



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS A PARTIR DE TÉCNICAS DE SÍNTESIS VERDE

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOING. KARLA ILIANA JUÁREZ HERRERA

DIRECTORA:

DRA. CLAUDIA MARIANA GÓMEZ GUTIÉRREZ

CODIRECTORA:

DRA. HAYDEÉ LÓPEZ RODRÍGUEZ

Ensenada, Baja California a 12 de mayo de 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS
NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS A PARTIR DE
TÉCNICAS DE SÍNTESIS VERDE**

TESIS

Para obtener el grado de maestra en ciencias presenta:

Karla Iliana Juárez Herrera

Aprobada por:



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Directora de tesis



Dra. Haydeé López Rodríguez

Co-directora de tesis



Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo

Sinodal



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez

Sinodal

RESUMEN

De la Tesis de **KARLA ILIANA JUÁREZ HERRERA**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**. Ensenada, Baja California, México. Noviembre 2024.

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS A PARTIR DE TÉCNICAS DE SÍNTESIS VERDE

Resumen aprobado por:

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Con el objetivo de evaluar el efecto de nanopartículas de plata sobre la línea celular C6 y linfocitos extraídos de sangre periférica humana, se sintetizaron nanopartículas utilizando extracto de *Camellia sinensis* (té verde) a distintas concentraciones, así como también se incluyeron nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *Dunaliella salina SQ*. El efecto sobre la viabilidad celular y el estrés oxidativo de la exposición de las células a estas nanopartículas se evaluaron mediante los ensayos de MTT y MDA. Las AgNPs demostraron una notable capacidad para inhibir el crecimiento de células de glioma C6 dependiente de la dosis, y una baja toxicidad en linfocitos humanos, lo que sugiere una potencial selectividad hacia las células cancerosas.

Las AgNPs, especialmente las sintetizadas con extracto de té verde a altas concentraciones, presentaron una actividad antioxidante significativa, reduciendo los niveles de peroxidación lipídica. La eficacia y el efecto antioxidante de las AgNPs variaron según el método de síntesis y la concentración utilizada, sin embargo, las AgNPs sintetizadas con extracto de té verde mostraron un mayor potencial antioxidante.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, síntesis, glioma, C6, linfocitos, MTT, MDA.

DEDICATORIA

A mis padres, Herminia Iliana Herrera López y Carlos Juárez Tovar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por su apoyo incondicional durante el desarrollo de esta tesis de maestría. Sus consejos fueron de gran importancia para culminar este proyecto profesional con éxito.

Estaré eternamente agradecida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia Gómez, mi más profundo agradecimiento por “adoptarme” académicamente, cuando no la pasaba nada bien con mi anterior mentora. Por su confianza y apoyo, han sido pilares esenciales en mi formación académica y en la realización de este proyecto de tesis.

Al Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo y a la Dra. Haydee López Rodríguez por aceptar ser sinodal y codirectora respectivamente y por proporcionarme las nanopartículas de plata para mis ensayos.

A mi mejor amigo, Carlos Cárdenas, por mandarme mensajes constantemente para que terminara mi tesis, por acompañarme en este viaje profesional, pero, sobre todo, por apoyarme y por estar ahí para mí siempre.

A mi familia de corazón, Fernanda García y Adela Flores, muchísimas gracias por demostrarme que me hice amiga de las personas correctas, sin duda, en la universidad se hacen las mejores amistades. Gracias por siempre estar, por estar orgullosas de mí y alegrarse por cada pequeño paso que doy.

A Eli, por ser mi amiga y compañera de experimentos, por esos momentos de cantar a todo pulmón en el auto, por las idas a comer, las veces que lloré en tu hombro y también por los disturbios. El trabajo experimental habría sido muy tedioso sin tu compañía.

A Sebas, por su constante apoyo emocional, por su disposición para escucharme en mis momentos de incertidumbre que ha sido esencial para mi bienestar. Por las conversaciones nocturnas y profundas, ojalá no se terminen nunca.

Al Laboratorio de Biociencias y Tecnología Molecular a cargo de la Dra. Claudia Gómez, de la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño de la Universidad Autónoma de Baja California, mi alma máter, por brindarme el material y la infraestructura necesaria para poder realizar mis ensayos.

*“The future belongs to
those who believe in
the beauty of their dreams”*

- Eleanor Roosevelt

Índice

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Nanopartículas	11
1.2 Aplicaciones de las nanopartículas en la biomedicina	12
1.3 Cáncer	13
1.4 Tratamientos disponibles para gliomas	15
Tabla 1. Tratamientos disponibles para gliomas	15
1.5 Línea celular C6	18
1.6 Evaluación de nanopartículas de plata en células sanguíneas	19
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1 Síntesis de nanopartículas con extracto de té verde (<i>C. sinensis</i>)	28
6.2 Síntesis de nanopartículas con extractos con microalga <i>D. Salina</i>	29
6.3 Mantenimiento de la línea celular C6	30
6.4 Conteo en cámara Neubauer	31
6.5 Viabilidad celular	31
6.5 Aislamiento de células sanguíneas (linfocitos)	34
6.6 MTT	35
6.7 MDA	36
7. RESULTADOS	38
7.1 Actividad antiproliferativa de células C6	38
7.2 MTT	40
7.3 MDA	42
7. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	49
10. REFERENCIAS	51
11. ANEXOS	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos disponibles para gliomas	15
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Glioma difuso de línea media en el cerebro	15
Figura 2. Cámara de Neubauer	29
Figura 3. Se muestra la forma en que se montaron los estímulos en la caja de 96 pocillos. En la fila A se montaron ambos controles, en la fila B y C se montaron las AgNPs sintetizadas con alga verde y sus diluciones, en la fila D y E se montaron las AgNPs sintetizadas con té verde a una concentración de 1% y sus diluciones, en la fila F y G AgNPs a una concentración de 3% y sus diluciones. En la fila H se montó un control negativo utilizando agua destilada.....	30
Figura 4. Se muestra cómo se montaron los estímulos en la caja de 96 pocillos. En las filas A y B se montaron AgNPs a una concentración de 5% y sus diluciones. En las filas C y D se montaron AgNPs a una concentración de 1% siendo está la más concentrada con sus respectivas diluciones.....	31
Figura 5. Diagrama del procedimiento que se realizó para la obtención de linfocitos mediante el método de gradiente de Ficoll.....	32
Figura 6. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenino. En la fila A, se montaron los controles negativos y positivos respectivamente. En la fila B y hasta el pozo C6, se montaron las AgNPs sintetizadas con alga y las diluciones 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml. Desde C7 hasta D12, se montó la formulación 1% y las diluciones. La formulación 3% se montó desde E1 hasta F6 con sus diluciones. A partir del pozo F7 hasta G12 se montó la formulación 5% con sus diluciones y por último, la formulación 1% concentrada se montó desde H1 hasta H12.....	33
Figura 7. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenina sana. En la fila A, se montó la concentración 1% concentrada a una dilución de 25 µg/ml.....	34
Figura 8. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenino. En la fila A, se montaron los controles negativos y positivos respectivamente. En la fila B y hasta el pozo C6, se montaron las AgNPs sintetizadas con alga y las diluciones 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml. Desde C7 hasta D12, se montó la formulación 1% y las diluciones. La formulación 3% se montó desde E1 hasta F6 con sus diluciones. A partir del pozo F7 hasta G12 se montó la formulación 5% con sus diluciones y por último, la formulación 1% concentrada se montó desde H1 hasta H12.....	35
Figura 9. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenina sana. En la fila A, se montó la concentración 1% concentrada a una dilución de 25 µg/ml.....	35
Figura 10. Se muestran los porcentajes obtenidos de la viabilidad celular en C6 con ambos extractos.....	37
Figura 11. Se muestra la viabilidad obtenida mediante el ensayo MTT. En la columna vertical se representa en porcentaje y en horizontal las formulaciones con sus respectivas concentraciones.....	39
Figura 12. Se muestran los resultados del ensayo de MDA.....	41
Figura 13. Se muestran los resultados de la prueba estadística ANOVA de una vía.....	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanopartículas

La nanomedicina es considerada como una de las ramas de la nanotecnología, la cual tiene aplicaciones directas en la medicina. Se puede decir que es la ciencia acompañada de tecnología utilizada en el diseño y evaluación de sistemas complejos a escala nanométrica, los cuales están formados por al menos dos componentes, uno al que se le conoce como principio activo y el segundo, es el sistema en conjunto que permite que tenga una función específica, la cual puede estar relacionada con el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad [1].

Actualmente existe una gran variedad de nanopartículas, estas se han popularizado por su gran versatilidad en su aplicación en el tratamiento de aguas residuales y debido a que se ha reportado que algunas tienen propiedades antimicrobianas y antiproliferativas. Las nanopartículas que suelen utilizarse con mayor frecuencia son las nanopartículas de óxidos metálicos, debido a sus propiedades fotocatalíticas, antimicrobianas, magnéticas y para su uso de sensores y dispositivos electrónicos [2,3,4,5,6]. Dentro de estas también se encuentran las nanopartículas de oro, que poseen propiedades ópticas particulares debido a que exhiben un fenómeno conocido como resonancia plasmónica de superficie lo que las vuelve atractivas para aplicaciones en sensores e imágenes biomédicas, además de ser fáciles de funcionalizar y tienen aplicación en la terapia fototérmica [10,11,12,13]. Por otra parte, las nanopartículas de plata son utilizadas por sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, así como su biocompatibilidad y citotoxicidad a células atípicas. También se ha reportado que tienen la habilidad de poder interactuar con organelos, e incluso modificar el material genético, punto clave para eliminar bacterias, virus y hongos sin la

necesidad de utilizar antibióticos, antivirales y antimicóticos. Las nanopartículas de plata tienen diámetros entre 1-100 nm, y pueden ser multifuncionales ya que estas pueden recubrirse en biomateriales como polímeros y biomoléculas; y en función de su envoltura serán las propiedades que pueda adquirir, de esta manera juegan un papel importante en el área farmacéutica, ingeniería de tejidos y administración de fármacos. Gracias a sus propiedades, en la actualidad se realizan investigaciones contra enfermedades infeccioso-resistentes a antibióticos y tratamientos contra diversos tipos de cáncer [14,15,16,17,18].

1.2 Aplicaciones de las nanopartículas en la biomedicina

Las nanopartículas, Np, tienen diversas aplicaciones por sus características únicas, como su tamaño y gran superficie. Dentro de sus aplicaciones se encuentran la liberación de fármacos, ya que actúan como vehículos para administrar el medicamento, de forma controlada y dirigida. Estas características ayudan a mejorar la eficacia del medicamento y a su vez minimiza la dosis requerida y la exposición del fármaco a los tejidos sanos. También son utilizadas en terapias contra el cáncer, por su capacidad de acumularse de manera selectiva en los tumores, esto lo logra por medio del efecto de permeabilidad y retención aumentada, propiciando que las nanopartículas liberen el medicamento de manera efectiva, eliminando selectivamente a las células tumorales y no a las células sanas. A su vez son de gran utilidad como agentes de contraste al momento de requerir una imagen con resonancia magnética, ya que se ha observado que las Np metálicas ayudan a mejorar notablemente la calidad de las imágenes lo que brinda una mayor precisión al diagnóstico temprano de enfermedades [19].

Las nanopartículas también juegan un papel crucial en la ingeniería de tejidos, debido a que pueden incorporarse en andamios biocompatibles que favorecen la regeneración de tejidos, a su vez, las Np pueden liberar factores de

crecimiento o señales biológicas que estimulan la reparación y el crecimiento celular en huesos, músculos o en la piel. Estos biomateriales, también han sido utilizados para el desarrollo de vacunas, ya que pueden ser el vehículo para entregar antígenos y mejorar la respuesta inmunológica, también suelen transportar material genético a las células diana, facilitando la corrección de mutaciones genéticas o bien la regulación de la expresión génica. Algunas otras de las aplicaciones de las nanopartículas, particularmente las de plata, se relacionan con las propiedades antimicrobianas que se han reportado, lo cual ha dado lugar a nuevas formulaciones para desinfectar superficies y dispositivos médicos, así como para tratar infecciones bacterianas y virales. Las nanopartículas también se emplean en la fabricación de biosensores los cuales detectan biomoléculas, como proteínas u otros analitos, algunos de estos se han desarrollado para tener diagnósticos tempranos de enfermedades [20,21,22].

