



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Efectos tóxicos de nanopartículas de óxidos de hierro en *Eisenia andrei* y sus implicancias ecotoxicológicas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Marcela Inés Cáceres Wenzel

Directoras de Tesis: Dra. Noemí R. Verrengia Guerrero

Dra. Adriana C. Cochón

Consejera de Estudios: Dra. María del Carmen Ríos de Molina

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Toxicología y Química Legal.

Dpto. de Química Biológica, FCEN-UBA.

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 17-07-2018

Efectos tóxicos de nanopartículas de óxidos de hierro en *Eisenia andrei* y sus implicancias ecotoxicológicas

Resumen

Los posibles efectos tóxicos de nanopartículas (NPs) de goethita fueron estudiados en lombrices terrestres (*Eisenia andrei*). Para ello, se realizaron bioensayos en papel y/o suelo artificial. Además, se investigó la influencia de dichas NPs en la biodisponibilidad y toxicidad de contaminantes, uno orgánico (Clorpirifos: CPF) y dos metálicos (Cd y Pb). El ingreso de estas NPs de hierro se estimó mediante la cuantificación del metal. Los efectos tóxicos se evaluaron mediante una batería de parámetros biomarcadores. Por otra parte, se realizaron determinaciones espectroscópicas y con microscopía electrónica para caracterizar las distintas suspensiones de NPs. Curiosamente, la concentración de Fe en organismos expuestos a las NPs en papel (72 h) o en suelo artificial (10 días) resultaron siempre menores a los valores basales, sugiriendo efectos sistémicos que pueden relacionarse con las alteraciones registradas en algunos de los parámetros bioquímicos seleccionados. En cambio, las lombrices expuestas a la mezcla de NPs+CPF presentaron un aumento en los niveles de Fe. En presencia de NPs y de los metales Cd y Pb, se observó una menor bioacumulación de ambos elementos. Ambos resultados muestran que estas NPs pueden afectar a los organismos del suelo y evidencian las complejas interacciones que pueden verificarse con otros contaminantes preexistentes en el ambiente.

Palabras claves: biomarcadores, contaminantes, *Eisenia andrei*, goethita, nanopartículas.

Toxic effects of iron oxide nanoparticles in *Eisenia andrei* and its ecotoxicological implications

Abstract

The possible toxic effects of goethite nanoparticles (NPs) were studied in earthworms (*Eisenia andrei*). Filter paper and artificial soil bioassays were performed for that matter. Furthermore, the influence of this NPs on the bioavailability and toxicity of an organic (Chlorpyrifos: CPF) and two metallic (Cd and Pb) contaminants was investigated. The toxic effects were evaluated through a battery of biomarkers. On the other hand, spectroscopic and electronic microscopy determinations were conducted to characterize different suspensions of NPs. Curiously, the Fe content in organisms exposed to NPs on filter paper (72 h) or in artificial soil (10 days) were always lower than the basal values, suggesting systemic effects that can be related to the alterations found in some biochemical parameters. In contrast, earthworms exposed to the mixture of NPs+CPF showed an increase in Fe levels. In the presence of NPs, a lower bioaccumulation of Pb and Cd was observed in comparison to the organisms exposed to the metals alone. Both results demonstrate that goethite NPs can affect soil organisms and show the complex interactions that can be verified with other pre-existing contaminants in the environment.

Keywords: biomarkers, contaminants, *Eisenia andrei*, goethite, nanoparticles.

AGRADECIMIENTOS

Es imposible llegar a este momento sin una mezcla de emociones. El doctorado ha sido una etapa de mucho trabajo, una etapa de formación profesional, intelectual y personal. Lo que me ha dejado sin dudas excede lo que está plasmado en esta tesis. He aquí mis agradecimientos para todos aquellos que de alguna u otra manera colaboraron en su desarrollo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA y al Departamento de Química Biológica por permitirme el uso de las instalaciones y el equipamiento, y por la formación académica recibida.

A mis directoras de Tesis. A Noemí, por abrirme las puertas del laboratorio de Tóxico y permitir que sea mi lugar de trabajo; y a Adriana, por sumarse a este proyecto a mitad de camino, valoro mucho tu aporte para llevar adelante este trabajo.

A mi consejera de estudios, la Dra. María del Carmen Ríos de Molina, por sus consejos y su ayuda en momentos críticos.

A la ANPCyT y CONICET por las becas otorgadas que posibilitaron la realización de este trabajo.

A la UBA, ANPCyT y CONICET por los subsidios otorgados a nuestro grupo de trabajo.

Al grupo “terrícola” de Tóxico, Norma, Marilú y Julio, por enseñarme con paciencia y dedicación a trabajar con las bichas, y por la calidez humana con la que enfrentan el trabajo científico, por los almuerzos-debate que aún extraño y por el café!

Julito, lo menos que te debía es un apartado en esta sección! Gracias totales por enseñarme todo lo que sé de las bichas, por tu colaboración durante los ensayos, por los consejos, oportunidades y por poner la oreja y voluntad siempre. Por el apoyo y la buena onda de todos los días que alivianan las largas jornadas en el labo, especialmente en los días no tan buenos.

A las docentes de Tóxico que ya no están: Sil, Marita, Estela y Marta, y a las nuevas: Carmen y Gaby C., por mostrar su interés en mi trabajo y por los gratos momentos compartidos.

A mis compañeros de mesada, Julián, Ornela, y Laura con quienes compartí largas jornadas de trabajo, viajes, congresos, y algunas “actividades extracurriculares”, muy necesarias en la vida del tesista!

A Dana y Ayelén, gracias por la ayuda con los trámites de becas y doctorado, por la buena onda y predisposición. Y a Mariano, por su asistencia informática en numerosas oportunidades.

A los vecinos de Tóxico: Pau K, Pau C, Lu, Mónica y Lis; a los vecinos de Micro: Diego, Rocío, Manuel, Gaby y Dani; a los vecinos de Biosensores: Federico, Albert y Mari; y a las chicas Nesse: Romi y Agus, por las “enriquecedoras” charlas de pasillo y la buena onda de siempre.

A Jimena y a Yanina del CM1 por enseñarme a usar el fluorómetro. Y a toda la gente de Micro por prestarme el freezer de -80 °C para guardar mis muestras.

A las chicas/os de Bedelía: Eva, Pato, Diego, Emiliano, Ariel, Sole, y especialmente a Ceci, con quienes compartí estos últimos meses de “gestación” de esta tesis.

Gracias a mi familia. A mi Mamá por ser mi fan N° 1, y hacer de mis logros una satisfacción personal. Por la libertad con la que me criaste, por tu apoyo incondicional y por las ricas comidas con las que me recibís después de 12 horas de viaje. A mi Abu, por la chispa que conserva con sus juveniles 91 años y por alentarme siempre ¡Las quiero infinito!

A mi tío Ismael por los ricos asados en familia que disfruté en cada visita a mis pagos, y a mi Tía Pitti, con quien comparto la afición por lo “Exacto”, por preocuparse siempre por mí, por los mensajitos y fotos que “abrazan” a la distancia. A mis primos, Pau, Diana, Fede y Yise, por estar siempre, por los viajes y aventuras compartidas durante estos años de doctorado ¡Los quiero mucho! Y a los peques de la familia: Lara, Feli, Oli y mi ahijado Mateo, quienes siempre me demuestran qué es lo más importante y me han dado luz en momentos de oscuridad. ¡Mi quarteto preferido!

A mis amigos de toda la vida: Ale, Anita, Jules, Andre y Gaby. Nuestra amistad ya no conoce kms y continentes! Brindo por muchas más juntadas, de esas que enriquecen el alma. Y ahora se viene la próxima generación con Joa, Isa y Lucía.

Ale, a vos también te debo un párrafo aparte. Sos incondicional, aun estando a más de 13.000 kms de distancia. Gracias por compartir las vicisitudes de la vida académica, por enseñarme a reírme de lo malo y disfrutar de lo bueno. Por hacerme ver el lado “luminoso” en medio de la tormenta, siempre para adelante y con actitud positiva. Sos de fierro!

A mis amigas “bioquis” Flavia, Gise y Eri, y a las “químicas” Pame, Yesi y Lore, mi grupo facultativo. Hemos recorrido y crecido un montón desde aquellos primeros días en la Facena, gracias por esta amistad y por el dúo dinámico que nos regaló el 2017: Bauti y Simón.

A mis amigos “porteños” (aunque somos más federales que otra cosa!): Clarita, Gaby A y Gaby D. Este tiempo en la city ha sido mucho más ameno con su compañía. Por más salidas, terapia de grupo y por más Malajunta!

A las chicas de Pilates, por la buena onda de todas las mañanas, en especial a Meli, gracias amiga por siempre estar!

A todos los que pudiera estar olvidando, que me alentaron, se preocuparon y se alegraron porque llegue a concretar este trabajo de Tesis Doctoral, simplemente gracias...

Empieza por hacer LO NECESARIO
luego haz LO POSIBLE
y de pronto estarás logrando
LO IMPOSIBLE.

San Francisco de Asís

Libres son quienes crean,
no quienes copian,
y libres son quienes piensan,
no quienes obedecen.
Enseñar es enseñar a dudar.

Eduardo Galeano

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1 NANOPARTÍCULAS	2
1.1 <i>Propiedades de NPs</i>	3
1.2 <i>NPs naturales</i>	5
1.3 <i>Destino y transformaciones de NPs sintéticas en el ambiente</i>	8
1.4 <i>NPs y la interfase biológica</i>	11
2 CONTAMINANTES METÁLICOS Y ORGÁNICOS.....	17
2.1 <i>Metales</i>	17
2.1.1 <i>Distribución de metales en el ambiente</i>	17
2.1.2 <i>Metales pesados: Cadmio y Plomo</i>	18
2.2 <i>Pesticidas organofosforados: Clorpirifos</i>	20
2.2.1 <i>Propiedades físico-químicas del clorpirifos</i>	21
2.2.2 <i>Mecanismo de acción</i>	23
3 LAS LOMBRICES TERRESTRES COMO ORGANISMOS BIOINDICADORES	25
3.1 <i>Clasificación</i>	26
3.2 <i>Aspectos básicos de la biología y ecología de lombrices</i>	28
3.3 <i>Sistemas y aparatos de las lombrices</i>	30
3.4 <i>La lombriz de tierra Eisenia andrei</i>	32
4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
4.1 <i>HIPÓTESIS DE TRABAJO</i>	34
4.2 <i>OBJETIVO GENERAL</i>	34
4.3 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	34

II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5 ORGANISMOS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS.....	36
6 NANOPARTÍCULAS UTILIZADAS	36
7 BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN	37
7.1 <i>Exposición en papel</i>	37
7.2 <i>Exposición a Suelo Artificial (SA)</i>	38
7.3 <i>Bioensayos con 2-cloroacetamida</i>	39
8 EXPOSICIÓN DE LOMBRICES <i>E. ANDREI</i> A NPs DE GOETHITA	39
8.1 <i>Ingreso de NPs de goethita</i>	39
8.1.1 Bioensayos en Papel	39
8.1.2 Bioensayo en Suelo Artificial.....	40
8.1.3 Ingreso de NPs de goethita. Análisis de los niveles de hierro	41
8.2 <i>Investigación de parámetros relacionados con procesos de estrés oxidativo</i>	42
8.2.1 Actividad de Catalasa	42
8.2.2 Actividad de Glutación S-transferasa	43
8.2.3 Niveles de Glutación Oxidado y Reducido	43
8.2.4 Evaluación de capacidad antioxidante total	44
8.2.5 Evaluación de daño por procesos de estrés oxidativo	46
9 INTERACCIÓN DE NPs DE GOETHITA CON METALES	47
9.1 <i>Análisis de metales. Bioensayos en papel</i>	47
10 INTERACCIÓN DE NPs DE GOETHITA CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS (CLORPIRIFOS).	47
10.1 <i>Actividad de Acetilcolinesterasa</i>	48
10.2 <i>Actividad de Carboxilesterasas</i>	49

