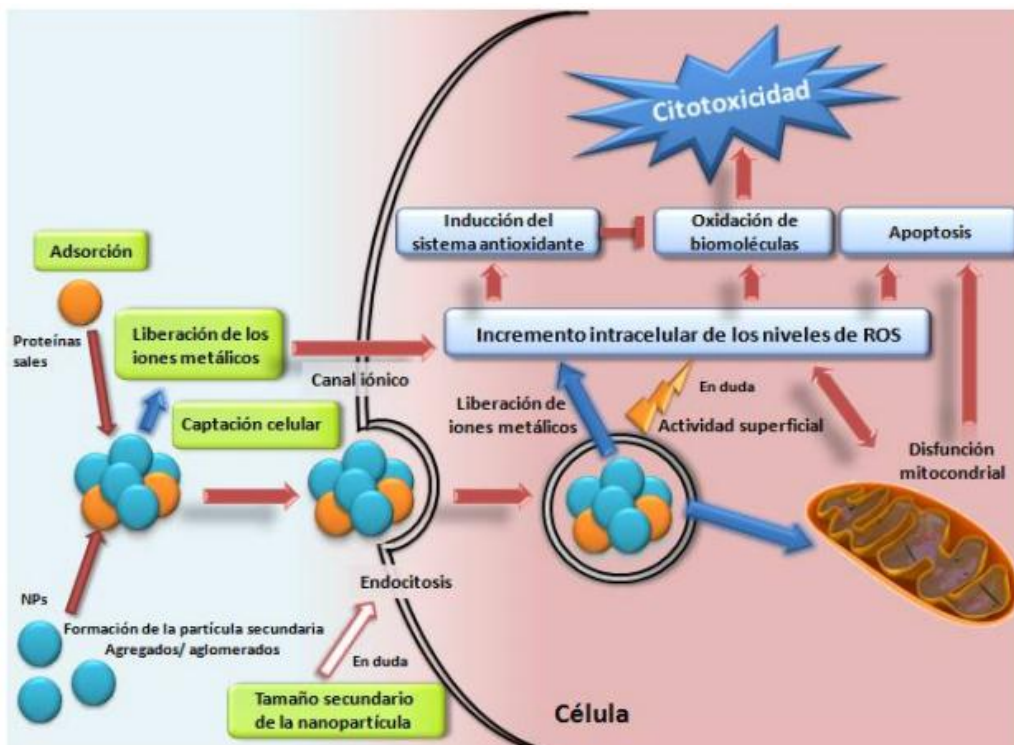
En el 2009 Asha Rani y cols expusieron fibroblastos de pulmón humano y células de glioblastoma de origen humano a NPs-Ag, y observaron endocitosis de las nanopartículas y su presencia dentro de los núcleos y citoplasma de ambos tipos celulares en los cuales se observó inestabilidad cromosómica y mitótica, sin embargo las células de pulmón se recuperaron mientras que las células de glioblastoma cesaron su proliferación. Por lo anterior sugirieron que las células cancerosas podían ser susceptibles al daño por el estrés producido por las NPs-Ag. <sup>(28)</sup> En el 2009 Ruden S. y colaboradores expusieron cultivos de diversos microorganismos a combinaciones de antimicrobianos con NPs-Ag y observaron efectos sinérgicos en la actividad antimicrobiana, en algunos casos la combinación mejoró la actividad intrínseca del antimicrobiano y en otros mejoró la permeabilidad hacia la membrana del microorganismo. <sup>(29)</sup>

En un estudio realizado en el 2009 por Sheikpranbabu y colaboradores en células epiteliales de retina porcina expuestas a NPs-Ag, se demostró la inhibición del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la interleucina 1-beta que inducen la permeabilidad por la activación de la vía de cinasas. Por lo anterior sugieren su potencial terapéutico para enfermedades oculares como la retinopatía diabética. <sup>(30)</sup> Colleen M y cols evaluaron el efecto de las NPs-Ag en contra de *Pseudomona aeruginosa* y la toxicidad en células de epiteliales de córnea, los resultados mostraron que las nanopartículas tuvieron actividad antimicrobiana y que pueden ser una estrategia para evitar la colonización de bacterias que puede ocurrir con el uso prolongado de lentes de contacto. <sup>(31)</sup>

#### 1.1.4.3. Efectos tóxicos de las nanopartículas de plata (NPs-Ag)

Aunque las NPs-Ag parecen tener una aplicación promisorio como antimicrobiano debido a las propiedades que su composición y magnitud le confieren existe la posibilidad de que su acción sobre las células del organismo humano provoquen efectos adversos, por lo que la evaluación de su posible toxicidad es necesaria para establecer su seguridad en caso del posible uso en el humano. Los atributos fisicoquímicos únicos de las nanopartículas, hacen que éstas puedan producir condiciones químicas que inducen a un ambiente pro-oxidante causando un desequilibrio en el sistema energético celular dependiendo del potencial redox, provocando efectos biológicos adversos, que van desde la activación de rutas inflamatorias hasta la muerte celular. En estudios realizados con NPs-Ag en diversas líneas celulares, como HepG2 y macrófagos entre otras, se demostró que la toxicidad fue dependiente del tamaño de la nanopartícula y que en gran parte fue mediada por la producción de estrés oxidativo. <sup>(32,33)</sup> Se ha reportado que a exposición de monocitos de origen humano a NPs-Ag indujo la producción de especies reactivas de oxígeno, que finalmente llevó a muerte celular por apoptosis. <sup>(34)</sup>

En estudios *in vitro* con células de hepatoma expuestas a NPs-Ag y de otros metales, se observó que la actividad mitocondrial disminuyó significativamente en células expuestas a NPs-Ag y hubo un incremento en la liberación de LDH, lo cual no ocurrió en las células expuestas a nanopartículas de otros metales. Además se observó que las NPs-Ag también disminuyeron los niveles de glutatión (GSH) e incrementaron las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual sugiere que la toxicidad de las NPs-Ag en hepatocitos puede estar mediada por la producción de estrés oxidativo. <sup>(35)</sup> La producción de citotoxicidad y formación de micronúcleos en células de hepatoma humano expuestas a NPs-Ag, también ha sido reportada. <sup>(36)</sup> Por otro lado se ha propuesto que las NPs-Ag pudieran interactuar con el sistema inmune y producir un efecto inmunomodulador estimulándolo o inhibiéndolo. <sup>(37)</sup>



**Fig.3.** Mecanismos de citotoxicidad inducidos por nanopartículas metálicas (Ávalos et al., 2013).

## **1.2. Justificación**

Existe una gran necesidad de la industria farmacéutica, industria biotecnológica, industria de la nanotecnológicas, de los médicos y pacientes de mejorar los tratamientos farmacológicos como la innovación en las formulaciones farmacéuticas y la modificación de moléculas o compuestos para reducir la toxicidad, el costo y la seguridad en el tratamiento. La nanotecnología sugiere una posible solución al problema del desarrollo de nuevos fármacos debido a las características relacionadas con el tamaño, las nanopartículas de plata pueden tener un uso potencial en el desarrollo de productos que podrían ser aprovechadas en un uso clínico para atacar muchas de las enfermedades que no tienen opciones de tratamiento para diferentes enfermedades como úlceras de pie diabético, enfermedades virales y cáncer. La valoración preliminar del efecto toxico las nanopartículas de plata en modelos animales servirá para avanzar en la búsqueda de principios que tengan actividad farmacológica y para la generación de beneficios sociales y económicos para la comunidad a través del acercamiento a nuevas alternativas terapéuticas en nuestra comunidad.

## **1.3. Pregunta de investigación**

¿Las nanopartículas de plata administradas por vía dérmica, ocular e intramuscular producirán baja toxicidad tanto a nivel local como sistémico?

## **1.4. Objetivos de investigación**

### **1.4.1. Objetivo general**

Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata “*in vivo*” en diferentes modelos animales.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar por espectroscopia UV-Visible y TEM las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata.

- Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata por la prueba de irritación ocular en conejos Nueva Zelanda.
- Valorar las nanopartículas de plata por la prueba de irritación del piel de conejos Nueva Zelanda, cobayos y humanos.
- Determinar el índice de irritación primaria, la toxicidad subcutánea y la sensibilización dérmica (respuesta alérgica retardada) de las nanopartículas de plata en diferentes modelos animales.
- Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno.

## **CAPÍTULO II.**

### **2.1. Metodología**

#### **2.1.1. Población**

Nuestra población de estudio será un mínimo de 10 voluntarios que cumplan con los criterios de inclusión, los cuales, antes de comenzar su participación en el estudio, proporcionaron al investigador una carta donde informan por escrito su consentimiento para participar voluntariamente en la prueba (consentimiento informado). El investigador proporciono a cada voluntario la información necesaria acerca del propósito y naturaleza del estudio, cada sujeto recibió una copia del informe de consentimiento.

- **Criterios de inclusión:**

- Que sea una persona sana.
- Que haya transcurrido por lo menos un mes desde su última participación en una prueba de parche.
- Que tenga por lo menos 18 años. No más del 20% de los participantes podrán tener más de 65 años.

- **Criterios de exclusión:**

- Que no sea una persona sana.

- Que no haya transcurrido por lo menos un mes desde su última participación en una prueba de parche.
- **Criterios de eliminación:**
  - Si ha sido sometido a algún trasplante de órgano que requiere el uso de medicamentos inmunodepresores (a excepción de trasplante de córnea).
  - Si presenta psoriasis, eczema u otro tipo de erupciones en cualquier sitio de la piel, cáncer en la piel o alguna enfermedad de esta, que pudiera interferir con las evaluaciones efectuadas en este estudio, o que pudieran exponer al voluntario a un riesgo inaceptable.
  - Si el voluntario está tomando algún medicamento esteroide anti-inflamatorio por administración sistémica, o si se está aplicando cualquier medicamento en e sitio de aplicación del parche.
  - Si presenta diabetes y está tomando insulina.
  - Si presenta asma severa o algún tipo de alergia respiratoria que requiere de una terapia crónica o frecuente con administración de medicamentos.
  - Si se le ha practicado mastectomía bilateral o unilateral durante el último año, o extirpación de nódulos linfáticos axilares.
  - Si está recibiendo tratamiento para cualquier tipo de cáncer, o si ha sido tratado contra cáncer durante los últimos 6 meses.
  - Si presenta alguna enfermedad de inmunodeficiencia (lupus, tiroiditis, etc.).
  - Si se desarrolló alergia como consecuencia de su participación en pruebas de parche previas.
  - Si la persona se encuentra embarazada o en periodo de lactancia.
  - Si la persona presenta antecedentes de trastornos mentales.

