



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA EN BIOTECNOLOGÍA

**VIABILIDAD DEL USO DE MICROESFERAS DE OXIYODURO
DE BISMUTO (BIOI) PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUA: UN
ANÁLISIS CITOTÓXICO**

Proyecto de titulación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: MARJORIE LIZBETH BONILLA MEJÍA

TUTOR: PhD. MIGUEL HERRERA ROBLEDO

CO-TUTORES: Mgs. MARCO VITERI– PhD. FABIÁN AGUILAR

Napo - Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Marjorie Lizbeth Bonilla Mejía con documento de identidad N° 1804242251, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 18 de septiembre de 2023



Marjorie Lizbeth Bonilla Mejía
N° 1804242251

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Marjorie Lizbeth Bonilla Mejía, con documento de identidad N°1804242251, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: **“Viabilidad del uso de microesferas de oxiyoduro de bismuto (BiOI) en la remediación de agua: un análisis citotóxico”** de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 18 de septiembre de 2023



Marjorie Lizbeth Bonilla Mejía

N° 1804242251

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: **“Viabilidad del uso de microesferas de oxiyoduro de bismuto (BiOI) para la remediación de agua: un análisis citotóxico”**, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato artículo, fue realizado por: Marjorie Lizbeth Bonilla Mejía bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 18 de septiembre de 2023



PhD. Miguel Herrera Robledo

C.I: G39738569



PhD. Fabian Aguilar Mora

C.I: 1717348088



Mgs. Marco Viteri Yáñez

C.I: 1718163759

AGRADECIMIENTOS

A mi equipo de trabajo, profesores Miguel Herrera Robledo y Miguel Quishpe quienes confiaron en mí y me dieron todo su apoyo para realizar mi proyecto de tesis. Al Ing. Michael Suarez que fue testigo de cada versión de este trabajo.

Al centro de investigación para la Salud en América Latina (CISeAL)- Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) por haberme permitido realizar mi trabajo de titulación en sus instalaciones

Al proyecto NB-LAB financiado por la cooperación alemana DAAD, que financió la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres: Rubén que siempre ha estado conmigo, quien además de padre es el mejor amigo que tengo y me incitó a dar el primer paso para lograr todo lo que he logrado hasta el momento y a mi Nancy por todos los consejos, cariño y sabiduría que me ha otorgado en mi vida. A los dos, por ser mi pilar fundamental en todos los caminos que tomo, por motivarme, por su apoyo, esfuerzo y por siempre creer en mí.

A toda mi familia Mejía que siempre me han brindado amor y han estado para mí. A mis mejores amigos, quienes fueron partícipes de cada ocurrencia y muchas veces fueron un gran faro de luz.

TABLA DE CONTENIDO

CARATULA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	II
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	IV
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
DEDICATORIA	VII
TABLA DE CONTENIDO.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
2.1 OBTENCIÓN DE MICROESFERAS BIOI Y NANOCINTURONES $Bi_{12}O_{17}Cl_2$	3
2.2 CULTIVO CELULAR	3
2.3 ENSAYOS DE TOXICIDAD	4
2.3.1 Ensayo hemolítico	4
2.3.2 Prueba de citotoxicidad mediante el ensayo de resazurina	5
2.4 ANÁLISIS MORFOLÓGICO CELULAR POR TINCIÓN GIEMSA	7
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	8
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
3.1 OBTENCIÓN DE MICROESFERAS BIOI Y NANOCINTURONES $Bi_{12}O_{17}Cl_2$	9
3.2 ENSAYO HEMOLÍTICO	9
3.3 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO CON RESAZURINA	12
3.4 ANÁLISIS MORFOLÓGICO CELULAR POR TINCIÓN DE GIEMSA	23
4. CONCLUSIONES	29
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Resultados del test de suma de rangos de Kruskal-Wallis para la exposición de BiOI y Bi ₁₂ O ₁₇ CL ₂ a la línea celular HFF bajo condiciones de oscuridad y luz.....	17
Tabla 2.	Resultados del test de suma de rangos de Kruskal-Wallis para la exposición de BiOI y Bi ₁₂ O ₁₇ CL ₂ a células LlcMk2 y RAW 264.7 bajo condiciones de oscuridad.....	18
Tabla 3.	Resultados del test de suma de rangos de Kruskal-Wallis para la exposición de BiOI Y Bi ₁₂ O ₁₇ CL ₂ a las células RAW 264.7 bajo condiciones de oscuridad entre la media de la fluorescencia y los subgrupos de la concentración	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Imágenes SEM de a: microesferas BIOI y b: nanocinturones $Bl_{12}O_{17}Cl_2$	9
Figura 2.	Efecto hemolítico de la exposición de eritrocitos humanos a microesferas BIOI en: a) condiciones de oscuridad y b) luz visible blanca	11
Figura 3.	Efecto hemolítico de la exposición de eritrocitos humanos a nanocinturones $Bl_{12}O_{17}Cl_2$ en: a) condiciones de oscuridad y b) luz visible blanca.....	12
Figura 4.	Viabilidad celular relativa medida como intensidad de fluorescencia en HFF expuestas a: a) BIOI y b) $Bl_{12}O_{17}Cl_2$. en oscuridad.....	14
Figura 5.	Viabilidad celular relativa medida de HFF expuestas A: A) BIOI Y B) $Bl_{12}O_{17}Cl_2$. durante 24, 48, 72 y 192 horas en condiciones de luz	16
Figura 6.	Viabilidad celular relativa medida como intensidad de fluorescencia en LLCMK2 expuestas a diferentes concentraciones de: BIOI Y B: $Bl_{12}O_{17}Cl_2$ en oscuridad.....	19
Figura 7.	Viabilidad celular relativa medida como intensidad de fluorescencia en RAW 264.7 a diferentes concentraciones de a) BIOI y b) $Bl_{12}O_{17}Cl_2$ en oscuridad.....	22
Figura 8.	Tinción giemsa de HFF sin exposición a BIOX en oscuridad (CONTROL-O y luz (CONTROL-L) y bajo 1000 $\mu g/ml$ de BIOI y $Bl_{12}O_{17}Cl_2$ en oscuridad (-O) y luz (-L).....	24
Figura 9.	Tinción giemsa LLCMK2 sin exposición a BIOX en oscuridad (CONTROL-O) y luz (CONTROL-L) y bajo 1000 $\mu g/ml$ de BIOI y $Bl_{12}O_{17}Cl_2$ en oscuridad (-O) y luz (-L)	26
Figura 10.	Tinción giemsa RAW 264.7 sin BIOX en oscuridad (CONTROL-O) y luz (CONTROL-L) y bajo 1000 $\mu g/ml$ de BIOI y $Bl_{12}O_{17}Cl_2$ en oscuridad (-O) y LUZ (-L)	28

RESUMEN

En este estudio, se evaluó la toxicidad de dos tipos de oxihaluros de bismuto (BiOX): microesferas de BiOI y nanocinturones de $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ en tres líneas celulares diferentes: fibroblastos de piel humana (HFF), macrófagos de ratón (RAW 264.7) y células renales de mono de *Macaca mulatta* (LLcMk2). Se investigaron varios parámetros, como la exposición a la luz, diferentes concentraciones, tiempo de exposición y el tipo de BiOX ($X = \text{I}, \text{Cl}$). Se utilizó la viabilidad celular relativa medida como la intensidad de fluorescencia (IF) mediante la conversión de resazurina a resofurina. Los resultados revelaron que la citotoxicidad de los BiOX dependía de la línea celular estudiada. Se observaron efectos en la proliferación celular y cambios morfológicos en las células expuestas a una concentración de 1,000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOX. Sin embargo, no se encontraron efectos dependientes de la concentración en todas las líneas celulares. Solo se encontraron diferencias significativas entre la viabilidad celular y la concentración en las células de macrófagos. Además, se observó una buena compatibilidad de los BiOX incluso a altas concentraciones con los eritrocitos humanos. Estos hallazgos proporcionan información inicial sobre la toxicidad de los BiOX en diferentes líneas celulares y respaldan la necesidad de realizar más investigaciones para comprender mejor los efectos toxicológicos y la seguridad de estos nanomateriales en aplicaciones futuras. En resumen, este trabajo contribuye al conocimiento actual sobre la toxicidad de las BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ en células *in vitro*, destacando la importancia de investigaciones adicionales en este campo.

Palabras clave: BiOI, $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$, citotoxicidad, fotocatalisis, resazurina, hemólisis.

ABSTRACT

In this study, the toxicity of two types of bismuth oxyhalides (BiOX), namely BiOI microspheres and Bi₁₂O₁₇Cl₂ nanobelts, was evaluated in three different cell lines: human skin fibroblasts (HFF), mouse macrophages (RAW 264.7), and *Macaca mulatta* monkey kidney cells (LlCmk2). Various parameters including light exposure, different concentrations, exposure time, and the type of BiOX (X = I, Cl) were investigated. Cell viability was assessed by measuring the relative fluorescence intensity (IF) through the conversion of resazurin to resorufin. The results revealed that the cytotoxicity of BiOX depended on the specific cell line. Effects on cell proliferation and morphological changes were observed in cells exposed to a concentration of 1,000 µg/mL of BiOX. However, concentration-dependent effects were not found in all cell lines. Significant differences in cell viability were only observed in macrophages. Additionally, BiOX demonstrated good compatibility with human erythrocytes even at high concentrations. These findings provide preliminary insights into the toxicity of BiOX in different cell lines and emphasize the need for further research to better understand the toxicological effects and safety of these nanomaterials in future applications. In summary, this study contributes to the current knowledge of the *in vitro* cytotoxicity of BiOI and Bi₁₂O₁₇Cl₂, highlighting the importance of additional investigations in this field.

Keywords: BiOI, Bi₁₂O₁₇Cl₂, cytotoxicity, photocatalysis, resazurin, hemolysis.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente hay una alta presencia de contaminantes orgánicos emergentes (COE) en diferentes cuerpos de agua, como el bisfenol-A (BPA) [1]. La mayoría de estos COE generados por la industria son vertidos en los efluentes de agua más cercanos [2]. En consecuencia, estudios de calidad del agua han confirmado la presencia de COE en aguas superficiales, subterráneas y residuales [2]. Por lo tanto, ha sido necesario el empleo de diversas técnicas para la eliminación completa de COE del agua [3]. En este contexto, la fotocátalisis con semiconductores (SC) ha destacado debido a su accesibilidad económica, no toxicidad, rapidez y eficacia en la degradación completa de estos contaminantes [4,5]. Entre los SC, los oxihaluros de bismuto (BiOX, X= Cl, Br, I) al funcionar en la región visible del espectro representan una alternativa prometedora en términos de eficacia y costo [6]. Recientemente, Suarez et al. (2022) y Tuba et al. (2022) informaron que microesferas de BiOI y nanocinturones de $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$, respectivamente, tienen una alta actividad fotocatalítica en la degradación de BPA. Sin embargo, la exposición no controlada de nanomateriales (NMs) podría causar efectos negativos en la salud [9].

Se ha informado que ciertos NMs causan trombosis, infarto de miocardio e inflamación en las vías respiratorias superiores e inferiores [10]. No obstante, los efectos tóxicos reales de los BiOX aún siguen siendo un enigma [11]. Es probable que dentro un entorno biológico los BiOX generen especies reactivas de oxígeno (ROS) al actuar como donantes o aceptores de electrones [12]. Lo que podría conducir a efectos tóxicos en las células e incluso inducir a la muerte celular [13]. De hecho, se ha observado que las nanopartículas a base de bismuto (BiNPs) reducen la viabilidad celular en células de cáncer de mama al generar daños en la membrana celular [14].

Estudios afirman que la toxicidad está influenciada por diversos factores, tales como el tipo de NM, tamaño, concentración, frecuencia y duración de exposición [15–17]. El tamaño nanométrico (≥ 100 nm) aumenta la probabilidad de que entren a las células y causen daños [15,18]. Aunque este no es el único factor que podría influir en la entrada de los nanomateriales a través de barreras biológicas de tejidos y membranas celulares [19].