1.3 Cáncer

De acuerdo con Gilbertson, el cáncer se define como una enfermedad de proliferación descontrolada por células transformadas mediante la evolución por selección natural. En 2020, se registraron y atribuyeron a esta enfermedad un total de 10 millones de defunciones en diversas regiones del planeta, evidenciando la magnitud y alcance global de las consecuencias mortales asociadas a dicha enfermedad [23,24].

A nivel global, se estima que se han registrado alrededor de 20 millones de incidencias de nuevas neoplasias y 10 millones de defunciones atribuidas a este fenómeno. La carga ecológica proyecta un incremento de aproximadamente 60% en los próximos 20 años, impactando de manera significativa en los sistemas sanitarios, individuos y comunidades. Se anticipa que para el año 2040, la carga

mundial de neoplasias ascenderá a unos 30 millones de casos nuevos, siendo los países de ingresos bajos y medianos los más afectados por este crecimiento exponencial.

En ausencia de las medidas preventivas y un control eficaz se proyecta un aumento del 55% en el número de diagnósticos de neoplasias de la región de las Américas, alcanzando aproximadamente 6,23 millones de casos para el 2040 [25].

De acuerdo con datos reportados en 2022 (World Cancer Research Found), actualmente se han tipificado más de 100 tipos de cáncer, siendo el más común los tumores de piel no melanoma, seguidos del cáncer de pulmón, el de mama que afecta principalmente a mujeres, el colorrectal, el de próstata, de estómago e hígado y vías biliares.

Dentro de los tipos de cáncer que se han identificado, también se encuentran los tumores de encéfalo y de médula espinal los cuales pueden ser benignos o no cancerosos o tumores malignos o cancerosos. En términos generales, un tumor del encéfalo o médula espinal abarca cualquier tipo de crecimiento anormal de las células y se pueden clasificar como tumores primarios o secundarios. Los primeros se originan en el sistema nerviosos central (SNC) y los secundarios se diseminan desde otros órganos como pulmón, hígado o tejido mamario.

Los gliomas son un tipo específico de tumor que se originan en las células gliales, las cuales son las células de soporte del SNC. Un glioma representa una variedad prevalente de neoplasia que se origina en el cerebro, constituyendo aproximadamente el 33% de los tumores cerebrales. Su inicio se atribuye a las células gliales, también conocidas como neurogliocitos que residen en el tejido cerebral. Cabe destacar que los gliomas son clasificados como tumores cerebrales intra-axiales, dado que un desarrollo que tiene lugar en la sustancia blanca cerebral, frecuentemente entrelazándose con los tejidos cerebrales sanos circundantes [26].

La clasificación de los gliomas sigue una escala numérica del I al IV, que se correlaciona con el índice de crecimiento tumoral y su agresividad. Los gliomas de grado I, son los más frecuentes en la infancia, exhiben un pronóstico más favorable. El grado II (gliomas de bajo grado) comprende tumores de crecimiento lento e infiltrativos, con un pronóstico intermedio. En contraste, los gliomas de grado III (anaplásicos) y de grado IV (glioblastoma) son considerados gliomas de alto grado, siendo altamente agresivos y generalmente presentando un pronóstico menos favorable [27].

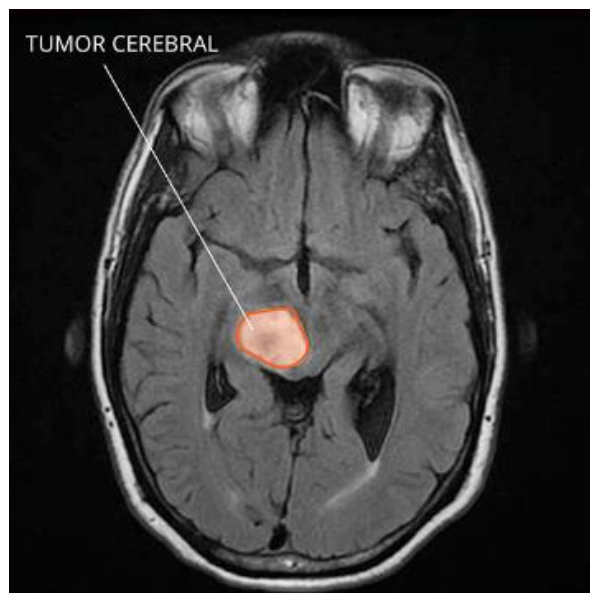


Figura 1. Glioma difuso de línea media en el cerebro. Tomado de NCI (2019)

1.4 Tratamientos disponibles para gliomas

Para tratar los gliomas existen diferentes tratamientos, estos dependerán del grado, tipo y ubicación de este.

Tabla 1. Tratamientos disponibles para gliomas

Cirugía	Biopsia: Se utiliza una computadora y un equipo de exploración tridimensional para encontrar el sitio donde se
---------	--

	encuentra el tumor y poder de manera precisa la extirpación del tejido para posteriormente examinarlo [26].
Quimioterapia	Usa medicamentos contra el cáncer, generalmente se administran de manera oral o intravenosa [27].
Terapia dirigida	Esta terapia actúa sobre las proteínas que controlan la forma en la que las células cancerosas se multiplica, dividen y diseminan [29].
Radioterapia	Generalmente, se utilizan altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y de esta manera reducir tumores [30].
Terapias físicas	El NovoTTF-100A, es una terapia innovadora para el tratamiento de algunos tumores cerebrales. Esta terapia emplea campos eléctricos alternantes de baja intensidad y de frecuencia intermedia, interfiriendo con la división de células cancerosas [31].
Terapias antiangiogénicas	Se busca reducir la vascularización limitando el suministro de nutrientes y oxígeno a las células tumorales [31].
Terapia dirigida contra señales intracelulares de crecimiento	Ataca específicamente alteraciones en las vías de señalización del tumor. Bloquea una proteína o enzima específica que busca crecer descontroladamente, inhibiendo el crecimiento tumoral sin dañar las células sanas [31].
Vacunas antitumorales	Consiste en estimular el sistema inmunológico del paciente para que pueda reconocer y de esta manera ataque a las células tumorales [31].
Terapia genética	Se introducen los genes en el tejido tumoral para obtener el efecto deseado [31].

Si bien hay tratamientos para los gliomas, actualmente la NP se encuentran en investigación para el tratamiento de estos tumores ya que los gliomas tienen características que presentan desafíos que los tratamientos establecidos no logran contrarrestar. Los gliomas, en particular los de alto grado como el glioblastoma, son altamente invasivos, lo que significa que las células tumorales se infiltran en el tejido cerebral sano circundante. Esto dificulta la eliminación completa del tumor mediante cirugía y hace que las terapias convencionales, como la quimioterapia y la radioterapia, sean menos efectivas. Por otra parte, la barrera hematoencefálica, una estructura protectora que regula el paso de sustancias al sistema nervioso central, impide que la mayoría de los medicamentos atraviesen hacia el cerebro, reduciendo significativamente la eficacia de los tratamientos estándar. Por lo anterior, una de las principales razones por las que se utilizan NP es su capacidad para penetrar la barrera hematoencefálica ya que estas partículas pueden diseñarse con propiedades físicas y químicas específicas que les permiten atravesar esta barrera y llegar directamente al tumor. Además, las NP ofrecen la posibilidad de una liberación dirigida y controlada de medicamentos, ya que al modificar sus superficies con ligandos que se adhieren específicamente a las células tumorales, las NP pueden concentrar los medicamentos en el sitio del tumor, minimizando el daño a las células sanas y reduciendo los efectos secundarios sistémicos. [71, 72, 73]

Otro aspecto importante es la capacidad de las NP para mejorar la eficacia terapéutica al encapsular múltiples tipos de agentes terapéuticos. Por ejemplo, pueden llevar quimioterapéuticos, agentes para terapia génica o inmunoterapia, e incluso moléculas que sensibilizan las células tumorales a la radiación. Este enfoque de combinación permite atacar al tumor desde múltiples frentes, aumentando las probabilidades de éxito del tratamiento [71]. Además, las NP pueden actuar como agentes para terapias emergentes como la fototérmica o la fotodinámica, que destruyen las células tumorales mediante la aplicación de luz y calor [74].

Las NPs también contribuyen a la reducción de los efectos secundarios de los tratamientos convencionales. Al dirigir los medicamentos de forma precisa al tumor, se disminuye la exposición de los tejidos sanos a los agentes tóxicos, lo que resulta en menos complicaciones para los pacientes. Esto es particularmente importante en el caso de medicamentos como la doxorrubicina, que puede causar toxicidad en órganos vitales como el corazón y el hígado [75, 76].

Por último, las NP ofrecen mejoras en el diagnóstico y monitoreo del glioma ya que estas partículas pueden funcionar como agentes de contraste para técnicas de imágenes avanzadas, como la resonancia magnética y la tomografía computarizada, lo que facilita la detección temprana del tumor y permite un seguimiento más preciso de su progresión o respuesta al tratamiento [75]. Esto, aunado con el potencial de desarrollar tratamientos personalizados basados en las características específicas del tumor en cada paciente, posiciona a las NP como una herramienta clave en la lucha contra el glioma.

Las investigaciones relacionadas con los gliomas se estudian principalmente con la línea celular C6.

1.5 Línea celular C6

Según el Instituto Nacional del Cáncer, una línea celular de cultivo, son células de un tipo único ya sea humano, animal o vegetal que se han adaptado para crecer y dividirse en el laboratorio y son ampliamente utilizadas en investigación en neurociencia y toxicología. La línea celular C6 se desarrolló a partir de ratas adultas Wistar-Furth a final de los 60s, es una línea celular glial que fue aislada del cerebro de una rata cuyo tumor fue inducido por N-nitrosometilurea después de una serie de experimentos alternos [32,33]. Si bien la línea C6 se derivó de un glioma inducido químicamente en ratas, estas células comparten muchas características con los

gliomas humanos. Estas células imitan la biología y el comportamiento de los gliomas humanos, lo que permite estudiar mecanismos de crecimiento, invasión, y respuesta a tratamientos en un entorno que es relevante para los tumores humanos. Por ejemplo, las células C6 exhiben una alta capacidad de proliferación e invasión, características típicas de los gliomas. Sus características son tales que con esta línea celular se han explorado vías de señalización involucradas en la proliferación celular, angiogénesis y resistencia a terapias así como el microambiente tumoral que contribuye al crecimiento del glioma y su capacidad para evadir el sistema inmunológico [76].

1.6 Evaluación de nanopartículas de plata en células sanguíneas

Una de las condiciones esenciales para proponer o desarrollar nuevos tratamientos que mejoren la calidad de vida de los seres vivos es el evaluar si estos son inocuos, por lo que es necesario evaluar si estos tienen alguna interacción con las células sanguíneas. En el caso de las nanopartículas de plata (AgNPs) es fundamental el estudiar la interacción que tienen con otros componentes del torrente sanguíneo como eritrocitos, leucocitos y plaquetas, ya que puede producir efectos tales como la alteración de su función normal y provocar efectos tales como hemólisis o daño celular, efectos no deseados en un tratamiento terapéutico. Debido a que las AgNPs tienen distintas aplicaciones médicas y farmacéuticas, la toxicidad y biocompatibilidad deben analizarse para poder garantizar su seguridad en el organismo. También pueden inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que provoca un estrés oxidativo y daño celular, aunado a que puede afectar la respuesta inmunológica si se alteran las funciones inmunes. No obstante, su potencial de acumulación en el torrente sanguíneo y en ciertos órganos, como el hígado o en los riñones, eventualmente puede implicar un riesgo de toxicidad [34,35,36,37].

