

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos

Informe Final
Documento I

**Determinación del efecto de diferentes nanopartículas
sobre la producción de brotes en células de hoja y callo
de *Uncaria tomentosa*.**

Centro de Investigación en Biotecnología
Escuela de Biología

Enero 2012 a Diciembre 2012

Contenido

Investigadores participantes:.....	4
Agradecimiento:.....	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
Antecedentes:.....	6
Definición del problema.....	7
OBJETIVOS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
REVISIÓN DE LITERATURA	9
Nanotecnología y Bionanotecnología	9
Bionanotecnología vegetal.....	10
- Penetración y transporte de nanopartículas en plantas.....	10
- Influencia de nanopartículas de Dióxido de titanio (TiO ₂ NP's) en la fotosíntesis de <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
- Síntesis de nanopartículas.....	12
- Toxicidad en plantas.....	12
Síntesis de nanopartículas.....	13
- Nanopartículas de Plata.....	13
- Nanopartículas de Oro.....	14
- Nanopartículas de cobre.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Síntesis de nanopartículas.....	16
Inducción a brotación.....	16
Efecto elicitor de las nanopartículas de plata.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
Obtención y caracterización de Nanopartículas	19
- Nanopartículas de Plata	19
- Nanopartículas de Oro	23
- Nanopartículas de Cobre.....	24

Inducción a brotación a partir de callo y segmentos de hoja	25
.....	26
Inducción a brotación a partir de hipocótilo.....	28
Observaciones al microscopio electrónico.....	30
Efecto elicitor de las nanopartículas de plata en suspensiones celulares de <i>U. tomentosa</i>	32
- Mitrafilina: 74.66277 ng/ul	34
- Isomitrafilina: 166.88923 ng/ul.....	34
- Uncarina C: 810.30390 ng/ul.....	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
APORTES Y ALCANCES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
Anexos.....	39

Determinación del efecto de diferentes nanopartículas sobre la producción de brotes en células de hoja y callo de *Uncaria tomentosa*.

Investigadores participantes:

M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo
MGA. Ricardo Coy
MBA. Karla Valerín Berrocal

salvarenga@itcr.ac.cr
rcoy@itcr.ac.cr
kvalerin@itcr.ac.cr

Coordinadora

Estudiantes participantes:

Naizmi Valverde

Agradecimiento:

Agradecemos la colaboración del Master Juan Scott Chaves y la Dra. Paola Vega del Programa de Nanotecnología del ITCR, y a su asistente Pamela Zúñiga.

RESUMEN

Mediante el cultivo de tejidos vegetales se podrían obtener brotes de *U. tomentosa* con el fin de generar una población de individuos con características deseables. Sin embargo, todavía no ha sido posible regenerar individuos a partir de explantes *in vitro*. El uso de nanopartículas, podría ejercer algún efecto sobre tejido vegetal cultivado *in vitro*. El objetivo de esta actividad de fortalecimiento fue determinar el efecto de nanopartículas de plata, oro y cobre sobre la producción de brotes en callo y segmentos de hoja de *Uncaria tomentosa*. Para lo cual se sintetizaron nanopartículas de plata, oro y cobre mediante el método de Creighton. Las soluciones obtenidas fueron analizadas mediante espectrofotometría para verificar si la absorbancia correspondía con lo reportado en la literatura para estas soluciones. Además, se analizaron en el Microscopio Electrónico de Transferencia, y se determinó que las AgNP's tenían un tamaño entre 7 y 8 nm. No se obtuvo brotación con las concentraciones probadas en explantes de hoja y callo, sin embargo, al usar hipocótilo como explante se obtuvo lo que parecían ser embriones somáticos. Sin embargo, esto no se pudo verificar ya que los mismo se oxidaron antes de poder ser analizados mediante microscopia electrónica.

Palabras clave: Nanopartículas, Bionanotecnología, Brotación, *Uncaria tomentosa*

INTRODUCCIÓN

Antecedentes:

El Instituto Tecnológico de Costa Rica a través del Centro de Investigación en Biotecnología ha desarrollado varias investigaciones enfocadas en la reproducción *in vitro*, así como inducción de calogénesis establecimiento de suspensiones celulares de *Uncaria tomentosa*, (Sánchez y Alvarenga) para la obtención de metabolitos secundarios, escalamiento en biorreactor y más recientemente estudios a nivel genético para identificar genes de interés (Alvarenga, *et al*, 2012). Estas investigaciones son importantes para la obtención de poblaciones con características fenotípicas uniformes, lo que se puede lograr mediante la micropropagación *in vitro*, o para la producción de metabolitos secundarios de interés sin necesidad de establecer plantaciones en campo. La importancia de los estudios a nivel genético radica en poder identificar genes de interés que participen en la producción de metabolitos secundarios, una vez identificados estos genes y seleccionado los individuos deseados con base a esta información, se hace necesaria la disponibilidad de un protocolo que permita la obtención de individuos genéticamente idénticos, esto a través de reproducción asexual *in vitro*, donde se asegura que la progenie es idéntica a la planta que le dio origen.

Por otro lado, con el surgimiento de la nanotecnología se han abierto una serie de posibilidades con respecto a lo que se puede hacer para potencializar tecnologías existentes, como la Biotecnología. La Nanotecnología se refiere al diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos que tienen su organización funcional en la escala de los nanómetros (nm), en un rango que puede variar desde pocos nanómetros hasta los 100 nm. (Reisner, 2008).

La combinación de la Biotecnología con la nanotecnología se ha denominado Bionanotecnología. Que consiste básicamente en aplicar todas las técnicas, nanomateriales y demás que ofrece la nanotecnología y potencializar con ello los alcances de la Biotecnología.

Los investigadores del ITCR cuentan con gran experiencia en el estudio y cultivo de *U. tomentosa*, debido a que han venido estudiando esta especie desde hace más de diez años, tiempo en el que además de los protocolos antes mencionados, también se ha logrado establecer relaciones con otras instituciones dedicadas al estudio de esta especie

tanto nacionales, como el CENIBiot (Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas) y en el extranjero, como lo es el CEPROBI (Centro de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (México).

Definición del problema.

Con todo este panorama, y ante la necesidad de contar con un protocolo que permita la obtención de individuos con características deseables y genéticamente idénticas, surge la opción de utilizar nanopartículas con el fin de determinar si este tipo de materiales podría favorecer la obtención de brotes a partir de hojas y callos, ya que, a pesar de las investigaciones sobre propagación *in vitro* de *Uncaria tomentosa* realizadas en el ITCR, no se cuenta con un protocolo que permita la obtención de individuos a partir organogénesis indirecta, (Alvarenga, 2011).

Con esta actividad de fortalecimiento se pretendía determinar si las nanopartículas tenían alguna influencia en células de callo y en segmentos de hoja para la inducción de organogénesis indirecta y la posterior obtención de brotes. La información generada podría complementarse con investigaciones previas realizadas en el ITCR sobre producción de callos y cultivo *in vitro*.

Se seleccionaron nanopartículas de plata ya que se ha reportado que el Nitrato de plata favorece la regeneración en café, otra especie de la familia Rubiaceae, familia a la cual pertenece *U. tomentosa*. Se han obtenido embriones somáticos en *Coffea canephora* a partir de explantes de semilla germinada, específicamente del hipocótilo al cultivarlos en medio M&S (1962) suplementado con 2,85 μM de ácido indolacético (AIA), 8,87 μM de Benciladenina (BA) y 40 μM de Nitrato de plata (AgNO_3). Además, obtuvieron brotes por organogénesis directa específicamente en la región de corte del explante utilizando la misma composición de medio, (Sridevi, *et al*, 2010). Al ser especies relacionadas por pertenecer a la misma familia, se genera la inquietud de si este compuesto en su forma de nanopartícula podría tener efectos positivos sobre la generación de brotes en *U. tomentosa*.

Se ha observado que algunos materiales en su forma de nanopartícula son más efectivos que como micropartículas esto debido a que se incrementa la relación superficie/volumen,

(Samrat *et al*, 2011), partiendo de esta premisa podría esperarse un incremento en la actividad de la plata, por lo que existe la posibilidad de que si se agrega al medio de cultivo en su forma de nanopartícula pueda tener algún efecto positivo en la generación de brotes en *U. tomentosa*.

Al lograr obtener individuos por medio de brotación *in vitro*, se podría contar con una población cuya producción de compuestos y características deseables sea uniforme en todos los individuos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de nanopartículas de plata, oro y cobre sobre la producción de brotes en callo y segmentos de hoja de *Uncaria tomentosa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir el tamaño adecuado que debe tener la nanopartícula utilizada para que se produzca efecto sobre el tejido e induzca a la regeneración o producción de brotes.
2. Probar diferentes concentraciones de nanopartículas en el medio, para determinar la más adecuada para la producción de brotes.
3. Determinar si hay diferencia significativa entre el uso de nanopartículas de plata, oro o cobre.
4. Evaluar la viabilidad de los brotes generados, mediante subcultivos de los mismos.
5. Realizar pruebas preliminares para verificar la influencia de nanopartículas en la producción de metabolitos secundarios de *U. tomentosa*

REVISIÓN DE LITERATURA

Nanotecnología y Bionanotecnología

Vega (2007) define nanotecnología como “el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia, sus propiedades y la explotación de fenómenos dentro de la nanoescala. El término “nanotecnología” es empleado para definir las ciencias y técnicas que se aplican a nivel de nanoescala, y permiten trabajar las estructuras moleculares y sus átomos, lo cual da la posibilidad de fabricar materiales y máquinas a partir del reordenamiento de átomos y moléculas”. También, se define nanotecnología como la manipulación de la materia a la escala de moléculas y átomos (en mil millonésimas de metro), esto debido a que la materia muestra en la nanoescala, propiedades totalmente distintas a las que presenta en su dimensión macro, (Delgado, 2007).

La aplicación de la nanotecnología se ha centrado principalmente en la producción de materiales para la industria, la medicina o cosmetología; de manera que ahora muchos de los productos comerciales tienen como base el uso de nanopartículas. En las áreas agrícola y ambiental, la implementación de estas tecnologías no ha sido tan rápida, debido, aparentemente, a la baja tasa de retorno de la inversión, pero constituyen áreas muy prometedoras, (Carrillo y González, 2009). Sin embargo, los estudios y avances en nanotecnología son constantes y de acuerdo al comportamiento normal que tiene la tecnología, podría llegar el momento en que los costos sean menores.

La Biotecnología, se basa en el uso organismos vivos o sus partes para obtener productos y beneficios para el hombre. Integra el uso de la bioquímica, la microbiología, biología celular y molecular, genética, entre otras, para obtener productos que puedan ser aplicados en la industria, la agricultura, la medicina, etc. (Smith, 2004). Este concepto engloba una serie de campos en los que se puede desarrollo, desde microorganismos, plantas, animales salud, entre otros y en todos ellos podría caber la aplicación de la nanotecnología.

Bionanotecnología vegetal.

Se han realizado varias investigaciones en el campo de la bionanotecnología, sin embargo, muchas están dirigidas a la biomedicina y al trabajo con microorganismos. En la literatura es poca la investigación que se encuentra documentada a nivel vegetal o agrícola, esto no quiere decir que no se realice.

A continuación se resumen algunas investigaciones realizadas en este campo:

- Penetración y transporte de nanopartículas en plantas.