### **2.1.2. Diseño del estudio**

Este estudio es de tipo descriptivo transversal observacional.

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. La obtención de las nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de plata fueron proporcionadas por el Laboratorio de la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNyN-UNAM). Se utilizaron diferentes lotes de las concentraciones de nanopartículas de plata al 40%, 20%, 10%, 5%, 3% y 1%, para realizar los ensayos en los diferentes modelos de animales. A los diferentes lotes se les realizaron estudios para la caracterización de las nanopartículas de plata y el análisis físico.

**Tabla.1. Análisis de la composición física de las nanopartículas de plata.**

<b>Análisis</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
- Apariencia	-Líquido.
-Color	-Marrón oscuro.
-Olor	-El olor debe coincidir con el estándar.
-Contenido: Variación de volumen.	-Volumen nominal en mL, no debe ser menor que los mencionados.
-Partículas extrañas.	-No debe poseer partículas extrañas visibles.
-pH.	-Valor de pH que debe tener las nanopartículas de plata según especificación de libro oficial.
-Cierre del frasco.	-No deben observarse trazas de solución coloreada en el interior del frasco, ni la toalla utilizada para limpiar su exterior.
-Viscosidad.	-Rango de viscosidad que debe tener las nanopartículas de plata según especificación de libro oficial.
-Densidad.	-Densidad que debe tener la solución según especificación de libro oficial.

### 2.2.2. Preparación de las nanopartículas de plata

Las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (40%, 20%, 10% 5%, 3% y 1%) se aplicaron directamente sobre la piel. Se utilizaron parches de algodón

y se aplicó la cantidad de sustancia de prueba especificada de 0.3 mL. Se tuvo cuidado de no aplicar una cantidad excesiva de la sustancia, ya que se pudo haber escurrido o abarcar un área mayor que la del parche.

#### **2.2.2.1. Caracterización de la estabilidad de los materiales con nanopartículas de plata por espectroscopia UV-Visible en diferentes concentraciones.**

En la figura 7 se presentan los espectros de UV-Visible de las diferentes concentración de las nanopartículas de plata (Argovit) producidas por Vector –Vita Ltd. Los picos se presentaron en intervalos de energía alrededor de  $25,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a nanopartículas de plata con diámetro más de 1 nm y  $< 26,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a cúmulos de plata con diámetro  $< 1\text{ nm}$  (neutrales, o cargadas positivamente), que contienen alrededor de 2- 30 átomos de plata. Las bandas con máximo de absorción alrededor de  $40,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los cationes de plata  $\text{Ag}^{+1}$ .

#### **2.2.2.2. Caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5%, 10% y 20% por espectroscopia electrónica de transmisión (TEM).**

La técnica de preparación de muestras y mediciones de las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata (Argovit) producidas por Vector –Vita Ltd en forma de suspensión: 1) suspensión original concentrada (que se aplica para exportaciones); 2) suspensiones diluidas en agua bi-distilada de menor concentración (0.3%, 3% y 5%) que se aplican para tratamientos en sanidad humana o veterinaria. El tamaño y la distribución de dimensión de las nanopartículas de plata se realizaron por espectroscopia electrónica de transmisión (TEM), utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEM-100CX/SEG (Jeol, Japón), siendo el voltaje de aceleración de 80 kV y con una magnificación 30,000 y 100,000. Como pre-tratamiento de la muestra, a una fracción de la dispersión coloidal se realizó un proceso de deshidratación y de desecación del líquido que se encuentre en la muestra, luego se depositó en

mallas de cobre para microscopía electrónica con la película de carbono repartió una gota de la muestra de la suspensión, después la gota se movió desde la malla en el papel y se secó durante 5 minutos, para la toma de las fotografías a escala nanométrica.

En Valor promedio del tamaño de partículas ( $d_{prom}$ ) se calculó usando la fórmula:

$$D = \frac{\sum(n_i \times d_i)}{\sum n_i},$$

Donde  $n_i$ : es número de partículas de tamaño  $d_i$ .

Adicionalmente, un análisis semicuantitativo de la composición química de la muestra se realizó por espectrometría de dispersión de energías de rayos X (EDX) mediante el sistema acoplado al equipo de TEM. Las imágenes de TEM obtenidas se analizaron utilizando el software DigitalMicrograph (TM) (versión 3.7.0, Gatan, Inc.) de donde se obtuvieron los tamaños de las nanopartículas de plata. Como descriptor de tamaño se empleó el diámetro de esfera equivalente (DEEq) el cual es un método de dimensionamiento que tiene como criterio de equivalencia que la partícula en estudio es circunscrita por una esfera, a la cual se le toma el diámetro. Con el fin de realizar el análisis estadístico y obtener las distribuciones de tamaño se utilizó el software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XV (versión 15.2.06, StatPoint, Inc.).

### **2.2.3. Procedimientos para el estudio de irritación en piel de humano**

Se aplicaron hasta 4 parches por brazo y sólo en caso de mucha necesidad un total de 8 parches por voluntario, con un espacio mínimo entre los bordes de cada parche de 2 cm. Los parches se aplicaron en la superficie lateral del brazo entre el hombro y el codo, con el brazo en una posición relajada al lado del cuerpo. Los lugares de aplicación de los parches se eligieron aleatoriamente y se rotaron entre los diferentes voluntarios para minimizar la variación entre los sitios, como en el siguiente ejemplo:

4 muestras: 1-2-3-4, 2-3-4-1, 3-4-1-2, 4-1-2-3

3 muestras: 1-2-3, 2-3-1, 3-1-2

2 muestras: 1-2, 2-1

El sitio de aplicación para cada muestra y para cada sujeto voluntario, se anoto claramente, conservándose su localización durante todo el tiempo que duro la prueba. Los sitios de prueba fueron marcados con 2 puntos arriba y 1 abajo con una solución al 0,5% de violeta de genciana, de forma que la localización del sitio de aplicación fue claramente visible para las subsecuentes evaluaciones y nuevas re aplicaciones del parche. Los parches se aplicaron 3 veces, cada uno durante el tiempo que se especifica por 24 horas y después se removieron. Los sitios se evaluaron 48 horas después de cada aplicación (72 horas después de un fin de semana).

**Los parches se aplicaron y se evaluaron de la siguiente manera:**

**Primer día:** Se aplicaron los parches y se mantuvieron en su lugar el tiempo que se especifica, cubriéndose con material adhesivo como micropore, dicho material debió colocarse de manera que se ejerza igual presión sobre todo el parche.

**Segundo día:** Se instruyó al voluntario para que él mismo se retirara el parche y eliminara cualquier residuo de la sustancia de prueba utilizando una toalla o un trozo de algodón húmedo.



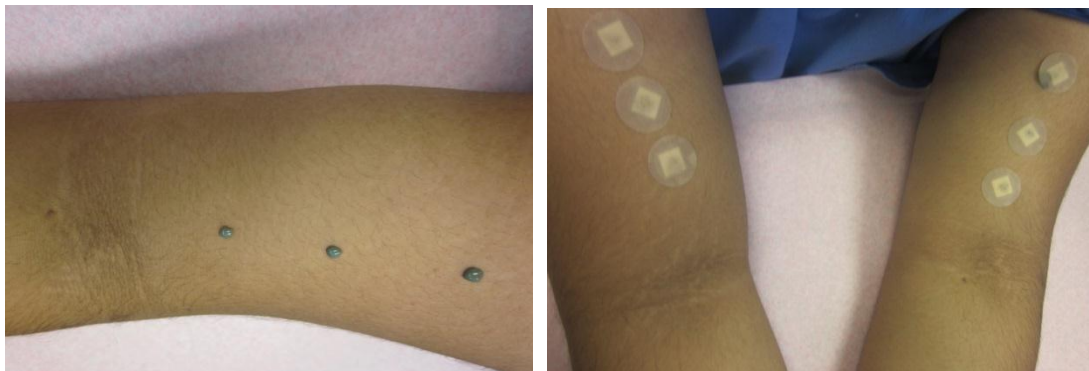
**Fig.4.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el brazo del voluntario.



**Fig.5.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el brazo del voluntario y aplicación de los parches adhesivos como micropore.



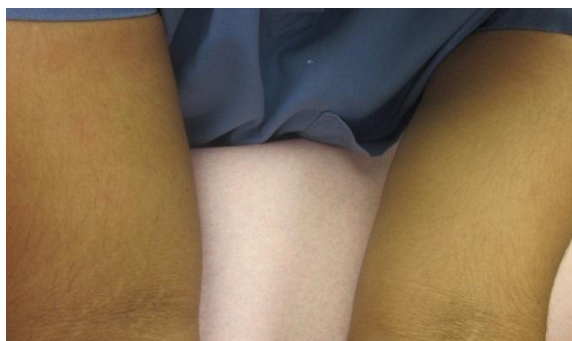
**Fig.6.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el otro brazo del voluntario.



**Fig.7.** Día 1.- Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el brazo del voluntario y aplicación de los parches adhesivos como micropore en los dos brazos.



**Fig.8.** Día 2.- Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata en el brazo del voluntario.



**Fig.9.** Día 3.- Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata en el brazo del voluntario.

**Tercer día:** Se acudió al centro de prueba donde se realizó la evaluación del área expuesta, empleando una fuente luminosa artificial, de haber sido necesario, se apoyó de una lente con aumento. Al terminar la evaluación se aplicó el siguiente parche.

**Cuarto día:** Se procedió como el segundo día.

**Quinto día:** Se procedió como el tercer día.

**Sexto día:** Se procedió como el segundo día.

**Séptimo día:** Se procedió como el tercer día sin aplicar nuevo parche.

### **Escala de evaluación de la prueba de parche**

- 0 No se presenta reacción visible en la piel.
- 0.5 Mayor que 0 y menor que 1.
- 1 Eritema ligero definido, sin erupciones ni grietas en la piel o bien ausencia de eritema con presencia de resequedad.
- 1.5 Mayor que 1 y menor que 2.
- 2 Eritema moderado, puede presentarse algunas pápulas o fisuras profundas y presentarse eritema moderado o severo en las grietas.
- 2.5 Mayor que 2 y menor que 3.
- 3 Eritema severo (color rojo brillante), pueden presentarse pápulas generalizadas o eritema severo con edema ligero (bordes bien definidos y elevados).
- 3.5 Mayor que 3 y menor que 4.
- 4 Vesículas generalizadas o eritema moderado a severo o edema que se extiende más allá del área del parche.