Asimismo, la evaluación de las nanopartículas de plata en linfocitos tiene un papel clave en el sistema inmunológico, debido a que los linfocitos son esenciales en la respuesta inmunitaria adaptativa, encargada de combatir infecciones y destruir células dañadas o cancerosas. Los linfocitos son células fundamentales del sistema inmunitario, responsables de la respuesta inmunitaria adaptativa. Tienen origen en la médula ósea y maduran en los órganos linfoides primarios. Su tamaño es de 7-8 μ , se caracteriza por tener un núcleo grande que ocupa la mayor parte de la célula misma, además no tienen gránulos específicos en su citoplasma [38,39]. De esta manera, los linfocitos al tener una tasa alta de división celular son sensibles al estímulo de agentes como las AgNPs alteran a los linfocitos puede generarse daño al ADN generando mutaciones o apoptosis, así como estrés oxidativo o bien inflamación [40,41,42].

2. ANTECEDENTES

Desde tiempos ancestrales, las plantas han sido un aliado imprescindible para la medicina por las sustancias bioactivas que poseen, otorgándoles propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianos, entre otras.

La síntesis verde de nanopartículas ha obtenido reconocimiento por ser una alternativa sostenible y prometedora debido a que no genera residuos que alteren el ecosistema. Esta síntesis aprovecha la capacidad de los organismos vivos para reducir iones metálicos y formar estructuras nanométricas, la síntesis verde promete ser una ruta más ecológica y biocompatible para la producción de nanomateriales. Algunas de las propiedades que conlleva utilizar síntesis verde es la reducción de iones metálicos por sus compuestos bioactivos que actúan transformando los iones metálicos en su estado metálico o en nanopartículas. También tienen la capacidad de biomineralizar en el caso de los organismos biológicos pueden dirigir la formación de nanopartículas a través de procesos de biomineralización.

Las ventajas de la síntesis verde, es la sostenibilidad porque minimiza el uso de sustancias o compuestos tóxicos reduciendo así el impacto ambiental. Posee cierta biocompatibilidad y su toxicidad es menor, también es versátil porque permite sintetizar diversas nanopartículas metálicas que pueden ser utilizadas en el área de la biomedicina, catálisis y sensores [43,44,45,46,47,48].

Una de las especies que se pueden utilizar para la síntesis verde es el extracto de *Camellia sinensis*, llamado también té verde. Estudios previos sugieren que los polifenoles juegan un papel importante al momento de protegernos contra enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y osteoporosis [50,51]. Y que estos son esenciales para la síntesis verde debido a actúan como agentes reductores, por

sus estructuras químicas que le confieren mayor potencial reductor, protección y estabilidad [52].

Alattar *et al.* (2024) sintetizaron nanopartículas de plata (AgNP) con extracto de té verde, donde utilizaron un láser Q-switch Nd YAG con una longitud de onda de 1064 y 532 nm, dichas nanopartículas se utilizaron para evaluar su toxicidad en la sangre. Los resultados muestran que la naturaleza de este nanomaterial no es tóxica, debido a que no se encontraron alteraciones en sus sustituyentes de la sangre [49].

Monireh *et al.* (2024), emplearon la síntesis verde utilizando té verde, para mejorar la actividad anticancerígena y reducir la citotoxicidad del melanoma y líneas celulares murinas normales. Los resultados mediante el análisis de MTT mostraron que estas nanopartículas de plata con un tamaño de 91 nm en promedio, lograron reducir la viabilidad de las células B16F10 con un IC₅₀ de 20.2; sin embargo, para la línea celular L929 no hubo ningún efecto. Aunado a que las AgNPs aumentaron el porcentaje de apoptosis en B16F10 y a su vez la redujeron para L929. Esto implica que las AgNPs tienen el potencial para poder realizar investigaciones con mayor profundidad [53].

Se resalta el uso de la síntesis verde utilizando té verde (*Camellia sinensis*). Fahimeh *et al.* (2022), indicaron que los efectos citotóxicos de las nanopartículas de plata que sintetizaron fueron bastante prometedoras, utilizando la metodología MTT y tinción de naranja de acridina/yoduro de propidio, obtuvieron efectos tóxicos de forma dosis dependiente, debido a que las concentraciones medias inhibitorias (IC₅₀) fue de 6 µg/ml y 28 µg/ml frente a las células cancerosas y normales a las 24 horas respectivamente [54].

Das *et al.* (2021), estudiaron los efectos citotóxicos de las AgNP sintetizadas a partir de té verde (GT), galato de picalocatequina (EGCG), catequina (Ct) como tamponantes/estabilizadores, frente a la línea celular HeLa,

utilizando concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 25 $\mu\text{g/ml}$ por 24 horas. Obtuvieron que la inhibición aumentaba a medida que la concentración de AgNP, mientras que los agentes reductores/taponadores no mostraron efectos citotóxicos [55].

En la actualidad la síntesis verde que utiliza plantas o partes de estas ha tenido mucha popularidad; sin embargo, el uso de algas, microalgas y sus derivados también puede ser una opción que puede ser viable. En el área de la bionanotecnología ha despertado mucho interés por su capacidad de acumular metales y reducir guiones su relativamente fácil manejo, cultivos económicos, tiene una tasa de crecimiento rápida, alta eficiencia fotosintética, y sobre todo por su capacidad de producir una gran cantidad de nanopartículas a gran escala de manera rápida. Se han realizado diversos estudios que demuestran la efectividad de la microalga *Nanochloropsis oculata*, estos resultados pueden deberse a la presencia de diversas biomoléculas como proteínas, enzimas y ácidos grasos polinsaturados, que pudieran actuar de agentes reductores y encapsulantes durante la síntesis [56].

También los miembros del género *Coelastrrella* son microalgas prometedoras en aplicaciones biotecnológicas e industriales por su contenido de ácidos grasos y pigmentos, así como su capacidad para biorremediar metales pesados. *Coelastrrella aeroterrestica* fue taxonomizada por primera vez por Tschalkner, aislaron las microalgas del suelo en Austria y se examinaron por medio de microscopios ópticos y electrónicos de barrido. Los autores se hicieron diversos experimentos y obtuvieron que la síntesis verde de estas microalgas mostró actividad anticancerígena hacia las células malignas con una baja toxicidad hacia las células no cancerosas. Así como también se dieron efectos inhibidores contra bacterias gran-positivas y negativas [57].

Aunque el extracto de acetato de etilo parcialmente purificado de la fracción de *Nanochloropsis sp.* hexano de microalgas para sintetizar nanopartículas de plata, mostró resultados bastante favorables en cuanto a la actividad

antimicrobiana contra patógenos bacterianos y fúngicos punto sin embargo como su potencial anti proliferativo de esas nanopartículas obtenidas tuvieron la capacidad para estimular la apoptosis en línea celular A-549 [58].

Un factor para considerar es el efecto de las NP sobre las células a las cuales se exponen por lo que es importante establecer parámetros que nos ayuden a determinar si la célula presenta daños a nivel de membrana. La peroxidación lipídica es un proceso en el que aquellos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, sufren una degradación oxidativa. Es una reacción inducida por los radicales libres sobre los enlaces dobles de los ácidos grasos, dando lugar a la formación de peróxidos lipídicos. Esta reacción puede dañar la membrana celular, proteínas e incluso al ADN como también puede ocasionar enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras [59].

La muerte celular inducida por la peroxidación lipídica es una reacción en cadena que daña los lípidos de la membrana celular. En los linfocitos este proceso es desencadenado por el estrés oxidativo, usualmente puede ocurrir por factores externos. Algunos de los mecanismos de muerte celular por peroxidación lipídica alteran la estructura de la membrana celular, también pueden activarse vía apoptóticas o en caso de ser más severo podría ser por necrosis, disfunción mitocondrial, esta afecta las membranas mitocondriales y a su vez se ve afectada la cadena de transporte de electrones y la producción de ATP [60].

3. JUSTIFICACIÓN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) hoy son un problema de salud pública a nivel mundial. En 2018, se presentó una incidencia global en hombres de 162,534 casos, con una tasa de incidencia de 3,9 por cada 100,000 habitantes. En ese mismo año como se reportaron 135843 muertes en hombres y 105,194 muertes de mujeres.

En México como los estudios relacionados con la incidencia de tumores del SNC son escasos y los que hay son a nivel hospitalario. De acuerdo con los datos que ofrece GLOBOCAN, hoy en el año 2018 en México los tumores del SNC ocuparon el 17 lugar en incidencia de cáncer, con 3,451 casos como en este mismo año se reportaron 2,663 muertes por lo que ocupa en el lugar 13 entre las causas de mortalidad por cáncer [60].

El estudio de los efectos de las nanopartículas de plata en sistemas biológicos, especialmente en linfocitos y células cancerígenas, es fundamental para poder garantizar que su uso es seguro y eficaz, de no hacerse las investigaciones pertinentes las consecuencias podrían ser significativas como riesgos desconocidos para la salud debido a la falta de conocimiento de los efectos a largo plazo de las AgNPs. Además de la dificultad para regular su uso como a falta de datos científicos sería sumamente complicado regular su consumo para aplicaciones médicas.

De esta manera el estudio de las nanopartículas de plata es de vital importancia como de no ser así podría retrasar el desarrollo de nuevos tratamientos como las nanopartículas de plata tienen un gran potencial como agentes anticancerígenos como sin una comprensión profunda sobre sus mecanismos de acción y sus efectos secundarios, sería complicado desarrollar tratamientos basados en este nanomaterial [61].

4. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata sintetizadas con técnicas verdes (*Camellia sinensis* y *D. salina*) inducen la muerte celular en la línea celular de glioma C6 y no tienen efecto sobre los linfocitos de sangre periférica humana.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico que tienen las nanopartículas de plata sintetizadas por técnicas verdes sobre las células C6 correspondiente a glioma y en linfocitos humanos.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad anti proliferativa de las nanopartículas de plata de síntesis verde en la línea celular de glioma C6.
- Evaluar el estrés oxidativo producido por las nanopartículas de plata de síntesis verde en linfocitos humanos.

6. METODOLOGÍA

En este trabajo se probaron nanopartículas sintetizadas por química verde utilizando dos fuentes naturales diferentes el extracto de té verde y microalga *D. salina SQ*.

6.1 Síntesis de nanopartículas con extracto de té verde (*C. sinensis*)

El proceso de síntesis de nanopartículas de plata consistió en la preparación de un extracto acuoso de té verde utilizando 5 gr de té verde (*Camellia sinensis*), en una proporción de 0.13 g/ml. Esta solución se mantuvo bajo un calentamiento controlado hasta que llegó a 70 °C, en donde se mantuvo a temperatura constante durante 1 h, seguido de un proceso de enfriamiento gradual. Tras este tratamiento térmico, el sobrenadante obtenido rico en compuestos activos del té verde fue cuidadosamente recolectado y almacenado en condiciones adecuadas hasta su uso.

Con el extracto concentrado se prepararon tres diluciones, 1%, 3%, y 5%, las cuales se sintetizaron a temperatura de 70 °C. Posteriormente, se añadieron 2 g de nitrato de plata y se continuó el calentamiento a la misma temperatura, manteniendo una agitación constante, hasta lograr una pasta densa y homogénea. Cada concentración de la solución se transfirió a crisoles individuales y se inició un calentamiento a 300 °C durante un periodo de 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo se colectó el contenido de cada crisol.

Para la preparación de la cuarta concentración de nanopartículas de plata se procedió de acuerdo con el método previamente detallado, con la excepción de que en esta instancia se alcanzó una proporción de concentración 1:5. Para la concentración 1% concentrada. De cada una de las ilusiones de nanopartículas de plata previamente descritas cómo se prepararon concentraciones de 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml.

6.2 Síntesis de nanopartículas con extractos con microalga *D. Salina*

El cultivo de *D. salina SQ* se centrifugó a 6500 RPM por 4 min a 20°C dos veces. Se retiró el sobrenadante y fue pesado la biomasa obtenida. Se resuspendió en agua desionizada en un equivalente de 5g por cada 30ml de agua desionizada. Se hirvió a 15 min a 80°C y se filtró utilizando un filtro Whatman No. 5 y se almacenó a 4°C.

Para la preparación de las AgNPs se añadió nitrato de plata a 4mM y se calentó entre 30-45°C, cuando se alcanzó esa temperatura, se agregó una concentración del 10% del extracto de alga previamente filtrado, con agitación y luz artificial constante por 1 hora. Al termino, de la síntesis, se tomó 1ml de la solución final de AgNPs en tubos Eppendorf de 1.5ml y se centrifugaron 2 veces a 10,000 RPM por 10 min a 20°C. En ambas ocasiones se retiró el sobrenadante y se resuspendió en agua desionizada.