La posibilidad de orientar el movimiento de las nanopartículas a sitios específicos de un organismo podría permitir el uso de la bionanotecnología en el tratamiento de enfermedades de plantas que afectan una parte o partes específicas de la misma. Investigadores de la Universidad Estatal de Iowa utilizaron nanopartículas de sílica mesoporoso (MSN) para introducir ADN y químicos en protoplastos vegetales y hojas completas, las MSN's son coberturas químicas que podrían servir como contenedores para introducir genes dentro de las plantas. Investigadores de la Universidad de Purdue, han desarrollado un nanosensor que reacciona con la auxina (hormona relacionada con la elongación de la raíz), estas interacciones generan señales eléctricas que se utilizan para medir la concentración de la auxina en diferentes puntos y determina si la auxina se absorbe o se libera. Este dispositivo ayudará a los científicos a entender como las plantas se adaptan a su ambiente, especialmente en suelos con condiciones extremas, (Torney *et al.*, 2007).

A pesar de este avance, el suministro de nanopartículas en los tejidos de la planta se había limitado a métodos que implican bombardeo, lo que no permite la aplicación masiva de partículas en un gran número de plantas, siendo por tanto de poco uso para fines agronómicos. (Corredor, et al. 2009)

Sin embargo, se han realizado otras investigaciones en las que se está explorando formas de aplicar las nanopartículas que sean más adecuadas para el uso en agricultura. Se hizo un estudio para analizar la penetración y el movimiento de las nanopartículas en las células vegetales, y la posibilidad de concentrarlas y retenerlas en partes específicas de la planta utilizando dispositivos magnéticos, para lo que se

trabajó con nanopartículas de hierro recubiertas de carbono. Los resultados obtenidos mostraron que cuando las nanopartículas se administraron a plantas de calabaza por inyección, estas se desplazaron lejos de la zona de aplicación y se encontraron en el citoplasma de células localizadas cerca del lugar donde se colocaron los dispositivos magnéticos. Se hicieron pruebas rociando nanopartículas en zonas focalizadas de la planta, se observó que no había desplazamiento, por el contrario se encontraron en las células de la epidermis muy cercanas a la zona de aplicación. Además, se pudo observar que en las células en que se apreciaban agregados de nanopartículas, había mayor densidad de organelas de almacenamiento de almidón, lo que hace pensar que es algún tipo de respuesta de las células a la exposición de las nanopartículas. Se encontraron también nanopartículas en la superficie externa de la planta, tanto dentro como fuera de los tricomas, lo que hace suponer que una parte de las nanopartículas fue expulsada. (Corredor, *et al.* 2009) Este estudio podría utilizarse como base para explorar la posibilidad de utilizar nanomateriales en la agricultura para el control de fitopatógenos, de modo que se puedan aplicar y dirigir a zonas específicas de las plantas afectadas por la enfermedad, trabajando de forma focalizada, limitando el desperdicio y uso excesivo de agroquímicos.

Estos mismos investigadores realizaron un estudio posterior en el que probaban la absorción de nanopartículas a través de las raíces en diferentes especies de plantas y como estas eran transportadas a las partes aéreas, en algunos casos hasta los tricomas, indicando una forma de excretar el exceso. (Cifuentes, 2010)

- Influencia de nanopartículas de Dióxido de titanio (TiO₂NP's) en la fotosíntesis de *Arabidopsis thaliana*.

Este estudio, pretendía determinar el mecanismo por el cual las TiO₂NP's podían favorecer la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas. Se utilizó como modelo *Arabidopsis thaliana* creciendo bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Cuando las plántulas tuvieron 2 hojas, se roció un grupo con una solución de 0,25% de TiO₂NP, otro grupo fue rociado con 0,25% de TiO₂ (no-nano) y un tercer grupo con agua destilada (control). Se cuantificó la expresión del **complejo proteico captador de luz** (LHCII-b) utilizando PCR Tiempo Real y se estudió el mecanismo de absorción de la luz y la transferencia de los cloroplastos. Los resultados mostraron

que las nanopartículas de TiO_2 podría inducir un aumento significativo de la expresión de genes que codifican para el complejo LCHII. En el caso en que se usó TiO_2 el incremento no fue tan elevado. Se cree que las nanopartículas podrían acelerar la velocidad de transporte de electrones de la cadena entera. Se concluyó que las TiO_2NPs podría promover la absorción de la luz de cloroplasto, regular la distribución de energía de la luz de Fotosistema I del Fotosistema II al aumentar la cantidad de LHCII y acelerar la transformación de la energía luminosa en energía electrónica, la fotólisis del agua y la producción de oxígeno. La mejora en la fotosíntesis y en consecuencia un mejor crecimiento de las plantas mediante el uso de TiO_2NP plantea la posibilidad de utilizar este nanomaterial como fertilizante a futuro, (Ze, *et al.* 2010).

- Síntesis de nanopartículas

Otros estudios se han enfocado en el uso de plantas para la síntesis de nanopartículas. Como la investigación en la que se pusieron a crecer plantas de alfalfa en un ambiente rico en AuCl_4 . La absorción de Au metálico por las plantas fue confirmada mediante estudios de absorción de rayos X y observaciones al Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM). Con estos resultados se confirmó la nucleación y crecimiento de nanopartículas de oro en estado cristalino dentro de la planta. Las imágenes también revelaron defectos como 2 nanopartículas en una misma estructura cristalina y en algunos casos se encontraron nanopartículas icosaédricas. Se confirmó que las nanopartículas eran de oro puro. Este estudio abre una nueva opción en la fabricación de nanopartículas. (Gardea *et al.*, 2002)

- Toxicidad en plantas.

Se usaron nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) en suspensiones celulares de arroz (*Oryza sativa* L.). El grupo A se trató con 0,05 g/l de MWCNT's y al grupo B con 0,1 g/l de MWCNT's, el grupo C funcionó como control. En un Microscopio Electrónico, se observó la acumulación de MWCNT's alrededor de grupos de células, además, notaron que la densidad celular disminuía con el aumento en la concentración de los nanotubos de carbono. A partir de estos resultados, se concluyó

que estas podían ser respuestas de auto-defensa de las células de arroz cultivadas *in vitro*, (Tan y Fugetsu, 2007).

Por otro lado, en el mismo estudio sobre transporte de nanopartículas en platas de calabaza, se analizó el efecto que podrían tener las nanopartículas en el crecimiento normal de las plantas, por lo que se pusieron a crecer bajo condiciones controladas hasta la etapa de floración junto con plantas que no fueron expuestas a nanopartículas. No se observaron diferencias aparentes entre ambos grupos, todas crecieron igual hasta ser capaces de dar frutos, por lo que se concluyó que no había efecto tóxico que pudiera afectar el crecimiento normal de la planta. Al analizar el tejido al microscopio tampoco se observó daño ni diferencias entre ambos grupos, a excepción de que las células que contenían agregados de nanopartículas presentaban citoplasma más denso. (Corredor, *et al.* 2009)

Síntesis de nanopartículas

Se han descrito diferentes metodologías para sintetizar nanopartículas, el método utilizado influye en la forma y tamaño de las mismas. En la síntesis de nanopartículas metálicas, se ha dispuesto mucho énfasis en el control de su tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura, puesto que las propiedades intrínsecas de las nanoestructuras metálicas dependen de estas variables, (Sáenz, *et al*, 2011).

En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes: i) precursor metálico; ii) agente reductor; iii) agente estabilizante.

- Nanopartículas de Plata.

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el proceso de crecimiento

requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc.) (Monge, 2009)

Sáenz *et al* (2011), obtuvieron nanopartículas de plata, disolviendo PVP en 100 ml de una solución acuosa 12 mM de AgNO₃. Agitando la mezcla en ultrasonido a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, calentaron a razón de 2 °C/min mantuvieron la mezcla durante 2h a 85 °C. Por este método, obtuvieron nanopartículas de aproximadamente 30 nm de diámetro.

En el método de Lee-Meisel (1982) se emplea AgNO₃ como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor, sin embargo se ha visto que por éste método se obtienen nanopartículas con una distribución amplia de tamaño (polidispersas). Por otro lado también existe el método Creighton que consiste en la reducción de AgNO₃ utilizando NaBH₄ como agente reductor, con éste método se obtienen nanopartículas esféricas de tamaño más uniforme de aproximadamente 10 nm. (Monge, 2009)

Por este método se generan típicamente nanopartículas con un tamaño de 12 ± 2 nm y un plasmón característico alrededor de los 400 nm. Entre mayor sea el tamaño de las nanopartículas, así también lo será la longitud de onda de su máximo de absorción (Alday *et al.*, 2012).

Se debe trabajar a temperatura baja debido a que favorece la formación de nanoesferas, además de que retrasa la descomposición del borohidruro. La agitación de la solución favorece el mezclado de los reactivos, además de impedir la aglomeración de las nanopartículas formadas (Alday *et al.*, 2012). La modificación de los parámetros involucrados en estas reacciones en disolución conduce a un control preciso sobre el tamaño, la forma, la monodispersidad y la superficie de estas nanopartículas (Monge, 2009).

- Nanopartículas de Oro.

En la síntesis de nanopartículas de oro se ha utilizado el método de Turkevich, que consiste en usar HAuCl_4 y citrato de sodio como agente reductor. Este método fue variado por Akbarzadeh y colaboradores (2009), en este caso se calienta 10 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ hasta el punto de ebullición manteniendo en agitación, mientras se agrega 15 mL del agente reductor. Se continúa calentando hasta que el color de la solución cambie a rosado. Para mantener la solución se agrega 3 mL de Polietilenglicol 1000 al 3,3% una vez que esta se encuentre a temperatura ambiente. Por este método se obtuvieron nanopartículas en un rango de 10 a 25 nm.

- Nanopartículas de cobre.

En este caso se toma una alícuota de 100 ml de una solución acuosa de CuSO_4 (2×10^{-4} mol. dm^{-3}), se mantiene en agitación mientras se le agrega 1 ml de NaBH_4 (0.1 mol. dm^{-3}) frío. Previo a esto la solución de CuSO_4 , es tratada con N_2 para eliminar el oxígeno disuelto. La formación de nanopartículas es confirmada por un cambio de la solución de incoloro a amarillo. Además, de análisis con espectrofotómetro en los que la solución da mayor absorbancia en 500 nm y de acuerdo a las observaciones utilizando TEM, se obtienen nanopartículas de tamaños entre 4 a 6 y 9 a 12 nm. (Jana, *et al*, 2000)

METODOLOGÍA

Síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de nanopartículas se utilizó el método de Creighton; que permite obtener nanopartículas de plata de aproximadamente de 10 nm y con una distribución estrecha de tamaños (monodispersas) (Monge, 2009).

Se mezcló una solución acuosa de nitrato de plata con un agente reductor, en este caso el Borohidruro de sodio (NaBH_4 2,00 mM). A 30 mL de NaBH_4 (2,00 mM) en agitación y colocado en baño de hielo, se le agregó gota a gota una solución de 10 mL de AgNO_3 (1,00 mM) durante un lapso de 3 minutos.

La reacción que se da durante este proceso es la siguiente:



El mismo método fue utilizado para la síntesis de nanopartículas de Oro y Cobre. Se usó AuCl y $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ respectivamente.

Las soluciones fueron analizadas con un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis 01Lambda 2S, para obtener la curva de absorbancia. También se analizaron en el Microscopio Electrónico de Transferencia (TEM) para determinar el tamaño de las nanopartículas.

Inducción a brotación

Se probaron varias concentraciones de nanopartículas en medio de cultivo M&S (1962). Debido a que no se tienen referencias de cuál podría ser la concentración inicial, ya que no se ha probado esto antes, se partió de concentraciones de AgNO_3 utilizadas por Sridevi, *et al*, (2010) en café, (4,3 mg/L de plata metálica). Además de la concentración con la que se ha trabajado en el Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR, (7mg/L de AgNO_3)

Como explantes se utilizaron segmentos de hoja y callos generados a partir de hoja. Estos se inocularon inicialmente en un medio M&S suplementado solamente con las nanopartículas de plata, Oro y Cobre en las siguientes concentraciones: 4,3 mg/L, 7 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L y 40 mg/L.