Las propiedades como la forma, composición y pureza de los constituyentes los cuales los vuelven extremadamente diferentes uno de otros, también son factores que influyen en el efecto toxicológico de los NMs en las células [20]. Estas propiedades provocan que existan respuestas biológicas distintas, por lo que no se puede inferir la toxicidad causada para cada tipo de NM [21]. Por ejemplo, Rashmizal et al. (2017) demostraron que nanoestructuras de Bi_2O_3 con diferentes formas exhiben distintos efectos citotóxicos en células hepáticas.

Los principales mecanismos de citotoxicidad resultantes de la exposición a nanomateriales incluyen estrés oxidativo, daño en la membrana celular, genotoxicidad, entre otros [22]. Abudayyak et al. (2016) ratificaron la toxicidad de nanoestructuras de Bi_2O_3 en diferentes líneas celulares de cáncer. En este estudio a pesar del tamaño de las Bi_2O_3 (149,1 nm) se demostró que todas las células engulleron fácilmente los NMs y mostraron efectos citotóxicos y genotóxicos. De la misma manera, la posible acumulación, translocación y los sitios de penetración; así como la forma en que los NMs ingresan al cuerpo humano, pueden determinar ciertos efectos toxicológicos [9]. Liu et al. (2021) sugieren que ciertos nanomateriales pueden incluso cruzar la barrera hematoencefálica, la barrera hematotesticular y la barrera placentaria hasta llegar al sistema nervioso central. En este sentido la evaluación toxicológica del nanomaterial es crucial para saber los efectos secundarios desencadenados en los sistemas biológicos [25].

Los ensayos de toxicidad de nanomateriales dependen de una gran variedad de criterios de valoración toxicológicos como la citotoxicidad, estrés oxidativo y apoptosis, aunque el primer paso para comprender como reaccionará un nanomaterial en el cuerpo implica estudios de cultivo celular [11,21]. Por tales razones las líneas celulares han demostrado ser buenos modelos *in vitro* [11]. Además de reducir el uso de animales en las pruebas toxicológicas [11]. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue investigar los efectos citotoxicológicos desencadenados por la exposición a microesferas de BiOI y nanocinturones $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ en tres diferentes líneas celulares: fibroblastos de piel humana (HFF), macrófagos de ratón (RAW 264.7) y células renales de mono de *Macaca mulatta* (LlCMk2).

Además, se analizó la influencia de diferentes parámetros como el efecto de la luz, diferentes concentraciones, tiempo de exposición e influencia del tipo de micro/nano estructuras BiOX (X= I, Cl) en las respuestas toxicológicas. Adicionalmente se realizó un ensayo hemolítico, debido a que los NMs tienen que viajar por el cuerpo dentro de la sangre antes de llegar a los órganos blanco [26,27].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de microesferas BiOI y nanocinturones Bi₁₂O₁₇Cl₂

Los BiOX: microesferas BiOI y nanocinturones Bi₁₂O₁₇Cl₂ fueron sintetizados por un método solvotermal e hidrottermal, respectivamente [7,8]. La morfología de ambas estructuras fue analizada por microscopia electrónica de barrido usando un microscopio electrónico de barrido Tescan Mira 3 con un emisor de campo Schottky [7,8]. Las propiedades físico-químicas de las nano/micro estructuras BiOI y Bi₁₂O₁₇Cl₂ fueron reportadas por Suarez et al. (2022) y Tuba et al. (2022) respectivamente.

Las concentraciones para Bi₁₂O₁₇Cl₂ y BiOI utilizadas para el ensayo hemolítico y de citotoxicidad se basaron en otros estudios con BiNPs [23,26,27]. Se preparó una reserva de cada BiOX en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) 1x a una concentración de 2 000 µg/mL. La solución madre para ambos ensayos de toxicidad (hemolítico y citotoxicidad) se diluyó en serie hasta lograr un rango logarítmico de diez concentraciones de 2 000, 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 8.81 y 3.90 µg/mL. Este enfoque se utilizó para obtener información sobre la dosis-respuesta y determinar cuán sensibles son las células a las diferentes concentraciones de BiOX.

2.2 Cultivo celular

Las líneas celulares RAW 264.7, HFF y LlcMk2 se adquirieron del centro de investigación para la Salud en América Latina (CISeAL)-Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm², en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina-estreptomina en un incubador humidificado a 37 °C en aire con 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa [23,28].

La densidad celular para ambos ensayos (microscopía y citotoxicidad) fue de 2×10^4 células/mL [29]. Los ensayos para cada línea celular por triplicado con al menos tres pseudoréplicas cada uno. Todos los reactivos utilizados en los procedimientos fueron precalentados en baño maría a 37 °C [19].

2.3 Ensayos de toxicidad

2.3.1 Ensayo hemolítico

Se utilizó 2 mL de sangre de un donador sano para obtener una suspensión de 50 mL de PBS 1x con 4% de eritrocitos (RBC) [30]. Para ello, la suspensión se lavó con PBS 2x durante 3 veces seguidas. Luego, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante [30]. Después se etiquetaron diez microtubos de 1,5 mL por cada concentración de BiOX (2 000-3.90 µg/mL). Seguido, se colocó 200 µL de la solución de 4% de RBC en cada microtubo y se homogenizó con 200 µL de la dilución seriada de BiOX (2 000-3.90 µg/mL) en solución estéril de PBS 2x. Además, se preparó un microtubo de 1,5 mL por cada control; control positivo (100% de hemólisis) microtubo con 200 µL de la solución de 4% de RBC + 195 µL de PBS + 5 µL de tritón X-100 y control negativo (0% de hemólisis) microtubo con 200 µL de la solución de 4% de RBC + 200 µL de PBS [31]. Posteriormente, los 12 microtubos (incluyendo los controles) se colocaron en la incubadora a 37 °C durante 4 horas en oscuridad [32]. Para eliminar la variabilidad, se mantuvieron tres réplicas por cada concentración de BiOX.

Además, se consideró que la luz activa al SC el cual a su vez genera singletes de oxígeno que provocan citotoxicidad [32]. Por tal razón se realizó un ensayo bajo condición de luz, donde se colocaron diez microtubos de 1,5 mL con 200 µL de la dilución seriada de BiOX (2 000-3.90 µg/mL) en solución estéril de PBS 2x junto a 200 µL de la solución de 4% de RBC. Luego, los doce microtubos (incluidos los controles) se colocaron dentro una caja de vidrio (40.5 x 30.0 x 35.2) cm bajo exposición a una lámpara LED de luz blanca (LEDEX B4665, 50 W, 5000 Lm, 6000 K luz día, 100-200V), durante cuatro horas.

Una vez finalizadas las cuatro horas de cada tratamiento, los 24 microtubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos [30]. En esta etapa, los sobrenadantes se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos [27].

Finalmente, se determinó el grado de hemólisis midiendo la absorbancia del sobrenadante a OD570 nm en un lector de microplacas de luminisecnai GloMax Discover [30]. Para el cálculo del porcentaje de hemólisis en términos de viabilidad se utilizó la siguiente fórmula [30].

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(A - A_o)}{(A_x - A_o)} * 100$$

Donde A es la lectura de la solución de BiOX, Ao es la lectura del control negativo y Ax es la lectura del control positivo. Por último, se consideró que el extracto probado no fue citotóxico si el porcentaje de hemólisis calculado por cada concentración no mostraba diferencias significativas respecto al control.

2.3.2 Prueba de citotoxicidad mediante el ensayo de resazurina

En este trabajo se evaluó la citotoxicidad inducida por la exposición a las micro/nano estructuras BiOX en tres diferentes líneas celulares de mamíferos: HFF, RAW 264.7 y LlcMk2. El ensayo con sal sódica de resazurina (RZN) permite evaluar la viabilidad celular por la actividad metabólica de las células vivas [33]. La actividad metabólica es evaluada a través de una respuesta colorimétrica resultado de la conversión de la forma oxidada de la resazurina (azul no fluorescente) a la forma reducida denominada resorufina (rosa altamente fluorescente) [34].

Para evitar errores que puedan alterar los resultados se incluyeron tres pasos adicionales en la prueba con resazurina. En primer lugar, para evitar la aglomeración y la sedimentación las soluciones de las micro/nano estructuras BiOX fueron sonicadas durante 15 minutos hasta obtener una mezcla homogénea [19]. Todos los reactivos utilizados fueron precalentados en baño maría a 37 °C [23]. El último paso fue una comparación de la respuesta toxicológica desencadenada por la exposición a BiOX fotoactivadas (fototoxicidad) respecto a las micro/nano estructuras sin fotoactivar en células HFF [32].

Durante el proceso de subcultivo, las tres líneas celulares fueron separadas por tripsinización una vez que alcanzaron un nivel de confluencia del 80% [35]. Posteriormente, se sembraron 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos para cada línea celular y se utilizó un volumen de 200 µl de DMEM por pocillo [36].

Para los ensayos citotóxicos las células se dejaron asentar y crecer a una temperatura de 37 °C con un 5% de CO₂ durante 24 horas [23]. Al día siguiente, se sustituyó el medio del primer pocillo de la primera columna por 200 µL de la suspensión de BiOX. Luego con una pipeta multicanal se preparó una dilución seriada de cada BiOX (2 000-3.90 µg/mL) en tres filas de la placa P96.

Una vez preparadas las placas (3 placas, una por cada línea celular) se colocaron dentro una caja de vidrio aséptica bajo condiciones de oscuridad durante 4 horas [32]. Inmediatamente concluido el tiempo se añadieron 20 µL de 3mM de RZN en PBS por pocillo [34]. Después las placas se colocaron en una incubadora a una temperatura de 37 °C con un 5% de CO₂ durante 24 horas [23].

Para estudiar el efecto citotoxicológico de las micro/nano estructuras BiOX fotoactivadas en células de fibroblastos de piel humana. Se preparó una placa de 96 pocillos con 2x10⁴ células HFF/pocillo con un volumen de 200 µl de DMEM por pocillo. Se incubaron y se dejaron crecer a una temperatura de 37 °C con un 5% de CO₂ durante 24 horas [23,32]. Finalizadas las 24 horas se colocó la dilución seriada de cada BiOX (2 000-3.90 µg/mL) en tres filas de la placa P96. Sin embargo, antes de agregar la RZN las placas se colocaron en una caja de vidrio aséptica bajo irradiación de luz visible a una distancia de 30 cm utilizando una lámpara LED (100-200 V) durante cuatro horas [32].

Finalizadas las cuatro horas de incubación bajo parámetros de oscuridad y luz, las placas se colocaron en la incubadora a una temperatura de 37 °C durante 24 horas con 5% de CO₂ [23]. Un día después, el espectro de fluorescencia (excitación: 530-560 nm; emisión 590 nm) fue evaluado utilizando un lector de microplacas multimodal Glomax [33]. Se realizó lecturas de la viabilidad celular relativa medida en términos de intensidad de fluorescencia (IF) durante cuatro periodos de tiempo (24h, 48h, 72h y 192h). El tiempo de exposición para Bi₁₂O₁₇Cl₂ y BiOI utilizadas para el ensayo de citotoxicidad se basaron en otros estudios con BiNPs [23,26,27].

Finalmente, según la siguiente fórmula, se calculó la actividad metabólica y se estimó el crecimiento celular y la toxicidad celular [37].

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{(A - A_o)}{(A_x - A_o)} * 100$$

Donde A es la lectura de la solución de BiOX, A_o es la lectura del control negativo y A_x es la lectura del control positivo.