*La síntesis y caracterización de estas nanopartículas de plata, no forma parte de este trabajo.

6.3 Mantenimiento de la línea celular C6

El mantenimiento, proliferación y ensayo celular, se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar.

El vial que contenía la línea celular C6 se descongeló paulatinamente y se sembró en un frasco de cultivo conteniendo DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, así como 1 μ l de antibiótico antimicótico 100X. Tras homogeneizar el contenido, se procedió a incubar a una temperatura de 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Como resultado del proceso de descongelamiento, aproximadamente el 20% de las células experimentan necrosis. Para eliminar residuos celulares, se llevó a cabo un cambio de medio. Este procedimiento implicó la extracción del medio de cultivo mediante el uso de una micropipeta, seguido de su reemplazo con medio fresco DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal y 1 μ l de antibiótico antimicótico a 100X.

6.4 Conteo en cámara Neubauer

Para poder realizar los ensayos pertinentes, se contaron las células que se necesitarían en una cámara de Neubauer para lo cual se colocaron 10 μl de suspensión celular y se contó la cantidad de células que se tiene en cada cuadrante. La cantidad de células se determinó con el promedio de los cuadrantes A, B, C, D (fig. 3).

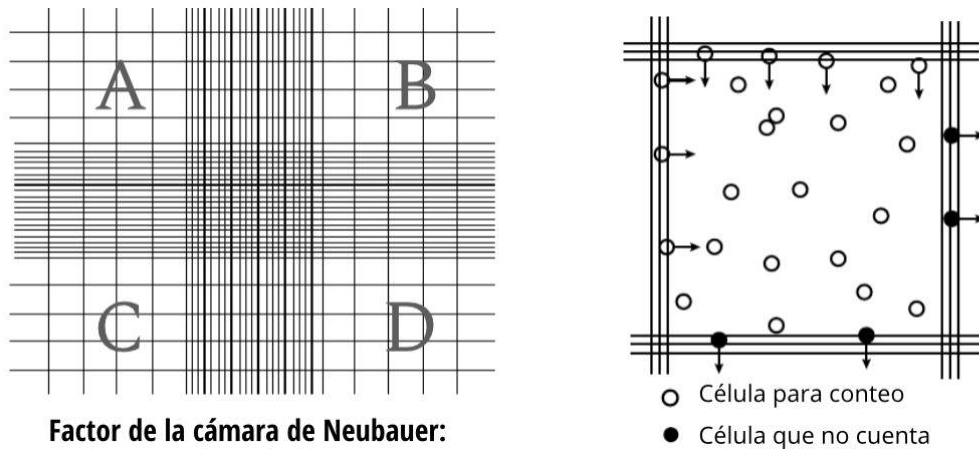


Figura 2. Cámara de Neubauer. Tomado de García-Contreras R, *et al.* (2019).

6.5 Viabilidad celular

Para este ensayo se montaron 20,000 células por pozo en una placa de 96 pocillos. Una vez sembrada las células en los pozos, se agregaron 10 μl del estímulo (de cada nanopartícula de plata descritas en el punto anterior), adicionalmente se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como control positivo y como control negativo se utilizaron las células sin ningún estímulo. Se incubaron por 24 h a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación para diferenciar las células vivas de las muertas, se utilizó un ensayo de exclusión vital con azul tripano, donde se colocaron 10 μl del colorante y se procedió a contar en la cámara de Neubauer.

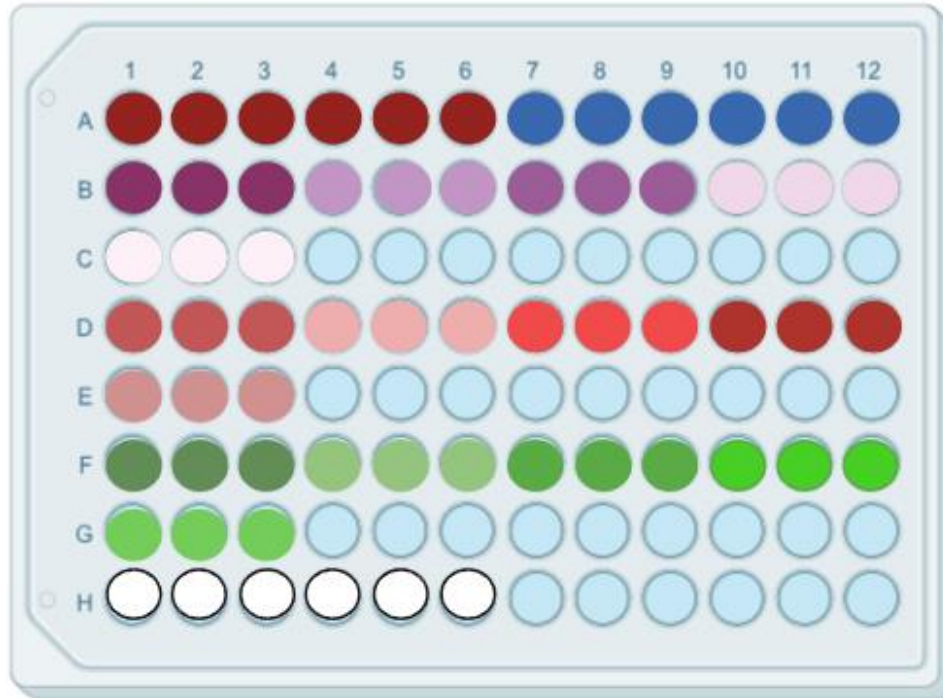


Figura 3. Se muestra la forma en que se montaron los estímulos en la caja de 96 pocillos.

En la fila A se montaron ambos controles, en la fila B y C se montaron las AgNPs sintetizadas con alga verde y sus diluciones, en la fila D y E se montaron las AgNPs sintetizadas con té verde a una concentración de 1% y sus diluciones, en la fila F y G AgNPs a una concentración de 3% y sus diluciones. En la fila H se montó un control negativo utilizando agua destilada.

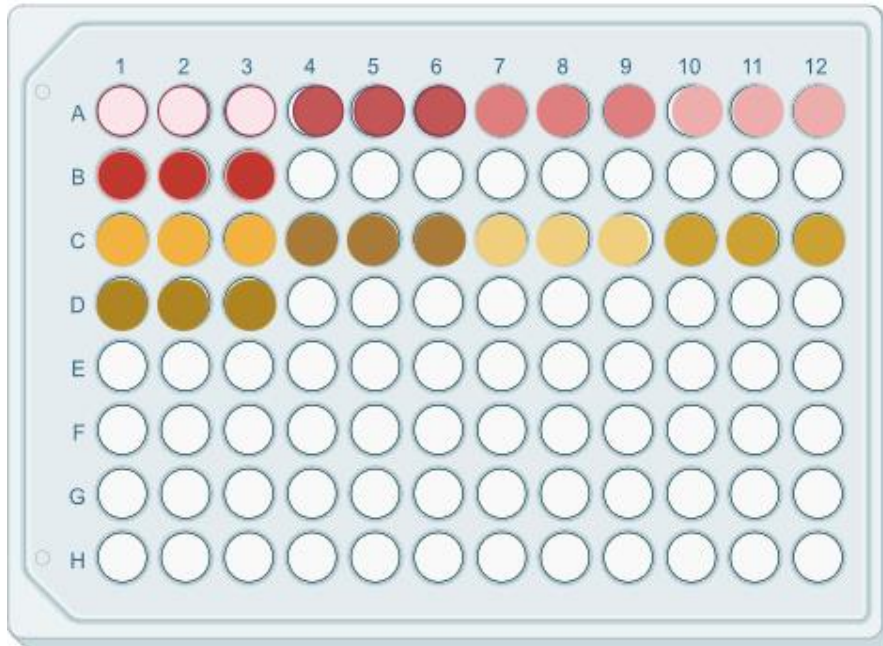


Figura 4. Se muestra cómo se montaron los estímulos en la caja de 96 pocillos. En las filas A y B se montaron AgNPs a una concentración de 5% y sus diluciones. En las filas C y D se montaron AgNPs a una concentración de 1% siendo está la más concentrada con sus respectivas diluciones.

6.5 Aislamiento de células sanguíneas (linfocitos)

Se realizó la extracción de sangre periférica humana de una paciente femenina sana. La sangre que se obtuvo se diluyó 1:1 con PBS al 0.02% previamente preparada. Una vez que se realizó la homogenización de manera cuidadosa, se añadieron 15 ml de Ficoll en un tubo de 50 ml y se incorporó la sangre cuidadosamente para evitar la mezcla con el Ficoll. Se centrifugó a 400 x g p durante 40 min, y se recuperaron los linfocitos para posteriormente duplicar el volumen con PBS. Nuevamente se realizó la centrifugación a 1800 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en medio de cultivo DMEN para posteriormente sembrarlas en una caja de 96 pozos y ver el efecto que ocasionaban las AgNPs anteriormente descritas.

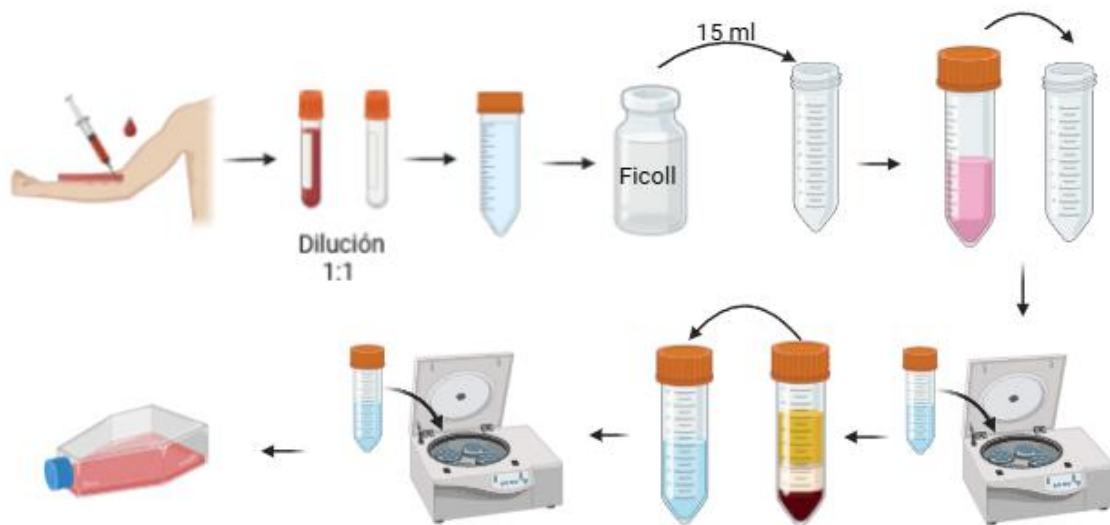


Figura 5. Diagrama del procedimiento que se realizó para la obtención de linfocitos mediante el método de gradiente de Ficoll.

6.6 MTT

Para preparar el reactivo para utilizarlo en este ensayo 0.2 mg/ml de la sal MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2,5-difeniltetrazol) disuelta en el medio de cultivo DMEM suplementado con suero bovino fetal.

Se montaron 100,000 células de sangre periférica humana de una paciente femenina sana, en cada pozo con los estímulos de las AgNPs sintetizadas con té verde y alga, con las siguientes concentraciones: 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, de la formulación 1%, 3%, 5% y 1% concentrada y se incubó por 24 h a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂. Una vez pasando las 24 h de incubación se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 μl de MTT a cada pocillo y se incubó por 4 h con las condiciones anteriormente mencionadas, se verificó a cada hora la formación de cristales de formazán. Se agregaron 100 μl de dimetil sulfóxido (DMSO). Se agitó por 10 segundos y se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro con una celda ahorcada.