Posteriormente se hizo una prueba adicional utilizando el mismo medio pero además de utilizar las mismas concentraciones de nanopartículas de plata, se suplementó con 2,85 μ M de ácido indolacético (AIA), 8,87 μ M de Benciladenina (BA).

Finalmente, se realizó una prueba adicional, en la que el explante utilizado fue hipocótilo, obtenido a partir de semillas de *U. tomentosa* germinadas *in vitro*.

Efecto elicitor de las nanopartículas de plata.

Se utilizaron nanopartículas de plata en suspensiones celulares de *U. tomentosa*, para determinar si estas funcionaban como elicitores, produciendo estrés en las células lo que podría generar un incremento en la producción de metabolitos secundarios. Para esto se cultivaron suspensiones celulares al 30% en medio M&S (1962) líquido complementado con 1 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de AIB y 30 g de sacarosa. Las suspensiones fueron colocadas en Erlenmeyer y puestos en agitación.

Se prepararon 24 erlenmeyer con suspensiones celulares, numerados del 1 al 24. El primer día se inocularon los numerados del 1 al 6 con 4,3 mg/L de nanopartículas de plata, al tercer día se inocularon los numerados del 7 al 12 y finalmente el séptimo día se inocularon los numerados del 13 al 18. Mientras que los numerados del 19 al 24 se dejaron sin inocular para que sirvieran como control. Se tomaron 500 μ l como muestra de todas las suspensiones para ser analizadas y determinar la producción de metabolitos secundarios.

Las muestras debían ser analizadas mediante HPLC, sin embargo, el protocolo de extracción y análisis no se ha podido estandarizar, por lo que las pruebas realizadas no han dado resultado, impidiendo obtener mediciones con las muestras analizadas hasta ahora, razón por la cual se tomó la decisión de hacer los análisis mediante la técnica de TLC de cromatografía, para lo cual se preparó una muestra a partir de hojas juveniles tomadas de plantas de invernadero, que sería utilizada como control positivo.

Se maceró 1 gramo de hojas frescas con nitrógeno líquido, al macerado se le agregó 1 ml de solución de amonio al 10%. Se incubó por 5 minutos. Se centrifugó la muestra se separó el amonio, se agregó 5 ml de metanol, se centrifugó nuevamente y la fase con metanol se transvasó a un tubo nuevo. Se colocó 40 ul del control positivo en la placa para TLC.

Para preparar las muestras de suspensiones celulares, estas fueron centrifugadas por 20 minutos a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante (medio de cultivo), una vez que se tuvo solamente las células, se les agregó 300ul de amoniaco al 10%, se incubó por 5 minutos, posteriormente se centrifugó por 20 min a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante (amoniaco) y al pellet (células) se les agregó 300 ul de metanol. Se incubaron por 10 minutos. Se centrifugaron por 20 min a 14000 rpm. Luego se trasvasó el sobrenadante a tubo nuevo, se incubaron a 65°C para evaporar el metanol con el fin de concentrar los compuestos, se agregó 25 ul de metanol para resuspender los compuestos. Los 25 ul fueron colocados en su totalidad en la placa para TLC.

Las placas se corrieron en una cámara cerrada con 10 ml de fase móvil compuesta de etil acetato, isopropanol y amoniaco en proporción 100:2:1. (Figura 1A. Anexo 1.)

Finalmente se roció la placa con reactivo Dragendof y nitrato de sodio al 1%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de Nanopartículas

Al sintetizar las nanopartículas de plata, se obtuvo una solución de color amarillo, que es el color característico de la nanopartículas de plata. Mientras que para la solución de nanopartículas de Oro la coloración obtenida fue rosada y según Akbarzadeh, *et al*, 2009 esta coloración indica la presencia de nanopartículas. Mientras que la de cobre se obtuvo una coloración final café claro, similar a agua turbia (figura 1). Jana *et al*; (2000), indican que la coloración esperada para una solución de nanopartículas de cobre es amarillo.

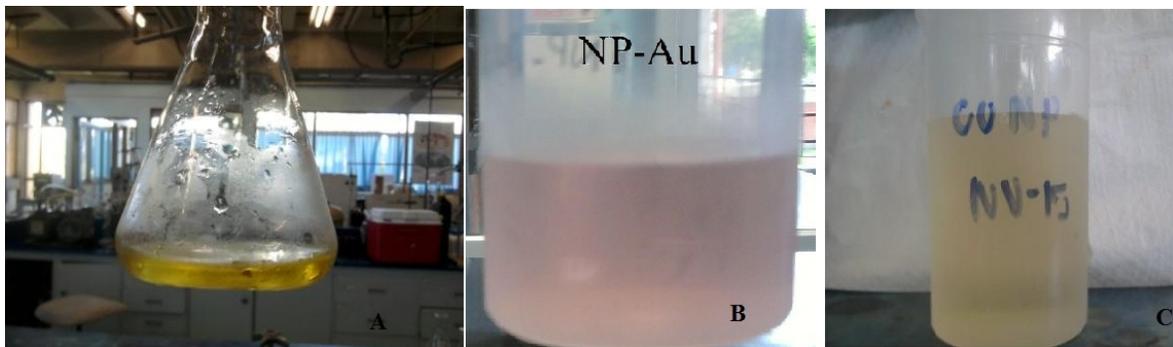


Figura 1. Soluciones de nanopartículas sintetizadas. A. Nanopartículas de plata. B. Nanopartículas de Oro. C. Nanopartículas de Cobre

- Nanopartículas de Plata

La solución mantuvo la coloración amarilla durante mucho tiempo, incluso 3 meses después de sintetizada. Esto debido probablemente al uso del borohidruro de sodio ya que este además de reducir el ión plata a plata metálica, se adsorbe sobre las nanopartículas, repeliéndolas entre sí mediante repulsiones electrostáticas y estabilizándolas. El resultado esperado es una suspensión coloidal de nanopartículas esféricas, (Figura 2.), (Alday *et al.*, 2012).

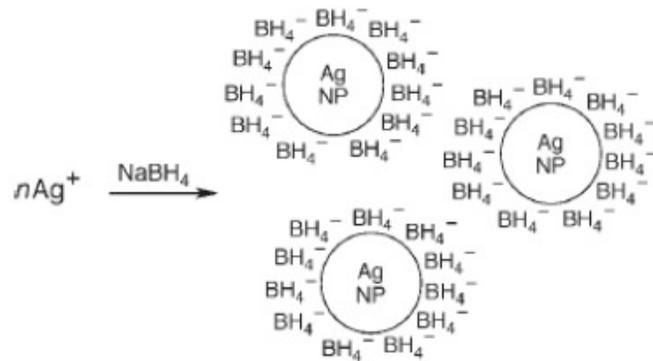


Figura 2. Representación esquemática de cómo el Borohidruro de sodio evita que las nanopartículas de plata se agreguen. (Alday, *et al*, 2012)

Al realizar los análisis de la solución en el TEM, se pudo determinar que las nanopartículas se encontraban en un rango de tamaño de entre 7 y 8 nm aproximadamente (Figura 3). Sin embargo, se observó que las nanopartículas se encontraban agrupadas y adheridas a una sustancia que no se pudo identificar. (Figura 4) Esta condición podría afectar la disponibilidad de las nanopartículas para ser incorporadas por el tejido vegetal e intervenir en el proceso de brotación deseado.

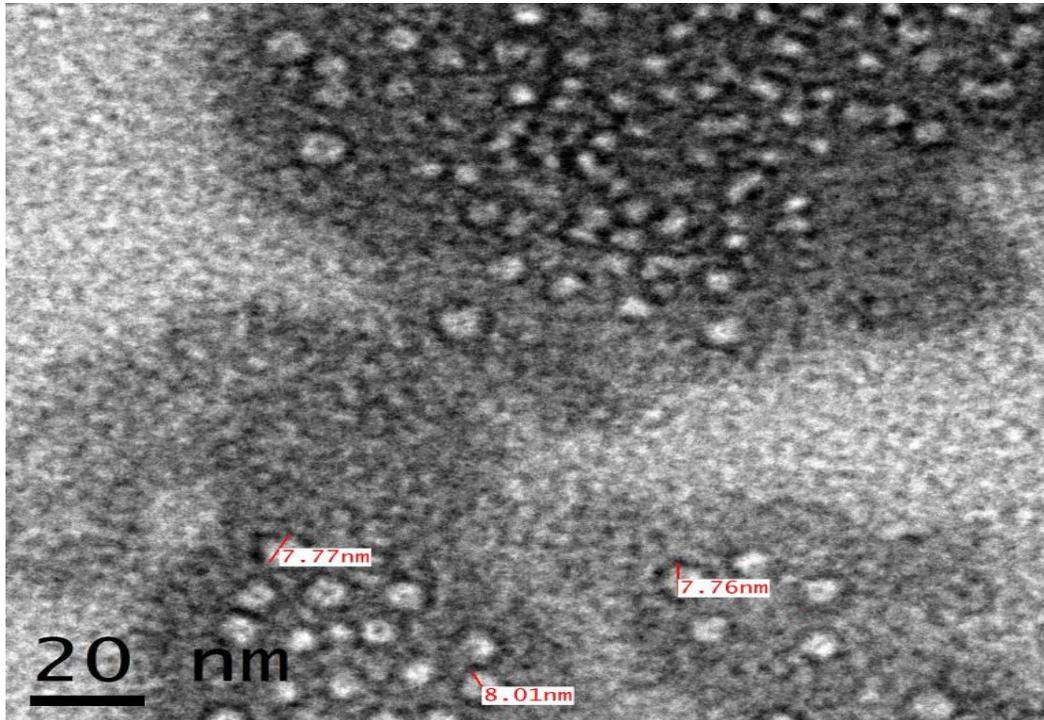


Figura 3. Solución de nanopartículas de plata vistas al Microscopio Electrónico de Transferencia (TEM). Las mediciones de las nanopartículas se encuentran entre 7 y 8 nm. (Fotografía tomada por: Pamela Zúñiga, Laboratorio de Nanotecnología, ITCR)

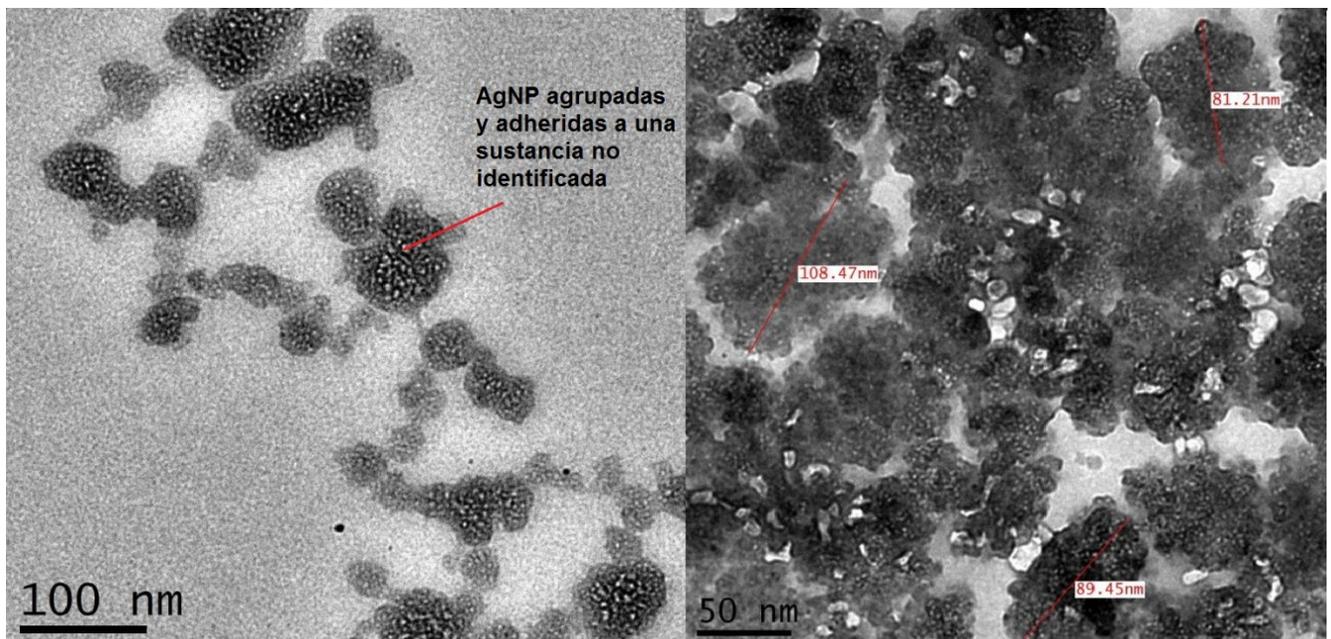


Figura 4. Solución de Nanopartículas de plata vistas en TEM. Los puntos blancos dentro de la nube oscura corresponden a las nanopartículas. (Fotografía tomada por: Pamela Zúñiga, Laboratorio de Nanotecnología, ITCR)