2.4 Análisis morfológico celular por tinción Giemsa

La tinción Giemsa se utilizó para identificar los cambios morfológicos inducidos por las micro/nano estructuras BiOX en las células HFF, L1cMk2 y RAW 264.7. Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de 6 pocillos (p6), por cada línea celular [38]. Se introdujeron asépticamente 3 cubreobjetos circulares en cada pocillo y se sembraron las células a una densidad de 2×10^4 células/pocillo [39]. Las placas se colocaron inmediatamente en la incubadora y se permitió que las células se asentaran y crecieran a una temperatura de 37°C con un 5% de CO₂, durante toda la noche. Al día siguiente, se substituyó el medio de dos pocillos por 0.02 mL de la suspensión de BiOI [1 000 µg/mL]. También se reemplazó otros dos pocillos por 0.02 mL de la suspensión de Bi₁₂O₁₇Cl₂ [1 000 µg/mL]. Los dos pocillos restantes se los utilizó como control (células sin exposición a BiOX). Después, se colocaron las tres placas p6 en una caja de vidrio aséptica durante cuatro horas de oscuridad.

Asimismo, para el ensayo bajo condiciones de luz se utilizó una placa p6 por cada línea celular [38]. Se siguió el mismo protocolo con ciertas modificaciones, una vez substituido el medio de las células por las soluciones de BiOX las tres placas p6 se colocaron en una caja de material inorgánico (vidrio) bajo exposición de luz visible blanca (100-200 V). Una vez finalizadas las cuatro horas en ambos ensayos (oscuridad y luz), las seis placas se dejaron asentar y crecer en una incubadora a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 24 horas.

Al día siguiente, se extrajo un cubreobjetos circular de cada pocillo y se lavó con PBS 3 veces y 2 veces en solución Wx (25 mL ácido acético, 75 mL de etanol, 1.25 mL de formaldehído al 37%) [35].

Posteriormente los cubreobjetos se secaron y se trataron con solución Giemsa (5.2 mL de Giemsa en 200 mL de agua destilada) durante 30 minutos [40]. Luego se dejaron secar a temperatura ambiente los cubreobjetos correspondientes a las primeras 24 horas de exposición a BiOX. A continuación, se retiró un cubreobjetos de cada pocillo correspondiente a las 48 horas. Luego de 72 horas de exposición se retiró el último cubreobjetos de cada pocillo. Todos los cubreobjetos se fijaron con glutaraldehído para luego teñirlos con Giemsa [38]. Finalmente, los cambios morfológicos se observaron bajo un microscopio invertido [40].

2.5 Análisis estadístico

En cada experimento independiente, se determinó el valor promedio de las submuestras para cada grupo, y estos valores se utilizaron para realizar comparaciones estadísticas ($N=3$). Se eligieron métodos paramétricos (ANOVA y prueba de Tukey) y no paramétricos (Kruskal-Wallis y prueba de comparación-múltiple de Dunn) según la normalidad de los datos. Por lo cual primero se requirió verificar en cada ensayo si los datos cumplían con las suposiciones de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y la varianza homogénea (Brown-Forsythe) [41]. En el caso del ensayo de citotoxicidad, los datos fueron sometidos a un análisis utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de comparación múltiple de Dunn, ambos métodos son no paramétricos. Esta evaluación comparó los grupos expuestos con el grupo de control. Por otro lado, para el ensayo hemolítico, se empleó el análisis de varianza (ANOVA), que es un método paramétrico, seguido por la prueba de Tukey.

En ambos ensayos, se estableció un nivel de confianza de 95% y se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como indicativo de significancia estadística [19,23]. Todo el análisis y la generación de gráficas se llevaron a cabo utilizando R v.3.4.1 y RStudio v.1.1.456.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de microesferas BiOI y nanocinturones Bi₁₂O₁₇Cl₂

Un aspecto importante en las pruebas de toxicidad de los nanomateriales es su tamaño y morfología. La imagen SEM representada en la Figura 1a revela que la muestra de BiOI se compone de microesferas en forma de flor con diámetros que varían entre 1,215 y 2,864 μm (diámetro medio = $1,912 \pm 0,436 \mu\text{m}$). Mientras, en la Figura 1b las estructuras de Bi₁₂O₁₇Cl₂ presentan una morfología en forma de cinturón con una anchura promedio de $93,82 \pm 42,08 \text{ nm}$, un grosor promedio de $16,58 \pm 0,78 \text{ nm}$ y longitudes que varían entre 90 nm y 2,5 μm [7,8]. La diferencia de tamaños descrita puede deberse al hecho de los diferentes métodos de síntesis utilizados [18,42].

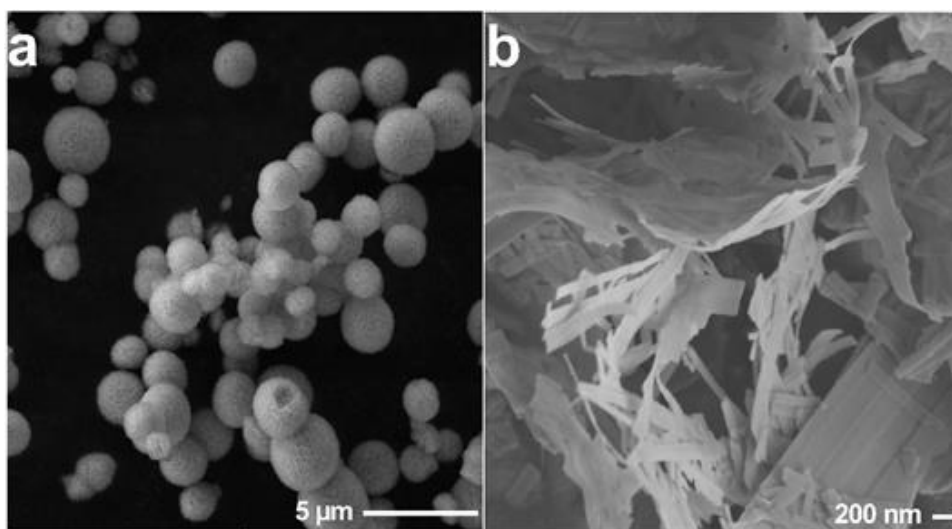


Figura 1. Imágenes SEM de a: microesferas BiOI y b: nanocinturones Bi₁₂O₁₇Cl₂.
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

3.2 Ensayo hemolítico

Un estudio de toxicidad realizado entre BiOBr y TiO₂ corroboró que las nanopartículas de titanio al tener menor tamaño muestran mayor daño celular [11]. No obstante, en el presente estudio se observó que la diferencia del tamaño, forma y composición entre ambas BiOX no influyó significativamente en la toxicidad presentada en el ensayo hemolítico (Figura 2).

Las micro/nanoestructuras BiOX no mostraron capacidad para lisar la membrana de los glóbulos rojos después de cuatro horas de incubación en condiciones de oscuridad y cuando fueron expuestas a irradiación de luz visible. Además, el porcentaje de hemólisis entre BiOI (Figura 2) y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ (Figura 3) no difirió significativamente con el aumento de la concentración. Estudios *in vitro* clasifican el porcentaje de hemólisis como “sin preocupación” cuando varía del 5 al 25% [31]. En este estudio se consideró como máxima respuesta (100%) de actividad hemolítica al grupo de control positivo expuesto al detergente aniónico (Tritón X-100). Se calculó un porcentaje de hemólisis del 2,49% en 2 000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI respecto al control en condiciones de oscuridad.

De la misma manera, se obtuvo un porcentaje de hemólisis de 3,22% para $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ a 2 000 $\mu\text{g/mL}$ respecto al control. Estos bajos porcentajes de hemólisis se deben a que los SC están inactivos en condiciones de oscuridad [32]. Es decir, que estos NMS al no estar expuestos a la luz no generan especies reactivas de oxígeno [32]. Por el contrario, el estudio de citotoxicidad con BiOX fotoactivadas con luz blanca visible presento mayor capacidad hemolítica.

El porcentaje de hemólisis luego de exponer los eritrocitos a 2 000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI fotoactivadas durante 4 horas bajo exposición de luz visible blanca fue del 4,09%. Mientras que la exposición de eritrocitos a $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ bajo las mismas concentraciones que BiOI, resultó un porcentaje de hemólisis de 3,57%. Estos resultados indican que las soluciones de BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ no son tóxicas para los eritrocitos incluso en altas concentraciones y bajo condiciones de luz y oscuridad. El resultado fue validado con la prueba estadística de Tukey, la cual evidenció diferencia estadísticamente significativa entre todas las concentraciones BiOX (2 000-3.90 $\mu\text{g/mL}$) respecto al control positivo. Sin embargo, no se halló significancia estadística entre las diez concentraciones probadas para cada BiOX sin contar el control.

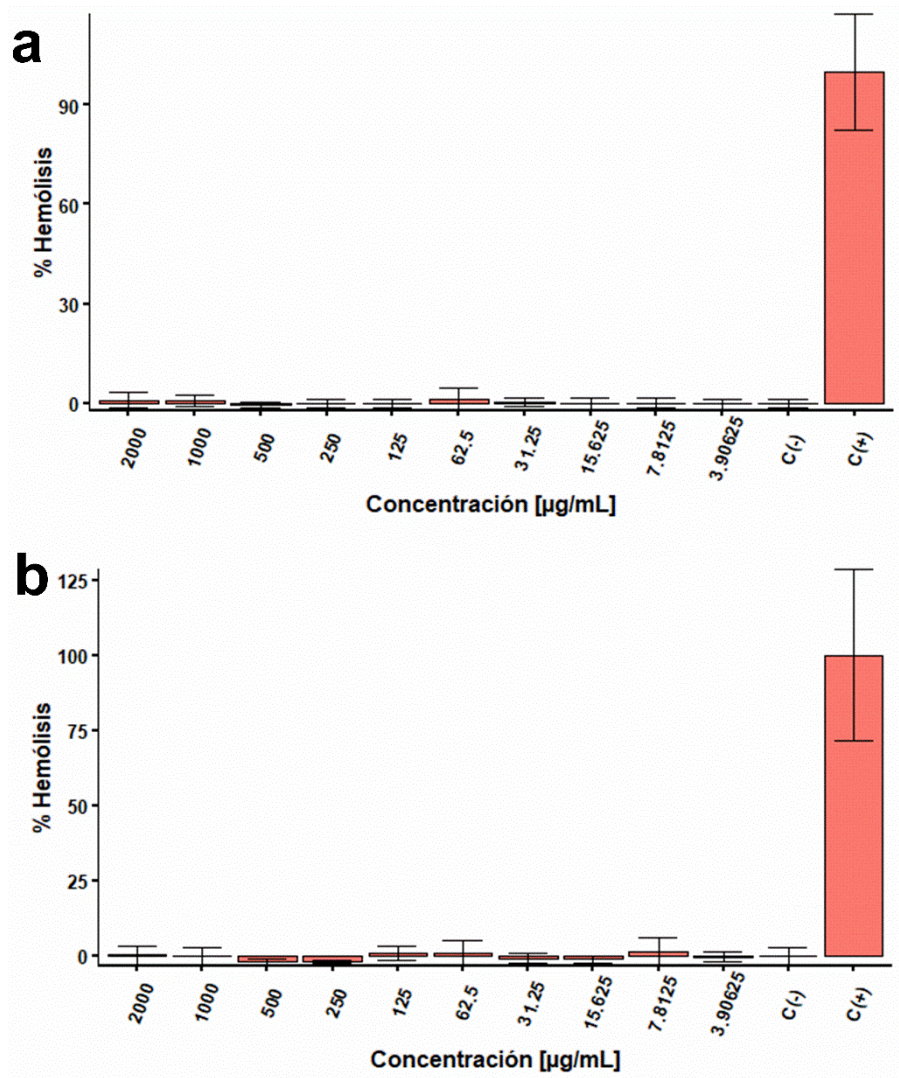


Figura 2. Efecto hemolítico de la exposición de eritrocitos humanos a microesferas BiOI en: a) condiciones de oscuridad y b) luz visible blanca
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