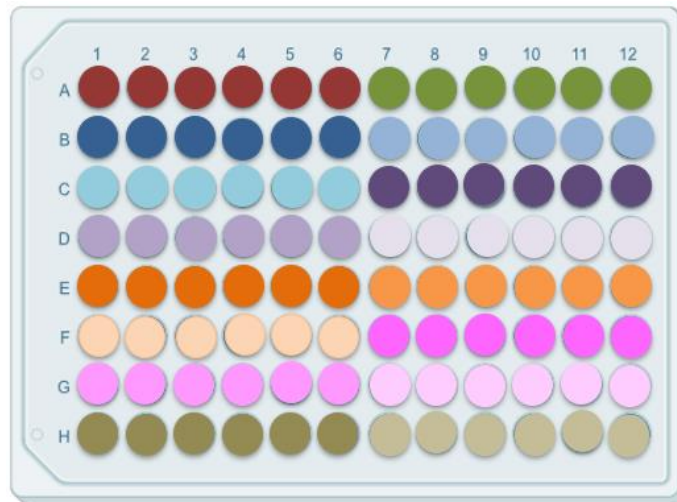


Figura 6. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenino. En la fila A, se montaron los controles negativos y positivos respectivamente. En la fila B y hasta el pozo C6, se montaron las AgNPs sintetizadas con alga y las diluciones 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$. Desde C7 hasta D12, se montó la formulación 1% y las diluciones. La formulación 3% se montó desde E1 hasta F6 con sus diluciones. A partir del pozo F7 hasta G12 se montó la formulación 5% con sus diluciones y por último, la formulación 1% concentrada se montó desde H1 hasta H12.

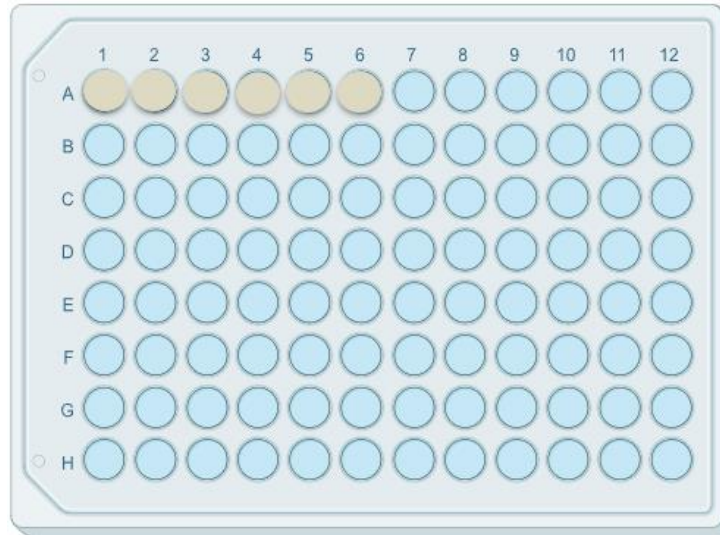


Figura 7. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenina sana. En la fila A, se montó la concentración 1% concentrada a una dilución de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6.7 MDA

En este ensayo se utilizó el kit de BioVision Lipid peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Catalog #K739-100). Las células utilizadas de sangre periférica humana de una paciente femenina sana fueron expuestas a las formulaciones de AgNPs, con las siguientes concentraciones: 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de la formulación 1%, 3%, 5% y 1% concentrada, de nanopartículas sintetizadas a partir de té verde y de alga. Fueron sembradas 100,000 células por cada pozo en una placa de 96 pocillos y se dejaron por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a la metodología descrita en el manual del kit. El contenido de células de un pozo se homogenizó con 300 μl de tampón de lisis y 3 μl de BHT, se centrifugó a 13,000 X g por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 150 μl dH₂O + 3 μl de BHT. Para revelar los resultados se utilizó un espectrofotómetro a 570 nm en un espectrofotómetro con una celda ahorcada.

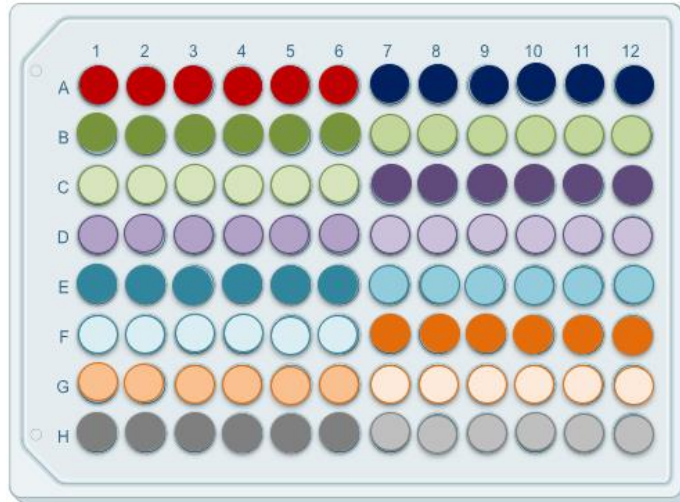


Figura 8. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenino. En la fila A, se montaron los controles negativos y positivos respectivamente. En la fila B y hasta el pozo C6, se montaron las AgNPs sintetizadas con alga y las diluciones 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$. Desde C7 hasta D12, se montó la formulación 1% y las diluciones. La formulación 3% se montó desde E1 hasta F6 con sus diluciones. A partir del pozo F7 hasta G12 se montó la formulación 5% con sus diluciones y por último, la formulación 1% concentrada se montó desde H1 hasta H12.

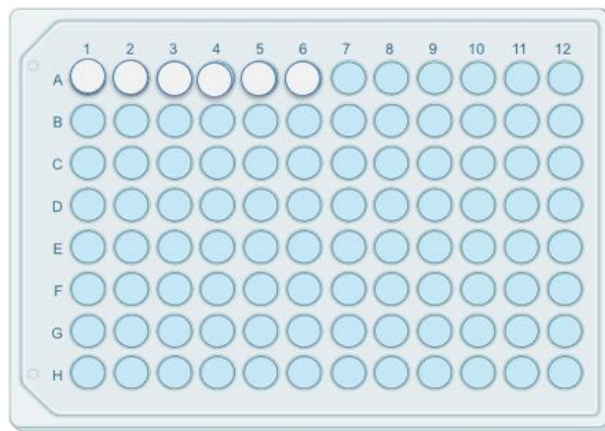


Figura 9. Se muestra cómo se montaron las células de sangre periférica humana de paciente femenina sana. En la fila A, se montó la concentración 1% concentrada a una dilución de 25 $\mu\text{g/ml}$.

7. RESULTADOS

7.1 Actividad antiproliferativa de células C6

La actividad antiproliferativa de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de síntesis verde se evaluó en células de glioma C6, mediante el azul tripano, después de 24 horas de exposición a 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml, sintetizadas a partir de extracto de *Camellia sinensis* y de la microalga *Dunaliella salina SQ*. Los porcentajes obtenidos de las concentraciones se graficaron, en comparación al control positivo, negativo y un control de agua. Se puede observar en la **figura 10** que conforme aumenta la concentración de las AgNPs el porcentaje de la viabilidad disminuye, por lo que tenemos un efecto dependiente de la dosis.

El grupo de exposición de AgNPs a diferentes concentraciones sintetizadas con *D. salina SQ* muestra un efecto dependiente de la dosis. En cuanto a las AgNPs sintetizadas con *C. sinensis* al 1% se puede observar que la concentración de 6.25 µg/ml tiene un porcentaje cerca de 50%, a partir de la concentración 12.5 µg/ml hay una disminución en la viabilidad. En las AgNPs al 3% sugiere que la toxicidad de éstas AgNPs tienen un efecto más pronunciado, en la concentración de 12.5 µg/ml tiene una viabilidad menor a 20%. Las AgNPs al 5% tienen un efecto más citotóxico en la concentración de 50 µg/ml, en comparación con las AgNPs anteriormente mencionadas (*D. salina*, *C. sinensis* al 1% y 3%) presentan una mayor citotoxicidad. En cuanto a las AgNPs al 1% concentrado se puede observar que en la concentración de 6.25 µg/ml y en el control de agua tienen el mismo resultado, por lo que a esta concentración las AgNPs no son citotóxicas; sin embargo, a partir de la concentración de 12.5 µg/ml la citotoxicidad es mayor.

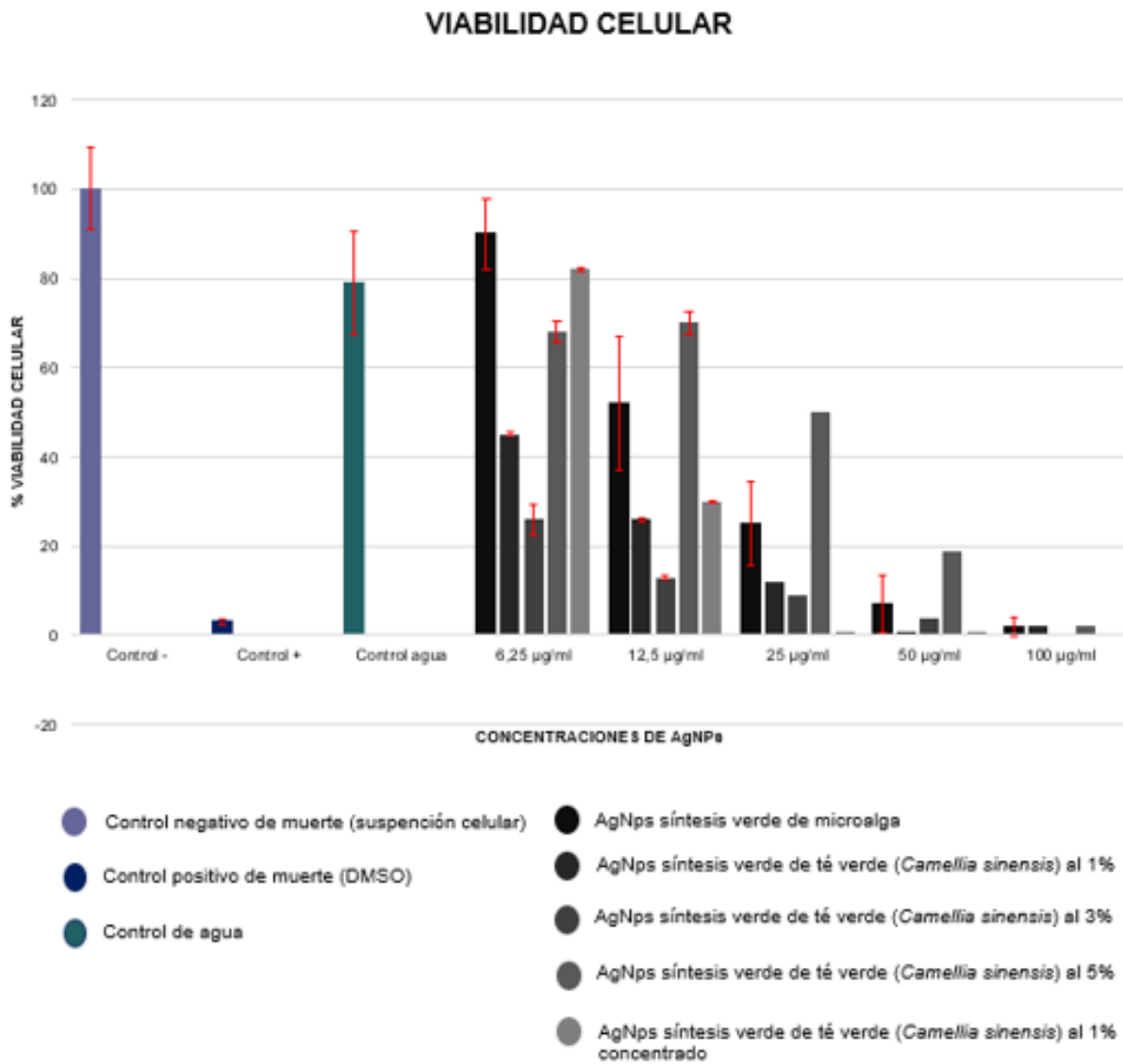


Figura 10. Se muestran los porcentajes obtenidos de la viabilidad celular en C6 con ambos extractos.

7.2 MTT

El ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), es ampliamente utilizado para evaluar la viabilidad y proliferación celular *in vitro*. Este ensayo mide la actividad metabólica de las células vivas, ya que el compuesto MTT es reducido por reductasas mitocondriales activas a formazán, este producto es insoluble y genera un color púrpura por lo que la intensidad del color es directamente proporcional al número de células viables [77].