Los voluntarios fueron evaluados por la misma persona durante toda la prueba. Los parches no se aplicaron en el sitio que presentó una calificación igual o mayor de 2. Esta calificación se registró adecuadamente. La reaplicación del parche se hizo en la parte anterior al sitio inicial de aplicación, si el sitio obtuvo una calificación igual o mayor de 2, el tercer sitio se eligió en la parte posterior al sitio inicial. Si se presentó una irritación excesiva (calificación >2) en todos los participantes de la primera evaluación, para las aplicaciones subsecuentes se disminuyó la concentración de la sustancia de prueba a la mitad para los productos que se aplicaron diluidos, o se disminuyó el tiempo de aplicación de esta sustancia a la mitad para aquellos productos que se aplicaron en su presentación original. En cualquier caso el parche se reaplicó en la parte anterior al sitio inicial de aplicación y, si se requirió, el tercer sitio se eligió en la parte posterior al sitio inicial. Esto se documentó claramente y se tomaron en cuenta en los criterios de aceptación del producto.

#### **2.2.3.1. Criterios de aceptación de la prueba de irritación en piel de humanos**

Los productos para uso en bebés deben presentar un índice de irritación promedio final no mayor de 1. Los productos que tengan una calificación menor o igual a 1.5 fueron aceptados como productos aptos para uso humano.

#### **2.2.4. Determinación de los índices de irritación ocular y dérmica de las nanopartículas de plata.**

Realizar pruebas experimentales para determinar la irritación ocular, primaria dérmica y sensibilización de nanopartículas de plata, con el fin de demostrar que no es irritantes al aplicarse o usarse directamente. Las nanopartículas de plata contienen sustancias químicas e ingredientes que pueden causar lesiones en ojos o en la piel, por ser éstos de uso cotidiano es importante comprobar que su contenido sea inocuo. Con objeto de determinar si las nanopartículas de plata son irritante o sensibilizante, las pruebas se efectuaron en animales demostrando los cambios visibles cuantificables. Estas pruebas *in vivo* se efectúan poniendo la muestra de nanopartículas de plata en contacto con el ojo o la piel del animal, para observar los cambios visibles y obtener los resultados haciendo las mediciones correspondientes. En la prueba del "parche" en humanos, de manera similar, se pone en contacto externo la muestra con la piel de la persona para medir la irritación dérmica y la sensibilización.

#### **2.2.5. Prueba de Irritación ocular en conejo.**

Esta prueba se realizó en 18 conejos con diferentes diluciones de las nanopartículas de plata. En la parte experimental se sujetaron los conejo, asimismo se sujetó suavemente el párpado del conejo para mantener el ojo de prueba abierto. Se aplicó directamente en la córnea 0.1 mL (100 microlitros) de la dilución de las nanopartículas de plata (evaluando las concentraciones del 40%, 20%, 10%, 5%, 3% y 1%), utilizando una micro pipeta limpia para cada dilución de prueba. El otro ojo quedo como testigo aplicando la misma cantidad de agua destilada y de la misma manera. Se realizó la liberación del párpado inmediatamente después de la aplicación, sin forzar el parpadeo ni manipular. Se

llevó un registro de la hora de aplicación, además se anotaron si los animales de prueba mostraron cualquier signo de malestar como consecuencia de la aplicación de las nanopartículas de plata. Se mantuvieron los animales en sus cepos durante tres horas y después regresarlos a sus jaulas.

#### **2.2.5.1. Evaluación de la prueba de Irritación ocular en conejo**

Se observaron los ojos de los conejos a la 1ra, 2da, y 3ra hora, a las 24 y 48 horas y al 4to, 5to, 6to y 7mo días después de aplicación de las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata, usando el ojo no tratado como control o testigo, haciéndose las anotaciones correspondientes. Se evaluó en los ojos de prueba la reacción que ante la aplicación de la muestra presentan la conjuntiva, la córnea y el iris, con ayuda de una lente de aumento, utilizando la siguiente escala de calificación. Escala para la evaluación numérica de las lesiones oculares observar en el ojo cerrado la quemosis y lacrimación, abrir el párpado para evaluar la conjuntiva, la córnea y el iris, utilizando la lente de aumento.

##### **Escala para la evaluación de la conjuntiva**

(Se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar, excluyendo la córnea y el iris):

Vasos normales 0

Vasos capilares con ligero enrojecimiento 1

Enrojecimiento 2

Enrojecimiento difuso intenso 3

##### **Escala para la evaluación de la quemosis**

No hay inflamación 0

Inflamación ligera, incluyendo la membrana nictante 1

Inflamación con eversión parcial del párpado 2

Inflamación con párpados cerrados a la mitad 3

Inflamación con párpados totalmente cerrados 4

### **Escala para la evaluación de la secreción**

Ausencia de secreción 0

Secreción ligera apenas perceptible 1

Secreción con humedecimiento de los párpados y del pelo adyacente al borde palpebral externo 2

Secreción con humedecimiento de los párpados y del pelo sobre grandes zonas alrededor del ojo 3

### **Calculo para la calificación total de la evaluación de la prueba de Irritación ocular en conejo**

$(a + b + c) \times 2 = 20$  (máximo)

Dónde:

a = Valor del enrojecimiento

b = Valor de la quemosis

c = Valor de la secreción

### **Escala para la evaluación de la córnea**

#### **- Escala para la evaluación del grado de opacidad**

No hay opacidad (no hay pérdida de brillantez o luminosidad) 0

Ligera opacidad (sin perder la transparencia pero sí la brillantez) 1

Presencia de opacidad aún traslúcida con el iris ligeramente oscurecido 2

Presencia de opacidad con iris poco visible y contorno de la pupila difícilmente visible 3

Presencia de opacidad que hace al iris invisible 4

### **Escala para la evaluación de las áreas de opacidad**

Menos de un cuarto 1

Entre un cuarto hasta la mitad 2

Más de la mitad y tres cuartos 3

De tres cuartos a toda el área 4

### **Calculo para la calificación total en la lesiones en córnea**

$$a \times b \times 5 = 80 \text{ (máximo)}$$

Dónde:

a = Valor del grado de opacidad

b = Valor del área de opacidad

### **Escala para la evaluación en el Iris**

#### **- Escala para la evaluación del grado de lesión en el iris**

Normal 0

Congestionado, con inyecciones circuncorneales y obviamente más arrugado que lo normal (una o varias de estas características), con el iris aún reaccionando a la luz (una reacción lenta es una reacción positiva) 1

No hay reacción a la luz, hemorragia, lesión considerable (una o varias de estas características) 2

### **Calculo para la calificación total en la lesiones en iris**

Total de lesiones en iris

$$a \times 5 = 10 \text{ (máxima)}$$

Dónde:

a = Valor de la lesión en iris

#### **2.2.5.2. Prueba de irritación en piel de conejos**

Preparación de los animales: el día anterior a la realización de la prueba, se rasura el dorso de los conejos de manera que quede sin pelo desde la región escapular a la lumbar a un lado y otro de la columna vertebral. Para ello utilizar primero el peine del No. 40 y después el del No. 0. Esto debe hacerse con mucho cuidado, a fin de no lesionar la piel al rasurar. El material de prueba se aplicará directamente en el dorso de cada animal, cubrir con un parche de gasa quirúrgica de 2 x 2 cm, con un grosor de 4 a 8 monocapas, colocado en el sitio elegido. Considerar como control cualquier otra área de la piel en esta zona. Colocar a cada animal en un cepo para minimizar sus movimientos durante la prueba. Si la sustancia de prueba

es un líquido, aplicar la cantidad de 0.3 mL directamente en la piel de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (40%, 20%, 10%, 5%, 3% y 1%), después, sujetar la gasa al conejo con una tela adhesiva. El tiempo de aplicación del parche varía dependiendo de la naturaleza del producto; este tiempo para cada grupo de productos se especifica de cuatro horas.

#### **2.2.6. Prueba de sensibilización en piel de cobayos**

En esta prueba deben utilizarse cobayos de la cepa Hartley, con un peso entre 300 y 400 g, para cada fase de la prueba se aconseja emplear el mismo número de hembras que de machos. El único periodo de estrés a que deben ser sometidos los animales es el tiempo que se les mantiene en los cepos, durante la exposición a la sustancia de prueba. La administración de analgésicos o sedantes puede modificar la respuesta inflamatoria a evaluar. También puede modificarse el tono muscular, trayendo como consecuencia que las condiciones de oclusión de los parches se modifiquen de manera importante. Por lo tanto, no se debe administrar este tipo de sustancias ni otros medicamentos a los animales durante el tiempo que dura la prueba.

##### **2.2.6.1. Métodos de tratamiento y observación**

El día anterior a la prueba debe rasurarse el dorso del animal en el área de aplicación de los parches con la rasuradora eléctrica, utilizando primero el peine del No. 40 y después el del No. 0. Esto debe hacerse cuidadosamente, sin lesionar la piel al rasurar. Los parches a aplicar deben ser ocluidos, preparándose como sigue: Las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (40%, 20%, 10%, 5%, 3% y 1%) se aplicarán directamente al animal, cubrir con el parche de gasa quirúrgica esterilizada de 2 x 2 cm, con un grosor de 4 a 8 monocapas, colocado en cualquier sitio del dorso del animal. Considerar como control cualquier otra área de la piel en esta zona. En el caso de líquidos, aplicar 0.4 mL, en el caso de sólidos, polvos o pastas sujetar el parche a la piel en uno de los lados utilizando tela adhesiva, colocar el material de prueba 0.4 g sobre la piel, y cerrar el lado restante del parche con tela adhesiva. Los sólidos y polvos deberán ser

molidos y tamizados antes de pesar. Cuando el material de prueba contenga sustancias volátiles, se debe permitir la evaporación del disolvente antes de aplicar el material de prueba con la sustancia y de colocarlo en la piel del animal. Colocar el animal en el cepo y aplicar el parche en el área adecuada. Ocluir el parche utilizando la banda elástica, ajustándola de manera que haga contacto con la región dorsal del animal de manera uniforme. Ajustar el cepo para minimizar los movimientos del animal durante el periodo de exposición.

#### **2.2.6.2. Evaluación de la prueba de sensibilidad de piel**

Se debe realizar la evaluación a las 18 horas, utilizando la escala que se incluye en el apartado posterior, hay que repetirla. Repetir la evaluación 24 horas más tarde (es decir 48 horas después de haber removido el parche). Debe utilizarse esta escala para realizar las evaluaciones de las pruebas preliminares de irritación y de la fase de desafío. La evaluación de todos los animales debe realizarse colocándolos bajo una fuente de luz blanca fluorescente de 160 watts, a una distancia de 90 cm y sobre un fondo negro plano. Esta evaluación debe hacerse por dos técnicos, los cuales deben estar de acuerdo en la calificación que se registre. Además, cuando la respuesta sea difícil de evaluar pueden compararse los sitios de aplicación del parche de otros animales en el grupo de prueba y en el control antes de emitir la calificación.