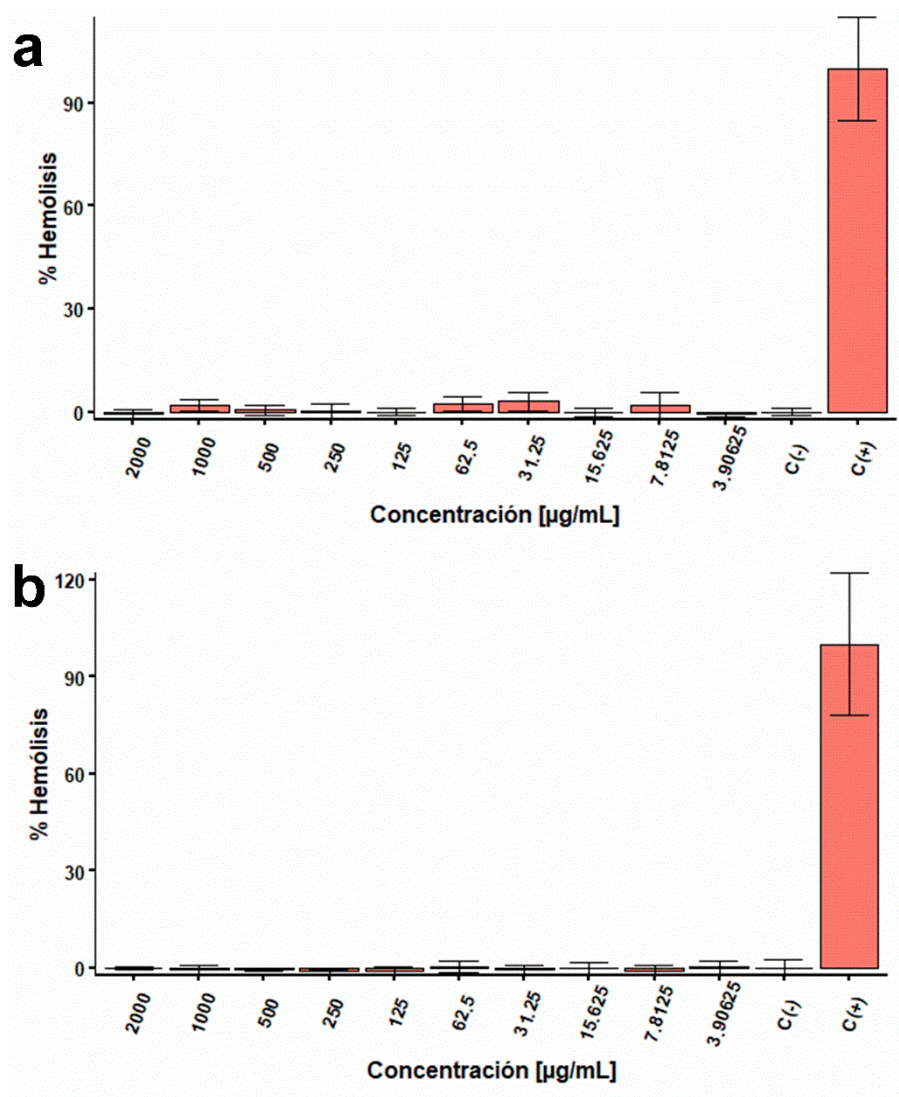


Figura 3. Efecto hemolítico de la exposición de eritrocitos humanos a nanocinturones $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ en: a) condiciones de oscuridad y b) luz visible blanca
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

3.3 Prueba de citotoxicidad mediante el ensayo con resazurina

Comprender el perfil toxicológico de las micro/nano estructuras BiOX en células HFF, LlcMk2 y RAW 264.7 puede ayudar a obtener respuestas de cómo se comportan estos materiales en distintos entornos biológicos. Existe evidencia de que las respuestas toxicológicas también se deben a la interacción celular con la superficie de las nanopartículas [23,36,43].

Por lo tanto, la elección correcta de líneas celulares para realizar toxicidad *in vitro* e *in vivo* es fundamental [19]. Por ejemplo, las líneas celulares de carcinoma normalmente usadas para las pruebas *in vitro* en ensayos de nanotoxicidad pueden presentar resultados diferentes con los de las células normales debido a su fisiopatología [44].

En la Figura 4a se muestra la viabilidad celular de células HFF expuestas a diferentes concentraciones de BiOI y por diferentes tiempos en condiciones de oscuridad. Como se observa, tras 48 y 72 horas de exposición existe una reducción del 97,69% al 86,70% en la viabilidad de las células HFF expuestas a 2000 µg/mL de BiOI respecto al control. Por otro lado, luego de 24, 48 y 192 horas de exposición a 2000 µg/mL de Bi₁₂O₁₇Cl₂ se evidenció un porcentaje de viabilidad celular del 100%. Sin embargo, tras 72 h de exposición a nanocinturones la viabilidad celular disminuyó hasta 98,28% respecto al control (Figura 4b). No obstante, la viabilidad celular calculada para ambas BiOX se encuentra en el rango de 70-90% que se considera un rango de viabilidad moderada [45]. Por consiguiente, estos resultados sugieren que la exposición no afecta drásticamente la viabilidad, pero sí limita el crecimiento celular incluso a altas concentraciones de ambas BiOX. Esto se corroboró mediante el análisis estadístico de Kruskal-Wallis, pues no se encontraron diferencias significativas en la IF respecto a los grupos de concentración (2 000-3.90 µg/mL).

Por otro lado, si se encontraron diferencias significativas en la IF en relación con los diferentes periodos de tiempo de exposición a BiOI ($p=1.48 \times 10^{-5}$) y Bi₁₂O₁₇Cl₂ ($p=1.48 \times 10^{-5}$). Estos resultados indican que los efectos de diferentes dosis de BiOX varían a lo largo del tiempo de manera significativa. De hecho, se calculó un porcentaje de viabilidad celular del 100% a las 192 horas de exposición para ambas BiOX incluso a altas concentraciones. Esto puede deberse a que, durante el tiempo de incubación el número de células vivas se multiplicó debido a la división celular cuyo período es entre 24-48 h aproximadamente [39].

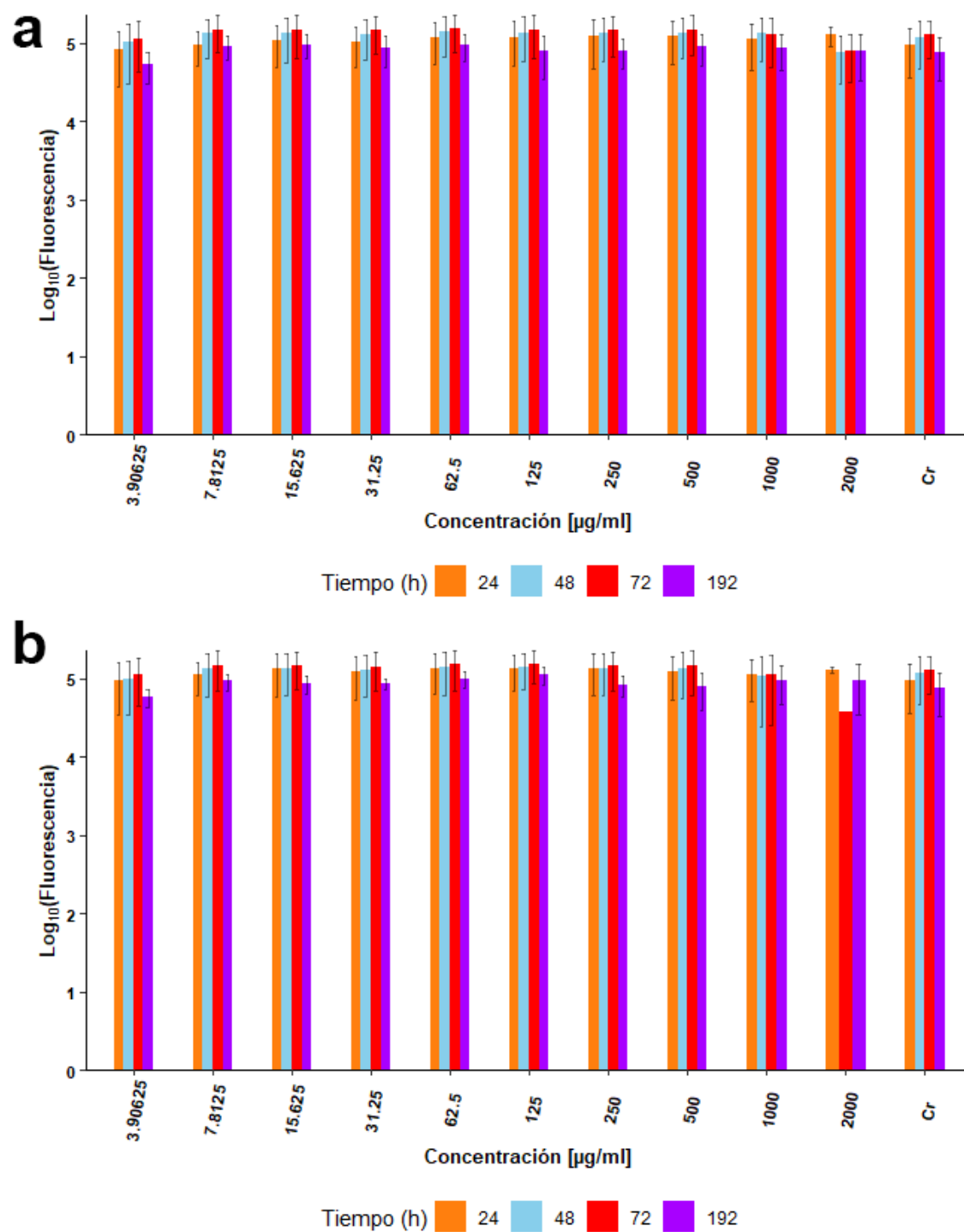


Figura 4. Viabilidad celular relativa medida como intensidad de fluorescencia en HFF expuestas a: a) BiOI y b) Bi₁₂O₁₇Cl₂ en oscuridad.
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

Por otro lado, como se observa en la Figura 5a y 5b el porcentaje de viabilidad celular de células HFF expuestas a BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ a 2 000 $\mu\text{g/mL}$ por 72 horas bajo irradiación de luz visible fue del 95,76 y 97,2 %, respectivamente. Estos resultados indican que la viabilidad de células HFF no es afectada incluso cuando ambas BiOX son fotoactivadas. La prueba estadística de Kruskal-Wallis para el ensayo con células HFF expuestas a BiOX irradiadas con luz visible durante cuatro horas, no mostró diferencias significativas en la media de fluorescencia entre los grupos de concentración. Esto podría indicar que los efectos de los BiOX son consistentes en todo el conjunto de concentraciones o que no existe un efecto sustancial en la variable evaluada (IF) [19].

Por otro parte, si se encontraron diferencias significativas en la relación entre la media de IF y el tiempo tanto para $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ ($p=4.20 \times 10^{-6}$) como para BiOI ($p=7.89 \times 10^{-5}$). Por lo tanto, se realizó un análisis estadístico de Dunn para identificar los grupos con diferencias significativas de cada ensayo (luz y oscuridad) (Tabla 1).