Este ensayo se realizó linfocitos de una paciente femenina sana. Para el control negativo se utilizó DMSO y para el control positivo no se adicionó ningún reactivo extra al medio de cultivo y la suspensión celular. Se puede observar que el control negativo y la AgNPs 6 $\mu\text{g/ml}$ 3% son similares obteniendo porcentajes de 100% y 90% respectivamente.

En cuanto a la AgNPs 6 $\mu\text{g/ml}$ de microalga y la AgNPs 6 $\mu\text{g/ml}$ sintetizada con té verde tampoco se observa una diferencia significativa, esto implica que ambas nanopartículas muestran citotoxicidad a esa concentración. En la AgNPs 25 $\mu\text{g/ml}$ 1% concentrada se obtuvieron resultados similares que en la AgNPs 25 $\mu\text{g/ml}$ sintetizadas con microalgas es más eficiente que las AgNPs sintetizadas con té verde.

En las AgNPs 12 $\mu\text{g/ml}$ al 3% y las AgNPs 25 $\mu\text{g/ml}$ no muestra diferencia, sin embargo, para la obtención de esos resultados la concentración utilizada fue el doble, lo que significa que no es necesario utilizar una concentración mayor para obtener el mismo resultado.

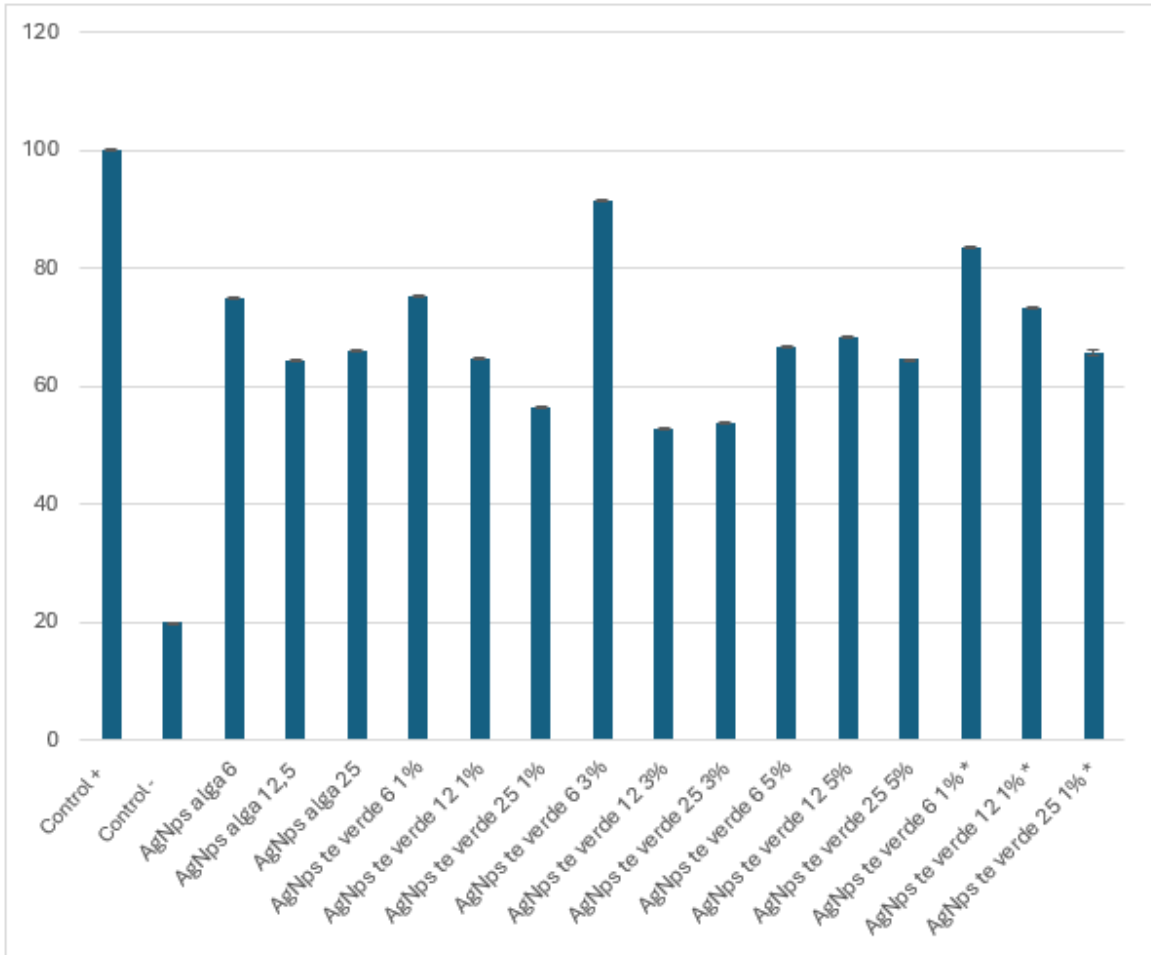


Figura 11. Se muestra la viabilidad obtenida mediante el ensayo MTT. En la columna vertical se representa en porcentaje y en horizontal las formulaciones con sus respectivas concentraciones.

7.3 MDA

Para medir el grado de oxidación lipídica, se utilizó el ensayo MDA (Malondialdehído) para estimar el grado de oxidación lipídica en linfocitos obtenidos de sangre periférica humana de una paciente femenina sana. Tomando como referencia los datos obtenidos en este trabajo, el control negativo (0.224) representa el valor base sin estímulo alguno que muestra el nivel más alto de MDA. Por otro lado, el control positivo (0.153) si se compara con el control negativo se aprecia una disminución del estrés oxidativo.

En cuanto a las AgNPs sintetizadas con microalgas, las concentraciones de 6 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, y 25 $\mu\text{g/ml}$ son 0.147, 0.147, 0.158 y 0.153 respectivamente. Estos valores son similares al control positivo, lo que puede ser un indicativo de una reducción moderada de MDA, esto es que estas AgNPs pueden tener un efecto antioxidante.

Las AgNPs sintetizadas a partir de té verde, para la concentración de 1% los valores disminuyeron gradualmente de 0.151 a 0.111 conforme aumenta la concentración de té verde, lo que implica que para concentraciones más fuertes hay un mayor efecto antioxidante. En la concentración de 3%, de igual manera hay una disminución de los valores de MDA con el incremento de concentración con valores de 0.144 a 0.140.

Para la concentración 5%, se obtuvieron los valores más bajos de MDA entre 0.099 y 0.061, lo que implica que hay un efecto antioxidante mayor a las concentraciones anteriormente evaluadas.

De manera general, se puede decir que la tendencia indica que las AgNPs de té verde muestran un efecto más fuerte en la reducción de MDA que las AgNPs sintetizadas con microalgas, en especial con las concentraciones más altas. Los tratamientos con concentraciones más bajas de té verde y de microalga tienen un

efecto antioxidante moderado, mientras que los valores más bajos de MDA se observan con té verde al 5%, lo que sugiere una mayor eficacia antioxidante en esta concentración.

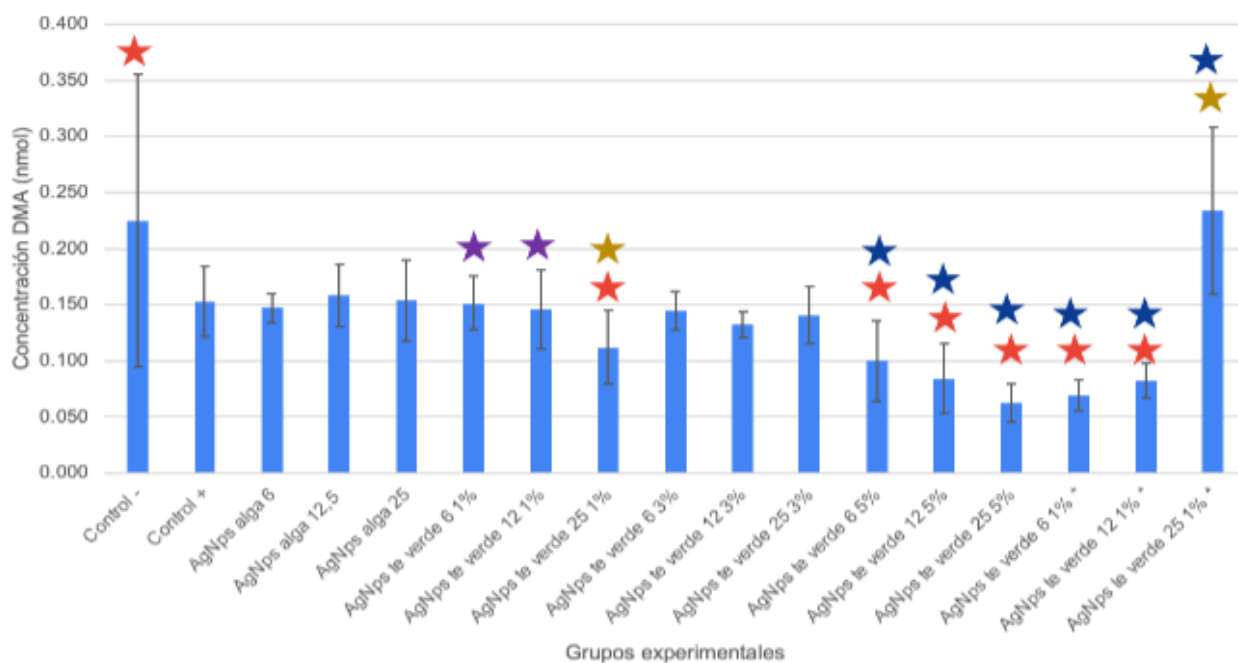


Figura 12. Se muestran los resultados del ensayo de MDA.

Anova: Single Factor

SUMMARY

	Groups	Count	Sum	Average	Variance
1	Control -	6	2.106	0.351	0.01697
2	Control +	6	1.678	0.279666667	0.00100
3	AgNps alga 6	6	1.643	0.273833333	0.00017
4	AgNps alga 12,5	6	1.709	0.284833333	0.00078
5	AgNps alga 25	6	1.683	0.2805	0.00128
6	AgNps te verde 6 1%	6	1.669	0.278166667	0.00054
7	AgNps te verde 12 1%	6	1.634	0.272333333	0.00120
8	AgNps te verde 25 1%	6	1.431	0.2385	0.00108
9	AgNps te verde 6 3%	6	1.627	0.271166667	0.00028
10	AgNps te verde 12 3%	6	1.554	0.259	0.00013
11	AgNps te verde 25 3%	6	1.603	0.267166667	0.00065
12	AgNps te verde 6 5%	6	1.359	0.2265	0.00126
					83
13	AgNps te verde 12 5%	6	1.264	0.210666667	0.00097
14	AgNps te verde 25 5%	6	1.131	0.1885	0.00029
15	AgNps te verde 6 1% *	6	1.174	0.195666667	0.00018
16	AgNps te verde 12 1% *	6	1.253	0.208833333	0.00024
17	AgNps te verde 25 1% *	6	2.161	0.360166667	0.00559
					0967

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.21860798	16	0.013662999	7.1045 14745	4.502 46E- 10	1.7639193 4
Within Groups	0.163467167	85	0.001923143			
Total	0.382075147	101				

Figura 13. Se muestran los resultados de la prueba estadística ANOVA de una vía.

En la prueba estadística pasada, se encontró que había diferencias, pero no entre que grupos por lo que se optó por realizar una prueba de Tukey para observar las diferencias entre los grupos. Los que están de color amarillo son los que presentan diferencias. Hay diferencias entre el grupo 1 con los grupos 8, 12, 13, 14, 15 y 16.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de AgNPs sintetizadas a partir de extractos de té verde y microalgas con técnicas de síntesis verde en la línea celular de gliomas C6, de esta manera conocer cuál de las dos formulaciones es más eficiente y ocasiona menos daños a las células sanas. También se probaron en linfocitos aislados de sangre periférica humana para conocer si tuviese efectos adversos y si las AgNPs tienen el potencial como agentes anticancerígenos.