10.3	<i>Ingreso de nano-goethita en presencia de CPF</i>	49
10.4	<i>Estudios espectroscópicos UV-Visible</i>	49
10.5	<i>Estudios de Microscopía</i>	50
11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
III.	RESULTADOS	52
12	CARACTERIZACIÓN DE NPS DE GOETHITA.....	53
13	BIOENSAYOS CON 2-CLOROACETAMIDA	55
14	INGRESO DE GOETHITA EN <i>E. ANDREI</i>	55
14.1	<i>Bioensayos en papel</i>	55
14.1.1	NPs de goethita	55
14.1.2	Goethita no-nano	56
14.2	<i>Bioensayos en Suelo Artificial</i>	57
15	PARÁMETROS RELACIONADOS CON PROCESOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>E. ANDREI</i> EXPUESTAS A NPS DE GOETHITA.....	59
15.1	<i>Actividad de Catalasa (CAT)</i>	59
15.2	<i>Actividad de Glutación-S-Transferasa (GST)</i>	60
15.3	<i>Niveles de Glutación Oxidado (GSSG) y Reducido (GSH)</i>	60
15.4	<i>Capacidad antioxidante total (TOSC)</i>	62
15.5	<i>Daño por procesos de estrés oxidativo: Peroxidación de lípidos</i>	62
16	INTERACCIÓN DE NPS DE GOETHITA CON CONTAMINANTES.....	63
16.1	<i>Metales: Cd y Pb</i>	63
16.1.1	Elección de la concentración de trabajo	63
16.1.2	Influencia de nano-goethita en el ingreso de Cd	64

16.1.3	Influencia de nano-goethita en el ingreso de Pb	65
16.1.4	Ingreso de nano-goethita en presencia de metales.....	66
16.2	<i>Clorpirifos (CPF)</i>	68
16.2.1	Estudios de interacción CPF – NPs por espectroscopía UV-vis y SEM	68
16.2.1.1	Estudios por espectroscopía UV-visible.....	68
16.2.1.2	Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	71
16.2.2	Estudios <i>in vivo</i>	75
16.2.2.1	Elección de la concentración de trabajo	75
16.2.2.2	Interacción entre nano-goethita y CPF.....	77
16.2.2.3	Ingreso de nano-goethita en presencia de CPF.....	84
IV.	DISCUSIÓN	86
17	INGRESO DE GOETHITA EN <i>E. ANDREI</i>	87
18	PARÁMETROS RELACIONADOS CON PROCESOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>E. ANDREI</i> EXPUESTAS A NPs DE GOETHITA	90
19	INTERACCIÓN DE NPs DE GOETHITA CON CONTAMINANTES.....	93
19.1	<i>Metales: Cd y Pb</i>	93
19.2	<i>Clorpirifos</i>	96
V.	CONCLUSIONES	101
VI.	BIBLIOGRAFÍA	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Fracción de moléculas en una partícula que se encuentran en la superficie en función del tamaño de partícula.....	3
Fig. 2. Imágenes obtenidas por TEM de NPs de goethita.	8
Fig. 3. Rutas y procesos de emisión, y posible exposición de NPs en el ambiente.	9
Fig. 4. Transformaciones, transporte y biodisponibilidad de NPs de óxidos metálicos en ambientes terrestres.	10
Fig. 5. Esquema de las reacciones catalizadas por catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa.....	13
Fig. 6. Mecanismo de la peroxidación lipídica.....	14
Fig. 7. Esquema secuencial de respuestas de distintos niveles de organización biológica a la exposición a un contaminante.	16
Fig. 8. Estructura general de los plaguicidas organofosforados.	21
Fig. 9. Estructura química del clorpirifos.	21
Fig. 10. Principales características de las distintas clases de lombrices terrestres.	27
Fig. 11. Anatomía de la lombriz de tierra.....	29
Fig. 12. Corte transversal del cuerpo de la lombriz de tierra	29
Fig. 13. Reproducción de lombrices.....	32
Fig. 14. Lombriz <i>Eisenia andrei</i>	33
Fig. 15. Impregnado de papeles con NPs de goethita.....	39
Fig. 16. Exposición de <i>E. andrei</i> a NPs de goethita en suelo artificial.	40
Fig. 17. Esquema de trabajo para la medición de GSH y GSSG.....	44
Fig. 18. Imágenes obtenidas por SEM de suspensión de NPs de goethita con diferentes magnificaciones	53
Fig. 19. Espectro EDX de la suspensión de NPs de goethita.	54
Fig. 20. Valores de concentración de Fe en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas por distintos tiempos a NPs de goethita en papel.....	56
Fig. 21. Valores de concentración de Fe en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas por 72 h a una suspensión de goethita no-nano.....	57
Fig. 22. Valores de concentración de Fe en lombrices <i>E. andrei</i> a suelo artificial durante 18 días.....	58

Fig. 23. Valores de concentración de Fe en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas a distintos niveles de NPs de goethita en suelo artificial durante 10 días..	58
Fig. 24. Actividad de CAT en lombrices expuestas a NPs a distintos tiempos.	59
Fig. 25. Actividad de GST en lombrices expuestas a NPs a distintos tiempos.	60
Fig. 26. Valores de GSH y GSSG en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas a NPs a distintos tiempos.	61
Fig. 27. Valores del ensayo de TOSC en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas por 72 h a una suspensión de NPs de goethita.....	62
Fig. 28. Niveles de TBARS en <i>E. andrei</i> expuestas a NPs de goethita a distintos tiempos.	63
Fig. 29. Curva de incorporación de Cd en función del nivel de exposición.....	64
Fig. 30. Valores de concentración de Cd en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas en papel por 72 h al metal en presencia y ausencia de NPs de goethita.....	65
Fig. 31. Valores de concentración de Pb en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas en papel por 72 h al metal en presencia y ausencia de NPs de goethita.....	66
Fig. 32. Valores de Fe de lombrices expuestas por 72 h a papeles de filtro impregnados con mezclas de metal (Cd o Pb)+NPs de goethita, y con Cd, Pb o NPs solamente.	67
Fig. 33. Espectros UV-visible de: A) CPF B) NPs de goethita, C) y D) mezcla NPs+CPF luego de 5 min y 20 min de incubación a temperatura ambiente	69
Fig. 34. Espectros UV-visible de A) CPF, B) mezcla de NPs+CPF y C) mezcla de NPs+CPF luego del segundo agregado de NPs	70
Fig. 35. Espectros UV-Visible de A) CPF, B) goethita no-nano, C) mezcla de goethita no-nano + CPF, D) mezcla de goethita no-nano + CPF luego del segundo agregado de goethita	71
Fig. 36. Imágenes SEM de A) suspensión de NPs de goethita en 100.000 X, B) suspensión de NPs de goethita en 200.000 X, C) mezcla NPs+CPF en 100.000 X, D) mezcla NPs+CPF en 200.000 X E) mezcla NPs+CPF en 70.000 X.....	72
Fig. 37. Espectro EDX de la mezcla de NPs+CPF.....	73
Fig. 38. Espectro EDX de la solución madre de CPF.	74
Fig. 39. Efectos de concentraciones crecientes de CPF sobre la actividad de AChE de lombrices <i>E. andrei</i>	75
Fig. 40. Efectos de concentraciones crecientes de CPF sobre la actividad de CES de lombrices <i>E. andrei</i>	76

Fig. 41. Actividad de AChE en sobrenadantes de lombrices expuestas NPs, CPF y a la mezcla de NPs+CPF por A) 24 h B) 48 h y C) 72 h.....	78
Fig. 42. Actividad de AChE en pellets y sobrenadantes de lombrices controles.	79
Fig. 43. Relación de la actividad de AChE en pellets y sobrenadantes de lombrices expuestas a CPF y a la mezcla de NPs+CPF. A) Relación pellet/sobrenadante en lombrices expuestas 48 h. B) Relación pellet/sobrenadante en lombrices expuestas 72 h..	80
Fig. 44. Actividad de CES en lombrices expuestas a NPs, CPF y a la mezcla de NPs+CPF por A) 24 h B) 48 h y C) 72 h.....	82
Fig. 45. Lombrices <i>E. andrei</i> expuestas por 72 h a papeles de filtro impregnados con a) agua destilada (control) b) NPs de goethita, c) y d) CPF, e) mezcla NPs+CPF..	83
Fig. 46. Valores de concentración de Fe en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas a la mezcla binaria de NPs+CPF a A) 24 h y B) 48 h.....	84
Fig. 47. Valores de concentración de Fe en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas por 72 h a CPF y a la mezcla binaria de NPs+CPF.....	85
Fig. 48. Reacción de Fenton.....	93
Fig. 49. Reacción de Haber-Weiss	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. NPs de óxidos y oxihidróxidos de hierro naturales.	7
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del clorpirifos.....	22
Tabla 3. Esquema del Bioensayo: Impregnación de Papeles.	48
Tabla 4. Análisis elemental por EDX de la suspensión de NPs de goethita.	54
Tabla 5. Valores de CL ₅₀ de 2-cloroacetamida de lombrices expuestas en papel (72 h) en distintos periodos de tiempo.	55
Tabla 6. Relación GSH /GSSG en lombrices <i>E. andrei</i> expuestas a NPs de goethita por distintos tiempos.....	61
Tabla 7. Análisis elemental EDX de la mezcla NPs+CPF.	74
Tabla 8. Análisis EDX de la solución madre de CPF.....	74
Tabla 9. Concentración de CPF que causa el 50 % de inhibición (CE ₅₀) en la actividad de AChE, y los cuatro parámetros de regresión no lineal para AChE y CES.	76

Abreviaturas y algunas definiciones

AChE	Acetilcolinesterasa
ABAP	2,2'-azobisaminopropano
ANOVA	Analysis of variance (análisis de la varianza)
AsChI	Ioduro de acetiltiocolina
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalasa
CDNB	Clorodinitrobenzeno
CE ₅₀	Concentración inhibitoria 50: concentración que inhibe al 50% de la población estudiada respecto de los controles, en condiciones determinadas.
CL ₅₀	Concentración letal 50: concentración de una sustancia que causa la muerte del 50% de los organismos evaluados en el ensayo.
CES	Carboxilesterasas
CPF	Clorpirifos
D.E.	Desviación estándar
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-2-bis-nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDX	Energía dispersiva de rayos X
EROs	Especies reactivas del oxígeno
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSH-t	Glutación total
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasa
IARC	International Agency for Cancer Research
IRAM	Instituto Argentino de Normalización y Certificación
ISO	International Organization for Standardization

KMBA	Ácido α -ceto- γ -metilbutírico
K_{ow}	Coefficiente de partición octanol/agua
MDA	Malondialdehído
MeO	Óxidos metálicos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEM	N-etilmaleimida
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OPs	Organofosforados
OPT	o-ftaldehído
PVC	Policloruros de vinilo
SA	Suelo Artificial
SEM	Scanning electron microscope (microscopio electrónico de barrido)
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Tiobarbituric reactive substances (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)
TEPP	Tetraetilpirofosfato
TOSC	Total antioxidant scavenging capacity (capacidad antioxidante total)
TEM	Transmission electron microscope (microscopio de transmisión electrónica)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
US-EPA	US Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de EE.UU)
WHO	World Health Organization

I. Introducción



1 Nanopartículas

En los últimos años, el desarrollo de la nanotecnología ha crecido hasta convertirse en una industria multibillonaria. De acuerdo a revisiones del año 2012, alrededor de 800 productos de consumo en el mercado incorporaron nanopartículas (NPs) en sus formulaciones debido a sus singulares propiedades con aplicación tecnológica (Kahru e Ivask, 2012). En este sentido, la actualización de la base de datos elaborada por el Departamento de Ingeniería Ambiental de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU-Environment), el Consejo Ecológico y del Consumidor danés refleja que para el 2017 ya se habían registrado más de 3.000 productos de consumo conteniendo NPs (DTU Environment, 2018).