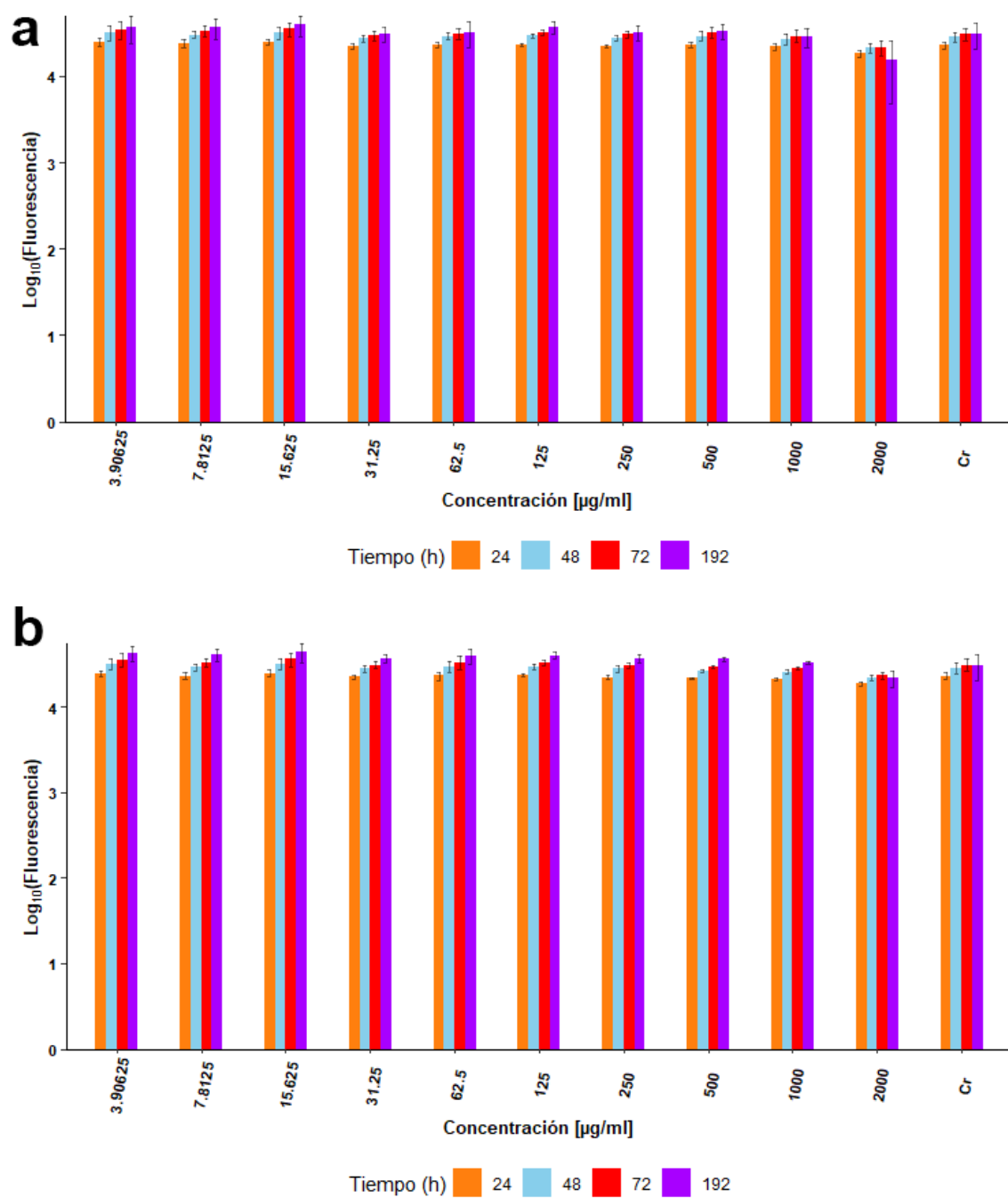


Figura 5. Viabilidad celular relativa medida de HFF expuestas a: a) BiOI y b) $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ durante 24, 48, 72 y 192 horas en condiciones de luz
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

Tabla 1. Resultados del Test de Suma de Rangos de Kruskal-Wallis para la exposición de BiOI y Bi₁₂O₁₇Cl₂ a la línea celular HFF bajo condiciones de oscuridad y luz.

Tiempo	Nanomaterial	Luz (L)/Oscuridad (O)	P. value
192-24	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	O	0.0123*
192-48	BiOI	O	0.0007*
192-48	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	O	0.0018*
192-72	BiOI	O	0.0000*
192-72	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	O	0.0000*
24-72	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	O	0.0318*
192-24	BiOI	L	0.0001*
192-48	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	L	0.0136*
24-72	BiOI	L	0.0008*
24-72	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	L	0.0011*

Nota: * indica diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $\alpha = 0.05$.

Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

La Figura 6 muestra los resultados de la IF en células LlcMK2 expuestas a BiOX sin fotoactivar en comparación con las células control sin exposición a BiOX. El porcentaje de viabilidad celular tras 24 horas de exposición a 2000-1000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI a altas concentraciones disminuyó de 98,76% a 85,07%, respectivamente. Mientras que para Bi₁₂O₁₇Cl₂ el porcentaje de viabilidad celular calculado para ambas concentraciones (2000-1000 $\mu\text{g/mL}$) fue del 88,0 y 100%. Estudios sugieren que la dosis nominal (área de superficie, masa y número de NMs) es proporcional al grado de citotoxicidad y absorción celular [46]. Sin embargo, el análisis estadístico de Kruskal-Wallis para LlcMk2 expuestas a BiOX en condiciones de oscuridad permitió verificar que no existe una correlación dosis-respuesta. Estos resultados sugieren que no existe una correlación consistente entre la cantidad de BiOX (dosis) y la magnitud de IF. Aunque el mecanismo de acción no se ha podido elucidar en este estudio, esto puede deberse al efecto Plateau el cual explica es posible que una vez alcanzada cierta dosis no importa cuánto se aumente la viabilidad celular no cambia [46].

Por otro lado, se verificó la presencia de diferencias estadísticamente significativas en el análisis estadístico de Kruskal-Wallis entre la media de fluorescencia y el tiempo para ambas BiOX: BiOI ($p=0$) y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ ($p= 1.90 \times 10^{-5}$). De hecho, estudios *in vivo* con BiNPs (nanopartículas de bismuto) demostraron que el nivel de bismuto acumulado disminuye a medida que transcurre el tiempo [47]. Para validar estas diferencias, se utilizó la prueba estadística de Dunn, la cual indicó que algunos grupos no presentaban diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del Test de Kruskal-Wallis para la exposición de BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ a células LlcMk2 y RAW 264.7 bajo condiciones de oscuridad

Tiempo	Línea celular	Nanomaterial	Luz (L)/Oscuridad (O)	P. value
192-24	LlcMk2	$\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$	O	0.0000*
192-24	LlcMk2	BiOI	O	0.0003*
192-48	LlcMk2	$\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$	O	0.0000*
192-48	LlcMk2	BiOI	O	0.0000*
192-72	LlcMk2	$\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$	O	0.0195*
192-72	LlcMk2	BiOI	O	0.0061*
192-24	RAW 264.7	BiOI	O	0.0003*
192-48	RAW 264.7	$\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$	O	0.0000*
192-48	RAW 264.7	BiOI	O	0.0006*
192-48	RAW 264.7	BiOI	O	0.0061*

Nota: * indica diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $\alpha = 0.05$.

Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023

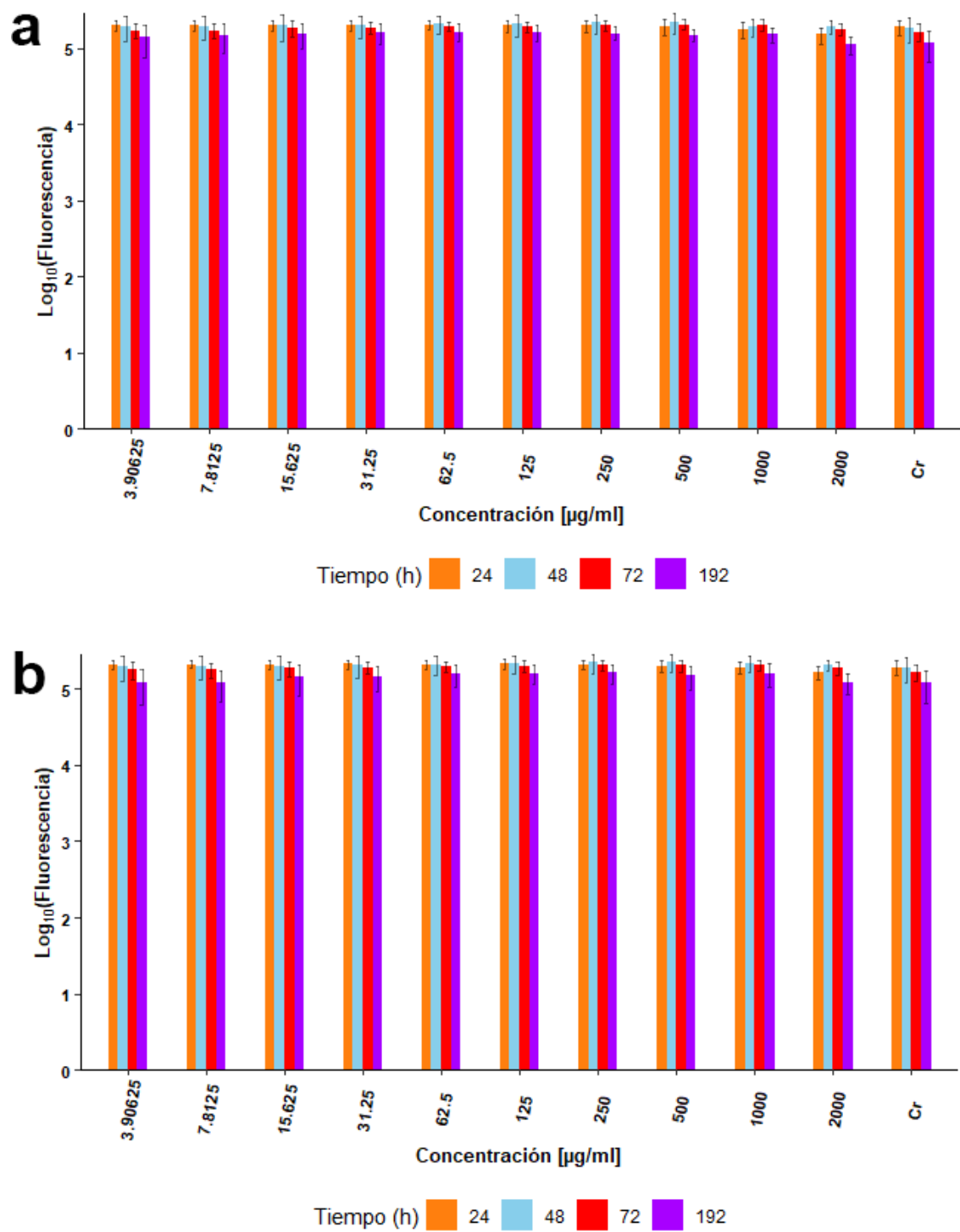


Figura 6. Viabilidad celular relativa medida como intensidad de fluorescencia en LlcMk2 expuestas a diferentes concentraciones de: BiOI y b: $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ en oscuridad. Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

Los macrófagos juegan un papel importante en la determinación de la biopersistencia de partículas extrañas y el inicio de respuestas inflamatorias [48]. En este sentido, en la Figura 7 se muestra la IF emitida por las células RAW 264.7 expuestas a diferentes concentraciones de BiOX durante 24,48,72 y 192h, en comparación con las células de control en condiciones de oscuridad. La evaluación citotóxica mostró una disminución en la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración y el tiempo. Además, a pesar de la diferencia del tamaño y composición entre ambas BiOX el perfil de toxicidad se diferencia únicamente en un 3%.

Tras 24 horas de exposición a 2000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ la viabilidad celular fue del 53,1 y 56,5%; respectivamente. Asimismo, la viabilidad celular tras 72 horas de exposición de BiOI fue del 20%. Estos resultados confirman que las micro/nano estructuras tienen una alta citotoxicidad en las células RAW 264.7 y por tanto afectan significativamente la supervivencia celular incluso a concentraciones bajas [48]. Por ejemplo, se obtuvo una viabilidad celular de 70,04 % tras 48 horas de exposición a 125 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI. Estos hallazgos fueron respaldados mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis (no paramétrica), la media de fluorescencia y las concentraciones de BiOI en condiciones de oscuridad indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p=0.01$) entre algunos subgrupos. Adicionalmente, mediante una prueba post hoc de Dunn se observaron las diferencias significativas en múltiples comparaciones (Tabla 3). También se confirmó la presencia de diferencias significativas entre la media de fluorescencia y el tiempo ($p=0.002$) (Tabla 2).