Se analizó otra solución de nanopartículas de plata 11 días después de haber sido sintetizada, esta no presentaba la aglomeración que se ve en las figuras 3 y 4, pero se observan 2 rangos muy diferentes de tamaño y ninguno es el esperado ya que con el método utilizado para la síntesis se esperaba obtener nanopartículas cercanas a los 10 nm. Por el contrario, las partículas obtenidas median entre 100 a los 300 nm y otras entre 30 a 60 nm. (Ver figura 5)

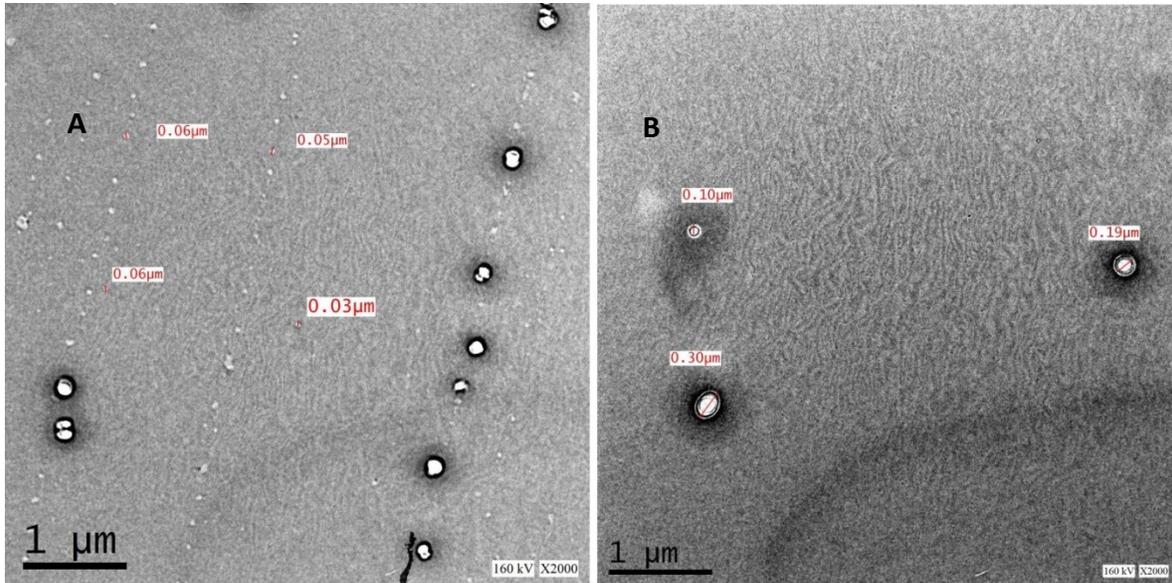


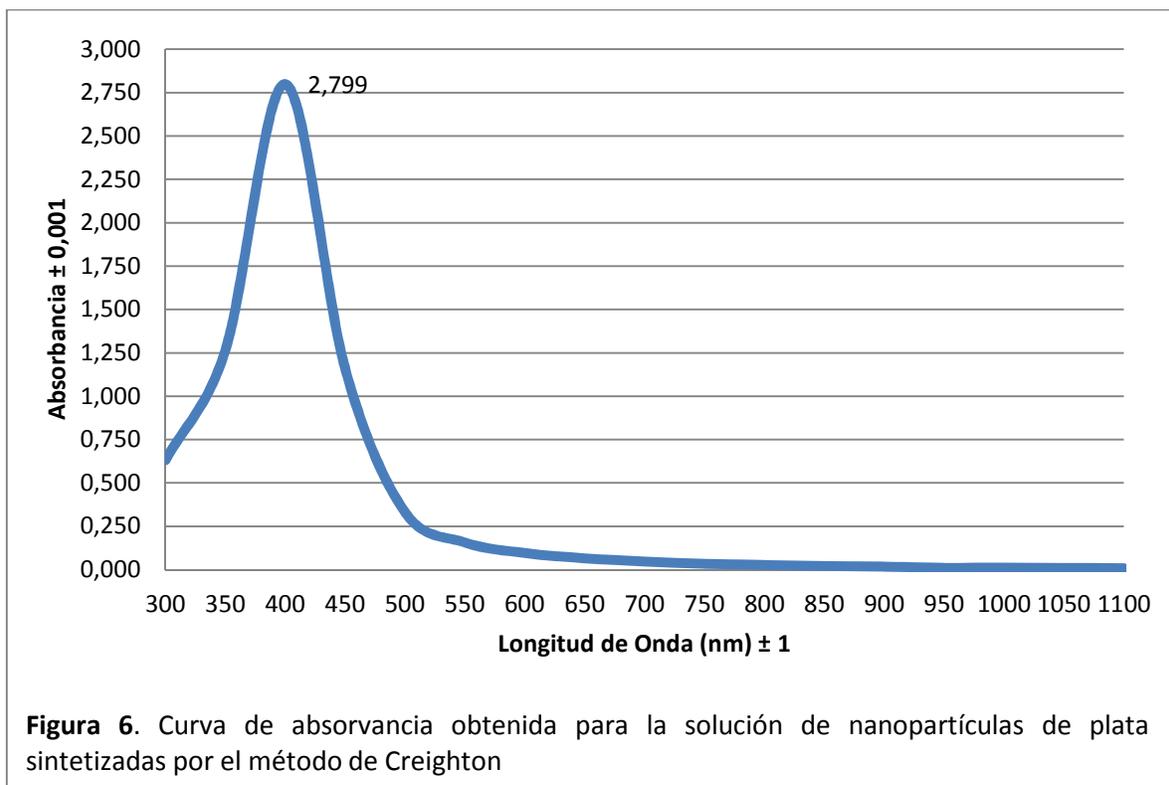
Figura 5. Solución de Nanopartículas de plata vistas en TEM. La fotografía A muestra tamaños de 30 a 60 nm, mientras que la figura B muestra tamaños de 100 a 300 nm. (Fotografía tomada por: Pamela Zúñiga, Laboratorio de Nanotecnología, ITCR)

La variación de tamaños obtenidos en ambas soluciones de nanopartículas, podría deberse a el uso de diferentes marcas de reactivos, ya que, podrían tener diferentes grados de pureza, lo que interfiere directamente en el tamaño de las nanopartículas obtenidas, o podría ser que las nanopartículas se estuvieran agregando entre sí. Es necesario tratar de estandarizar el protocolo para procurar la menor variación en el tamaño de las nanopartículas obtenidas.

De acuerdo a las curvas de absorbancia obtenidas en el espectro del ultra violeta visible, se obtuvo que para las nanopartículas de plata, la absorbancia más alta, se encontraba en los 400 nm de longitud de onda. (Figura 6)

La aparición de bandas de absorción en el espectro alrededor de longitudes de onda de 400 a 450 nm indica la presencia de nanopartículas metálicas. Estas bandas se deben a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales (Morales *et al.*; 2009)

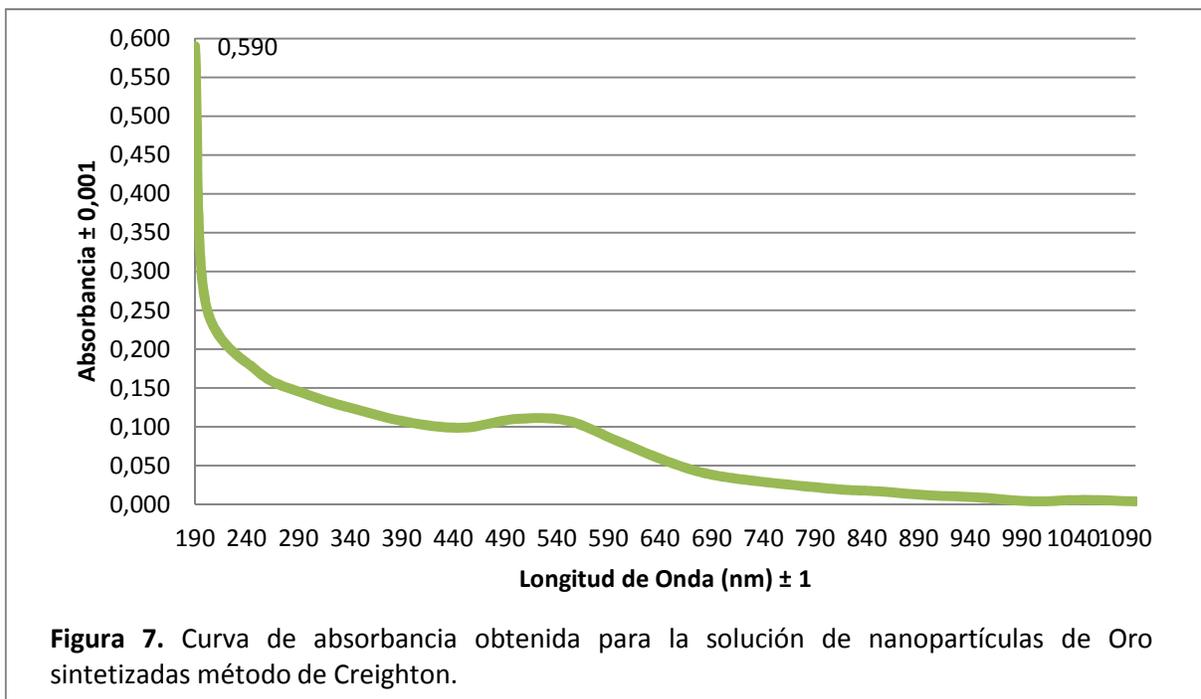
Salomon y colaboradores, (2007), citados por Alday, *et al.*, (2012), indican que por el método de Creighton, que fue el que se utilizó en esta investigación, se obtienen nanopartículas de aproximadamente 12 ± 2 nm de tamaño, con un plasmón característico alrededor de los 400 nm.