#### **Escala de evaluación de la prueba de sensibilización en piel**

- 0 No se presenta reacción visible en la piel.
- 0.5 Mayor que 0 y menor que 1.
- 1 Eritema ligero definido, sin erupciones ni grietas en la piel o bien ausencia de eritema con presencia de resequedad.
- 1.5 Mayor que 1 y menor que 2.
- 2 Eritema moderado, puede presentarse algunas pápulas o fisuras profundas y presentarse eritema moderado o severo en las grietas.
- 2.5 Mayor que 2 y menor que 3.

-3 Eritema severo (color rojo brillante), pueden presentarse pápulas generalizadas o eritema severo con edema ligero (bordes bien definidos y elevados).

-3.5 Mayor que 3 y menor que 4.

-4 Vesículas generalizadas o eritema moderado a severo o edema que se extiende más allá del área del parche.

### **2.2.7. Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno**

Se utilizó la composición de nanopartículas de plata al 5% para evaluar la toxicidad a dosis repetida en un grupo de 10 vacas (Holstein), se realizaron cultivos para evaluar el crecimiento bacteriano, se realizó la identificación del microorganismo y la prueba de sensibilidad. El tratamiento consistió en la administración intramuscular por 3 días de la aplicación de nanopartículas de plata al 5% cada 12 horas.

### **2.2.8. Transporte de la muestra**

Los procedimientos de embalaje, transporte y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) se realizaron siguiendo como referencia los siguientes documentos y la legislación aplicable vigente.

1. Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos de la OMS-División para la Vigilancia y el Control de Enfermedades Emergentes y otras Enfermedades Transmisibles, Ginebra, 1997.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCT2/1995, Especificaciones especiales y adicionales para los envases y embalajes de las sustancias peligrosas de la división 6.2 agentes infecciosos.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2000, Características de las etiquetas de envases y embalajes destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

4. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

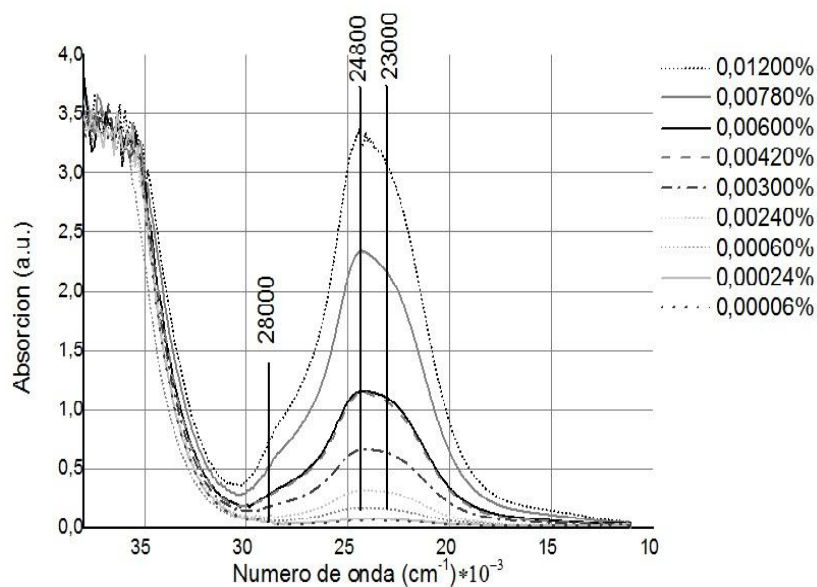
## CAPÍTULO III

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterización de las nanopartículas de plata

##### 3.1.1. Identificación por Espectroscopia UV-Visible de las nanopartículas de plata

Con el fin de observar la absorción en la región ultravioleta-visible (UV-Vis) del espectro electromagnético de las nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5%, 20% y 40% de Argovit producidas por Vector –Vita Ltd, se realizó con un espectrofotómetro Varían, modelo CARY-300, utilizando como blanco una solución de nitrato de plata 1.0 % p/v a pH 7.0. En la figura 10 se muestra la caracterización de la estabilidad de los materiales con nanopartículas de plata por espectroscopia UV-Visible en diferentes concentraciones. En donde se presentan los espectros de UV-Visible de las diferentes concentración de las nanopartículas de plata (Argovit) producidas por Vector –Vita Ltd.

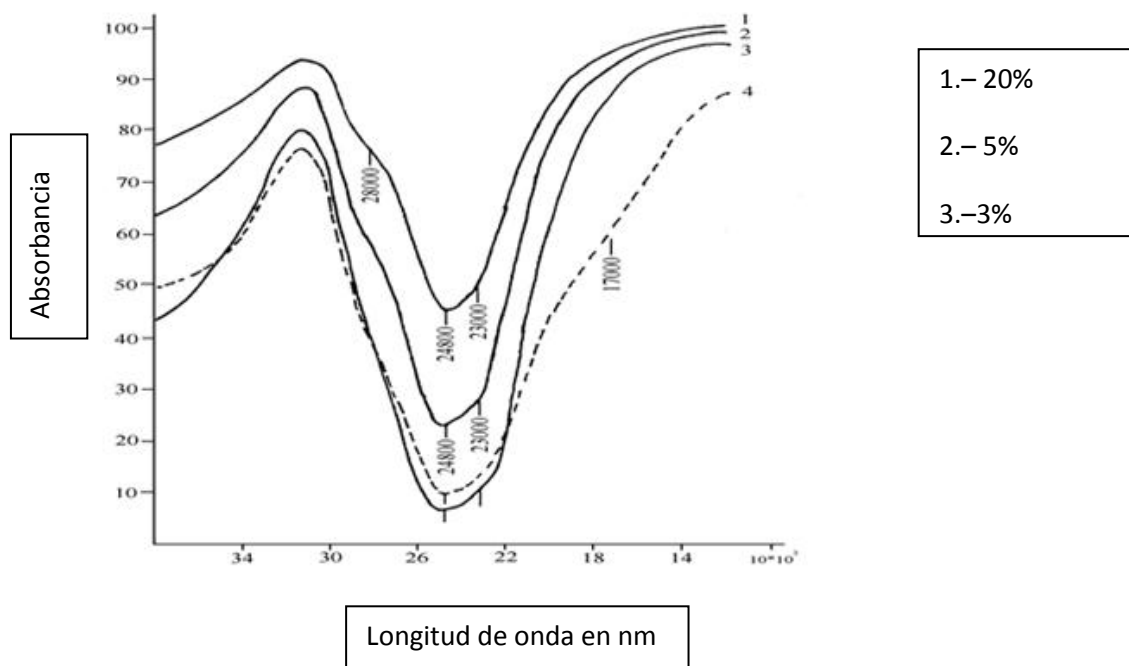


**Fig.10.** Espectros de UV-Visible de Argovit de diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata producidas por Vector –Vita Ltd.

Los picos se presentaron en intervalos de energía alrededor de  $25,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a nanopartículas de plata con diámetro más de  $1\text{ nm}$  y  $< 26,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a cúmulos de plata con diámetro  $< 1\text{ nm}$  (neutrales, o cargadas positivamente), que contienen alrededor de 2- 30 átomos de plata. Las bandas con máximo de absorción alrededor de  $40,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los cationes de plata  $\text{Ag}^{+1}$ .

### 3.1.2. Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20% por espectroscopia UV-Visible.

En la figura 11 se presentan los espectros de UV-Visible de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%. En el espectros de Argovit se observan la banda más intensiva a  $24,800$  es (la banda típica para nanopartículas de plata con diámetro  $> 1\text{ nm}$ ); un hombro a  $23,000\text{ cm}^{-1}$ , (se interpreta como nanopartículas de plata con diámetro  $> 1\text{ nm}$ ), el hombro ligeramente notable a  $28,000\text{ cm}^{-1}$  (cúmulos de plata de con diámetro  $< 1\text{ nm}$  neutrales, o cargadas positivamente).

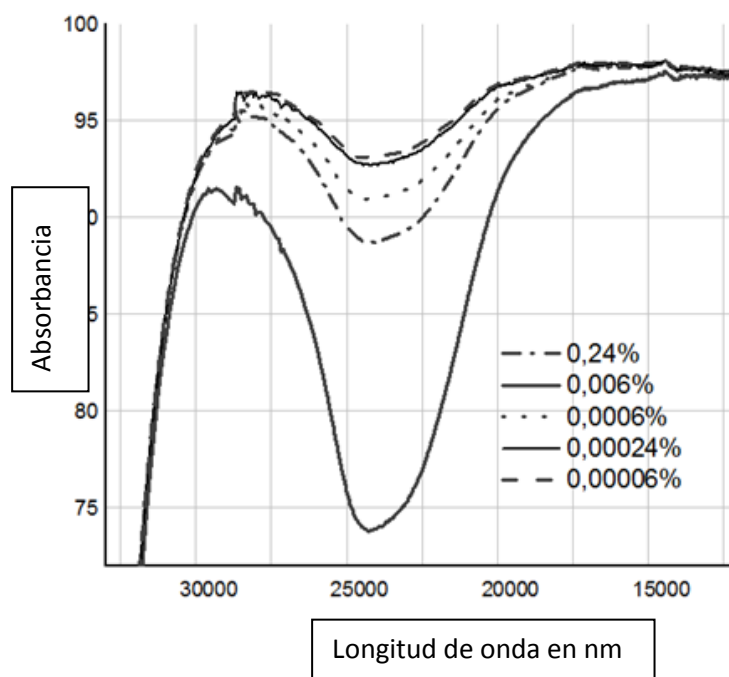


**Fig.11.** Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5% y 20%.

El aumento de concentración de las nanopartículas de plata de 0.3% hasta 20% de plata metálica de Argovit, aumenta la intensidad del espectro, pero no resulta al cambio considerablemente la forma del espectro e intensidad relativa de los 3 tipos de bandas. Esto indica que el estado electrónico de nanopartículas y cúmulos de plata no se cambió con la variación de concentración de Argovit en los intervalos estudiados.

### 3.1.3. Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20% por espectroscopia UV-Visible.

En la figura 12 se presentan los espectros de UV-Visible de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%. En los espectros de Argovit se observan la banda más intensiva a 24,800 y un hombro a 23,000  $\text{cm}^{-1}$ , el hombro ligeramente notable a 28,000  $\text{cm}^{-1}$ .