Las NPs son partículas que tienen un tamaño inferior a 100 nm en al menos dos de sus dimensiones (Nowack y Bucheli, 2007). Han encontrado aplicación en diferentes campos de la medicina, electrónica, óptica, cosmética, alimentos pinturas, catalizadores, lubricantes, biosensores, y agroquímicos (Dowling, 2004; Handy et al., 2008; Kahru y Dubourguier, 2010; Khot et al., 2012; Rivero et al., 2015). También en productos para la eliminación de desechos y la producción de combustible y energía, las denominadas nanotecnologías “amigables” con el ambiente (Hussein, 2015; Hyeon et al., 2015; Najafpour et al., 2016). En este aspecto, los nanopesticidas representan un desarrollo emergente en los últimos años (Kookana et al., 2014).

La versatilidad de estas partículas es realmente asombrosa ya que incluye desde el desarrollo de vidrios autolimpiantes, parches antimicrobianos para facilitar la cicatrización de heridas y quemaduras, hasta agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas patologías (Dowling, 2004; Sanvicens y Marco, 2008). Paralelamente, se están investigando potenciales aplicaciones de las NPs para procesos de remediación de aguas y suelos contaminados (Vunain et al., 2016).

El empleo industrial de las NPs puede conducir a su liberación al ambiente ejerciendo un impacto cuyas consecuencias aún no estamos en condiciones de predecir adecuadamente. Las NPs pueden ingresar al ambiente no solo a través de los procesos de producción o aplicación, sino también a través de la eliminación de los residuos de fabricación, los

desechos municipales y de productos envejecidos a la intemperie. Una vez en el ambiente, las NPs pueden llegar a causar efectos citotóxicos y genotóxicos (Savolainen et al., 2010; Kahru e Ivask, 2012).

1.1 Propiedades de NPs

Las NPs cuentan con propiedades físicas y químicas muy diferentes a las de las partículas de igual composición en escala convencional, lo cual puede plantear nuevos riesgos para la salud humana y el ambiente. Propiedades como la elevada área superficial y reactividad que presentan dichas partículas son utilizadas para diversas aplicaciones en ciencia y tecnología (European Commission, 2006; Amde et al., 2017). A nanoescala, las fuerzas químicas y físicas gobiernan el ensamblaje de átomos o moléculas, dando lugar a estructuras con una elevada relación superficie-volumen o superficie-masa. Esta elevada área superficial es responsable de una mayor reactividad, una mayor adsorción de sustancias químicas y una alta actividad catalítica. A medida que el diámetro de partícula disminuye, el número de moléculas superficiales expuestas aumenta abruptamente (**Fig. 1**) (Oberdörster et al., 2005).

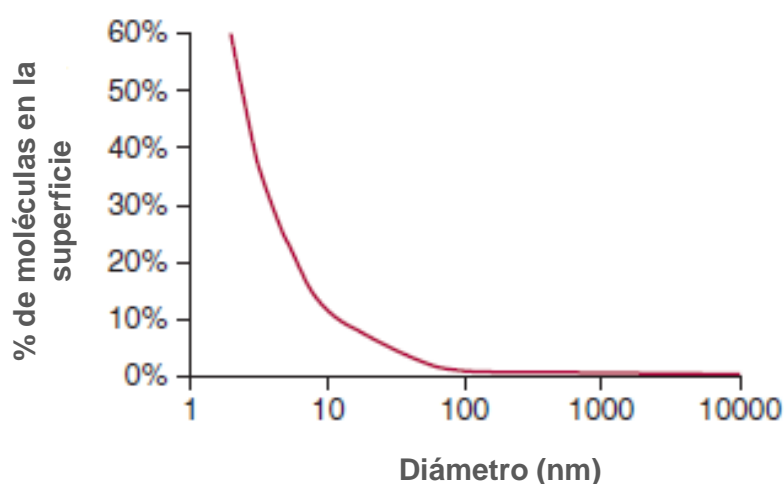


Fig. 1. Fracción de moléculas en una partícula que se encuentran en la superficie en función del tamaño de partícula (adaptado de Fissan, 2008).

El gran número de átomos o moléculas superficiales expuestas expone defectos superficiales, sitios vacantes y enlaces químicos débiles que aumentan la reactividad química y el potencial *redox*.

Las propiedades de superficie que presentan las NPs también contribuyen al modo y al alcance de sus efectos biológicos. La composición, energía, carga, y reactividad superficial gobiernan diferentes tipos de interacciones con biomoléculas y sistemas biológicos (Zhao et al., 2016).

De acuerdo con algunos investigadores, el área superficial juega un papel importante en la toxicidad de las NPs (Oberdörster, 2001; EC, 2011). Asimismo, la composición y la carga superficial han sido establecidas como factores principales de su toxicidad (Qiu et al., 2010; Bozich et al., 2014; Silva et al., 2014). En este sentido, hay que tener en consideración que la carga inicial de una partícula puede verse alterada debido a las interacciones con el medio de exposición (Stankus et al., 2011).

La carga superficial puede revelar la superficie nativa de las NPs o la adsorción de iones y biomoléculas en la interfase, lo que influirá en la estabilidad de la dispersión de NPs en soluciones acuosas (Zhao et al., 2016). La carga superficial también puede influir en el ingreso celular de las partículas. Varios estudios de interacciones electrostáticas entre NPs cargadas y la membrana celular han resaltado la importancia de la carga superficial de las NPs en este campo. Por ejemplo, He et al., (2010) observaron que las NPs de quitosano con mayor carga superficial (ya sea positiva o negativa) son captadas por macrófagos a mayor velocidad en comparación con NPs con carga neutra; esto sugiere la importancia de la interacción electrostática en los procesos de fagocitosis (Behzadi et al., 2017).

Las NPs con elevada área superficial pueden adsorber otras moléculas orgánicas contaminantes, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales son potencialmente cancerígenos (Yang et al., 2006; Wang et al., 2014) y quinonas que participan en reacciones *redox* y en la generación de radicales libres (Nel et al., 2006).

La energía superficial de las NPs es una propiedad a considerar para comprender los fenómenos de agregación y disolución (Zhao et al., 2016). Algunas NPs presentan elevada

energía superficial, lo cual promueve la agregación de las partículas y la adsorción de constituyentes del medio (Walczyk et al., 2010).

De igual forma, otras propiedades de superficie que presentan algunas NPs como la hidrofiliidad e hidrofobicidad pueden contribuir a las interacciones con moléculas biológicas. La hidrofiliidad superficial de NPs cargadas aumenta su capacidad de suspensión en agua, mientras que, la hidrofobicidad superficial de fullerenos y de grafeno hace que repelan al agua y permite que puedan sortear las membranas lipídicas y entrar en las células blanco (Titov et al., 2010; Nakanishi et al., 2014).

Se ha demostrado también que la toxicidad de las NPs puede controlarse mediante la modificación de su superficie. Yin et al., (2010) observaron que NPs coloidales de fullereno produjeron altos niveles de citotoxicidad debido a la formación de anión superóxido y peroxidación lipídica; pero al agregar grupos hidroxilo a su superficie, la toxicidad se redujo significativamente.

1.2 NPs naturales

La composición química de estas NPs puede ser orgánica o inorgánica. Pueden tener origen atmosférico, geogénico o biogénico (Nowack y Bucheli, 2007). Las NPs naturales inorgánicas están presentes en el suelo (Banfield y Zhang, 2001; Waychunas et al., 2005); también se encuentran en la atmósfera, como aerosoles y son precursoras de la formación de partículas más grandes que influyen en el clima, la visibilidad y el transporte de contaminantes. Entre las orgánicas, se encuentran las partículas ultrafinas del hollín, que son generadas en la combustión incompleta de combustibles fósiles (Nowack y Bucheli, 2007).

Algunas NPs naturales son de origen interestelar, debido al impacto de los cometas y asteroides en la tierra (Buzea et al., 2007). Otras se formaron a partir de componentes principales del suelo, carbón, lagos distróficos, agua del océano y aguas subterráneas superficiales, y son similares a las que se sintetizan en el laboratorio (Sachindri y Kalaichelvan, 2013). Por ejemplo, las características que presentan las NPs de Ag resultantes

de la erosión en el ambiente en presencia de ácidos húmicos, son similares a las de las NPs desarrolladas en el laboratorio (Pachapur et al., 2015).

Las NPs se pueden encontrar en el ambiente en variadas composiciones y conformaciones. La mayoría consiste en productos de bajo peso molecular provenientes de la descomposición biológica (materia húmica), y minerales generados durante la erosión química de rocas, principalmente óxidos y oxihidróxidos de hierro, manganeso, aluminio y aluminosilicatos (Sharma et al., 2015).

La abundancia de oxígeno, hierro e hidrógeno sobre la corteza terrestre ha fomentado la ocurrencia de óxidos y oxihidróxidos de Fe en ambientes acuáticos y terrestres (Guo y Barnard, 2013). Se sabe que 10 de los 14 óxidos e oxihidróxidos de Fe conocidos se encuentran en la naturaleza, siendo la hematita, magnetita y goethita los más abundantes (Jambor y Dutrizac, 1998). Muchos procesos biogeoquímicos involucran óxidos y oxihidróxidos de Fe que funcionan como sumideros o donantes de electrones, absorbentes, nutrientes y como magnetoreceptores. El ciclo del hierro, que generalmente comienza a partir de rocas primarias que contienen Fe (II) (por ejemplo, pirita), es común y activo en muchos ecosistemas, como los marinos (Moore et al., 2002) y sedimentarios (Maloof et al., 2007). En estos procesos, las NPs de óxidos y oxihidróxidos de Fe se forman y persisten en el ambiente bajo determinadas condiciones *redox* y de pH (Guo y Barnard, 2013).

Debido a su gran área superficial y elevada reactividad química, las NPs de óxidos y oxihidróxidos de Fe contribuyen significativamente a la inmovilización de metales pesados (por adsorción o incorporación), a la variación de pH y potencial *redox* (mediante reacciones biogeoquímicas) y a la provisión de nutrientes esenciales para animales y plantas, especialmente en aguas abiertas deficientes en hierro (Guo y Barnard, 2013).