Estudios han corroborado la reducción de la viabilidad celular dependiente a la concentración de los NMs [45]. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis en las células RAW 264.7 bajo exposición a $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ en condiciones de oscuridad mostró diferencias significativas ($p=0.001$) entre las concentraciones evaluadas (Tabla 2). El análisis mostró significancia únicamente entre 1 000-7.81 $\mu\text{g/mL}$ y 2 000- 7.81 $\mu\text{g/mL}$ para BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$, respectivamente (Tabla. 3). Los resultados de la intensidad de fluorescencia revelaron que las RAW 264.7 son más sensibles que HFF y LlcMk2, esta sensibilidad guarda correlación entre dosis-tiempo-efecto. De hecho, un estudio del perfil toxicológico de NP de sílice en dos líneas celulares: K17 (queratinocitos humanos) y HDF (fibroblastos dérmicos humanos) verificaron que la toxicidad dependía del tipo celular y del modo de internalización [49].

Asimismo, estudios *in vivo* con BiNPs demostraron que el nivel de bismuto acumulado disminuía a medida que aumentaba el tiempo hasta los 90 días, lo que indica efectos de eliminación dependientes del tiempo [47]. De hecho, las tres líneas celulares mostraron diferencias significativas en el análisis estadístico entre la IF y los grupos de tiempo.

En general, se observó con más frecuencia diferencias significativas en la fluorescencia celular a las 192 horas de exposición. Estas diferencias sugieren que a medida que aumentó el tiempo de exposición, se observaron cambios medibles y consistentes en la variable de interés (fluorescencia), lo que resultó en diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados. El fenómeno de la toxicidad dosis-tiempo puede explicarse mediante: a) reducción de la difusividad de la solución de BiOX; b) alteración en la expresión génica; d) crecimiento celular [37].

Tabla 3. Resultados del Test de Kruskal-Wallis para la exposición de BiOI y Bi₁₂O₁₇Cl₂ a las células RAW bajo condiciones de oscuridad entre la fluorescencia y la concentración

Concentración	Nanomaterial	Luz (L)/Oscuridad (O)	P. value
1000-7.8125	BiOI	O	0.0006*
1000-Cr	BiOI	O	0.2530*
2000-7.8125	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	O	0.0238*
1000-Cr	Bi ₁₂ O ₁₇ Cl ₂	O	0.0195*

Nota: * indica diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $\alpha = 0.05$.
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

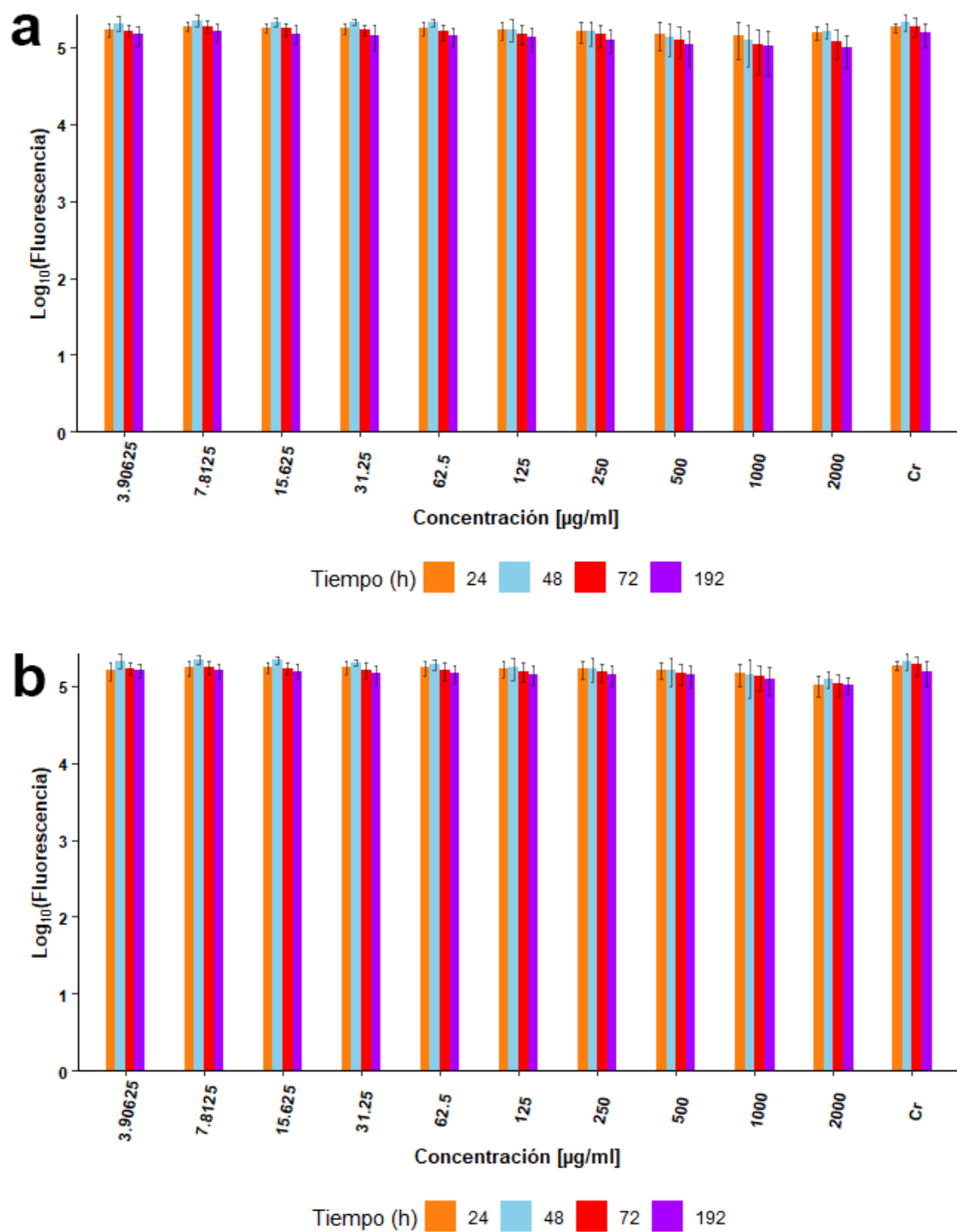


Figura 7. Viabilidad celular relativa medida como intensidad de fluorescencia en RAW 264.7 a diferentes concentraciones de a) BiOI y b) Bi₁₂O₁₇Cl₂ en oscuridad. Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

3.4 Análisis morfológico celular por tinción de Giemsa

Las imágenes de microscopía (40x) muestran los efectos de los BiOX sobre la morfología celular. El grupo control de células HFF sin BiOX en condiciones de oscuridad (Control-O) y expuestas a luz (Control-L) mostraron células alargadas y con forma de estrella, ambas morfologías comunes en fibroblastos (Figura 8). De la misma manera, se verificó que luego de 24 horas de exposición a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI-O (oscuridad) las células aún mantienen la morfología celular alargada [50]. Asimismo, tras 24h se observa que las células tratadas con 1000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI-L fotoactivadas pierden su morfología celular por completo. Esto puede deberse a que los BiOX no producen singletes de oxígeno cuando se incuban en oscuridad [32]. De hecho, se ha reportado que tras el tratamiento de NMs en las células bajo condiciones de oscuridad, se produce una sobreproducción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) [37]. Este estrés oxidativo puede conducir a la muerte celular, ya sea mediante vías de señalización de apoptosis o de necrosis [45].

Además, obsérvese en la Figura 8 que tras 72h de exposición a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2\text{-O}$ en condiciones de oscuridad las células HFF muestran aún una morfología celular alargada. Por el contrario, tras 72 horas de exposición a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI-L fotoactivadas bajo luz visible las células presentan desintegración celular completa (Figura 8). En general, las células tratadas con ambas BiOX tras 72 horas de exposición muestran engrosamiento de la membrana celular, contracción del cuerpo celular y desintegración. Este resultado es consistente con un estudio publicado de Hashemzadeh et al. (2022) donde se ha reportado que las células pueden tolerar una dosis baja de NMs en el tiempo de exposición inicial, pero después de un tiempo más prolongado existen respuestas citotoxicológicas [37].

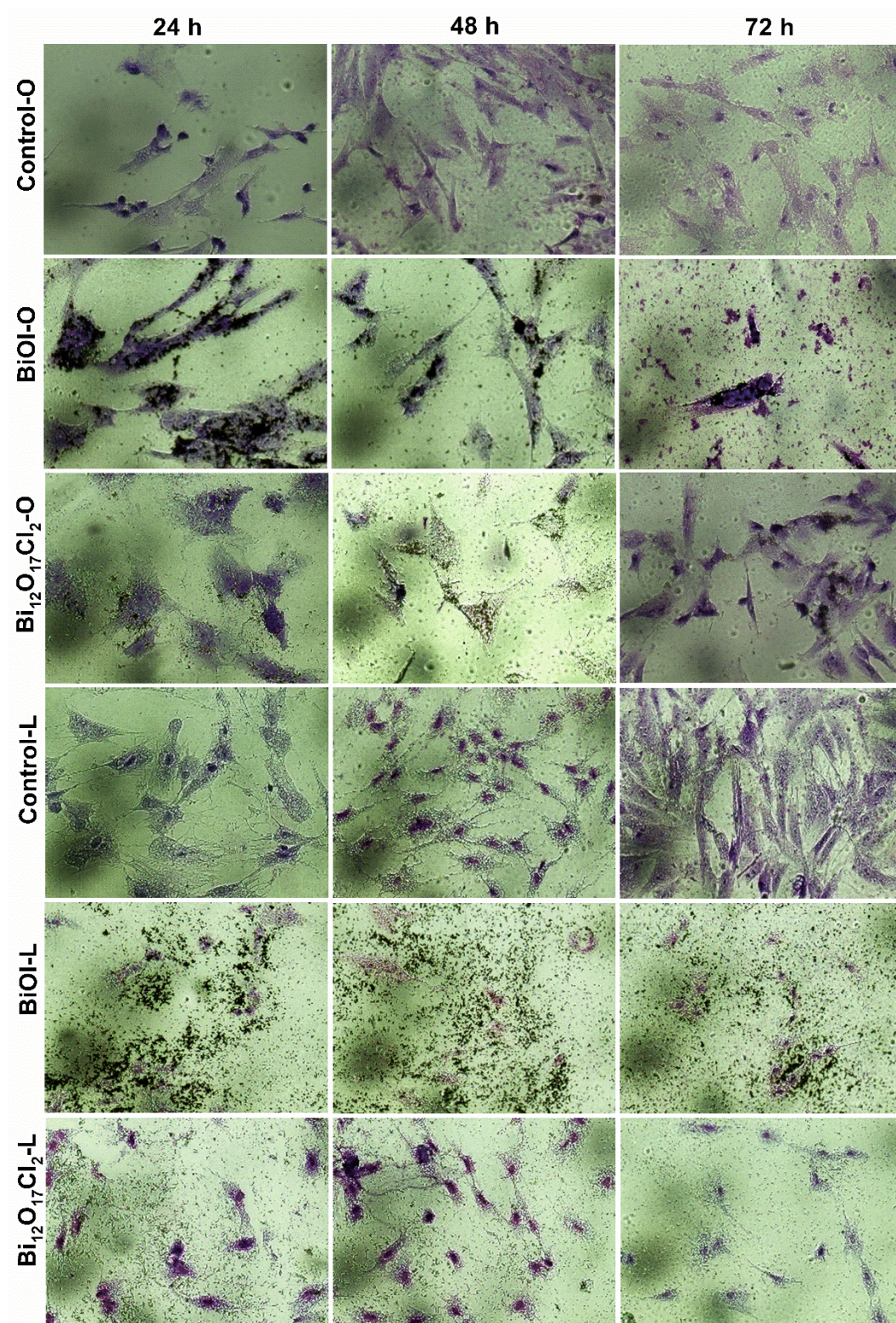


Figura 8. Tinción Giemsa de HFF sin exposición a BiOX en oscuridad (Control-O) y luz (Control-L) y bajo 1000 µg/mL de BiOI y Bi₁₂O₁₇Cl₂ en oscuridad (-O) y luz (-L).

Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

Los cambios morfológicos observados en las células LlcMk2 se muestran en la Figura 9. Las células teñidas con Giemsa muestran una coloración de azul o azul violeta, mientras que el citoplasma se tiñe de rosa [51]. En el presente estudio, los núcleos normales se tiñeron de azul purpura y exhibieron un color uniforme después de la tinción con Giemsa (Figura 9). De hecho, las células sin exposición a BiOX en condiciones de oscuridad (Control-O) y bajo exposición de luz blanca visible (Control-L) mantuvieron su forma celular en forma de estrella y crecimiento continuo a lo largo del tiempo.

El ensayo morfológico muestra que ambas BiOX indujeron a diferentes cambios estructurales. Además, en este estudio se observó aglomeración de ambas BiOX alrededor de las células LlcMk2 expuestas a 1,000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI-O y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2\text{-O}$. Tuba et al. (2022) sugiere que la aglomeración de BiOX ocurre por la gran área superficial. Una mayor área superficial conlleva a un incremento en la producción de ROS y por tanto a una mayor respuesta citotóxica [8]. Esto se verificó a través de los cambios en la morfología celular de una forma estrellada a una forma redondeada bajo exposición de ambas BiOX (Figura 9). De hecho, luego de 72 horas de exposición a $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2\text{-L}$ en condiciones de luz no se observó células viables.

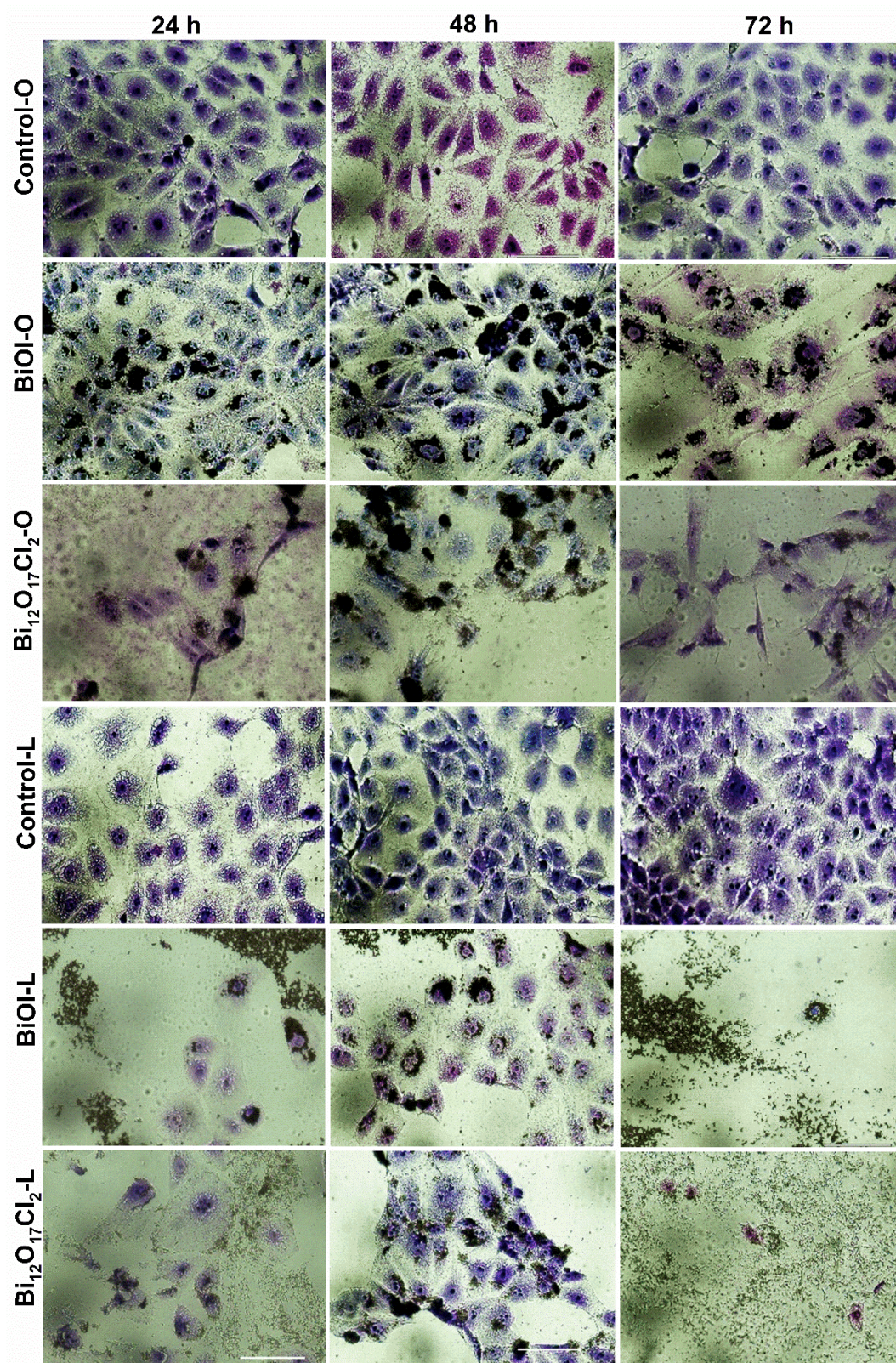


Figura 9. Tinción Giemsa LlcMk2 sin exposición a BiOX en oscuridad (Control-O) y luz (Control-L) y bajo 1000 µg/mL de BiOI y Bi₁₂O₁₇Cl₂ en oscuridad (-O) y luz (-L)
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

El análisis morfológico mediante tinción Giemsa de las células RAW 264.7 incubadas en condiciones de oscuridad (Control-O) y expuestas a cuatro horas de luz blanca visible (Control-L) sin exposición a BiOX, tenían predominante márgenes celulares redondos regulares y núcleos grandes, usual en macrófagos (Figura 10). Asimismo, luego de 24 horas de exposición a BiOI-O las células aún mantuvieron su forma celular. Por el contrario, tras 24 horas de exposición a $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ -O no se observaron células viables. Por otro lado, en condiciones de luz las células expuestas a BiOI-L perdieron su morfología celular a partir de las primeras 24 horas de exposición. Mientras que después de 24h bajo exposición a $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ -L se observaron células con su morfología celular redondeada usual en RAW 264.7. Sin embargo, con el transcurso del tiempo no se observaron células viables (Figura 10). En resumen, se observaron crecientes cambios morfológicos en presencia de BiOX respecto a los diferentes tiempos de exposición.

Los resultados de tinción Giemsa en células RAW 264.7 muestran que el tamaño y composición entre ambas BiOX no influyó en la toxicidad celular. Esto se correlaciona con los ensayos de viabilidad celular con resazurina muestran solo un 3% de diferencia entre ambas BiOX (Figura 7). El perfil de toxicidad de ambas BiOX es similar, los resultados de la Figura 10 muestran que tras 48 y 72 horas de exposición a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ no se observan células viables. La disminución en la tasa de supervivencia celular puede deberse a la inhibición de la proliferación y/o muerte celular [43,52]. Nuestros resultados muestran que la toxicidad entre HFF, LcMk2 y RAW 264.7 bajo la exposición de BiOX: BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ difieren respecto a la línea celular [50]. Otros estudios también informaron los mismos resultados [23,42]. Además, ensayos de toxicidad en diferentes NMs afirmaron que la variabilidad de la nanotoxicidad entre tipos de células contribuye a la función fisiológica, que es diferente y está relacionada con los tipos de células [42,52].

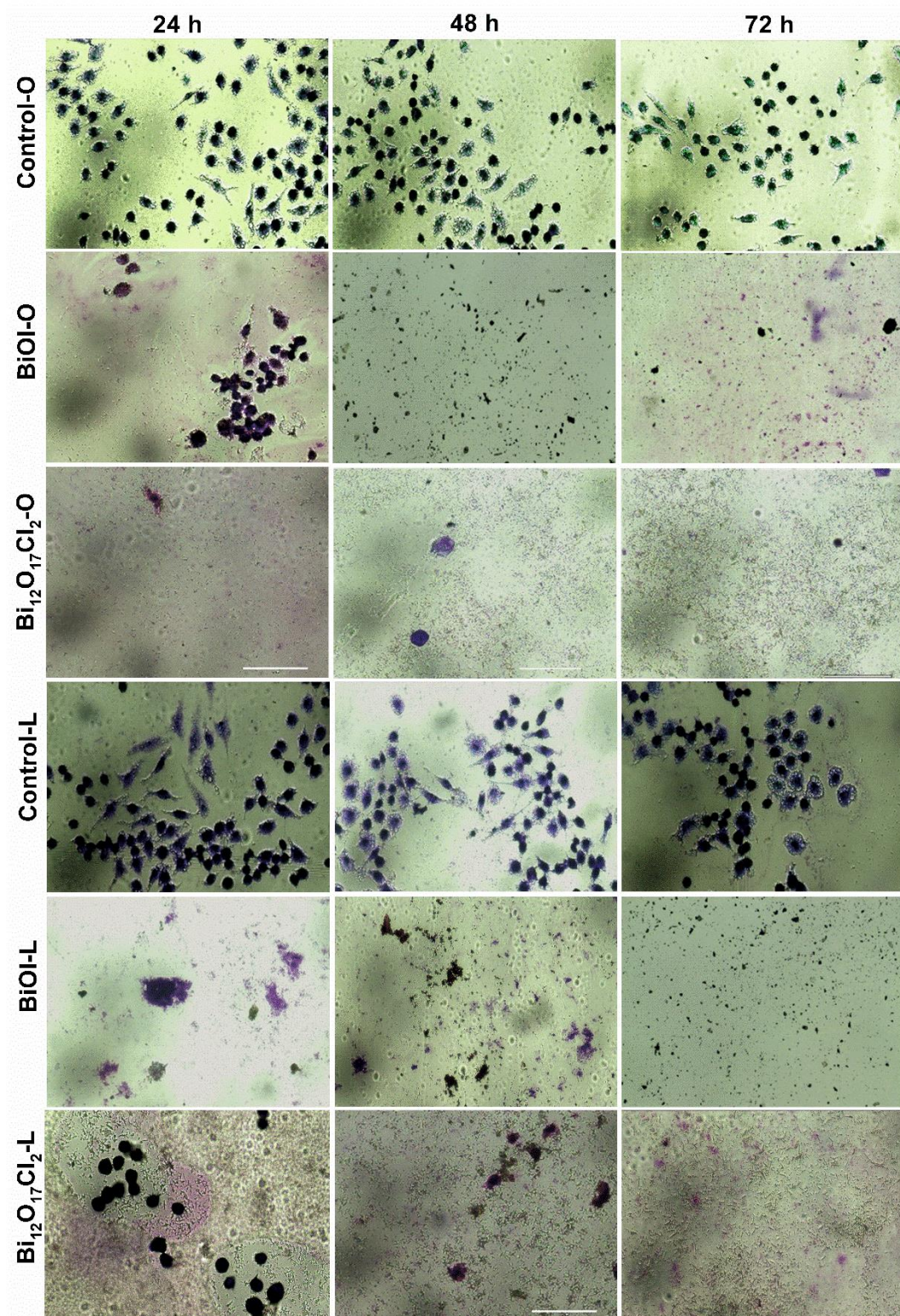


Figura 10. Tinción Giemsa RAW 264.7 sin BiOX en oscuridad (Control-O) y luz (Control-L) y bajo 1000 µg/mL de BiOI y Bi₁₂O₁₇Cl₂ -O en oscuridad (-O) y luz (-L).
Realizado por: Bonilla, Marjorie, 2023.

4. CONCLUSIONES

En conclusión, este trabajo evalúa la toxicidad de dos tipos de micro/nano estructuras BiOX de diferentes formas, tamaño y composición. En este estudio se calculó un grado de hemólisis por debajo del 5% por lo que se concluye que ambas BiOX incluso a altas concentraciones no son tóxicas para los eritrocitos. Además, se comprobó que el perfil de citotoxicidad entre BiOX era similar, pues no variaba más del 10% frente a los tres tipos de líneas celulares utilizadas. Los resultados de citotoxicidad demostraron que las microesferas de BiOI y los nanocinturones de $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ no son tóxicas para las células HFF y LlcMK2. Sin embargo, los ensayos de resazurina y Giemsa mostraron que ambas BiOX tienen efectos citotóxicos en células RAW 264.7. Por lo tanto, estos resultados señalan que la citotoxicidad de los BiOX depende en gran medida de la línea celular expuesta y no únicamente de la forma y tamaño de la micro/nano estructura.