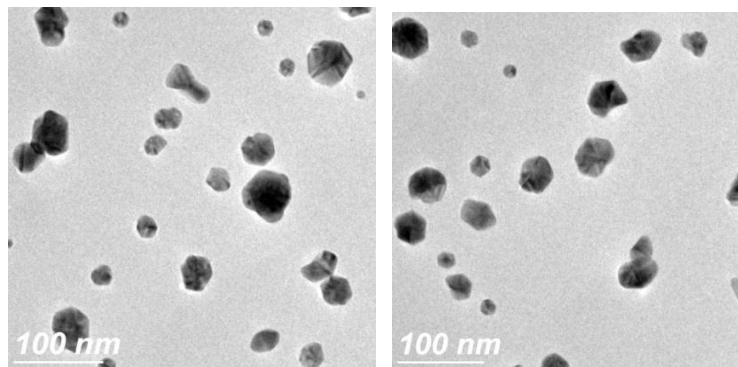


**Fig.12.** Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%.

El aumento de concentración de las nanopartículas de plata de 0.3% hasta 20%, aumenta la intensidad del espectro, pero no resulto al cambio considerablemente la forma del espectro e intensidad relativa de los 3 tipos de bandas.

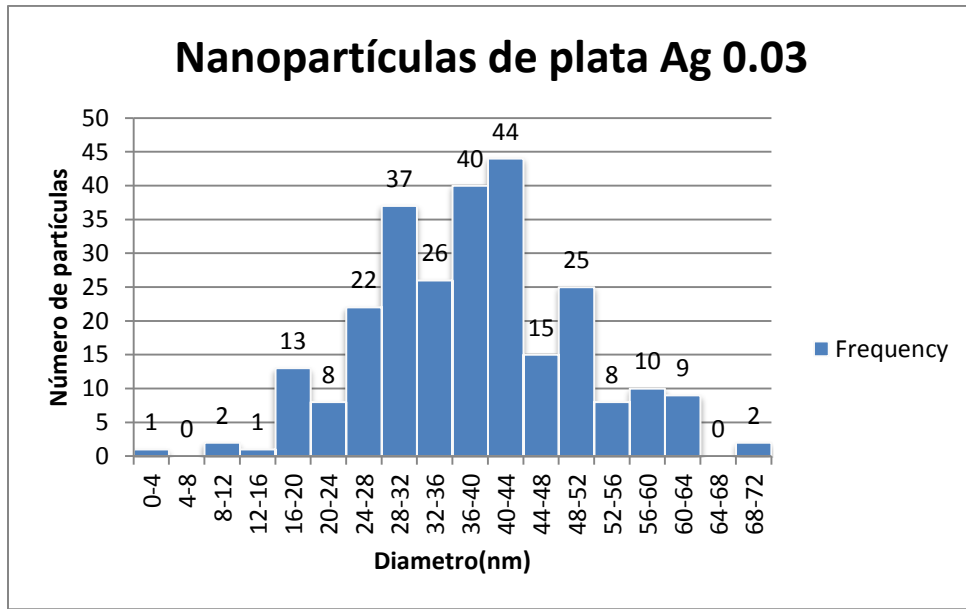
### **3.2. Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5%, 10% y 20% por espectroscopia electrónica de transmisión (TEM).**

En la figura 13 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.03% de Argovit con el lote B001077. Totalmente se contó 263 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $38.3 \pm 11.5 \text{ nm}$ .



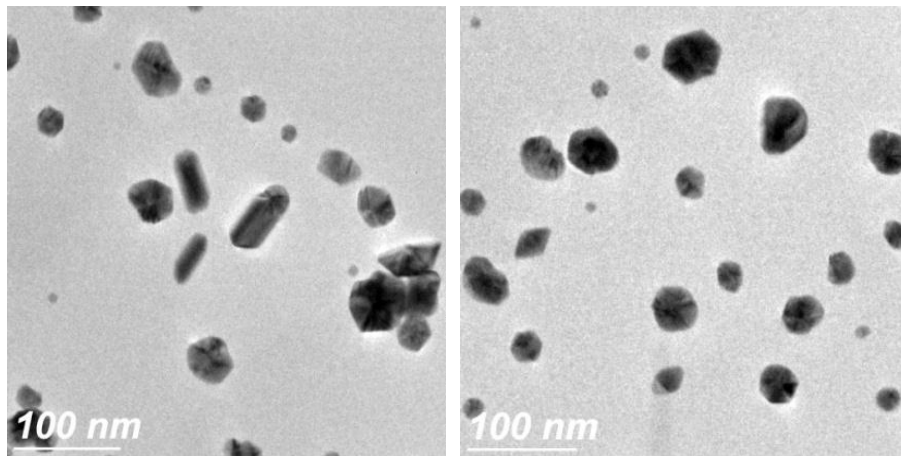
**Fig.13.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 0.3% del lote B001077.

En la gráfica 1 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.3% de Argovit. Totalmente se contó 263 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $38.3 \pm 11.5 \text{ nm}$ .



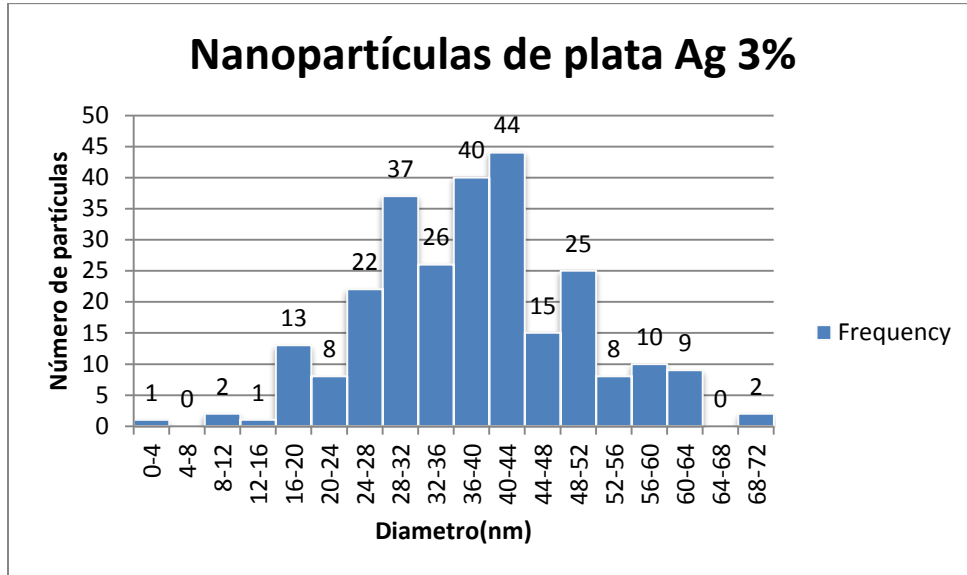
**Gráfica.1.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.3% de Argovit con el lote B001077.

En la figura 14 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit con el lote B001078. Totalmente se contó 244 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $36.0 \pm 12 \text{ nm}$ .



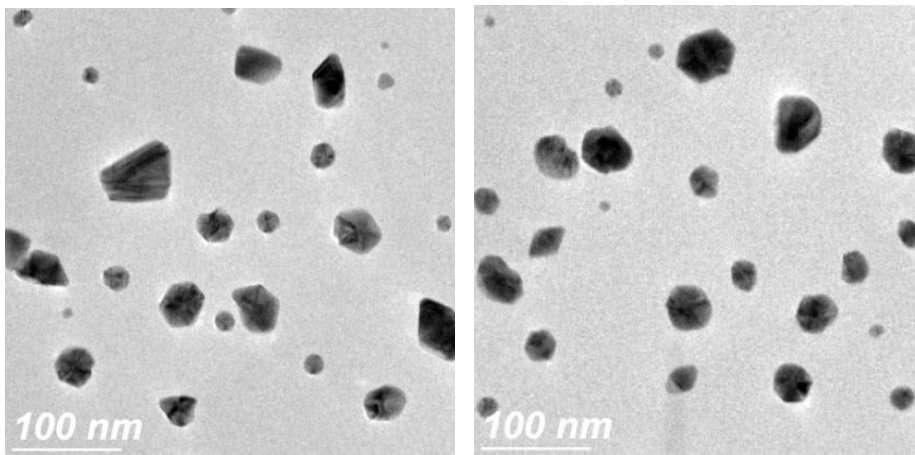
**Fig.14.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 3% del lote B001078.

En la gráfica 2 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit. Totalmente se contó 244 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $36.0 \pm 12 \text{ nm}$ .



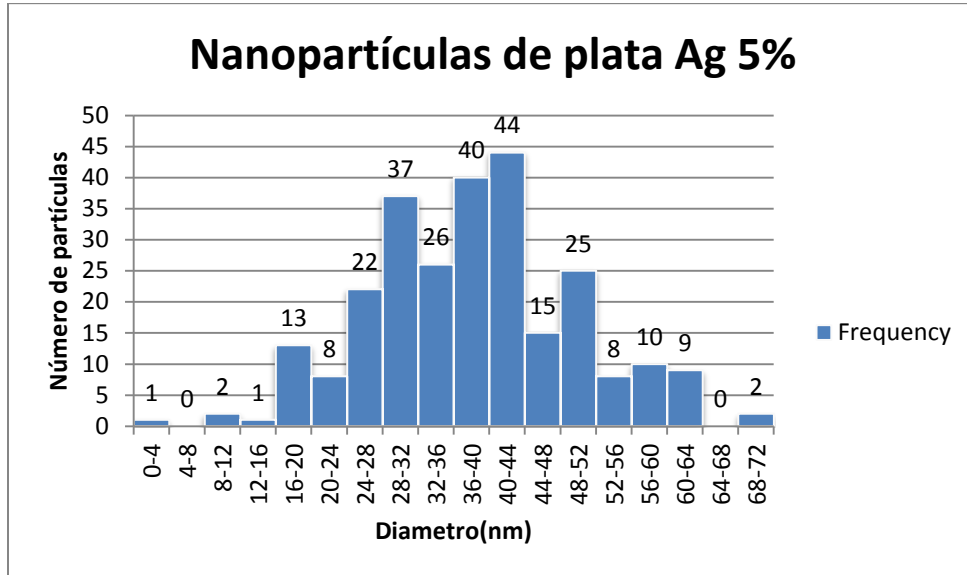
**Gráfica.2.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit con el lote B001078.

En la figura 15 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit con el lote B001079. Totalmente se contó 223 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $34.0 \pm 12.5 \text{ nm}$ .