El suelo es una estructura heterogénea compuesta por minerales, materia orgánica, microorganismos vegetales y animales, aire y agua. Es una capa delgada que se ha formado muy lentamente, a través de los siglos, con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, del viento, y de los cambios de temperatura (Cornell y Schwertmann, 2003). Su temperatura es generalmente inferior a 60 °C, pero puede aumentar transitoriamente varios grados Celsius en ocasionales eventos de incendios forestales. Estos incendios

generan cenizas, lo cual conduce a ambientes con elevado pH (hasta 10) que, junto con la participación de los microorganismos, modifican los óxidos de hierro en el suelo superior (Nørnberg et al., 2009). Las condiciones microambientales en los poros, tales como las presiones parciales de O₂ y CO₂, el potencial *redox* y la humedad, varían ampliamente con el espacio y el tiempo. En general, las NPs de óxidos de hierro se forman en ambientes de baja temperatura, y no en procesos de alta temperatura, como las plumas de cenizas volcánicas, que son una de las fuentes primarias de NPs inorgánicas naturales (Guo y Barnard, 2013).

NPs naturales	Tamaño (nm)	Forma	Ambiente
Ferrihidrita	2-10	Irregular y esférica	Cerca de aguas aireadas, suelos y biota
Goethita	Pocos nm hasta macroscópico	Acicular	Suelos y aguas (medio alcalino y ácido)
Hematita	Varios nm hasta macroscópico	Redondas y rombohédricas	Suelos (secos en zonas cálidas) y aguas
Magnetita	Varios nm hasta macroscópico	Octaédricas y rombo-dodecaédricas	Suelos anóxicos, sedimentos y biota

Tabla 1. NPs de óxidos y oxihidróxidos de hierro naturales (adaptado de Guo y Barnard, 2013).

En la **Tabla 1** se muestran algunas de las NPs de óxidos y oxihidróxidos de hierro naturales. La goethita (α -FeOOH) es el oxihidróxido de hierro más común en los suelos debido a su alta estabilidad termodinámica en condiciones ambientales (Moore et al., 2002). Se encuentra también comúnmente en varios ambientes acuáticos, tanto a pH ácido como alcalino. En algunos ambientes (enriquecidos con silicato, fosfato y materia orgánica), la nano goethita se encuentra principalmente en forma precipitada (van der Zee et al., 2003), y se obtiene mayoritariamente a partir de otras NPs de oxihidróxidos relativamente metaestables (como la ferrihidrita) en suelos y aguas.

El resultado de la evolución morfológica de las NPs de goethita en medio acuoso es la tendencia hacia el equilibrio termodinámico, independientemente de sus morfologías originales. Su morfología es acicular, es decir, en forma de agujas (**Fig. 2**) (Cornell y

Schwertmann, 2003). Los nanocristales de goethita de los suelos y sedimentos pueden mostrar las morfologías aciculares habituales, pero bajo pobre crecimiento pueden predominar formas irregulares. En suelos, los nanocristales de goethita pueden agregarse dando lugar a orientaciones específicas, indicando un crecimiento de fijación orientada a partir de NPs de ferrihidrita o de una nucleación rápida a partir de goethita recién formada (Konishi et al., 2012).

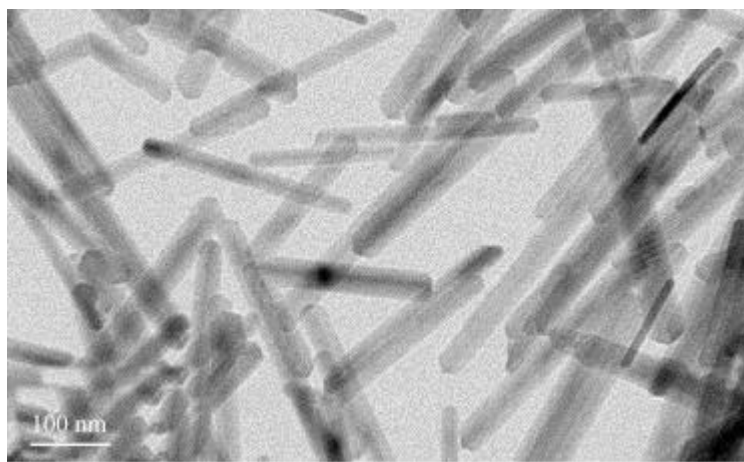


Fig. 2. Imágenes obtenidas por TEM de NPs de goethita donde se observa la morfología acicular de los bastones de goethita (Lee Penn et al., 2006).

1.3 Destino y transformaciones de NPs sintéticas en el ambiente

Las rutas y los procesos más importantes de emisión y exposición de NPs de origen antropogénico en el ambiente se muestran en la **Fig. 3**. La liberación de estas NPs se origina a partir de varias fuentes, como en el punto de producción (fuente puntual), fuente no puntual, liberaciones accidentales e intencionales. Una vez en el ambiente, pueden formar agregados y algunas se adsorben sobre los sedimentos o sobre las partículas del suelo (Nowack y Bucheli, 2007). Pueden ser transportadas por aire, agua o tierra para concentrarse, depositarse o dispersarse a través de diversos procesos. En el caso de NPs de óxidos metálicos, las reacciones *redox* y la adsorción de aniones (por ejemplo, sulfatos y silicatos, entre otros) generalmente inician los procesos de disolución. Fenómenos como la

cloración, sulfuración y oxidación son algunos de los principales responsables de la transformación y disolución de estas NPs en el ambiente.

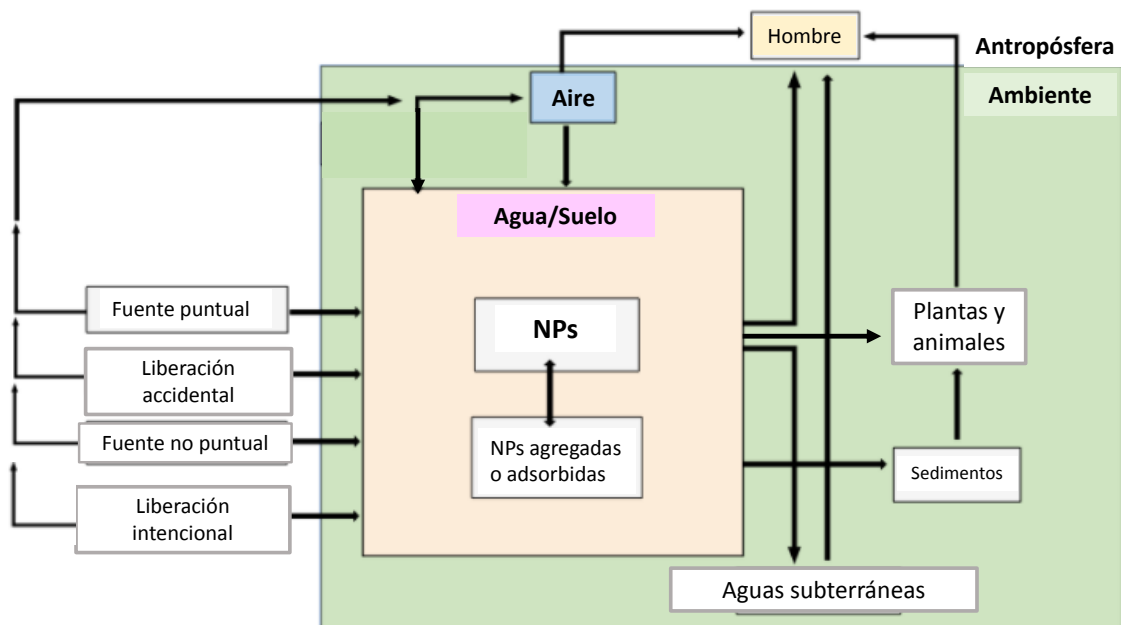


Fig. 3. Rutas y procesos de emisión, y posible exposición de NPs en el ambiente (adaptado de Nowack y Bucheli, 2007).

Las principales rutas a través de las cuales las NPs sintéticas de óxidos metálicos llegan al suelo son por la descarga de residuos (en especial, de aguas residuales y de rellenos sanitarios), por liberación intencional de fertilizantes y pesticidas que contienen NPs en sus formulaciones, y de manera casual o accidental por el uso de productos que los contienen. Existe información limitada sobre el destino de estas NPs en ambientes terrestres en comparación con el ambiente acuático. En parte esto se debe a las técnicas analíticas existentes para caracterizar y realizar estudios sobre los procesos de transformación en una matriz compleja como lo es el suelo. La mayoría de los estudios se han basado en suspensiones del suelo (Ju-Nam y Lead, 2016).

Hay transformaciones químicas (disolución, reacciones *redox* y otras) y transformaciones físicas (cambio en tamaño y morfología, difusión y/o agregación) (Fig. 4) que pueden iniciarse en el sistema terrestre (Pachapur et al., 2016; Peijnenburg et al., 2016).

La agregación se define como la asociación de partículas primarias mediante un enlace fuerte, mientras que la aglomeración se define como la asociación por un enlace débil causado por las fuerzas de Van der Waals (Jiang et al., 2009). Sin embargo, en la bibliografía sobre estudios de exposición de NPs en agua y suelo, el término “agregación” se usa en casos donde posiblemente solo se ha producido aglomeración. Por lo que se optará por el uso de “agregación” para referirse a esta transformación (Tourinho et al., 2012).

La agregación de NPs de óxidos metálicos en los sistemas terrestres está asociada con sus interacciones entre las partículas o con otros componentes del sistema que conducen a homo o hetero-agregaciones, respectivamente. Es también uno de los procesos que pueden afectar el destino y la biodisponibilidad de las NPs en los sistemas terrestres (Cornelis et al., 2014).

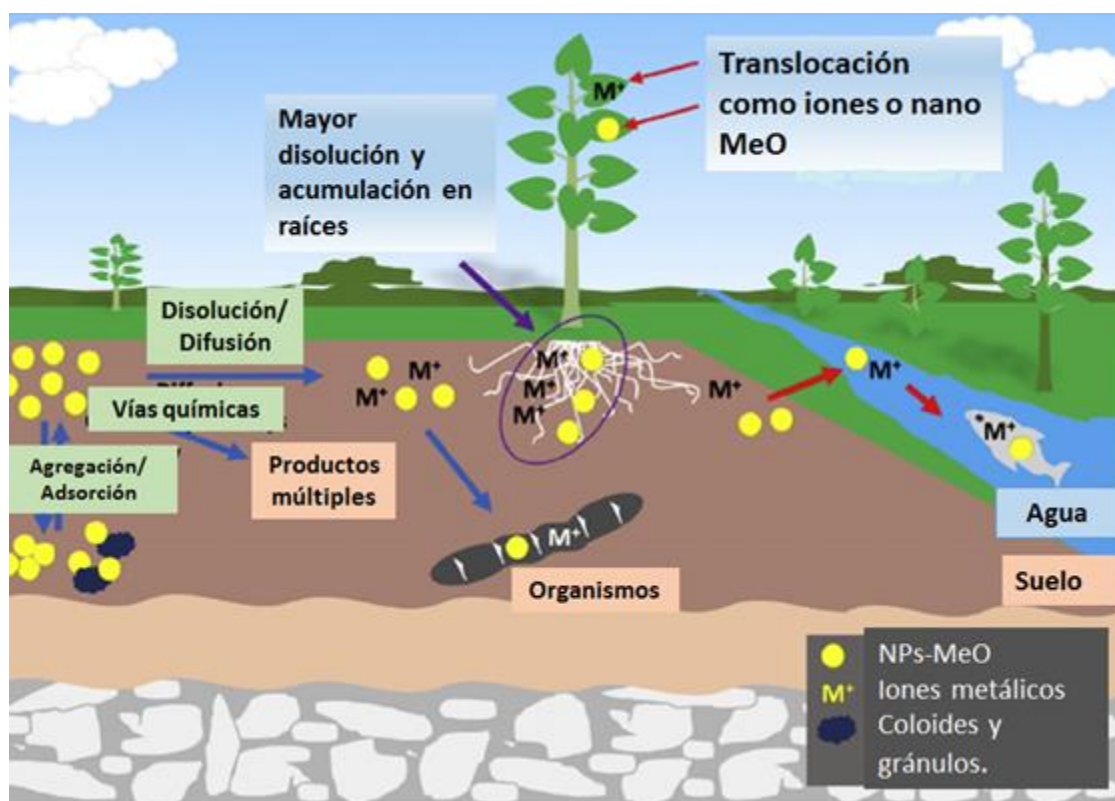


Fig. 4. Transformaciones, transporte y biodisponibilidad de NPs de óxidos metálicos en ambientes terrestres (adaptado de Amde et al., 2017).