- Nanopartículas de Oro

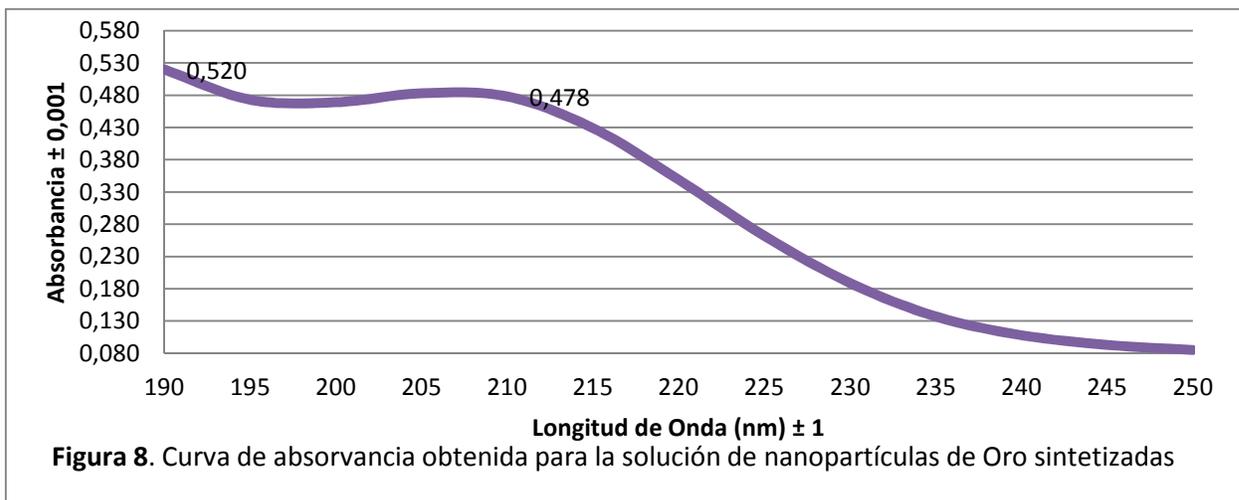
En el caso de la nanopartículas de oro, éstas debían presentar el pico más alto de absorción cercano a los 518 nm para un tamaño aproximado de entre 10 y 25 nm. (Akbarzadeh *et al.*; 2009) Sin embargo, al analizar la solución de nanopartículas obtenidas mediante espectrofotómetro, la mayor absorbancia se obtuvo a los 190 nm y un pico adicional obtenido en los 500nm, sin embargo con una absorbancia muy baja, lo que

podría indicar una concentración muy baja de nanopartículas de oro o que estas se encontraban agregadas. (Figura 7)



- Nanopartículas de Cobre

El gráfico obtenido para las nanopartículas de cobre no muestra la presencia de nanopartículas. (Figura 8). No se obtuvo la mayor absorvancia en la longitud de onda esperada. Jana y compañía (2000) reportan la mayor absorvancia en los 500 nm. De igual forma, como ya se mencionó antes, el color obtenido no fue el esperado.



Inducción a brotación a partir de callo y segmentos de hoja

Al colocar los explantes de callo y hoja en el medio M&S (1962) sin reguladores de crecimiento adicionado solamente con las nanopartículas de plata, oro o cobre, estos tendían a oxidarse rápidamente. Por la experiencia acumulada al trabajar con *U tomentosa*, se ha visto que es una especie que tiende a oxidarse con facilidad, lo que se ha podido observar al cortar segmentos de la planta *in vivo*, o cuando la misma se encuentra bajo condiciones de estrés, por ejemplo temperaturas no adecuadas para el cultivo. También se ha observado una rápida oxidación en suspensiones celulares de más de 7 días de subcultivo. Esto, podría deberse a que las nanopartículas generaron condiciones de estrés que favorecieron el proceso de oxidación.

Al repetir las pruebas utilizando las mismas concentraciones, algunos explantes produjeron brotes de raíz, en presencia de las AgNP, sin embargo, esto no se atribuye a la influencia de las nanopartículas, ya que estas raíces también se presentaron en los callos control inoculados en medio sin nanopartículas, sin embargo, se observa gran diferencia entre la apariencia de las raíces producidas sin nanopartículas comparadas con las que se produjeron en presencia de nanopartículas de plata, (Figuras 9 y 10).

Las raíces generadas por el material expuesto a AgNP's son más gruesas y sin vellocidades y aparentemente más largas, además presentaron la formación de una protuberancia en la región del meristemo radical, mientras que las raíces que produjo el control eran pubescentes, más delgadas y de menor longitud, (Figura 10). Es necesario hacer más pruebas que soporten de forma estadística estos resultados antes de afirmar la influencia de las nanopartículas en la obtención de este tipo de raíces.

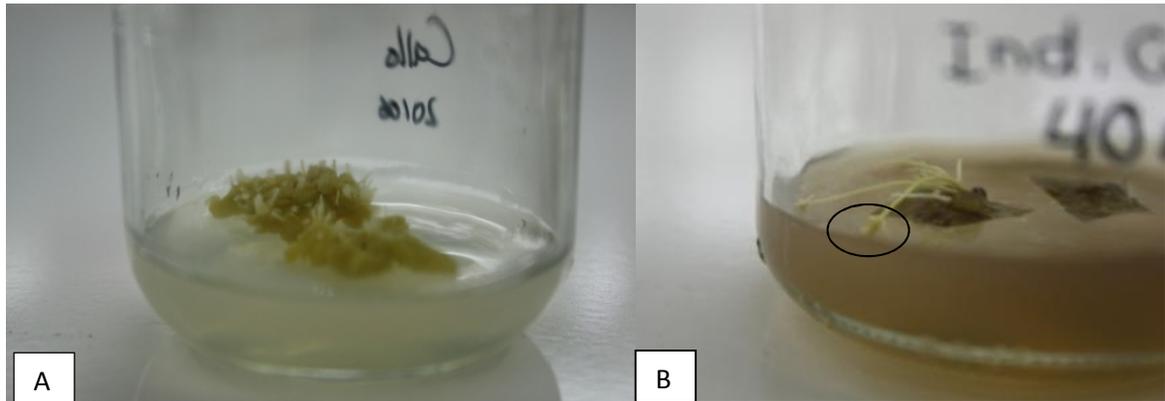


Figura 9. Crecimiento de raíz en explante de hoja cultivado en medio M&S (1962) y mantenido en oscuridad. A. Control (Sin Ag-NP). B. Medio suplementado con 40mg/L de AgNP.

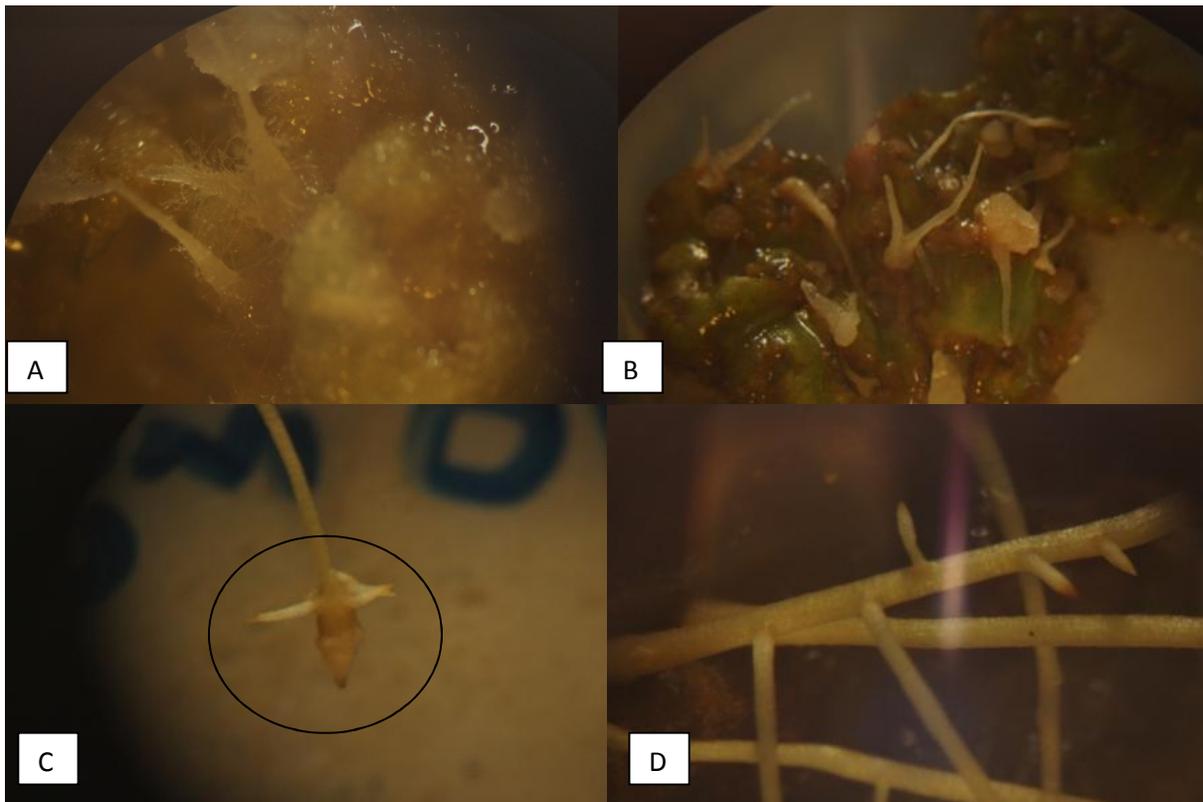


Figura 10. Formación de raíz a partir de explantes de hoja cultivados en medio complementado con diferentes concentraciones de AgNP. A. Control (Sin AgNP). B. 20 mg/L de AgNP. C y D. 40 mg/L de AgNP.

Al medir la longitud de las raíces obtenidas en los explantes cultivados en presencia de nanopartículas, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 1. Longitud promedio de las raíces generadas en los explantes expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata.

Concentración de AgNP (mg/L)	Longitud promedio de raíces (mm)
0	5,77
7	5,16
10	6,88
20	8,44
30	9,79
40	9,15

A pesar de que la tendencia fue que a mayor concentración de nanopartículas mayor elongación de la raíz, esto no puede afirmarse hasta realizar un mayor número de ensayos y con más individuos por ensayo para verificar si los resultados se repiten. Además, la longitud máxima se obtuvo a una concentración de 30 mg/L de AgNP y no con la concentración mayor de 40 mg/L, lo que podría indicar un máximo en este punto. Por otro lado, se observó que los explantes se oxidaban más rápidamente conforme aumenta la concentración de AgNP

Al utilizar el medio M&S (1962) suplementado con BA y AIA los explantes de hoja tendían a oxidarse rápidamente y en los casos en que hubo formación de raíz, esta era muy similar a las obtenidas en ensayos anteriores, gruesas, largas y sin pubescencia. (Figura 11)



Figura 11. Explantes de hoja cultivados en medio MS complementado con 2,85 μM de AIA, 8,87 μM de BA y 4,3 mg/L de AgNP. Obsérvese la oxidación de los explantes en la foto A y las raíces largas y sin pubescencia en la foto B.

Inducción a brotación a partir de hipocótilo

En *Tamarindus sp*, se ha reportado que el uso de BA favorece la formación de brotes en callo, mayoritariamente que otras citoquininas. En *Coffea canephora*, el uso de BA en conjunto con AIA y AgNO_3 en el medio, favoreció la organogénesis directa en explantes de hipocótilo. Se ha visto que el AgNO_3 , actúa inhibiendo la acción del etileno favoreciendo la regeneración en cultivo *in vitro* de muchas mono y dicotiledóneas. (Sridevi *et al*, 2009)

En cuanto al uso de nanopartículas de plata, no existen referencias en la literatura, por otra parte, las propiedades de los materiales pueden variar y presentar propiedades totalmente distintas a las que presentan en su dimensión macro, además se ha visto que son más efectivos como nanopartículas que como micropartículas.

Al utilizar hipocótilo como explante en medio con nanopartículas, AIA y BA, se dio la formación de callo y en algunos casos, al hacer las observaciones al estereoscopio un mes después de inoculados los explantes en el medio, se pudo identificar lo que parecían diferentes etapas de desarrollo de embriones somáticos, (Figura 12). Sin embargo, antes de hacer esta afirmación se deben realizar análisis de los tejidos mediante microscopía electrónica. Estos análisis no se pudieron hacer ya que los embriones se oxidaron antes de poder ser observados en el microscopio electrónico.