De acuerdo con los resultados, se observó que las AgNPs sintetizadas con té verde al 1% tienen efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular C6 efecto similar al encontrado por Alkhulaifi *et al* (2020) para nanopartículas de plata sintetizadas con cáscara de *Citrus limon*. El tamaño de las AgNPs es importante, es un factor que ayuda a determinar su potencial citotóxico, la caracterización para las AgNPs sintetizadas con *D. salina* tuvieron un tamaño de 81 nm y las AgNPs de *P. alba* sintetizadas con síntesis verde de Rudrappa *et al.* (2022) tuvieron un tamaño de 20,12 a 45,40 nm cuyo potencial citotóxico fue menor a la viabilidad reportada en la **figura 10**, lo que sugiere que influyeron otros factores además del tamaño para lograr este efecto. Cabe destacar que en las concentraciones de 50 y 25 µg/ml se observa una mayor citotoxicidad, Mani *et al.* (2021) obtuvieron resultados muy similares a la misma concentración, no obstante, el tamaño de las AgNPs que utilizaron es de alrededor de 54,3 nm, lo que resulta especialmente curioso que a pesar de ser una AgNPs de menor tamaño a las sintetizadas con *D. salina*, los resultados son muy similares, se habrían que realizar otras técnicas de caracterización que ayudaran a comprender el porqué de esta similitud.

Para evaluar la viabilidad celular de linfocitos extraídos de sangre periférica humana expuestos a nanopartículas de plata sintetizadas con microalgas y té verde, se utilizó el ensayo MTT. Se evaluaron concentraciones crecientes de ambas nanopartículas (6.25, 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$) al 1%, 3%, 5% y 1% concentrada para las AgNp sintetizadas con té verde.

Los resultados del ensayo de MTT son muy similares a los resultados de Vuković *et al.* (2021) utilizaron AgNPs sintetizadas con borohidruro de sodio recubiertas con PVP, PLL, AOT y BSA, a pesar de utilizar un extracto diferente y recubrimientos no se observaron diferencias significativas en la viabilidad.

Pirković *et al* (2023) reportaron resultados similares, sin embargo, se presenta una mayor citotoxicidad en las AgNPs de DOLE y OLE, siendo que la concentración que utilizan es menor a la reportada en este trabajo, la citotoxicidad con mayor efecto fue inducida por la exposición a las Ag/OLE, se puede inferir que la citotoxicidad alcanzó su punto máximo, de igual manera, se infiere que las AgNPs sintetizadas con DOLE Y OLE tienen un mayor potencial citotóxico a bajas concentraciones que las AgNPs sintetizadas con *D. salina* y *C. sinensis*.

Debido a la relevancia que tiene el uso de la síntesis verde, también se ha utilizado soja para la síntesis de AgNPs, mediante un ensayo de MTT Kumar *et al.* (2024) reportan que obtuvieron un IC_{50} de 145.11 $\mu\text{g/ml}$ en células MCF-7, considerando que la concentración más alta fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ con las AgNPs de *D. salina SQ* y *C. sinensis* y cuyo porcentaje de viabilidad es menor, se puede decir que estas AgNPs mostraron mejores resultados.

Para evaluar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica de linfocitos extraídos de sangre periférica humana expuestos a nanopartículas de plata sintetizadas con microalgas y té verde, se utilizó el ensayo MDA. Se evaluaron concentraciones crecientes de ambas nanopartículas (6, 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$) al 1%, 3%, 5% y 1% concentrada para las Np sintetizadas con té verde.

En cuanto a las especies reactivas de oxígeno, las AgNPs sintetizadas con té verde tuvieron un efecto de reducción de MDA más fuerte que las AgNPs sintetizadas con *D. salina*. La reducción de MDA implica una reducción del daño celular, debido a que la peroxidación lipídica es el producto final de MDA. Vuković *et al.* (2020) utilizaron AgNPs sintetizadas de manera tradicional y obtuvieron un aumento en la internalización de AgNPs en hPBMCs (células mononucleares de sangre periférica humana) de manera dependiente de la dosis y el tiempo, lo que implica una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y al agotamiento del potencial de membrana mitocondrial lo que lleva a las células a la apoptosis y muerte celular. Fialho *et al.* (2023), utilizaron Np de óxido de zinc-zinc con recubrimientos de Ta y obtuvieron una mayor formación de ROS, en comparación con las AgNPs sintetizadas con extracto de *D. salina SQ* y *C. sinensis*, sugieren que el uso de Np con superficies que contienen Ta induce una mayor formación de ROS.

Si bien en este trabajo no se reportaron ensayos de hemólisis, lo cual limita una comparación directa de los resultados de Gholami *et al.* (2020) quienes utilizaron AgNPs utilizando extracto acuoso de *Ferula assafoetida* (Fer@AgNP) como agente reductor y taponante, la similitud en la metodología de síntesis sugiere una posible correlación en los perfiles de citotoxicidad. Los autores comparten que obtuvieron una excelente biocompatibilidad y se lo atribuyeron a los compuestos de origen natural, incluyendo péptidos, compuestos fenólicos y polisacáridos. Parece que estos compuestos ralentizan la liberación de Ag de las nanopartículas y como resultado, los mecanismos antioxidantes de la célula tienen más oportunidad de eliminar ROS y reducir su toxicidad. La concentración que se utilizó para evaluar la actividad biológica es comparable a estudios previos donde se ha demostrado la importancia de la evaluación de este parámetro. Estos hallazgos permiten desarrollar una prometedora línea de investigación para determinar que tan viable es la utilización de este nanomaterial en el área biomédica.

9. CONCLUSIONES

Las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos de *Camellia sinensis* (té verde) y *D. Salina SQ* presentaron una notable actividad antiproliferativa sobre células de glioma C6, evidenciando un efecto citotóxico dependiendo de la dosis. Los resultados sugieren que estas nanopartículas podrían ser buenos candidatos para futuras investigaciones en el desarrollo de terapias contra el cáncer cerebral.

Es importante resaltar que, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular a concentraciones más altas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre algunas de las formulaciones a concentraciones más bajas. Esto indica que la citotoxicidad no solo depende de la concentración de las nanopartículas, sino también de la síntesis y de la interacción específica de estas nanopartículas con las células tumorales.

De acuerdo con el ensayo MTT las NP no tienen efecto citotóxico significativo sobre los linfocitos humanos, esto indica que, bajo las condiciones experimentales establecidas, estas nanopartículas presentan una buena biocompatibilidad con las células del sistema inmunológico. Si bien, no se observó una citotoxicidad marcada a las concentraciones evaluadas, se apreciaron algunas tendencias interesantes. Por ejemplo, las AgNPs sintetizadas con extracto de té verde al 1% y 3% a una concentración de 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mostraron una ligera disminución en la viabilidad celular en comparación con las AgNPs sintetizadas con microalgas a la misma concentración, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

El análisis de los niveles de malondialdehído (MDA) indica que el tratamiento con AgNPs, especialmente aquellas sintetizadas con extracto de té verde a concentraciones más altas (5%), conduce a una disminución significativa en la oxidación lipídica en comparación con el control negativo. Esto sugiere que las

AgNPs pueden actuar como agentes antioxidantes, previniendo el daño celular causado por los radicales libres.

La capacidad antioxidante de las AgNPs parece estar influenciada por diversos factores, como la concentración y el método de síntesis. Las AgNPs sintetizadas con extracto de té verde mostraron un efecto más pronunciado que aquellas sintetizadas con microalgas, especialmente a concentraciones más elevadas.

10. REFERENCIAS

1. Irache JM. Nanomedicine: nanoparticles with medical applications. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 2];31(1):7–10. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272008000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=en
2. FUJISHIMAA, ZHANG X, TRYK D. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*. 2008 Dec 15;63(12):515–82.
3. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Povey M, York D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*. 2006 Oct 10;9(3):479–89.
4. Janata J, Josowicz M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. *Nature Materials*. 2003 Jan;2(1):19–24.
5. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(18):3995–4021.
6. He Q, Zhang Z, Gao F, Li Y, Shi J. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small*. 2010 Dec 10;7(2):271–80.
7. Bharti C, Nagaich U, Pal AK, Gulati N. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* [Internet]. 2015;5(3):124–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4522861/#:~:text=In%20particular%2C%20mesoporous%20silica%20nanoparticles>
8. Manzano M, Vallet-Regí M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*. 2019 Sep 6;30(2):1902634.
9. Croissant JG, Fatieiev Y, Khashab NM. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Advanced Materials*. 2017 Jan 13;29(9):1604634.
10. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006 Apr;110(14):7238–48.
11. Connor Ellen E, Mwamuka J, Gole A, Murphy Catherine J, Wyatt Michael D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small*. 2005 Mar;1(3):325–7.

12. Dykman LA, Khlebtsov NG. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta naturae* [Internet]. 2011;3(2):34–55. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347577/>
13. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances* [Internet]. 2009;27(1):76–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854209>
14. Lara HH, Ayala-Núñez NV, Ixtapan Turrent L del C, Rodríguez Padilla C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009 Oct 22;26(4):615–21.
15. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2012 Oct 29;2(1).
16. Gilbertson Richard J. Mapping Cancer Origins. *Cell*. 2011 Apr;145(1):25–9.
17. Artículo especial [Internet]. Available from: <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanoparti%CC%81culas-de-plata.pdf>
18. Diaz Acosta EM. Nanopartículas de plata: un enfoque en aplicaciones biológicas. *Mundo Nano Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* [Internet]. 2018 Feb 4;12(22):1. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/mn/v12n22/2448-5691-mn-12-22-00006.pdf>
19. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2016 Nov 11;17(1):20–37. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.108>
20. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*. 2010 Dec 16;363(25):2434–43.
21. Tiwari P, Vig K, Dennis V, Singh S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials* [Internet]. 2011 Jun 14;1(1):31–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5315048/>
22. Conde J, Dias JT, Graña V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in Chemistry*. 2014 Jul 15;2.
23. Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet]. www.who.int. 2022. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
24. Día Mundial contra el Cáncer 2021: Yo Soy y voy a - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. www.paho.org. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-contra-cancer-2021-yo-soy-voy#:~:text=A%20nivel%20mundial%2C%20se%20estima>

25. Serie De Guías G, Pacientes P, Fcc E. ¿Qué es el glioma? Déjenos explicárselo [Internet]. Available from: <https://www.esmo.org/content/download/106302/1866797/1/ES-Glioma-Gui%CC%81a-para-Pacientes.pdf>
26. Biopsia – Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. www.cancer.gov. 2011 [cited 2024 Aug. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/biopsia-estereotactica>
27. Quimioterapia para tratar el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. www.cancer.gov. 2015. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>
28. Glioma difuso de línea media - NCI [Internet]. www.cancer.gov. 2019. Available from: <https://www.cancer.gov/rare-brain-spine-tumor/espanol/tumores/gliomas-difuso-linea-media>
29. Terapia dirigida para el cáncer - NCI [Internet]. www.cancer.gov. 2014. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida>
30. Radioterapia para el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. www.cancer.gov. 2017. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>
31. Valenzuela R. NUEVAS TERAPIAS EN EL MANEJO DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO. Revista Médica Clínica Las Condes. 2017 May;28(3):401–8.
32. Línea celular de cultivo – Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. www.cancer.gov. 2011. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/linea-celular-de-cultivo>
33. C6 - CCL-107 | ATCC [Internet]. www.atcc.org. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-107>
34. Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi Nasrabadi H, et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. Critical Reviews in Microbiology [Internet]. 2016;42(2):173–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937409>
35. Artículo especial [Internet]. Available from: <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanoparti%CC%81culas-de-plata.pdf>
36. AshaRani P, Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. BMC Cell Biology. 2009;10(1):65.
37. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates:

- Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 2010 Feb 3;40(4):328–46.
38. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*. 2009 Oct;190(2):156–62.
 39. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, K. Braydich-Stolle L, Hess KL, Jones RL, et al. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008 Oct 30;112(43):13608–19.
 40. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier; 2017.
 41. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby Inmunología*. McGraw-Hill; 2007.
 42. Navarro E, Bañuelos MA, Vázquez E, et al. Toxicity of silver nanoparticles: influence of size and functionalization. *Environ Pollut*. 2008;156(2):845-851.
 43. Chen X, Meng H. Toxicity of nanomaterials: opportunities and challenges. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2007;3(3):165-175.
 44. Nel A, Xia T, Madler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622-627.
 45. Fahmy M, Shamaila S, et al. Síntesis verde de nanopartículas de magnetita (NPs-Fe₃O₄): factores y limitaciones. *Rev Mex Ing Bioméd*. 2023;14(1):402-415
 46. Kumar V, Yadav SK. Biological synthesis of nanoparticles: sources and techniques. *Trends Biotechnol*. 2009;27(6):298-304.
 47. Shankar SS, Renganathan N, Ravichandran N. Bio-synthesis of colloidal gold nanoparticles using *Emblca officinalis* fruit extract. *Biotechnol Prog*. 2003;19(6):1626-1631.
 48. Philip D. Green synthesis of nanoparticles using plants. *Plant Sci*. 2009;176(2):278-280.
 49. Alattar AM, Al-Sharuee IF, Jafer Fahdel Odah. Laser Fragmentation of Green Tea-synthesized Silver Nanoparticles and Their Blood Toxicity: Effect of Laser Wavelength on Particle Diameters. *Journal of Medical Physics*. 2024 Jan 1;49(1):95–102.

50. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005 Jun;45(4):287–306.
51. A. Wirwis, Sadowski Z. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Optimizing Green Tea Leaf Extraction for Enhanced Physicochemical Properties. *ACS omega*. 2023 Aug 10;8(33):30532–49.
52. Santos-Espinoza A, Gutiérrez-Miceli F, Ruíz-Valdiviezo V, Montes-Molina J. El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. *Año* [Internet]. 2020(2):46. Available from: <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2020/08/7-Santos-Espinoza-et-al-2020.pdf>
53. Monireh Golpour, Pedram Ebrahimnejad, Zahra Rezanejad Gatabi, Najafi A, Davoodi A, Rezvan Khajavi, et al. Green tea-mediated synthesis of silver nanoparticles: Enhanced anti-cancer activity and reduced cytotoxicity melanoma and normal murine cell lines. *Inorganic Chemistry Communications*. 2024 Mar 1;161:111989–9.
54. Fahimeh Mobaraki, Momeni M, Jahromi M, Farshad Moharrami Kasmaie, Barghbani M, Ehsan M, et al. Apoptotic, antioxidant and cytotoxic properties of synthesized AgNPs using green tea against human testicular embryonic cancer stem cells. *Process Biochemistry*. 2022 Aug 1;119:106–18.
55. Das S, Langbang L, Haque M, Belwal VK, Aguan K, Singha Roy A. Biocompatible silver nanoparticles: An investigation into their protein binding efficacies, anti-bacterial effects and cell cytotoxicity studies. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2021 Aug;11(4):422–34.
56. Jannelle P, Ulises D. Síntesis verde de nanopartículas de plata (AgNPs) con biomasa de la microalga *Nannochloropsis oculata*. *QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas* [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 1];(1):8–14. Available from: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/article/view/447>
57. Hamida RS, Ali MA, Almohawes ZN, Alahdal H, Momenah MA, Bin-Meferij MM. Green Synthesis of Hexagonal Silver Nanoparticles Using a Novel Microalgae *Coelastrella aeroterrestica* Strain BA_Chlo4 and Resulting Anticancer, Antibacterial, and Antioxidant Activities. *Pharmaceutics*. 2022 Sep 21;14(10):2002.
58. Gnanakani PE, Santhanam P, Premkumar K, Eswar Kumar K, Dhanaraju MD. *Nannochloropsis* Extract-Mediated Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles, Characterization and In Vitro Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2019 Aug 1;20(8):2353–64.
59. Miranda C, Castillo Herrera, José. La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso: Realidad o mito. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* [Internet]. 2021;27(2). Available from:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403002008000200003

60. Navarro E, Bañuelos MA, Vázquez E, et al. Toxicity of silver nanoparticles: influence of size and functionalization. *Environ Pollut.* 2008;156(2):845-851.
61. Sánchez Barriga JJ. Tendencias de mortalidad por tumores del sistema nervioso central en las siete regiones socioeconómicas y en los 32 estados de México entre 2000 y 2017. *Revista de Neurología.* 2022;74(10):315.
62. García-Contreras R, Acosta-Torres L, Arenas-Arrocena MC, Pilar D. Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas [Internet]. 2019. Available from: https://www.researchgate.net/publication/336348823_Manual_para_la_ensenanza_practica_del_ENSAYO_MTT_PARA_EVALUAR_LA_CITOTOXICIDAD_DE_NANOPARTICULAS
63. Alkhulaifi MM, Alshehri JH, Alwehaibi MA, Awad MA, Al-Enazi NM, Aldosari NS, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Citrus limon peels and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2020 Sep;
64. Rudrappa M, Rudayni HA, Assiri RA, Bepari A, Basavarajappa DS, Nagaraja SK, et al. Plumeria alba-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Exhibits Antimicrobial Effect and Anti-Oncogenic Activity against Glioblastoma U118 MG Cancer Cell Line. *Nanomaterials.* 2022 Jan 30;12(3):493.
65. Mani M, Okla MK, Selvaraj S, Ram Kumar A, Kumaresan S, Muthukumaran A, et al. A novel biogenic Allium cepa leaf mediated silver nanoparticles for antimicrobial, antioxidant, and anticancer effects on MCF-7 cell line. *Environmental Research.* 2021 Jul;198:111199.
66. Vuković B, Cvetić Ž, Bendelja K, Barbir R, Milić M, Dobrošević B, et al. In vitro study on the immunomodulatory effects of differently functionalized silver nanoparticles on human peripheral blood mononuclear cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 2021 Sep 2;26(7):817–31.

67. Pirković A, Vesna Lazić, Biljana Spremo-Potparević, Lada Živković, Dijana Topalović, Kuzman S, et al. Comparative analysis of Ag NPs functionalized with olive leaf extract and oleuropein and toxicity in human trophoblast cells and peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Sep 30];38(3):169–81. Available from: <https://academic.oup.com/mutage/article-abstract/38/3/169/7179780>
68. Kumar V, Kavitha Raj Varadaraju, Shivaramu PD, Kumar H, Prakruthi HR, Shekara C, et al. Bactericidal, anti-hemolytic, and anticancerous activities of phytofabricated silver nanoparticles of glycine max seeds. *Frontiers in Chemistry*. 2024 Aug 16;12.
69. Fialho L, Costa-Barbosa A, Sampaio P, Carvalho S. Effects of Zn–ZnO Core–Shell Nanoparticles on Antimicrobial Mechanisms and Immune Cell Activation. *ACS Applied Nano Materials* [Internet]. 2023 Sep 11 [cited 2024 Jan 17];6(18):17149–60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10526648/>
70. Gholami A, Mousavi SM, Shomali A, Hashemi SA, Abootalebi SN, Chiang WH, et al. One-Pot Ferula-Mediated Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles with More Antimicrobial Effect and Promising Human Cell Biocompatibility. Del Toro Sanchez CL, editor. *Journal of Nanomaterials*. 2022 Jan;2022(1).
71. Hu, D., Xia, M., Wu, L., Liu, H., Chen, Z., Xu, H., He, C., Wen, J., & Xu, X. (2023). Challenges and advances for glioma therapy based on inorganic nanoparticles. *Materials Today Bio*, 20, 100673–100673. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100673>
72. Song, B., Wang, X., Qin, L., Hussain, S., & Liang, W. (2024). Brain gliomas: Diagnostic and therapeutic issues and the prospects of drug-targeted nano-delivery technology. *Pharmacological Research*, 206, 107308-. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107308>

73. Wang, J., Yang, J., Liu, K., Yuan, J., Shi, Y., Li, H., & Zhao, L. (2023). Tumor targeted cancer membrane-camouflaged ultra-small Fe nanoparticles for enhanced collaborative apoptosis and ferroptosis in glioma. *Materials Today Bio*, 22, 100780–100780. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100780>
74. Bi, Y., Qian, P., Su, Z., Dai, W., Xu, F., & Luo, C. (2024). Construction of biomimetic camouflaged neutrophil membrane nanoparticles for precise delivery and augmented glioma cancer treatment. *Process Biochemistry* (1991), 145, 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.06.021>
75. Zhu, K., & Li, Y. (2024). Computed tomography imaging to evaluate the effects of gold-coated silver core-shell nanoparticles in pediatric glioma. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 17(4), 101039-. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2024.101039>
76. Kunjumon, R., Viswanathan, G., & Baby, S. (2024). Potential of asiaticoside encapsulated alginate chitosan nanoparticles in the management of antiproliferative activity in C6 glioma cells. *Brain Behavior and Immunity Integrative*, 5, 100043-. <https://doi.org/10.1016/j.bbii.2023.100043>
77. Goodwin, A. M. (2007). In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular Research*, 74(2), 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.05.006>

11. ANEXOS

Síntesis de nanopartículas de plata con extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ.

Adaptado de la metodología [49], en un vaso de precipitado se agregó nitrato de plata al 4 mM y se calentó entre 30 a 45°C en plancha. Una vez llegada la temperatura, se agregó una concentración del 10% del extracto previamente filtrado de alga proveniente de un cultivo de 15 días, con agitación magnética y luz artificial (intensidad promedio de 16,000 lux) constante durante 1 hora. Durante las síntesis, se tomaron muestras cada 5 y 10 minutos para su posterior análisis en el UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10s) y así determinar la velocidad y rendimiento de la síntesis.

Al finalizar la síntesis, se vació 1 mL de la solución final de AgNP's en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron 2 veces a 10,000 RPM por 10 minutos a 20°C. Siempre retirando el sobrenadante y resuspendido en agua desionizada para su correcto lavado.

Para determinar el rendimiento final en peso de las diferentes síntesis y un mejor control de las concentraciones en solución, se llevaron los tubos Eppendorf a horno de secado con vacío a 40°C por 24 hrs. Una vez secadas y pesadas, se resuspendieron en agua desionizada y se ultrasonicaron durante 1 hora, ciclos de 0.8 y amplitud al 80% (hielscher. UP200S, Ultrasonic Processor).

La visualización del tamaño y forma de las AgNP's fue por medio del Microscopio electrónico de transmisión (*TEM*, por sus siglas en inglés) (Hitachi High-Tech, TEM H7500 series). Las rejillas de cobre fueron cargadas con 10 µL a una concentración de 100 µg/mL de la solución de AgNP's.

Las imágenes TEM muestran las micrografías de nanopartículas de plata por síntesis verde al 10% de EB obtenidas con los cultivos C9, C15 y C30 días. Se confirma la existencia de AgNP's con distintas morfologías, entre ellas su mayoría casi esféricas. Con ayuda del software FIJI (ImageJ2) se analizó el tamaño promedio de partícula y se obtuvo un tamaño promedio de 17 nm a partir del EB-C15,

El tamaño y potencial Z fue determinado por el método de dispersión dinámica de la luz (*DLS*, por sus siglas en inglés) (Malvern Panalytical, Malvern DTS 1070, folded capillary cell). Las celdas fueron cargadas con 1 mL de las soluciones de síntesis realizadas.

Los resultados de las AgNP's al 10% de EB-C15 arrojaron un tamaño medio de 81 nm, polidispersidad de 0.413 y un potencial zeta de -15.2mV.

El tamaño de partícula obtenido a partir del DLS es comparativamente más amplio que el calculado a partir de las imágenes TEM. La diferencia en el tamaño de las partículas determinado por las dos técnicas puede atribuirse al hecho de que estas dos técnicas funcionan con principios y métodos de detección diferentes. Así mismo, según Singh et al., el aumento de tamaño de las nanopartículas a base de síntesis verde también se atribuye a la biomasa final que recubre a la nanopartícula [49]. Dicha biomasa resulta difícil de observar mediante el TEM debido a la forma en la que el haz de electrones interactúa con la materia orgánica [48], dicho esto, podríamos decir que el núcleo de plata tiene un tamaño pequeño (Fig. 12) y es el recubrimiento orgánico lo que aumenta el tamaño al momento de la medición por DLS (Fig. 13)

Referencias

[49] A. K. Singh *et al.*, “Photo-induced biosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Dunaliella salina* and their anticancer potential”, *J Photochem Photobiol B*, vol. 166, pp. 202–211, ene. 2017, doi:10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.11.020.