Asimismo, se verificó una relación tiempo-respuesta. El tiempo de exposición a BiOI y $\text{Bi}_{12}\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ juega un papel fundamental en la citotoxicidad. Estos resultados se corroboraron mediante diferentes análisis estadísticos que comprobaron la existencia de diferencias significativas entre las medias de la intensidad de fluorescencia y el tiempo, para cada línea celular.

Las pruebas nanotoxicológicas dependen de una gran variedad de análisis *in vitro* e *in vivo*. Además, varios estudios mencionan la importancia de la caracterización físico-química del nanomaterial antes de las pruebas toxicológicas. Por consiguiente, es indispensable realizar más investigaciones de citotoxicidad celular y moleculares bajo diferentes parámetros como: tiempo de exposición, línea celular, concentración, composición, tamaño, forma, para mejorar la comprensión de los mecanismos involucrados en la toxicidad de estos nanomateriales y así asegurar su aplicación práctica como materiales útiles para resolver problemas de contaminación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kataria N, Bhushan D, Gupta R, Rajendran S, Teo MYM, Khoo KS. Current progress in treatment technologies for plastic waste (bisphenol A) in aquatic environment: Occurrence, toxicity and remediation mechanisms. *Environmental Pollution*. 2022;315: 120319. doi:10.1016/J.ENVPOL.2022.120319
2. Kasonga TK, Coetzee MAA, Kamika I, Ngole-Jeme VM, Benteke Momba MN. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. *J Environ Manage*. 2021;277: 111485. doi:10.1016/J.JENVMAN.2020.111485
3. Deblonde T, Cossu-Leguille C, Hartemann P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214: 442–448. doi:10.1016/J.IJHEH.2011.08.002
4. Ye L. BiOX (X = Cl, Br, and I) Photocatalysts. *Semiconductor Photocatalysis - Materials, Mechanisms and Applications*. 2016 [cited 28 Mar 2023]. doi:10.5772/62626
5. Ameta R, Solanki MS, Benjamin S, Ameta SC. Photocatalysis. *Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Emerging Green Chemical Technology*. 2018; 135–175. doi:10.1016/B978-0-12-810499-6.00006-1
6. Gondal MA, Xiaofeng C, Dastageer MA. Band structure, band energy, and density of states. *Advanced Structured Materials*. 2017;76: 29–31. doi:10.1007/978-81-322-3739-6_3/COVER
7. Suarez-Chamba M, Tuba-Guamán D, Quishpe M, Vizuete K, Debut A, Herrera-Robledo M. Photocatalytic degradation of bisphenol A on BiOI nanostructured films under visible LED light irradiation. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2022;431: 114021. doi:10.1016/j.jphotochem.2022.114021
8. Tuba-Guaman D, Suarez-Chamba M, Quishpe-Quishpe L, Reinoso C, Santacruz CP, Herrera-Robledo M, et al. Photodegradation of Rhodamine B and Bisphenol A Over Visible-Light Driven Bi7O9I3-and Bi12O17Cl2-Photocatalysts Under White LED Irradiation. *Top Catal*. 2022;65: 1028–1044. doi:10.1007/S11244-022-01689-0/TABLES/3
9. Forbe T, García M, Gonzalez E. Potencial risks of nanoparticles Riscos potenciais do nanopartículas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2011;31: 835–842.
10. Kakoty V, Sarathlal KC, Pandey M, Taliyan R, Dubey SK, Kesharwani P. Biological toxicity of nanoparticles. *Nanoparticle Therapeutics: Production Technologies, Types of Nanoparticles, and Regulatory Aspects*. 2022; 603–628. doi:10.1016/B978-0-12-820757-4.00016-8
11. Gao X, Wang Y, Peng S, Yue B, Fan C, Chen W, et al. Comparative toxicities of bismuth oxybromide and titanium dioxide exposure on human skin keratinocyte cells. *Chemosphere*. 2015;135: 83–93. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.03.075
12. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87: 245–313. doi:10.1152/PHYSREV.00044.2005
13. Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): Implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11: 777–790. doi:10.1089/ARS.2008.2270
14. Ahamed M, Akhtar MJ, Khan MAM, Alrokayan SA, Alhadlaq HA. Oxidative stress mediated cytotoxicity and apoptosis response of bismuth oxide (Bi2O3) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells. *Chemosphere*. 2019;216: 823–831. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.10.214
15. Chen P, Wang H, He M, Chen B, Yang B, Hu B. Size-dependent cytotoxicity study of ZnO nanoparticles in HepG2 cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;171: 337–346. doi:10.1016/J.ECOENV.2018.12.096
16. Woźniak A, Malankowska A, Nowaczyk G, Grześkowiak BF, Tuśnio K, Słomski R, et al. Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2017;28. doi:10.1007/S10856-017-5902-Y
17. Braakhuis HM, Gosens I, Krystek P, Boere JAF, Cassee FR, Fokkens PHB, et al. Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11. doi:10.1186/S12989-014-0049-1
18. Cho YM, Mizuta Y, Akagi JI, Toyoda T, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol*. 2018;31: 73–80. doi:10.1293/TOX.2017-0043
19. Kong B, Seog JH, Graham LM, Lee SB. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011;6: 929–941. doi:10.2217/NNM.11.77
20. Rana A, Yadav K, Jagadevan S. A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *J Clean Prod*. 2020;272. doi:10.1016/J.JCLEPRO.2020.122880

21. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 2008;4: 26–49. doi:10.1002/SMLL.200700595
22. Tasso M, Amparo M, Huvelle L, Diaz Bessone I, Picco AS. Toxicity Assessment of Nanomaterials. 2020; 383–446. doi:10.1007/978-3-030-39923-8_13
23. Abudayyak M, Öztaş E, Arici M, Özhan G. Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines. *Chemosphere*. 2017;169: 117–123. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.11.018
24. Liu Y, Zhu S, Gu Z, Chen C, Zhao Y. Toxicity of manufactured nanomaterials. *Particuology*. 2022;69: 31–48. doi:10.1016/J.PARTIC.2021.11.007
25. Mu Q, Hondow NS, Krzemiński Ł, Brown AP, Jeuken LJC, Routledge MN. Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9. doi:10.1186/1743-8977-9-29
26. Zook JM, MacCuspie RI, Locascio LE, Halter MD, Elliott JT. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology*. 2011;5: 517–530. doi:10.3109/17435390.2010.536615
27. Chen LQ, Fang L, Ling J, Ding CZ, Kang B, Huang CZ. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chem Res Toxicol*. 2015;28: 501–509. doi:10.1021/TX500479M/ASSET/IMAGES/MEDIUM/TX-2014-00479M_0009.GIF
28. Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, et al. Single-walled carbon nanotubes: Geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*. 2007;70: 2071–2079. doi:10.1080/15287390701601251
29. Cao Y. The toxicity of nanoparticles to human endothelial cells. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1048: 59–69. doi:10.1007/978-3-319-72041-8_4
30. Maramorosch Karl, Koprowski Hilary. *Methods in virology*. : 396.
31. Dobrovolskaia MA, Clogston JD, Neun BW, Hall JB, Patri AK, McNeil SE. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Lett*. 2008;8: 2180–2187. doi:10.1021/NL0805615/SUPPL_FILE/NL0805615-FILE003.PDF
32. Zhang Y, Chen W, Wang S, Liu Y, Pope C. Phototoxicity of zinc oxide nanoparticle conjugates in human ovarian cancer NIH: OVCAR-3 cells. *J Biomed Nanotechnol*. 2008;4: 432–438. doi:10.1166/JBN.2008.006
33. Ghosh M, Chakraborty A, Mukherjee A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*. 2013;33: 1097–1110. doi:10.1002/JAT.2863
34. Mello DF, Trevisan R, Rivera N, Geitner NK, Di Giulio RT, Wiesner MR, et al. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. *Chem Biol Interact*. 2020;315: 108868. doi:10.1016/J.CBI.2019.108868
35. Böhmert L, Niemann B, Thünemann AF, Lampen A. Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Arch Toxicol*. 2012;86: 1107–1115. doi:10.1007/S00204-012-0840-4/METRICS
36. Gao X, Zhang X, Wang Y, Wang Y, Peng S, Fan C. An in vitro study on the cytotoxicity of bismuth oxychloride nanosheets in human HaCaT keratinocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;80: 52–61. doi:10.1016/J.FCT.2015.02.018
37. Hashemzadeh H, Kelkawi AHA, Allahverdi A, Rothbauer M, Ertl P, Naderi-Manesh H. Fingerprinting Metabolic Activity and Tissue Integrity of 3D Lung Cancer Spheroids under Gold Nanowire Treatment. *Cells* 2022, Vol 11, Page 478. 2022;11: 478. doi:10.3390/CELLS11030478
38. Wang C, Hu X, Gao Y, Ji Y. ZnO nanoparticles treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in LTP-a-2 cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/423287
39. Bakand S, Hayes A, Routledge M, Yan B. Molecular Sciences Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. doi:10.3390/ijms17060929
40. Yang Y, Du X, Wang Q, Liu J, Zhang E, Sai L, et al. Mechanism of cell death induced by silica nanoparticles in hepatocyte cells is by apoptosis. *Int J Mol Med*. 2019;44: 903–912. doi:10.3892/IJMM.2019.4265/HTML
41. Pereira SPP, Boyle D, Nogueira AJA, Handy RD. Comparison of toxicity of silver nanomaterials and silver nitrate on developing zebrafish embryos: Bioavailability, osmoregulatory and oxidative stress. *Chemosphere*. 2023;336: 139236. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139236
42. Kim IY, Joachim E, Choi H, Kim K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine*. 2015;11: 1407–1416. doi:10.1016/J.NANO.2015.03.004
43. Awashra M, Mlynarz P. The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an in vitro metabolomic perspective. *Nanoscale Adv*. 2023;5: 2674–2723. doi:10.1039/D2NA00534D
44. Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J*. 2016;20: 1. doi:10.7508/IBJ.2016.01.001

45. Wang C, Hu X, Gao Y, Ji Y. ZnO nanoparticles treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in LTP-a-2 cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/423287
46. Chueh PJ, Liang RY, Lee YH, Zeng ZM, Chuang SM. Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *J Hazard Mater*. 2014;264: 303–312. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2013.11.031
47. Badrigilan S, Heydarpanahi F, Choupani J, Jaymand M, Samadian H, Hoseini-Ghahfarokhi M, et al. A Review on the Biodistribution, Pharmacokinetics and Toxicity of Bismuth-Based Nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2020;15: 7079. doi:10.2147/IJN.S250001
48. Waters KM, Masiello LM, Zangar RC, Tarasevich BJ, Karin NJ, Quesenberry RD, et al. Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. *Toxicological Sciences*. 2009;107: 553–569. doi:10.1093/TOXSCI/KFN250
49. Ganguly P, Breen A, Pillai SC. Toxicity of Nanomaterials: Exposure, Pathways, Assessment, and Recent Advances. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4: 2237–2275. doi:10.1021/ACSBOMATERIALS.8B00068/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AB-2018-000688_0032.GIF
50. Luo C, Li Y, Yang L, Zheng Y, Long J, Jia J, et al. Activation of ERK and P53 regulates copper oxide nanoparticle-induced cytotoxicity in keratinocytes and fibroblasts. *Int J Nanomedicine*. 2014;9: 4763–4772. doi:10.2147/IJN.S67688
51. Yang Y, Du X, Wang Q, Liu J, Zhang E, Sai L, et al. Mechanism of cell death induced by silica nanoparticles in hepatocyte cells is by apoptosis. *Int J Mol Med*. 2019;44: 903–912. doi:10.3892/IJMM.2019.4265/HTML
52. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *J Nanobiotechnology*. 2014;12. doi:10.1186/1477-3155-12-5