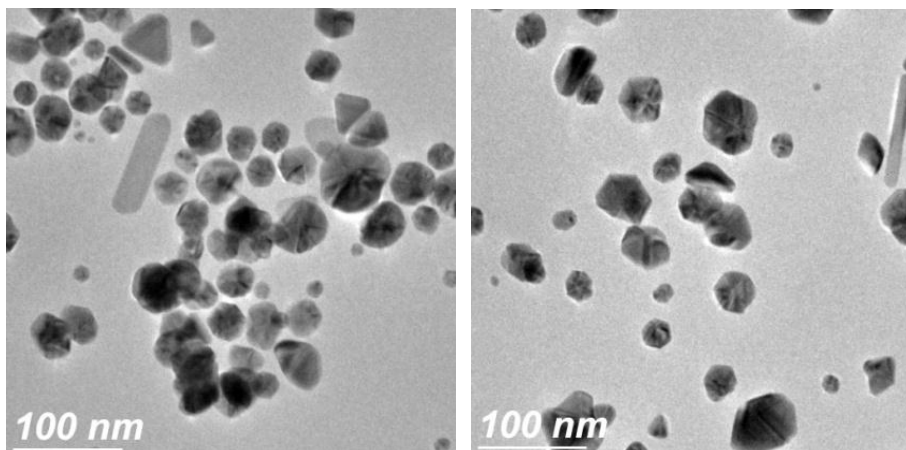
**Fig.15.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 5% del lote B001079.

En la gráfica 3 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit. Totalmente se contó 223 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $34.0 \pm 12.5 \text{ nm}$ .



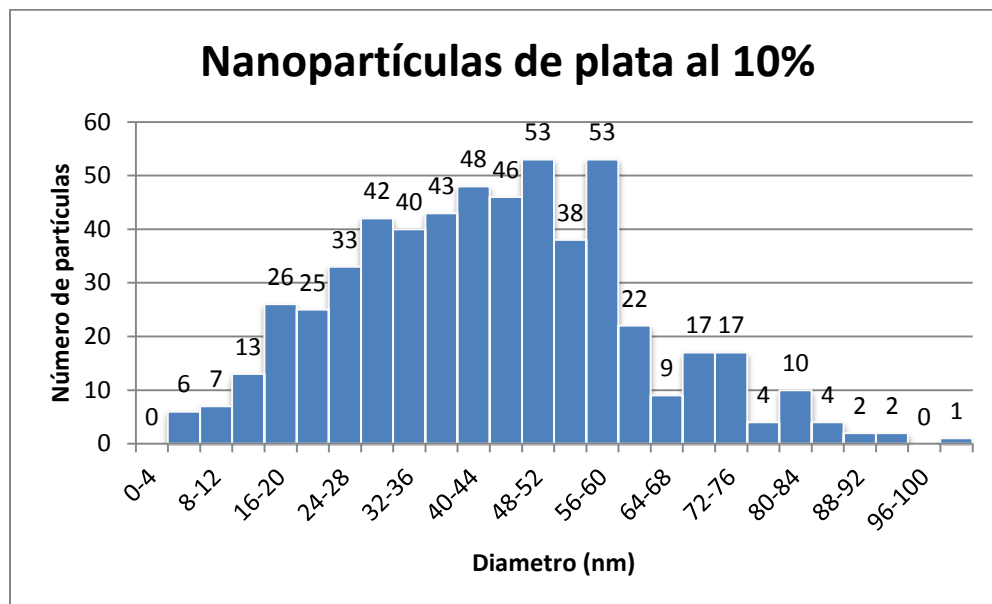
**Gráfica.3.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit con el lote B001079.

En la figura 16 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit. Totalmente se contó 561 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $44.4 \pm 17.8 \text{ nm}$ .



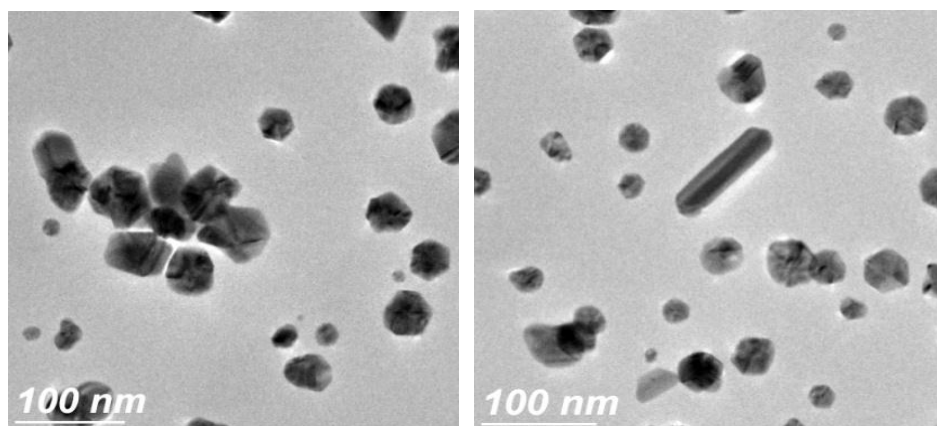
**Fig.16.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 10% del lote B001066.

En la gráfica 4 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit. Totalmente se contó 561 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $44.4 \pm 17.8 \text{ nm}$ .



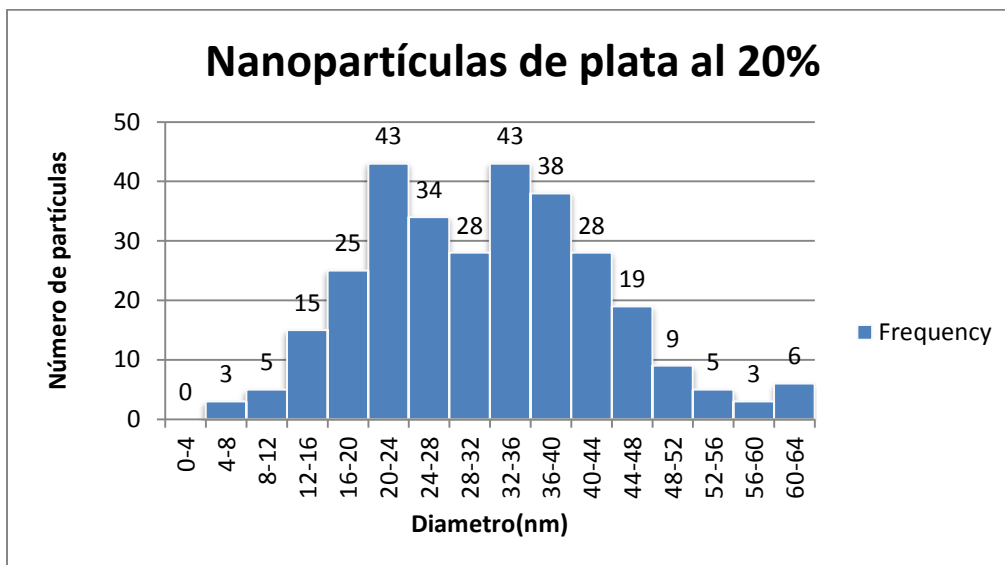
**Gráfica.4.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit con el lote B001066.

En la figura 17 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit. Totalmente se contó 422 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $40.0 \pm 15.3 \text{ nm}$ .



**Fig.17.** Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 20% del lote B001067.

En la gráfica 5 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit. Totalmente se contó 422 partículas. El valor promedio del tamaño es:  $40.0 \pm 15.3 \text{nm}$ .



**Gráfica.5.** Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit con el lote B001067.

### 3.3. Resultados de la prueba de Irritación ocular en conejo

Se observaron y se tomaron los datos clínicos correspondientes de los ojos en cada conejos a la 1ra, 2da, y 3ra hora, a las 24 y 48 horas y al 4to, 5to, 6to y 7mo días después de aplicación de las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata, usando el ojo no tratado como control o testigo, haciéndose las anotaciones correspondientes. Se evaluó en los ojos de prueba la reacción que ante la aplicación de la muestra presentan la conjuntiva, la córnea y el iris, con ayuda de una lente de aumento, utilizando la siguiente escala de calificación. Escala para la evaluación numérica de las lesiones oculares observar en el ojo cerrado la quemosis y lacrimación, abrir el párpado para evaluar la conjuntiva, la córnea y el iris, utilizando la lente de aumento.

### 3.3.1. Interpretación de los resultados de la prueba de Irritación ocular en conejo

Se suman las calificaciones obtenidas en conjuntiva, córnea e iris para cada conejo, se promedian los valores de los 3 conejos, obteniéndose así la calificación de la prueba por día. Una vez terminada la prueba, e incluyendo el valor del último día de la prueba, se promedian los valores de las calificaciones de la prueba por día. El valor promedio obtenido se divide entre 110 (suma total de las calificaciones máximas posibles) y dependiendo del cociente obtenido se clasificará el producto de acuerdo a la siguiente tabla:

0.0 a 0.1 no irritante

Más de 0.1 a 0.3 ligeramente irritante

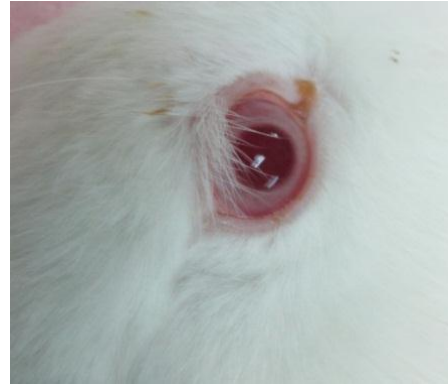
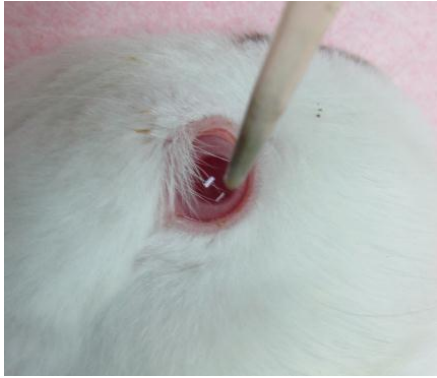
Más de 0.3 a 0.5 irritante

Más de 0.5 a 1.0 irritante severo

**Tabla 2.** Resultados de la prueba de Irritación ocular en conejo

Número de conejos	Concentración de nanopartículas de plata	*Conjuntiva	*Córnea	*Iris	Total
1	0.3%	0	0	0	0
2	0.3%	0	0	0	0
3	0.3%	0	0	0	0
4	0.3%	0	0	0	0
5	3%	0	0	0	0
6	3%	0	0	0	0
7	3%	0	0	0	0
8	3%	0	0	0	0
9	5%	0	0	0	0
10	5%	0	0	0	0
11	5%	0	0	0	0
12	5%	0	0	0	0
13	10%	0	0	0	0
14	10%	0	0	0	0
15	10%	0	0	0	0
16	10%	0	0	0	0
17	20%	0	0	0	0
18	20%	0	0	0	0
19	20%	0	0	0	0
20	20%	0	0	0	0

Se presenta el promedio de la 1ra, 2da, y 3ra hora, a las 24 y 48 horas y al 4to, 5to, 6to y 7mo días de los diferentes tiempos de evaluación.