La disolución es otra de las transformaciones que sufren las NPs de óxidos metálicos en suelos, principalmente debido al agua de lluvia. Algunas NPs metálicas son termodinámicamente inestables y experimentan disolución química si no existen restricciones cinéticas (por ejemplo, un recubrimiento superficial insoluble en agua). La disolución ocurre cuando un ión se separa de la partícula y migra a través de la doble capa eléctrica hacia la solución (Borm et al., 2006). La cinética de disolución depende del tipo y la propiedad de los suelos, además de las propiedades relacionadas con las NPs, y su forma de introducción a los suelos (ya sea como suspensión o polvo) (Amde et al., 2017).

Dado que las sustancias orgánicas del suelo tienen carga neta negativa bajo condiciones ambientales, éstas se adsorben a las superficies de las NPs de óxidos metálicos, predominantemente a través del intercambio de ligandos e interacciones electrostáticas, mejorando así la estabilidad de estas NPs en el ambiente (Ju-Nam y Lead, 2016).

Además, las NPs de óxidos metálicos pueden interactuar con numerosos contaminantes preexistentes en el ambiente terrestre, como herbicidas, pesticidas, aniones y metales pesados (Pachapur et al., 2016). Estas interacciones podrían verse favorecidas por la elevada área superficial de las NPs. Asimismo, la interacción de NPs con contaminantes puede aumentar o reducir la toxicidad de estos compuestos en el medio.

1.4 NPs y la interfase biológica

La biodisponibilidad de las NPs de óxidos metálicos depende en gran medida de las transformaciones que estas partículas sufren en el ambiente (Amde et al., 2017). En este sentido, cuando las NPs interactúan con organismos del suelo se enfrentan a una variedad de cambios en su entorno, ya que éstos pueden introducir enzimas y agentes quelantes (como ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos, proteínas, y azúcares) capaces de transformar a las NPs en formas más biodisponibles (Cornelis et al., 2014; Schwabe et al., 2015). A su vez, aquellas NPs que experimentan procesos de oxidación, reducción, disolución e interactúan con la superficie celular pueden penetrar fácilmente en las células (Amde et al., 2017). La difusión pasiva, la difusión facilitada, el transporte activo y la endocitosis son

algunos de los mecanismos propuestos como vías de ingreso celular de NPs de óxidos metálicos y sus productos de transformación (Schultz et al., 2015).

Asimismo, las NPs pueden interactuar también con contaminantes preexistentes alterando su biodisponibilidad y potenciales efectos tóxicos. Las posibles interacciones entre NPs, contaminantes y organismos pueden conducir a que el contaminante se adsorba sobre las NPs, reduciendo así la concentración libre de ambos componentes, disminuyendo su biodisponibilidad. Por otra parte, si en las células ingresan NPs con los contaminantes adsorbidos, la consecuencia puede ser un efecto tóxico, ya sea causado por las NPs, por el contaminante o por un sinergismo entre ambos. También podría ocurrir que no se observe ningún efecto si el contaminante adsorbido no está biodisponible. Sin embargo, en la bibliografía no se encuentran muchos estudios acerca de estas interacciones (Canesi et al., 2015). Por lo tanto, los efectos de los contaminantes coexistentes también deberían considerarse en el estudio del destino de NPs de óxidos metálicos en el ambiente (Amde et al., 2017).

Por otro lado, se ha comprobado en varios modelos experimentales que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos de toxicidad de diversos xenobióticos (Xue et al., 2009). El estrés oxidativo se produce como resultado del desbalance entre especies prooxidantes (especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno y radicales libres) y las defensas antioxidantes. Este estado metabólico está caracterizado por la activación de sistemas antioxidantes, y, cuando los mismos son superados, se puede generar daño a biomoléculas de vital importancia como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Birben et al., 2012).

En organismos vivos, se considera que uno de los mecanismos más importantes involucrados en la citotoxicidad de las NPs consiste en la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) que pueden derivar en procesos de estrés oxidativo (Moore, 2006; Curieses et al., 2017; Goswami et al., 2017). Las NPs pueden entrar en las células e interactuar con estructuras subcelulares. Su ingreso en mitocondria y núcleo abre la posibilidad de disminución de las defensas antioxidantes y/o aumento en la producción de EROs (Moore, 2006).

Para minimizar el daño producido por las EROs los organismos poseen defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Las enzimas antioxidantes (**Fig. 5**) incluyen a la superóxido dismutasa (SOD) que convierte el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2), y a la catalasa (CAT) que convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Livingstone, 2001; Forman, 2008). Otras enzimas que también participan en la defensa frente al estrés oxidativo son las glutatión-S-transferasas (GSTs) y la glutatión reductasa (GR). Las GSTs son enzimas detoxificantes de fase II que catalizan la conjugación del tripéptido glutatión (GSH) con una variedad de sustratos hidrofóbicos y electrofílicos facilitando su eliminación. Las GSTs también participan en la defensa frente al estrés oxidativo ya que estas enzimas son capaces de eliminar los productos reactivos de la peroxidación lipídica. La GR cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH a expensas de NADPH, mediante un ciclo *redox* (Meister y Anderson, 1983).

Dentro de las defensas no enzimáticas involucradas en la regulación de EROs se encuentra el GSH. Es el péptido con grupos tioles más abundantes en las células y juega un papel fundamental en la protección contra la injuria oxidativa. Además, participa en el metabolismo de xenobióticos y en la regulación del ciclo celular y la expresión génica (Arrigo, 1999).

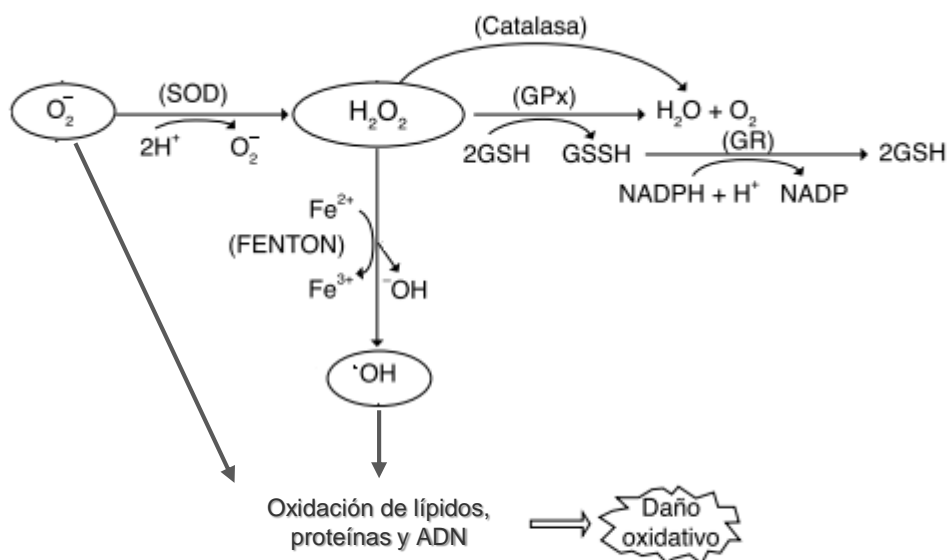


Fig. 5. Esquema de las reacciones catalizadas por catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa (adaptado de Paparella et al., 2015).

El mantenimiento de la relación GSH/GSSG es esencial para el normal funcionamiento del metabolismo celular. La exposición a componentes que generan EROs tiende a incrementar la síntesis de GSH (Dickinson y Forman, 2002). Mientras que el GSSG se mantiene normalmente en niveles correspondientes al 1-4% del glutatión total (GSH-t). Pero frente a procesos de estrés oxidativo puede aumentar, aunque transitoriamente, ya que es rápidamente reducido por la GR (Forman, 2008). Es por esto que varios autores señalan que los cambios en la relación GSH/GSSG estarían relacionados al grado de estrés oxidativo *in vivo* (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lange et al., 2002; Stanicka et al., 2015).

El exceso de EROs puede conducir a daño oxidativo, como por ejemplo, peroxidación de lípidos. Este proceso comprende un conjunto de reacciones en cadena, especialmente por ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son muy sensibles a las reacciones de oxidación por las EROs debido a la presencia de los dobles enlaces. Consta de tres etapas (**Fig. 6**): la primera de iniciación, seguida de una de propagación y por último la terminación de la peroxidación que es el resultado de la interacción de los radicales lipídicos y/o formación de especies no radicalarias por acción del radical lipoperóxido.

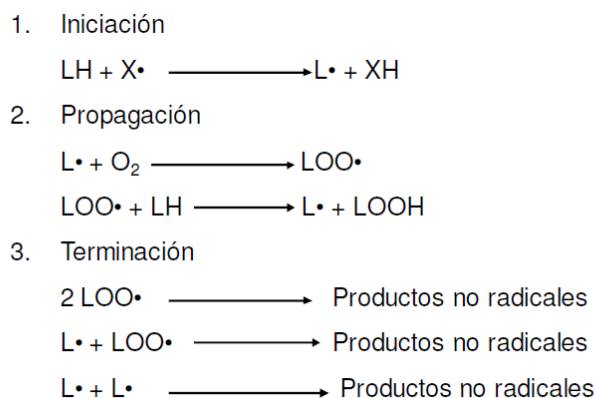


Fig. 6. Mecanismo de la peroxidación lipídica. L· : radical lipídico, LOO· : radical lipoperóxido, hidroperóxido: LOOH.

El resultante LOOH puede descomponerse fácilmente en varias especies reactivas, incluyendo radicales alcoxi lipídicos (LO·), aldehídos como el malondialdehído (MDA),

hidroxinonenal y hexanal, y también alcanos. El MDA es uno de los productos finales de la lipoperoxidación que se utiliza a menudo como indicador de daño oxidativo. La mayoría de estos productos son tóxicos y mutágenos activos. Pueden formar aductos con el ADN dando lugar a mutaciones y patrones alterados de la expresión génica (Marnett, 1999). Las membranas peroxidadas se vuelven rígidas y pierden su permeabilidad e integridad (Greenberg et al., 2006).