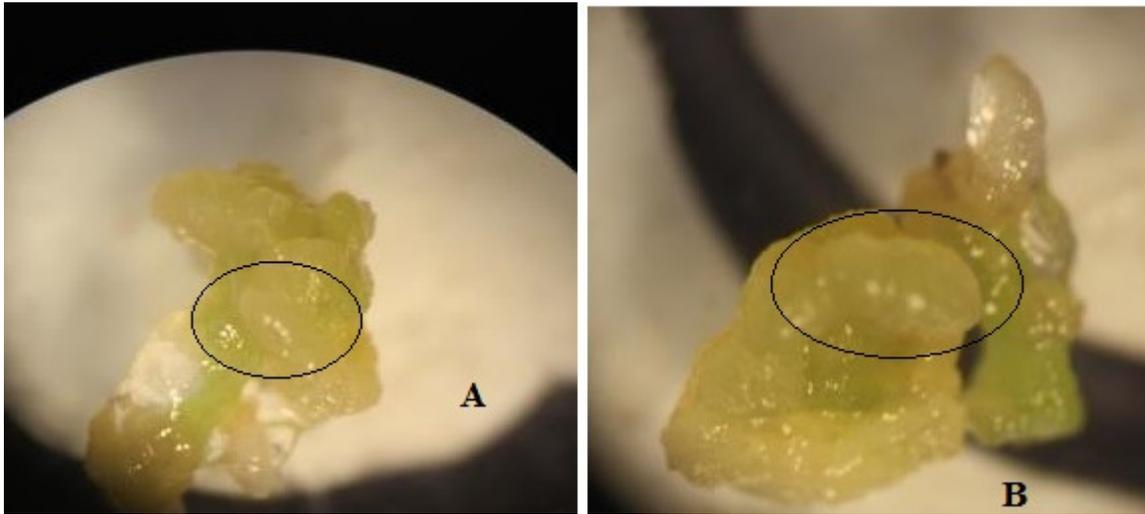


Figura 12. Explantes de hipocótilo sembrados en medio MS complementado con BA, AIA y AgNP. Se observa la formación de callo y lo que parece ser un embrión somático, señalado con el círculo negro.

En uno de los explantes cultivados en medio con nanopartículas de plata se obtuvo la formación de una plántula (figura 13), sin embargo no es posible asegurar que este brote se originó por la influencia de las nanopartículas, ya que los demás individuos sometidos al mismo tratamiento no presentaron formación de brotes, por el contrario, tendieron a oxidarse. La formación de esta plántula podría deberse a otros factores como predisposición del explante o que a la hora de tomar el explante se tomó más que solo el hipocótilo. Es necesario repetir el ensayo utilizando mayor número de individuos. En los individuos control (medio sin nanopartículas) no se obtuvo ninguna plántula.

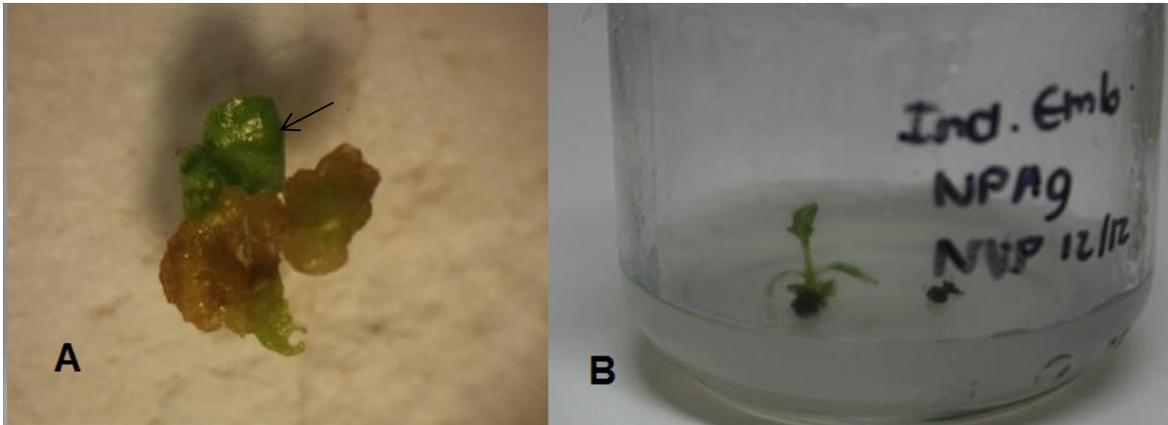


Figura 13. Plantula obtenida a partir de hipocótilo cultivado en medio con nanopartículas de plata, AIA y BA. **A.** Después de 1 mes de cultivo, en la parte superior se observan lo que parecen ser la primeras hojas, señaladas con la flecha. **B.** Después de 2 meses de cultivo, ya la plántula está formada.

Observaciones al microscopio electrónico

Se hicieron observaciones de los tejidos en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM 3000), sin embargo, con las imágenes obtenidas no se logró observar ninguna estructura que pudiera identificarse como nanopartículas, ya que las partículas observadas superaban por mucho los 100 nm, para considerarlas como nanomateriales. Dichas partículas podrían ser agregados de nanopartículas, (Figura 14)

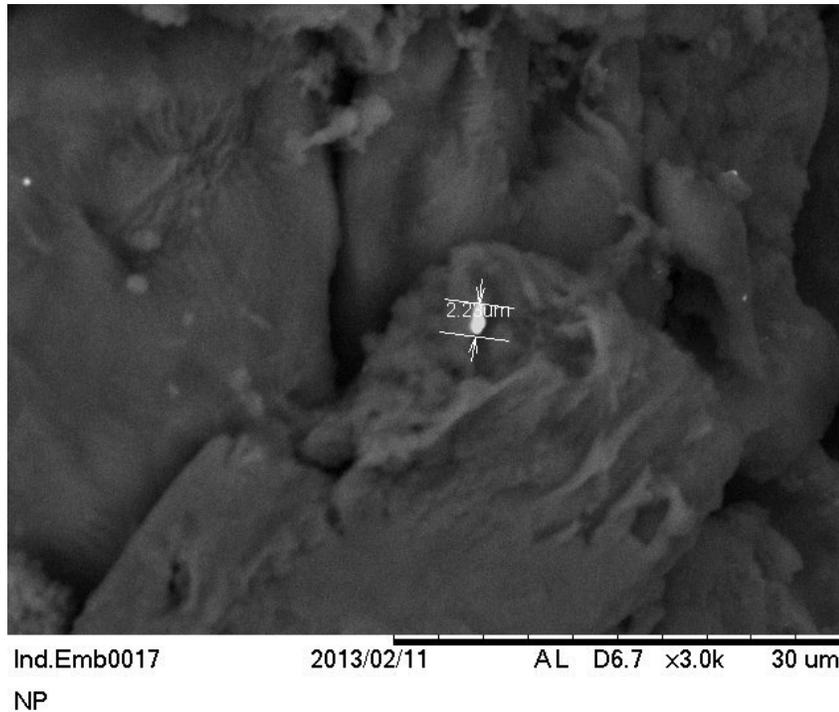


Figura 14. Tejido de *U. tomentosa* cultivado en medio con Nanopartículas de plata, visto en el SEM 3000. La partícula encontrada mide 2,23 μm (Laboratorio de Nanotecnología ITCR)

Al comparar el tejido del explante expuesto a las nanopartículas con los explantes control se pudo observar que el primero presenta lo que parecen ser espacios aéreos a diferencia del segundo donde el tejido se observa más uniforme y sin dichos espacios, (Figura 15). Esto podría deberse a algún tipo de daño en el tejido que provoca la ruptura de las células, pero no se puede afirmar que las nanopartículas generen este efecto en el tejido provocando la formación de dichos espacios, ya que es necesario repetir las pruebas para corroborar si se da el mismo efecto.

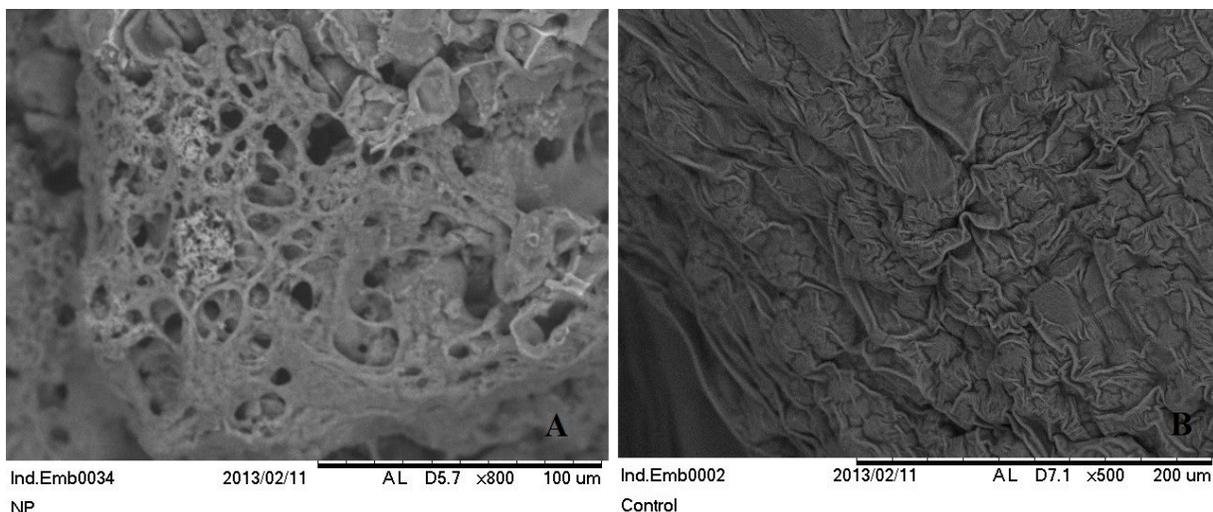


Figura 15. Tejidos de hipocótilo de *U. tomentosa*, vistos al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM 3000). A. Explante en medio con nanopartículas de plata. B. Explante control, en medio sin nanopartículas.

Efecto elicitor de las nanopartículas de plata en suspensiones celulares de *U. tomentosa*.

Durante la elicitación, los compuestos producidos por los patógenos desencadenan una señal que es captada por los receptores en la planta, lo que da lugar a una respuesta de defensa por parte de esta última. Estos compuestos producidos por los patógenos se denominan *elicitores*. (Ebel y Mithöfer, 1998) Los elicitores generan estrés en la planta que puede provocar el incremento en la producción de metabolitos secundarios. Bajo esta premisa, se probaron nanopartículas de plata en cultivos de suspensiones celulares con el fin de provocar estrés en las células y desencadenar una respuesta que favorezca la acumulación de metabolitos secundarios.

Se ha visto que los cultivos de células limitan la acumulación de metabolitos secundarios, sin embargo, se ha reportado el incremento en la producción de estos compuestos, cuando las células son sometidas a condiciones de estrés como el que puede generar la presencia de sustancias fúngicas, hormonas o ácido jasmónico. (Pereira, *et al*, 2000)

En plantas productoras de resinas, se ha reportado que cuando están bajo estrés por patógenos o estrés abiótico, incrementan la producción de resinas. Los elicitores, incrementan la acumulación de metabolitos secundarios tanto en plantas *in vivo* como en plantas *in vitro*. (Dass y Ramawat, 2009)

Los resultados de las pruebas de cromatografía mediante TLC, no fueron lo esperado para las muestras de suspensiones celulares, ya que, no se pudo observar la formación de bandas en la placa, (figura 16). Esto podría deberse a que la cantidad de muestra colocada en la placa no fue suficiente como para ser detectada, ya que, esta prueba es poco sensible y requiere una cantidad mínima de muestra para poder detectar los compuestos presentes en la misma. No fue posible incrementar la cantidad de muestra debido a que el ensayo fue diseñado para HPLC, el cual puede trabajar con cantidades pequeñas, ya que es mucho más sensible.