**Fig.18.** Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el ojo de conejo.



**Fig.19.** Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el ojo de conejo.



**Fig.20.** Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el ojo de conejo.

### **3.4. Resultados de la prueba de irritación en piel de humanos**

Para identificar claramente el resultado, el sitio de aplicación para cada muestra y para cada sujeto voluntario, se anota claramente, conservándose su localización durante todo el tiempo que dure la prueba. Los sitios de prueba son marcados con 2 puntos arriba y 1 abajo con una solución al 0.5% de violeta de genciana, de forma que la localización del sitio de aplicación sea claramente visible para las subsecuentes evaluaciones y nuevas re-aplicaciones del parche. Los parches fueron aplicados 3 veces, cada uno durante el tiempo que se especifica en materiales y métodos por 24 horas y después se remueven. Los sitios se evalúan 48 horas después de cada aplicación (72 horas después de un fin de semana).

#### **3.4.1. Los parches se aplicaron y se evaluaron de la siguiente manera**

-Primer día: Se aplican los parches y se mantienen en su lugar el tiempo que se especifica en la Tabla 1, cubriéndose con material adhesivo como micropore, dicho material debe colocarse de manera que se ejerza igual presión sobre todo el parche.

-Segundo día: Se instruye al voluntario para que él mismo se retire el parche y elimine cualquier residuo de la sustancia de prueba utilizando una toalla o un trozo de algodón húmedos.

-Tercer día: Acudir al centro de prueba donde se realiza la evaluación del área expuesta, empleando una fuente luminosa artificial, de ser necesario, auxiliarse con una lente de aumento. Al terminar la evaluación se aplica el siguiente parche.

-Cuarto día: Proceder como el segundo día.

-Quinto día: Proceder como el tercer día.

-Sexto día: Proceder como el segundo día.

-Séptimo día: Proceder como el tercer día sin aplicar nuevo parche.

Los voluntarios fueron evaluados por la misma persona durante toda la prueba. Los parches no se aplican en el sitio que ha presentado una calificación igual o mayor de 2. Esta calificación se registra adecuadamente. La re-aplicación del parche se hará en la parte anterior al sitio inicial de aplicación, si este sitio obtiene una calificación igual o mayor de 2, el tercer sitio se eligió en la parte posterior al

sitio inicial. En ningún momento se presentó una irritación excesiva (calificación >2) en todos los participantes en la primera evaluación, para las aplicaciones siguiente se disminuyó la concentración de las nanopartículas de plata.

**Tabla.3.** Resultados de la prueba de irritación en piel de humanos

<b>Voluntarios</b>	<b>1er día</b>	<b>2do día</b>	<b>3er día</b>	<b>4to día</b>	<b>5to día</b>	<b>6to día</b>	<b>7mo día</b>
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>4</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>5</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>6</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>7</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>8</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>9</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>10</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>11</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>12</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>13</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>14</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>15</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>16</b>	0	0	0	0	0	0	0

Se presenta el promedio de los diferentes días de la aplicación del parche en distintas concentraciones de nanopartículas de plata.

### **3.4.2. Análisis de datos de la prueba de irritación en piel de humanos**

En el caso de que se obtuviera una calificación de 3 o más, no se reaplico parche y se supuso una calificación de 3 para las evaluaciones restantes. Durante la prueba se pudieron presentar como respuestas esperadas, reacciones que van de medio a moderado eritema, con alguna comezón o sensación de ardor. Los voluntarios se comunicaron vía telefónica con el centro de prueba, tan pronto como haya sido la respuesta de mayor intensidad, a fin de que contara con asistencia médica las 24 horas del día. Cualquier sujeto que faltara a una aplicación o evaluación fue eliminado del estudio. La razón por la cual se eliminó algún voluntario debió ser anotada para tomarse en cuenta al hacer la evaluación final.

### 3.4.3. Interpretación de los resultados de la prueba de irritación en piel de humanos

Después de que se completaron todas las sesiones de evaluación se sumaron las calificaciones obtenidas por día y se dividieron entre el número total de sujetos, lo que representa al promedio de calificación para ese día. El promedio de estas calificaciones es calculado el índice de irritación promedio final.

### 3.4.4. Resultados de la prueba de irritación en piel de conejos y cobayos

Se realizó la evaluación a las 18 horas, 24 horas y a las 48 horas después de haber removido el parche. Se utilizó la escala para realizar las evaluaciones de las pruebas preliminares de irritación y de la fase de desafío. La evaluación de todos los animales se realizó colocándolos bajo una fuente de luz blanca, a una distancia de 90 cm y sobre un fondo negro plano. Esta evaluación se realizó por dos colaboradores del proyecto, los cuales coincidieron en la calificación que se registró. Además, cuando la respuesta sea difícil de evaluar pueden compararse los sitios de aplicación del parche de otros animales en el grupo de prueba y en el control antes de emitir la calificación.

**Tabla.4.** Resultados de la prueba de irritación en piel de conejos.

<b>Número de conejos</b>	<b>18 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>1</b>	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0
<b>4</b>	0	0	0
<b>5</b>	0	0	0
<b>6</b>	0	0	0
<b>7</b>	0	0	0
<b>8</b>	0	0	0
<b>9</b>	0	0	0
<b>10</b>	0	0	0
<b>11</b>	0	0	0
<b>12</b>	0	0	0

Se presenta el promedio de los diferentes días de la aplicación del parche en distintas concentraciones de nanopartículas de plata en conejos.



**Fig.21.** Conejo #2, Día 0, Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y aplicación de los parches adhesivos como micropore.



**Fig.22.** Conejo #2, Día 3, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata.



**Fig.23.** Conejo #5, Día 0, Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y aplicación de los parches adhesivos como micropore.



**Fig.24.** Conejo #5, Día 8, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata.

**Tabla.5.** Resultados de la prueba de irritación en piel de cobayos.

Número de cobayos	18 horas	24 horas	48 horas
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

Se presenta el promedio de los diferentes días de la aplicación del parche en distintas concentraciones de nanopartículas de plata en cobayos.



**Fig.25.** Cobayo #1, Día 1 Colocación de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y aplicación de los parches adhesivos como micropore.



**Fig.26.** Cobayo #1, Día 4, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata



**Fig.27.** Cobayo #1, Día 9, Evaluación de los riesgos tras la aplicación de las nanopartículas de plata.

### **3.5. Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno.**

Se utilizó la composición de nanopartículas de plata al 5% para evaluar la toxicidad a dosis repetida en un grupo de 10 vacas (Holstein), se realizaron cultivos para evaluar el crecimiento bacteriano, se realizó la identificación del microorganismo y la prueba de sensibilidad. El tratamiento consistió en la administración intramuscular por 3 días de la aplicación de nanopartículas de plata al 5% cada 12 horas.

**Tabla.6.** Resultados de la prueba de toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno.

No. Vaca	Agente etiológico	Resistente a los antimicrobianos	Sensible a los antimicrobianos
1	> de 100,000 UFC de <i>E. Coli</i>	AM, GE y TE	CF, CTX, FEP, CXM, DC, y SXT
2	40,000 UFC de <i>E. Coli</i>	AM y PE	FEP, CXM, DC, E, LEV, TE y SXT
3	30,000 UFC de <i>E. Coli</i>	NET y PE	LEV, CTX, CL, NF y SXT
4	30,000 UFC de <i>Staphylococcus aureus</i>	AM, DC, E, GE y SXT	CF, CTX, CXM y LEV
5	40,000 UFC de <i>Staphylococcus aureus</i>	AM y GE	CXM, DC, E, GE, LEV, PE, TE y SXT
6	> de 100,000 UFC de <i>E. Coli</i>	AM y PE	LEV, CF, CTX, CRO, CL, GE, NET, NF y SXT
7	> de 100,000 UFC de <i>E. Coli</i>	N/A	AK, LEV, CF, CTX, CRO, CL, GE, NET, FEP y SXT
8	60,000 UFC de <i>E. Coli</i>	AK, AM y LEV	CTX, CRO, CL, GE, NET, NF, FEP y SXT
9	60,000 UFC de <i>E. Coli</i>	AM y LEV AM y PE	AK, CTX, CRO, CL, GE, NET, NF, FEP y SXT
10	100,000 UFC de <i>E. Coli</i>	AK y AM	LEV, CF, CTX, CRO, CL, GE, NET, NF, FEP y SXT

## **CAPÍTULO IV.**

### **4. Discusión**

#### **4.1. Caracterización de las nanopartículas de plata**

##### **4.1.1. Identificación de las nanopartículas de plata por Espectroscopia UV-Visible**

Se caracterizaron las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5%, 20% y 40% de Argovit por espectroscopia en la región ultravioleta-visible (UV-Vis). Los picos se presentaron en intervalos de energía alrededor de  $25,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a nanopartículas de plata con diámetro más de 1 nm, la banda más intensiva a  $24,800$  es la banda típica para nanopartículas de plata con diámetro  $> 1\text{ nm}$  y  $< 26,000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a cúmulos de plata con diámetro  $< 1\text{ nm}$  (neutrales, o cargadas positivamente), que contienen alrededor de 2- 30 átomos de plata. Existencia un hombro a  $23,000\text{ cm}^{-1}$ , que es también la banda típica para nanopartículas de plata con diámetro  $> 1\text{ nm}$ , muestra que nanopartículas de plata tienen ancho distribución de partículas por tamaño. El hombro ligeramente notable a  $28,000\text{ cm}^{-1}$  se interpreta como cúmulos de plata con diámetro  $< 1\text{ nm}$  (neutrales, o cargadas positivamente). Estos tipos de cúmulos se forman en el proceso de almacenaje del material original en el proceso de oxidación de nanopartículas de plata. Aumento de concentración de Argovit de 0.00006 hasta 0.012 % de plata metálica en Argovit que corresponde de los porcentajes de 0.03 hasta 40% de nanopartículas de plata, en los espectros se observa el aumento de la intensidad del espectro, pero se presentó cambios considerablemente de forma del espectro e intensidad relativa de los 3 tipos de bandas. Esto indica que el estado electrónico de nanopartículas y cúmulos de plata no se cambió con la variación de concentración de Argovit de 0.3%, 3%, 5%, 20% y 40% en los intervalos estudiados.