Para combatir el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, las enzimas antioxidantes endógenas, como CAT y SOD eliminan el exceso de H_2O_2 y radical $O_2^{\cdot-}$ para evitar sus efectos deletéreos. Por lo tanto, los cambios en los niveles de MDA y en las actividades enzimáticas pueden indicar indirectamente los efectos tóxicos de los contaminantes en los organismos vivos (Zhang et al., 2013).

Otro parámetro que según la bibliografía podría generar alguna respuesta sensible frente a las NPs es la acetilcolinesterasa (AChE). Ésta es una enzima crucial del sistema nervioso tanto de vertebrados como de invertebrados y está asociada a la toxicidad de pesticidas organofosforados (OPs) y carbamatos. No obstante, Wang et al., (2009) han observado en estudios *in vitro* la adsorción e inhibición de AChE por NPs metálicas y de óxidos metálicos.

Por lo antes planteado, las defensas enzimáticas y no enzimáticas, los niveles de MDA, y la actividad de la AChE podrían usarse como biomarcadores de exposición a NPs. Los biomarcadores, son parámetros biológicos que reflejan cambios inducidos por xenobióticos en componentes o procesos celulares o bioquímicos, estructuras o funciones, medibles en sistemas biológicos. De acuerdo con esta definición, los biomarcadores describen efectos inducidos por diferentes estresores ambientales a cualquier nivel de organización biológica, desde nivel celular/subcelular hasta ecosistema (Colgan et al., 2003) (**Fig. 7**).

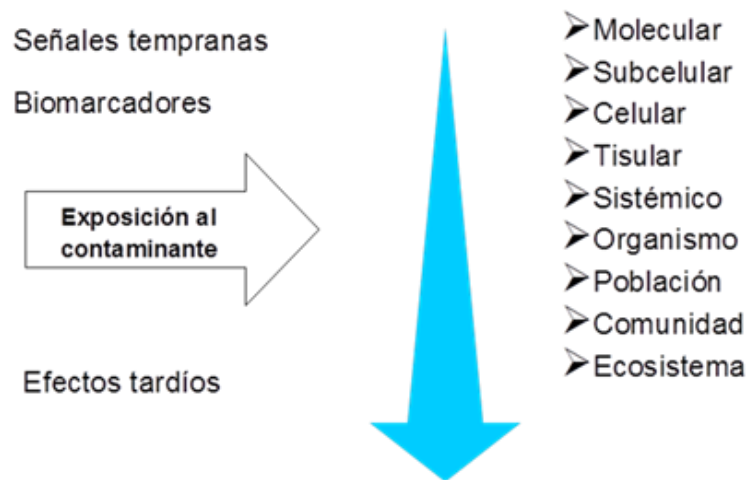


Fig. 7. Esquema secuencial de respuestas de distintos niveles de organización biológica a la exposición a un contaminante (adaptado de van der Oost et al., 2003).

En la práctica, el término biomarcadores es muchas veces usado en un sentido más restrictivo, como cambios bioquímicos a nivel suborganismo. A este nivel, las respuestas son más rápidas, sensibles, y relativamente más fáciles de interpretar. La evaluación de respuestas en los primeros niveles de la cadena de eventos puede resultar de utilidad como indicadores tempranos de perturbación en individuos y poblaciones (Vasseur y Cossu-Leguille, 2003; Shi et al., 2017).

2 Contaminantes metálicos y orgánicos

2.1 Metales

2.1.1 Distribución de metales en el ambiente

Los metales están presentes en el ambiente desde que se formó el planeta. Muchos de ellos resultan esenciales para diversos procesos biológicos. Si bien la cantidad total de los metales es invariante en la Tierra, pueden presentarse bajo la forma de diferentes especies químicas, modificando su reactividad y solubilidad, afectando así la disponibilidad para los organismos, y por lo tanto su toxicidad (Zalts, 2011).

Los sistemas biológicos requieren de una variedad importante de metales, pero las cantidades suelen ser a niveles trazas. Algunos metales, como el Fe, Cu y Mn son oligoelementos esenciales para la supervivencia de los seres vivos porque son imprescindibles en determinados procesos metabólicos. Otros metales, como el Cd y Pb, son considerados no esenciales, ya que hasta ahora no se les reconoce ninguna función fisiológica (Klassen et al., 2013).

A diferencia de otros contaminantes, los metales no pueden degradarse, por lo que son concentrados en el agua, los suelos, sedimentos y/o acumulados en los organismos vivos. Los metales pueden ser incorporados por las diferentes especies de organismos que habitan las aguas contaminadas, acumulándose en éstas y consecuentemente pasando a la cadena trófica. Mientras que los organismos terrestres como las lombrices, pueden acumular metales concentrados en el suelo y en el agua de poro (Vijver et al., 2003). De esta forma, la exposición del hombre a estos metales no está solamente limitada a los factores ambientales, sino también a los alimentos que se consumen.

La demanda de metales siempre ha estado vinculada a los servicios que prestan a la población los productos que los contienen. Actualmente estos servicios se han expandido y prácticamente no existe ámbito de actividad humana que no requiera metales: vivienda, transporte, suministro de energía, producción y conservación de alimentos, comunicaciones, salud, son algunos de ellos. Debido a esto, la liberación de metales a partir de fuentes antropogénicas continúa en ascenso (Wu et al., 2016).

2.1.2 Metales pesados: Cadmio y Plomo

Se denominan metales pesados a aquellos elementos químicos que poseen peso atómico comprendido entre 63,55 (Cu) y 200,59 (Hg), y que presentan un peso específico mayor a 4 g ml⁻¹. Estos elementos manifiestan una elevada toxicidad cuando se dispersan en el ambiente. Los riesgos dependen de las concentraciones en las que pueden presentarse y el tipo de especie que se encuentra en un determinado medio (Greenwood y Earnshaw, 2001).

En general, los metales pesados incorporados al suelo pueden encontrarse a distintas profundidades y en diferentes especies químicas: a) ocupando sitios de intercambio catiónico de la fracción arcillosa (silicatos laminares, óxidos e hidróxidos de Fe y Mn, etc.), b) adsorbidos o coprecipitados junto con óxidos e hidróxidos, c) precipitados como carbonatos en suelos alcalinos, d) precipitados como sulfuros en suelos con alta capacidad reductora, e) adsorbidos específicamente al material húmico formando quelatos estables y f) en el agua de poro presente entre las partículas del suelo en medios neutros o ácidos, formando complejos de coordinación con otros aniones, como el ión Cl⁻ (García y Dorronsoro, 2005; Domènech y Peral, 2006).

A pesar de que los efectos adversos de metales pesados como Cd y Pb son ampliamente conocidos, sus usos y concentraciones en el medio ambiente son cada vez mayores (Alloway, 2013).

El Cd es un metal no esencial que se encuentra libre en la naturaleza en forma de sales (Mellor, 1958) o asociado a distintos minerales de Zn, Pb y Cu (Colangelo y Abbiatti, 2003). Tiene la capacidad de bioacumularse en los tejidos en altas concentraciones, asociándose a proteínas de bajo peso molecular (por ejemplo, las metalotioneínas), y puede biomagnificarse a través de la cadena trófica (Rainbow, 1988). Puede provenir de industrias galvanoplásticas, textiles, fábricas de policloruros de vinilo (PVC), metalurgias, baterías de Ni-Cd, pinturas y centrales nucleares (Rashid et al., 2013). Se lo utiliza a nivel industrial como agente antifricción, antioxidante y en aleaciones. Las descargas y combustión de muchos desechos urbanos e industriales provocan emisiones de Cd que crean una contaminación local o regional.

En ambientes terrestres, el Cd se muestra bastante móvil y se distribuye uniformemente a lo largo del perfil del suelo (Méndez Prieto et al., 2009). Un ingreso importante de Cd proviene de la aplicación sobre el suelo de fertilizantes a base de fosfatos contaminados con este metal (Roberts, 2014). En este medio, el Cd es absorbido por las plantas, debido a su semejanza con el Zn, y así ejerce su acción tóxica.

El Cd y sus compuestos se encuentran clasificados como carcinógenos para humanos y debido a su toxicidad se encuentra sujeto a una de las legislaciones más severas en términos ambientales y de salud humana (IARC, 2012).

El Pb es un metal no esencial que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Está presente en un gran número de minerales, siendo la forma más común el PbS. También son comunes, aunque en orden decreciente, la cerusita (PbCO_3) y la anglesita (PbSO_4). Debido a su carga y tamaño, puede sustituir al Ca y acumularse en los tejidos óseos (Fergusson, 1990).

En ambientes naturales, los animales pueden absorber Pb por inhalación o ingestión; si la absorción es lenta, la excreción lo es aún más, de manera que el Pb tiende a acumularse. Su presencia en el ambiente se debe principalmente a las actividades antrópicas como la industria de fabricación de anticorrosivos, pinturas y esmaltes, la minería, la fundición, y como constituyente de baterías de automotores.

Los niveles de Pb en el suelo pueden tener una influencia importante sobre la salud humana y animal (Thornton et al., 1990). Sin embargo, no todo el Pb del suelo presenta el mismo grado de movilidad o biodisponibilidad. La distribución química del Pb en el suelo depende del pH, de la mineralogía, de la textura, del contenido en materia orgánica así como de la naturaleza de los compuestos de Pb contaminantes (Méndez Prieto et al., 2009).

En cuanto a valores de estos metales en el ambiente terrestre, se han encontrado concentraciones relativamente altas de Cd ($> 1 \text{ mg kg}^{-1}$) en suelos cercanos a fábricas de fundiciones y en otras áreas industrializadas (WHO-IARC, 2006). En nuestro país, los datos cualitativos y cuantitativos del contenido de metales pesados en los suelos son escasos. Estudios de metales pesados en suelos pampeanos de uso agrícola de la provincia de Buenos

Aires reportaron que para el año 1975 la concentración de Pb varió entre 6-12 mg kg⁻¹ (Romieu et al., 1997). En estudios más recientes, Giuffré et al., (2012) encontraron que en suelos de zonas urbanas y periurbanas de uso hortícola de la provincia de Buenos Aires el valor máximo de Pb fue de 676 mg kg⁻¹, más elevado que el valor guía establecido por la Ley de Residuos Peligrosos N° 24051 (1993) para este metal (375 mg kg⁻¹). Asimismo, investigaciones realizadas por Roca, (2015) en suelos pampeanos de uso agrícola de Azul (provincia de Buenos Aires) revelaron que la mayoría de las muestras analizadas presentaban altos niveles de Cd en relación a los valores de fondo previamente determinados. En las zonas más contaminadas se encontraron niveles elevados de Pb y Cd, entre otros metales pesados.