Esto se corrobora al observar los resultados obtenidos con el control positivo (figura 16), ya que se obtuvo una corrida con bandas definidas, lo que indica que el protocolo funcionó adecuadamente, fundamentando la hipótesis de que el problema estuvo en la cantidad de muestra utilizada.

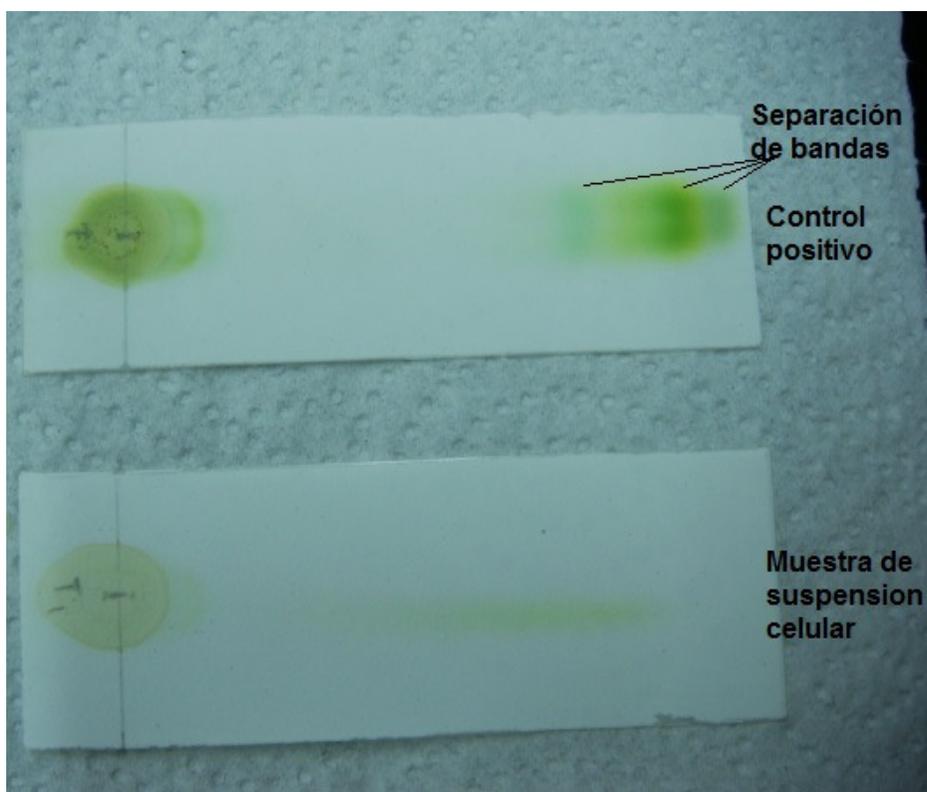


Figura 16. Cromatografía mediante TLC de muestras de *U. tomentosa*. Arriba: Extracción realizada de hojas jóvenes de planta mantenida en invernadero. Abajo: extracción de suspensión celular en medio con nanopartículas.

Existe también la posibilidad de que las suspensiones no hayan producido metabolitos secundario, o que lo hayan hecho en una cantidades mínimas, imposibles de ser detectadas. Sin embargo, esto no puede ser corroborado hasta realizar las pruebas mediante HPLC, una vez que se tenga estandarizado el protocolo de extracción a partir de suspensiones celulares.

El control positivo fue enviado a analizar mediante HPLC (Anexo 2) y se obtuvo que tenía una alta concentración de los siguientes alcaloides:

- Mitrafilina: 74.66277 ng/ul
- Isomitrafilina: 166.88923 ng/ul
- Uncarina C: 810.30390 ng/ul

Este resultado plantea la posibilidad de que el protocolo para extraer las muestras que van a ser analizadas mediante HPLC no está funcionando, ya que, el control positivo fue extraído mediante el protocolo usado para TLC. Estas mediciones obtenidas verifican que este último protocolo de extracción funcionó adecuadamente para obtener los alcaloides de interés, por lo que es necesario hacer nuevas pruebas a las suspensiones celulares en las que se trabaje con una cantidad mayor de muestra, por ejemplo, 1 gramo, que fue el peso utilizado para el control positivo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El método de Creighton es una forma fácil de obtener nanopartículas de plata de un tamaño aproximado a los 10 nm, sin embargo, se recomienda hacer pruebas para estandarizarlo
2. Los nanomateriales pueden presentar propiedades diferentes a las que presentan en su forma de micropartícula.
3. El mayor efecto de las nanopartículas se atribuye a que se incrementa su relación superficie/volumen.
4. El tejido de *U. tomentosa* se oxida rápidamente y las nanopartículas usadas en el medio pueden contribuir a acelerar este proceso.
5. Se observó mayor elongación de las raíces obtenidas en presencia de nanopartículas. Sin embargo, no se garantiza que sean funcionales.

6. No se obtuvo formación de brotes a partir de callo ni segmentos de hoja cultivados en medio con nanopartículas de plata.
7. Al utilizar medio MS con BA, AIA y nanopartículas de plata, se obtuvo lo que parecían ser embriones somáticos. Se recomienda hacer estudios de los tejidos con microscopía electrónica para determinar si corresponde a embriones somáticos
8. Se recomienda hacer pruebas con concentraciones inferiores a los 4,3 mg/L de nanopartículas de plata con el fin de determinar si con esto se evita la oxidación de los explantes.
9. Es recomendable utilizar la solución de nanopartículas a no más de 7 días después de haber sido sintetizada.
10. Se podría hacer una investigación futura en la que se estudie más a fondo los efectos de las nanopartículas sobre el tejido vegetal vistos en esta investigación, tal y como la formación de tejido de aereación en los hipocótilos y la obtención de raíces más gruesas y alargadas.
11. Al hacer los análisis mediante HPLC, se recomienda cambiar el protocolo de extracción por el método usado para TLC, ya que de acuerdo a el resultado obtenido con el control positivo da una medición adecuada.
12. Es necesario estandarizar la extracción de metabolitos secundarios a partir de suspensiones celulares para ser analizados mediante HPLC, ya que es una técnica más sensible que el TLC, además permite cuantificar los compuestos que se están analizando.

APORTES Y ALCANCES

1. Con esta investigación se lograron obtener nanopartículas de plata por el método Creighton, con tamaños promedio de 10 nm. En investigaciones futuras que requieran nanopartículas podrán utilizar este método para obtenerlas.
2. Esta actividad de fortalecimiento generó conocimiento base para el trabajo con nanopartículas en cultivos vegetales y podría servir de punto de partida para

investigaciones futuras más profundas sobre el efecto de las nanopartículas en las plantas.

3. La experiencia generada sobre síntesis de nanopartículas ya se está aplicando en cursos sobre nanotecnología en el ITCR.

BIBLIOGRAFÍA

Akbarzadeh, A., Davood, Z., Farhangi, A., Mehrabi, M.R., Norouzian, D., Tangestaninejad, S., Moghadam, M., Bararpour, N. 2009. American Journal of Applied Sciences. 6 (4): 691-695.

Alday, E., García, N., Mejías, M.P., Silbermins, M. 2012. Nanopartículas de plata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. 26 p

Alvarenga, S., Valerín, K., Hernández, A. 2012. *Búsqueda de genes de Uña de gato (Uncaria tomentosa) mediante estrategias de microarreglos heterólogos o Chips de ADN*. Informe final de investigación. Centro de Investigación en Biotecnología. Vicerrectoría de Investigación y Extensión. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 59p

Alvarenga, S. 2011. Comunicación personal. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Agosto, 2011

Carrillo, R. y González, C. 2009. La nanotecnología en la agricultura y rehabilitación de suelos contaminados. Mundo Nano. 2 (2):50-63 < www.mundonano.unam.mx> (22 de noviembre, 2012)

Cifuentes, Z., Custardo, L., De la Fuente, J.M., Marquina, C., Ibarra, R., Rubiales, D., Pérez, A. 2010. *Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants*. Journal of Nanobiotechnology. 8 p. <http://www.inanobiotechnology.com/content/8/1/26> (2 de febrero, 2012)

Corredor, E., Testillano, P., Coronado, M.J., González, P., Fernández, R., Marquina, C., Ibarra, R., De la Fuente, J.M., Rubiales, D., Pérez, A., Risueño, M.C. 2009. *Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification*. BMC Plant Biology. 9 (45) 11p <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/45> (1 de abril, 2011)

Dass, S. y Ramawat, K.G. 2009. *Elicitation of guggulsterone production in cell cultures of Commiphora wightii by plant gums*. Plant Cell Tiss Organ Cult . 96:349–353. Disponible en: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-008-9493-7> (1 de abril, 2013)

Delgado, G.C. 2007. *Nanotecnología: Avances y retos*. Ciencia y Desarrollo. 33 (206):19.23

Ebel, J., Mithöfer, A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Revista Planta*. 206: 335-348. Disponible en: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs004250050409> (21 de marzo, 2013)

Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J. G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H.E., Santiago, P. and Yacaman, M.J. 2002. *Formation and Growth of Au Nanoparticles inside Live Alfalfa Plants*. *Nano Letters*. (4), 397-401

Jana, N.R., Wang, Z.L., Sau, T.K., Pal, T. 2000. *Seed-mediated growth method to prepare cubic copper nanoparticles*. *Current Science*. 79 (9): 1367-1310

Monge, M. 2009. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Investigación Química*. Real Sociedad Española de Química. 105 (1): 33-41

Morales, J., Moran, J., Quintana, M., Estrada, W. 2009. *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta Sol-Gel a partir de Nitrato de plata*. *Revista Sociedad Química de Perú*. 75 (2): 177-184

Pereira, A.M.S., Bertoni, B.W., Câmara, F.L.A., Duarte, I.B., Queiroz, M.E.C., Leite, V.G.M., Moraes, R.M., Carvalho, D. França, S.C. 2000. Co-cultivation of plant cells as a technique for the elicitation of secondary metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 165–169. Disponible en: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1006340313900> (22 de marzo, 2013)

Reisner, D. 2008. *Bionanotechnology. Global Prospects*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Florida, Estados Unidos. 349 p.

Vega, J. 2007. *La Nanotecnología en Costa Rica: la experiencia en el LANOTEC*. IX Congreso Nacional de Ciencias. Exploraciones fuera y dentro del aula. Laboratorio de Nanotecnología – LANOTEC, CENAT. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 24 y 25 agosto.

Saenz, G., Hernández, M.C., Martínez, L. 2011. Síntesis acuosa de Nanopartículas de Plata. *Memorias del "XIV Coloquio Venezolano de Polímeros"*. Universidad Simón Bolívar. *Revista Latino Americana Metal. Mat.* 3: 34-35

Samrat, R., Mahua, G., Amrita, M., Dipankar, C., Moumita, P., Saheli, P., Arunava, G. 2011. "Surface-modified sulfur nanoparticles: an effective antifungal agent against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90 (2): 733-743. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/?k=Surface-modified+sulfur+nanoparticles> (30 de marzo, 2012)

Sánchez; L. y Alvarenga, S. 2012. Calogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (Uña de Gato. Tecnología en Marcha. En prensa

Smith, J.E. 2004. Biotechnology. 4th edition. Cambridge University Press. New York, USA. 271p.