#### **4.1.2. Identificación de las nanopartículas de plata por espectroscopia electrónica de transmisión (TEM)**

A través de la caracterización por TEM, se obtuvieron imágenes de las nanopartículas de plata, las cuales fueron analizadas con el propósito de determinar el tamaño promedio para cada experimento. De igual manera se pudo observar la morfología de las nanopartículas y poder evaluar la forma promedio. Se realizó la caracterización por TEM de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5%, 20% y 40%. La distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.3%, con el recuento de 263 partículas, presento un valor promedio del tamaño de:  $38.3 \pm 11.5 \text{nm}$ ; la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3%, con el recuento de 244 partículas, presento un valor promedio del tamaño de:  $36.0 \pm 12 \text{nm}$ ; la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5%, con el recuento de 223 partículas, presento un valor promedio del tamaño de:  $34.0 \pm 12.5 \text{nm}$ ; la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10%, con el recuento de 561 partículas, presento un valor promedio del tamaño de:  $44.4 \pm 17.8 \text{nm}$ ; la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20%, con el recuento de 422 partículas, presento un valor promedio del tamaño de:  $40.0 \pm 15.3 \text{nm}$ . De las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata según los histogramas se obtuvo un rango de diámetro promedio de 3-28nm. Asimismo se pudo observar una prevalencia de nanopartículas de forma esferoidales en las diferentes concentraciones. Las nanopartículas de mayor tamaño utilizadas en esta investigación, tuvieron un diámetro promedio de  $44.4 \pm 17.8 \text{nm}$  y fueron la concentración de partículas del 20%.

#### **4.2. Resultados de la prueba de Irritación ocular en conejo**

El método que se utilizó en este trabajo con la aplicación de nanopartículas de plata a 20 conejos es útil gracias a que permite distinguir entre la concentración de nanopartículas de plata que pueden ser consideradas irritantes severos o moderados de aquellas que representan poco o ningún potencial irritante para el hombre. Así mismo, la técnica de dilución que se empleó, resultó adecuada para determinar la concentración no irritante de las nanopartículas de plata y de esta manera reducir el riesgo de irritación de futuros estudios en el humano. En relación al valor encontrado del índice de Irritación Ocular de 0.0 de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, resultaron ser una sustancia no irritante. La ley Federal de Sustancias Peligrosas de los Estados Unidos de Norteamérica (FHSA) especifica que un compuesto es considerado no irritante peligroso si su IIP en el índice de Irritación Ocular es menor de 5 y potencialmente irritante peligroso si es mayor de 5. Por lo tanto, de acuerdo a este criterio las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sería considerada una sustancia no irritante. Por otra parte, la FHSA define a una sustancia como corrosiva si causa una destrucción visible o irreversible en el tejido en el sitio de contacto. Aunque el significado del término "destrucción visible" no esté claro, en términos generales, la destrucción visible podría significar la muerte de células de la superficie de la epidermis.

#### **4.3. La prueba de irritación en piel de humanos**

La interacción de las nanopartículas de plata para provocar reacciones en la piel, es un proceso muy complejo que da como resultado cambios fisiológicos tanto en la capa dérmica como la epidérmica. Así pues, las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata no generaron ningún cambio crónico en la piel de los 16 voluntarios, no se encontró ningún grado de reacción toxica en la piel. El procedimiento descrito en este trabajo fue empleado satisfactoriamente para la detección de irritación en piel de humanos con las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata.

#### **4.4. Resultados de la prueba de irritación en piel de conejos y cobayos**

En los ensayos pre-clínicos en el momento actual de la prueba de irritación en piel de conejos y cobayos, se han llevado a cabo con diferentes dosis de las nanopartículas de plata. Sin embargo, en estas pruebas se aplicaron dosis elevadas de nanopartículas de plata al 20%, y no se observó toxicidad dérmica proporcional a la dosis. Una de las diferencias más importantes en los estudios de irritación es que en las pruebas realizadas en animales se utilizan sitios con abrasión, lo cual no pueden ser realizados en el hombre. El uso de los sitios de abrasión se basa en el procedimiento diseñado originalmente para evaluar medicamentos de uso tópico y cosméticos sobre piel dañada.

#### **4.5. El resultado de evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata a dosis repetidas en ganado vacuno.**

Se utilizó la composición de nanopartículas de plata al 5% para evaluar la toxicidad a dosis repetida en un grupo de 10 vacas (Holstein), se realizaron cultivos para evaluar el crecimiento bacteriano, se realizó la identificación del microorganismo y la prueba de sensibilidad. El tratamiento consistió en la administración intramuscular por 3 días de la aplicación de nanopartículas de plata al 5% cada 12 horas, ninguna de las 10 vacas padeció malestar por la vía de administración de las nanopartículas de plata y presentaron una mejoría general contra el padecimiento de mastitis.

## **CAPITULO V.**

### **5. Conclusiones.**

-Los resultados de la caracterización por espectroscopia UV-Vis y microscopia electrónica de transmisión pudieron correlacionarse adecuadamente en relación al tamaño y morfología de las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata.

-Las nanopartículas de plata utilizadas en esta investigación presentaban un rango de diámetro promedio de 3-28nm, con una forma esferoidal en las diferentes concentraciones y las de mayor tamaño tuvieron un diámetro promedio de  $44.4 \pm 17.8$ nm (20%).

-De acuerdo al índice de irritación ocular en conejos que se obtuvo, se consideran las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata como una sustancia no irritante.

-Las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata administrada vía tópica en humanos, conejos y cobayos no produjeron efectos de fototoxicidad ni de fotopigmentación.

-La dosis del 5% de nanopartículas de plata administrada por vía intramuscular es adecuada para mitigar la mastitis en ganado vacuno.

## **CAPITULO VI.**

### **6. Anexos**

#### **6.1. Aspectos Éticos y Legales**

Los pacientes dieron su autorización mediante la firma del consentimiento informado. En el cual se les explico los términos de su participación, los riesgos que conlleva el estudio, la forma en que se protegería la confidencialidad de su información y su libertad para retirarse del estudio cuando lo deseen.

Este proyecto ha sido evaluado y autorizado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Mendoza G, Rodríguez-López JL. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*2007;29:161-86.
2. Diccionario de nanotecnología disponible en:  
<http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologías/diccionario/diccionario.htm>
3. Echeverría-Castillo F. Challenges of the present century: nanotechnology and health. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*2013;29(1):3-15.
4. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*2006;3(11).
5. Gutiérrez C. Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto Nuclear*2005.
6. Holister P, Weener JW, Román C, Harper T. Nanoparticles. *Científica*2003.
7. Brown S. D., Nativo P., et al. "Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin". *Journal of American Chemical Society*. 2010.
8. Mukherjee P., Bhattacharya R., Bone N., et al., "Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis". *Journal of Nanobiotechnology*, May 8, 5:4, 2007.
9. Irache J. M., et al., "Nanomedicine: nanoparticles with medical applications", *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 2008. 31:1.
10. Godin B., Sakamoto J. H., et al. "Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases". *Trends Pharmacol. Sci*. 2010.

11. Cherukuri P., Curley S. A., et al., "Use of nanoparticles for targeted, noninvasive thermal destruction of malignant cells". *Methods Mol Biol.*, 2010.
12. Jiménez R., et al. "Medidas preventivas y de control para nanopartículas y nanomateriales". *Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS)*. 2008
13. Monteiro-Riviere N. A., Tran L., et al, "Nanotoxicology, Characterization, doping and health effects", *Ed. Informa healthcare*, 2007.
14. Hussain S. M., Javorina A. K., Schrand A. M., et al. "The interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells induces Dopamine Depletion". *Toxicological Sciences*, 92(2), 456-463, 2006.
15. Murdock et al. "Effects of Copper Nanoparticles on viability and Function of PC-12 Cells". *The Toxicologist*. 2007
16. Braydich-Stolle et al, "The effect of titanium Dioxide nanoparticles in mouse keratinocytes". *The Toxicologist*, 2007.
17. De Lapuente J. et al. "In vitro cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles" *J Toxlet*, 2010.
18. Sadauskas E., Wallin H., Meredin S. et al. "Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism". *Particle and Fibre Toxicology*, 4:10, 2007.
19. Jerez-Urriolagoitia Mónica Marcela. "Efecto bactericida de nanopartículas de plata sobre microorganismos resistentes a los antibióticos". (Fac. de Cs. Biológicas, UANL) 2006.
20. Mongue M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 2009; 105(1):33-41.

21. Ávalos A, Haza A, Mateo D, Morales P. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2013;7(2):1-23.
22. Leyva-Gómez G. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad*. 2013; 2(1):18-22.
23. Cardoso PC. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev Hosp Niños (B Aires)*. 2016; 58(260):19-28.
24. Elechiguerra J. L., Burt J. L., Morones J., *et al.*, "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1". *J. of Nanobiotechnology*,3:6, 2005.
25. Lara H. H., Ayala-Nuñez N. V., Ixtepan-Turrent L. and Rodriguez-Padilla C. "Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1". *Journal of Nanobiotechnology*. Jan 20;8:1, 2010.
26. Yacamán *et al.* "Pursuing the use of silver nanoparticles in vaginal cream against HIV". *Gaceta Biomédica*, 2006.
27. Siddhartha S., Tanmay B., Arnab R. *et al.* "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles". *Nanotechnology*, 18:22, 5103, 2007.
28. Asha Rani P. V., Prakash Hande M., *et al.* "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles". *BMC Cell Biology*, 2009.
29. Ruden S., Hilpert K., *et al.*, "Synergistic Interaction between Silver Nanoparticles and Membrane-Permeabilizing Antimicrobial Peptides". *American Society for Microbiology*, 2009.
30. Sheikpranbabu S., Kalishwaralal K., *et al.*, "Silver nanoparticles inhibit VEGF- and IL-1 induced vascular permeability vía Src dependente pathway in porcine retinal endothelial cells". *Nanobiotechnology*, 2009.

31. Colleen M., Nicole L., *et al.*, “Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles”. *Nanobiotechnology*, 2007.
32. Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. *et al.* “Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species”. *J. Phys. Chem. B.* 112.13608-13619, 2008.
33. Kim S., Choi J. E., *et al.* “Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells”. *Toxicol In Vitro.* 2009.
34. Foldbjerg R., Olesen P., *et al.* “PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes”. *Toxicol. Lett.*, 2009.
35. Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M. *et al.*, “*In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells”. *Toxicol. In Vitro*, 19, 975-983, 2005.
36. Kawata K., Osawa M., *et al.*, “*In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells”. *Environ. Sci. Technol.* 2009.
37. Zolnik B. S., González-Fernández A., *et al.*, “Nanoparticles and the immune system”. *Endocrinology*, 2010.