2.2 Pesticidas organofosforados: Clorpirifos

Los compuestos organofosforados (OPs) fueron sintetizados por primera vez en la década de 1820, sin embargo, la actividad insecticida de estos compuestos se evidenció muchos años más tarde cuando, en el año 1932, se describieron por vez primera los efectos nocivos de los OPs sobre los seres vivos (Carod Benedico, 2002; Delfino et al., 2009). Este hecho, próximo al comienzo de la Segunda Guerra Mundial, despertó el interés para el desarrollo de potenciales gases de guerra, lo cual trajo aparejado un incremento en los recursos destinados al diseño de nuevas moléculas. Se le atribuye al químico alemán Gerhard Schrader el conocimiento de la estructura general de los compuestos OPs anticolinesterásicos, la síntesis del primero (Bladan, conteniendo tetraetilpirofosfato, TEPP, como principio activo), introducido en el mercado en 1944 y por síntesis de uno de los OPs más conocidos, paratión, en el mismo año (Klassen et al., 2013). Posteriormente, surgieron el malatión (1952), el diazinón (1953) y el clorpirifos (1965). Desde entonces, cientos de compuestos OPs se han desarrollado y comercializado en todo el mundo (Carod Benedico, 2002; Blair et al., 2015).

Los plaguicidas OPs, o sus metabolitos activos, son inhibidores de serina esterasas, entre ellas la AChE, una enzima presente en el sistema nervioso de mamíferos y de invertebrados, con la consecuente acumulación de acetilcolina en sinapsis nerviosas. Estos plaguicidas

presentan una estructura básica, generalmente ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico (**Fig. 8**). R1 y R2 son generalmente grupos alcoxi, alquilamino o tioderivados. El grupo X (“grupo saliente”), un grupo acilo unido al P a través de una unión de tipo -O- o -S-, es un grupo electrofílico, muy lábil a la hidrólisis alcalina. Cuando el átomo que se une al fósforo con doble enlace es un oxígeno, los compuestos resultantes (oxones) son buenos inhibidores de las colinesterasas.

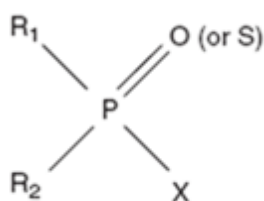


Fig. 8. Estructura general de los plaguicidas organofosforados.

Los fosforotioatos (P=S), son pobres inhibidores de las colinesterasas (ChEs), pero son bioactivados a sus análogos oxigenados (P=O) por desulfuración oxidativa, cuando son ingeridos o absorbidos por los animales, resultando en un aumento de la toxicidad (Fukuto, 1990; Jokanovic y Stepanovic Petrovic, 2016).

2.2.1 Propiedades físico-químicas del clorpirifos

El clorpirifos (CPF) (**Fig. 9**) es un insecticida y acaricida de amplio espectro, no sistémico, usado tanto para controlar plagas presentes en cultivos así como para uso hogareño.

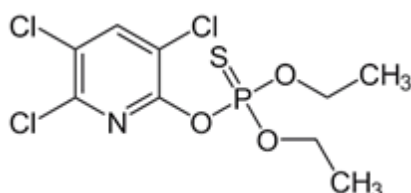


Fig. 9. Estructura química del clorpirifos.

En la **Tabla 2** se presentan algunas de las propiedades físico-químicas del CPF. Su persistencia es considerada corta en los cultivos, sin embargo en el suelo puede permanecer varias semanas (World Health Organization, 2015). Es uno de los insecticidas OPs más utilizados en Argentina. Se lo emplea para el control de plagas en la producción de frutas, hortalizas, cereales y plantas ornamentales. La aplicación se realiza mediante pulverización foliar o aplicación directa al suelo. Adicionalmente, es utilizado para el control de termitas y hormigas en productos maderables y para el control de pulgas, garrapatas y piojos en la producción ganadera. El uso residencial del CPF fue prohibido en Estados Unidos en el año 2001, quedando restringida su aplicación a los sectores rurales (Cocca et al., 2016). En nuestro país, la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT), por Disposición 2659/2008, prohibió el uso del principio activo CPF en formulaciones de productos desinfectantes domisanitarios, a excepción de cebos maticucarachas que posean cierre a prueba de niños.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del clorpirifos

Nombre común	Clorpirifos
Nombre IUPAC	O,O-Dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato
Peso Molecular	350.6 g/mol
Punto de fusión	42-43,5 °C
Punto de ebullición	> 300° C
Presión de vapor	$1,87 \times 10^{-5}$ mmHg a 25 °C
Solubilidad en agua	0,0014 g/L a 25 °C
Coefficiente de Partición Octanol/Agua (log K_{ow})	4,70

(Adaptado de <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorpotech.html>).

El CPF tiene una fuerte tendencia a ser adsorbido por la materia orgánica del suelo, previniendo su lixiviación hacia aguas subterráneas. Se degrada por la exposición a luz UV,

por la hidrólisis química y por acción de microorganismos. Con el aumento del pH del suelo, la persistencia del CPF disminuye debido a la predominancia de la hidrólisis alcalina abiótica (Baskaran et al., 1999).

Tiene una baja solubilidad en agua y su liposolubilidad hace que atraviese fácilmente las barreras biológicas (piel, mucosas), incluyendo la barrera hematoencefálica (World Health Organization, 2015).

2.2.2 Mecanismo de acción

El modo de acción del CPF es similar para organismos blanco y no-blanco. Sin embargo, su nivel de toxicidad en invertebrados no parece ser similar al de vertebrados, y requiere ser estudiado. El principal blanco es la enzima AChE, responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina, produciendo una acumulación de dicho neurotransmisor en las terminales nerviosas colinérgicas. Esto da como resultado alteraciones en el funcionamiento normal del sistema nervioso y eventualmente la muerte (Klassen et al., 2013). Los insecticidas OPs son considerados funcionalmente inhibidores irreversibles de la AChE dado que el tiempo necesario para liberar a la enzima de la inhibición puede ser mucho mayor al tiempo requerido para la nueva síntesis de la enzima. Los OPs se unen a través del P electrofílico a un residuo de serina en el sitio activo de la enzima, impidiendo de esta manera su acción sobre el sustrato fisiológico. Las velocidades de la reacción de fosforilación de la AChE por las formas oxónicas de los OPs, que usualmente son muy rápidas, indican la afinidad de la enzima para un determinado OP (Klassen et al., 2013).

Las carboxilesterasas (CES) son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos mediante la adición de agua (Wheelock et al., 2005). Las CES junto con la AChE pertenecen a una gran familia de proteínas llamadas α/β -hidrolasas y comparten el mismo mecanismo catalítico como serina proteasas (Sogorb et al., 2004). Estas enzimas cumplen un rol importante en el metabolismo y detoxificación de muchos xenobióticos, incluidos pesticidas. En particular, las CES participan en la detoxificación de pesticidas de dos maneras: a) por hidrólisis de uniones éster (carbamatos, piretroides y OPs que contienen este tipo de

unión) (Wheelock et al., 2008) y b) por unión de OPs y carbamatos en el sitio activo de la enzima produciendo su inhibición (Maxwell, 1992). Al igual que las ChEs, las CES son B-esterasas porque son inhibidas por OPs (Aldridge, 1953), por lo que también son utilizadas en estudios ambientales de exposición a pesticidas OPs. Se ha sugerido que en muchas especies acuáticas y terrestres, el monitoreo combinado de las actividades de las CES y la AChE puede proporcionar información más útil de la exposición a OPs que la medición de la AChE solamente (Wheelock et al., 2005).

3 Las lombrices terrestres como organismos bioindicadores

Un organismo bioindicador se puede definir como una especie o grupo de especies que reflejan fácilmente el estado de un ambiente (Hodkinson y Jackson, 2005). Proporciona información sobre las condiciones ambientales de su hábitat ya sea por su presencia o ausencia y su comportamiento (Van Gestel y Van Brummelen, 1996).

Los organismos del suelo juegan un rol crucial en el ecosistema, por su participación en el ciclo geoquímico de los elementos y en el suministro de nutrientes a las plantas. En la selección de especies bioindicadoras terrestres, a menudo se consideran las siguientes características: la sensibilidad toxicológica, la facilidad de cría y mantenimiento de los cultivos en laboratorio, reproducibilidad de los resultados en ensayos intra e inter laboratorios y la tasa reproductiva (Gong y Perkins, 2016).

Particularmente, las lombrices de tierra cumplen un rol vital en los suelos debido a su contribución en procesos complejos como la incorporación y descomposición de materia orgánica, el ciclo de nutrientes y el desarrollo y mantenimiento de la estructura del suelo. Estas características, entre otras, las convierten en excelentes organismos bioindicadores de la “salud” del suelo. Su importancia radica no sólo en el efecto directo sobre el suelo, sino también en que son importantes reguladores de la actividad microbiana (Coleman et al., 2017). Es así que se han constituido en uno de los grupos más adecuados para evaluar la calidad del suelo, sumado a la alta sensibilidad que presentan frente a los cambios del entorno edáfico (Edwards y Bohlen, 1996; Reinecke y Reinecke, 2004). Además, son organismos fáciles de manipular, tienen gran distribución terrestre y tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos.

Caracterizadas funcionalmente como importantes “ingenieras del ecosistema edáfico”, las lombrices de tierra son capaces de modificar el suelo a través de sus actividades mecánicas. Al mismo tiempo, producen estructuras físicas a través de las cuales pueden modificar la disponibilidad o accesibilidad de un recurso para otros organismos (Jouquet et al., 2006). Cuando las lombrices se entierran en el suelo crean galerías, túneles o macroporos de diversos tamaños, profundidades y orientaciones dependiendo de la especie y tipo de suelo.

El diámetro de estas galerías o túneles tiende a ser similar al de las lombrices que los produjeron (Coleman et al., 2017). Estos macroporos, que resultan estables pueden tener un rol en la infiltración de agua y en el transporte de solutos por el suelo. Además, las lombrices son presa importante para muchos organismos superiores y proveen una ruta a través de la cual los contaminantes se transfieren a niveles más altos en la cadena trófica. Constituyen el principal componente del ecosistema suelo y son susceptibles a la acción de xenobióticos, cuyos efectos pueden sentirse a nivel de especie, población y comunidad (Edwards y Bohlen, 1992; Paoletti, 1999).

Las lombrices de tierra tales como *Lumbricus spp.* y *Eisenia spp.* han sido consideradas entre los mejores bioindicadores para el monitoreo de la “salud” de los ecosistemas terrestres (Hirano y Tamae, 2011), debido a su papel esencial en la pedogénesis y la estructura del suelo, la fertilidad y la cadena alimentaria terrestre (Edwards, 2004). Por lo tanto, las lombrices de tierra juegan un papel importante en la ecotoxicología terrestre y se utilizan ampliamente para evaluar el riesgo ambiental y la toxicidad química, tanto en estudios de laboratorio como de campo (Sanchez-Hernandez, 2006).

3.1 Clasificación

Desde el punto de vista ecológico, las lombrices de tierra pueden dividirse en tres grandes categorías basadas en su comportamiento, su alimentación y su microhábitat en el suelo. (Bouché, 1977; Edwards y Bohlen, 1996; Brown et al., 2000) (**Fig. 10**):

- **EPÍGEAS:** viven sobre la superficie del suelo, se alimentan de materia orgánica y producen humus. Los peligros a los que están expuestas son depredación, inundaciones, baja temperatura, incendios, escasez de comida. Estos peligros les hizo desarrollar una serie de adaptaciones para sobrevivir como: alta reproducción para compensar las pérdidas poblacionales, buen apetito para aprovechar al máximo las ocasionales fuentes de comida (hojas secas, estiércol), capullos resistentes para preservar los huevos del desecamiento.