Sridevi, S. Giridhar, P., Simmi, S., Ravishankar, G. A. 2007. *Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants with collar region from in vitro seedlings of Coffea canephora Pierre ex. Frohner cv. CxR and Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation*. Plant Cell Tissue Organ Culture. 101:339–347

Tan, X.M. y Fugetsu, B. 2007. *Multi-Walled Carbon Nanotubes Interact with Cultured Rice Cells: Evidence of a Self-Defense Response*. Journal of Biomedical Nanotechnology. 3: 285–288

Torney, F., Trewyn, G., Lin, V.S. y Wang, K. 2007. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nanotechnology* 2, 295 – 300. <http://www.nature.com/nnano/journal/v2/n5/abs/nnano.2007.108.html> (marzo, 2013)

Ze, Y, Liu, C., Wang, L., Hong, M., Hong, F. 2010. *The Regulation of TiO₂ Nanoparticles on the Expression of Light-Harvesting Complex II and Photosynthesis of Chloroplasts of Arabidopsis thaliana*. Springer Science Business Media. 11p

Anexos

Anexo 1. Cromatografía mediante TLC

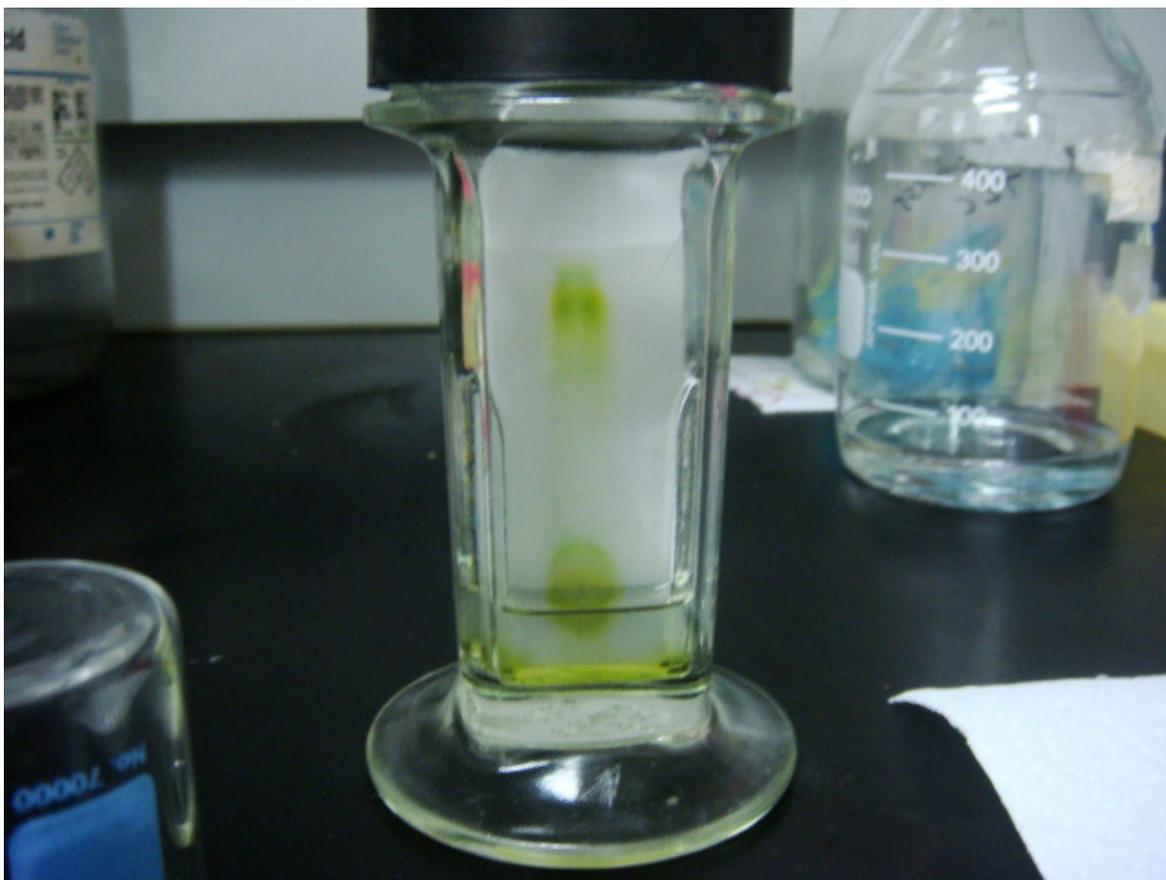


Figura 1A. Cámara utilizada para realizar las pruebas de TLC. La muestra que se observa corresponde al control positivo

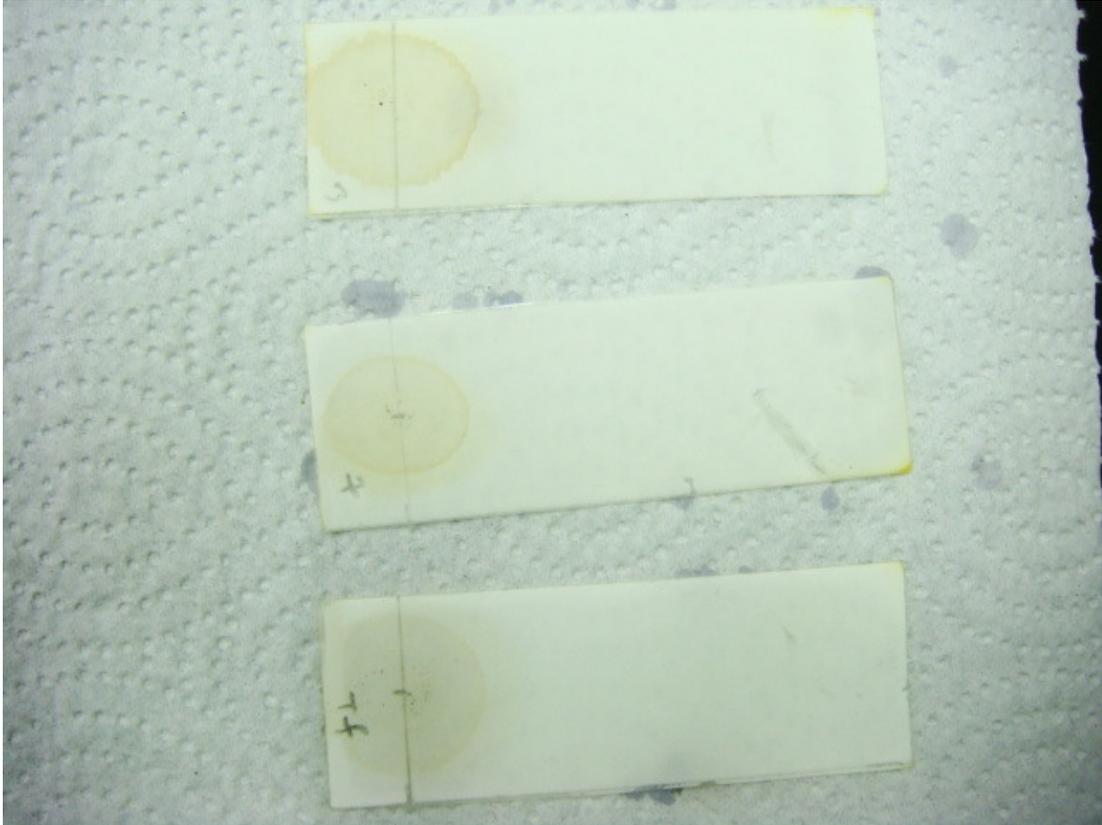
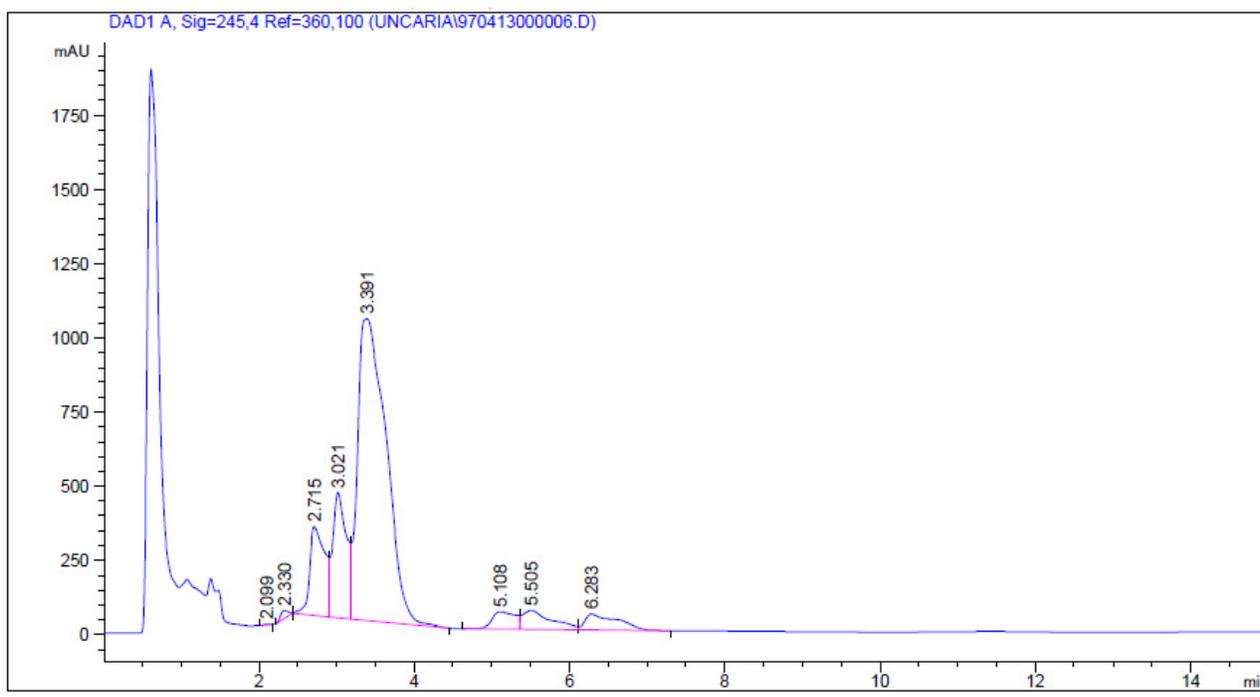


Figura 2A. Resultados obtenidos con otras muestras de suspensiones celulares.

Anexo 2. Cromatograma obtenido mediante HPLC de alcaloides extraídos a partir hojas jóvenes de *U. tomentosa* mantenida en invernadero.

=====
Acq. Operator : Tatiana
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 5/2/2013 2:13:15 PM
Inj Volume : Manually
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ALCALOIDES.M\CALIBRACION+TABLA.M
Last changed : 5/2/2013 1:58:21 PM by Tatiana
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ALCALOIDES.M\CALIBRACION+TABLA.M
Last changed : 5/2/2013 2:34:25 PM by Tatiana
(modified after loading)
Method Info : Esperanza!
Sample Info : Temp 15
Additional Info : Peak(s) manually integrated



External Standard Report

=====
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 5/2/2013 2:34:57 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount: : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Signal 1: DAD1 A, Sig=245,4 Ref=360,100
Data File C:\CHEM32\1\DATA\UNCARIA\970413000006.D
Sample Name: Muestra fresca
Instrument 1 5/2/2013 2:35:15 PM Tatiana Page 1 of 2
RetTime Type Area Amt/Area Amount Grp Name

```

[min] [mAU*s] [ng/ul]
-----|-----|-----|-----|-----|---|-----
2.715 BV 4093.74927 1.82382e-2 74.66277 Mitrafilina
3.021 VV 5188.90137 3.21627e-2 166.88923 Isomitrafilina
3.391 VB 2.58816e4 3.13081e-2 810.30390 Unc C
4.058 - - - Unc E
Totals : 1051.85591
2 Warnings or Errors :
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found
=====
*** End of Report ***
Data File C:\CHEM32\1\DATA\UNCARIA\970413000006.D
Sample Name: Muestra fresca
Instrument 1 5/2/2013 2:35:15 PM Tatiana Page 2 of 2

```