- **ENDOGEICAS:** viven dentro del suelo, cavan galerías horizontales y, comen y defecan tierra. Se alimentan de productos que eliminan las raíces y materia orgánica arrastrada hacia la profundidad por las lluvias o por otros gusanos e insectos. Al evolucionar en un medio más estable su tasa de reproducción es baja.
- **ANÉCICAS:** viven dentro del suelo, cavan galerías verticales y durante la noche suben a la superficie del suelo alimentándose de materia orgánica. Es sin duda el grupo más conocido y estudiado. Cavan galerías en forma de "U" donde pasan la mayor parte del tiempo. Por las noches se asoma a mordisquear restos vegetales arrastrándolos al fondo para devorarlos junto con partículas de tierra.

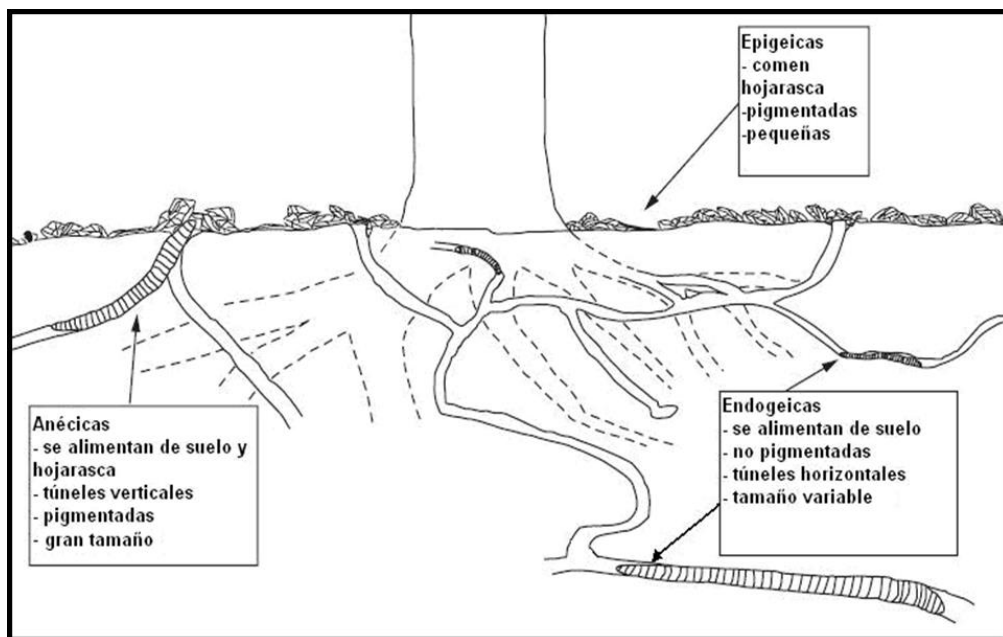


Fig. 10. Principales características de las distintas clases de lombrices terrestres (adaptado de Coleman et al., 2017).

Las lombrices anécicas cumplen un papel muy importante en la aireación y acondicionamiento del suelo (desmenuzamiento, neutralización del pH, aporte de bacterias), dejando esos típicos montículos que pueden confundirse con hormigueros (Zirbes et al., 2012).

Estos tres grupos se reparten los recursos disponibles. La alimentación de las lombrices epigeas es casi exclusivamente orgánica, con las endogeicas la relación se invierte: la mayor parte de lo que ingieren es de origen mineral. Mientras que las anécicas tienen una dieta combinada.

3.2 Aspectos básicos de la biología y ecología de lombrices

Las lombrices son organismos de cuerpo blando y segmentado (**Fig. 11**). En general el cuerpo podría esquematizarse como un tubo dentro de otro tubo, constituyendo el tubo externo el cuerpo propiamente dicho y funcionando el tubo interno como canal alimentario (Coleman et al., 2017).

En la **Fig. 12** se puede observar el corte transversal del cuerpo de la lombriz de tierra. La pared del cuerpo está constituida de afuera hacia dentro por:

- una cutícula (lámina muy delgada, generalmente de color marrón brillante).
- Una epidermis (epitelio simple con células glandulares que producen una secreción mucosa).
- Capas musculares (dos, una circular externa y una longitudinal interna).
- Peritoneo (una capa más interna que limita exteriormente con el celoma de la lombriz).
- El celoma (una cavidad que contiene el fluido celómico, se extiende a lo largo del animal y envuelve el canal alimentario).

En ejemplares adultos puede observarse un engrosamiento en el extremo anterior del animal, que recibe el nombre de clitelo. Se trata de un área glandular más o menos amplia, en forma de anillo completo, que abarca un número determinado de segmentos contiguos (de dos a varias decenas). Esta área glandular no es visible durante toda la vida del animal, ya que se desarrolla cuando la lombriz alcanza la madurez sexual y/o en los períodos reproductivos. Su función está relacionada con la reproducción e interviene tanto en la unión de los individuos durante el apareamiento (mediante la secreción de moco), como en la

formación del cocón, capullo que contiene los huevos fecundados, y en la elaboración de los fluidos que van a nutrir los huevos de su interior.

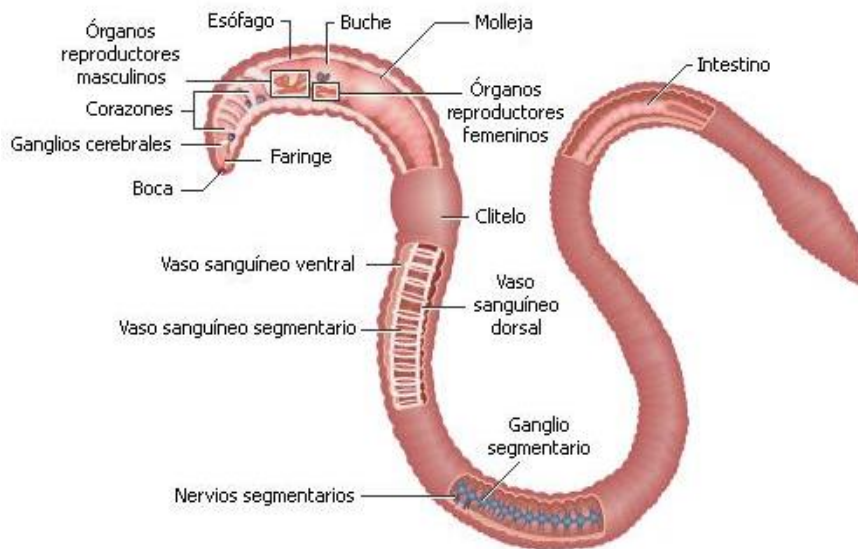


Fig. 11. Anatomía de la lombriz de tierra (obtenido de Enciclopedia Encarta 2009).

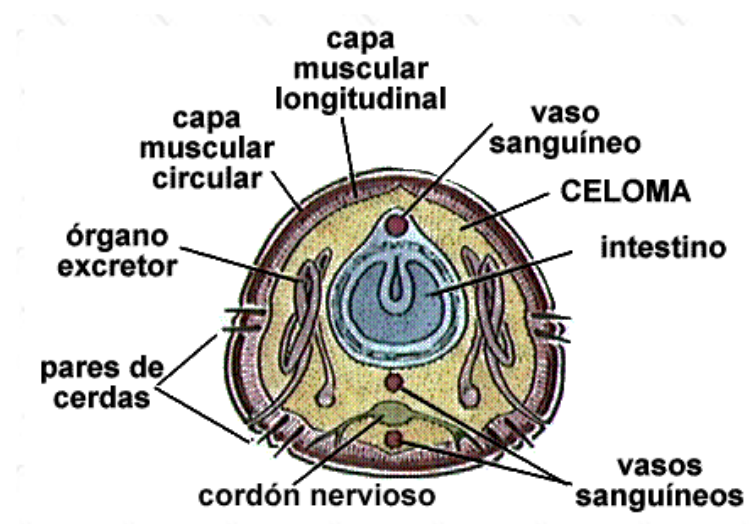


Fig. 12. Corte transversal del cuerpo de la lombriz de tierra (obtenido de <http://www.biologia.edu.ar/animales/celomados%201.htm>).

3.3 Sistemas y aparatos de las lombrices

Canal alimentario

El suelo y la materia orgánica particulada ingresan por la boca en el extremo anterior de la lombriz, pasando luego a través de la faringe hacia el esófago. El resto del canal alimentario consiste en intestino y ano. Digieren la materia nutritiva presente en el suelo y depositan los restos en la superficie o en galerías o túneles (Coleman et al., 2017).

Respiración

Las lombrices carecen de sistema respiratorio organizado, la respiración ocurre a través de la piel. Una capa acuosa superficial actúa como los alvéolos humanos, en ella se disuelven los gases antes de ser transportados a la sangre. Las lombrices carecen de la capacidad de mantener su temperatura corporal constante (Storer, 1979).

Sistema nervioso

Las lombrices poseen un ganglio suprafaríngeo, desde donde se extiende el cordón nervioso ventral. A partir de éste se desprenden nervios laterales formando una red neuronal local en cada segmento (Edwards y Lofty, 1977; Storer, 1979). Además, poseen un sistema nervioso entérico, dentro de la pared del intestino. Las sinapsis son más simples que las de vertebrados, pero esencialmente funcionan de manera similar.

Musculatura

Las cerdas que tienen a los lados del cuerpo les sirven de gran ayuda en sus movimientos. El sistema muscular consiste en una serie de fibras externas circulares o transversas de músculo, que rodean el cuerpo, y una serie interna de fibras musculares longitudinales que sirven para mover las cerdas (Martin et al., 1999).

Aparato circulatorio

El aparato circulatorio está formado por un vaso sanguíneo dorsal prominente y cuando menos cuatro vasos sanguíneos ventrales, que recorren de forma longitudinal el cuerpo y

están conectados entre sí a intervalos regulares por medio de una serie de vasos transversales. El vaso dorsal está equipado con válvulas y es el verdadero corazón. No obstante, el bombeo de la sangre se produce sobre todo por movimientos musculares generales (Edwards y Lofty, 1977).

Excreción

Cada segmento de la lombriz posee un par de estructuras tubulares, los nefridios, que le permiten excretar los desechos del fluido celómico a través de poros nefridiales o nefridioporos. Este fluido contiene diversos tipos de células denominadas celomocitos: basófilos, acidófilos, neutrófilos, granulocitos y cloragógenos (cloragocitos), que están relacionados con el sistema inmune de la lombriz. Los celomocitos remueven los desechos por fagocitosis y los depositan en el fluido celómico para su excreción (Storer, 1979). No todos los desechos son excretados por los nefridioporos, algunos se eliminan con mucus a través de la pared del cuerpo. Estas secreciones sirven como revestimiento para los túneles que forman las lombrices (Edwards y Lofty, 1977).

Reproducción

Las lombrices son hermafroditas, todos los individuos presentan órganos reproductivos masculinos y femeninos (testículos, ovarios y estructuras asociadas). Un intercambio mutuo de esperma ocurre entre dos organismos durante el apareamiento (**Fig. 13**). Los espermatozoides y óvulos maduros se depositan en capullos (cocones, formado por células mucosas) producidos por el clitelo. Los óvulos son fertilizados por las células espermáticas dentro del cocón, que luego son liberados y se depositan en el suelo. Cada cocón contiene entre tres y veinte huevos fecundados. Los óvulos fecundados eclosionan después de aproximadamente tres semanas (Storer, 1979; Martin et al., 1999; Coleman et al., 2017).

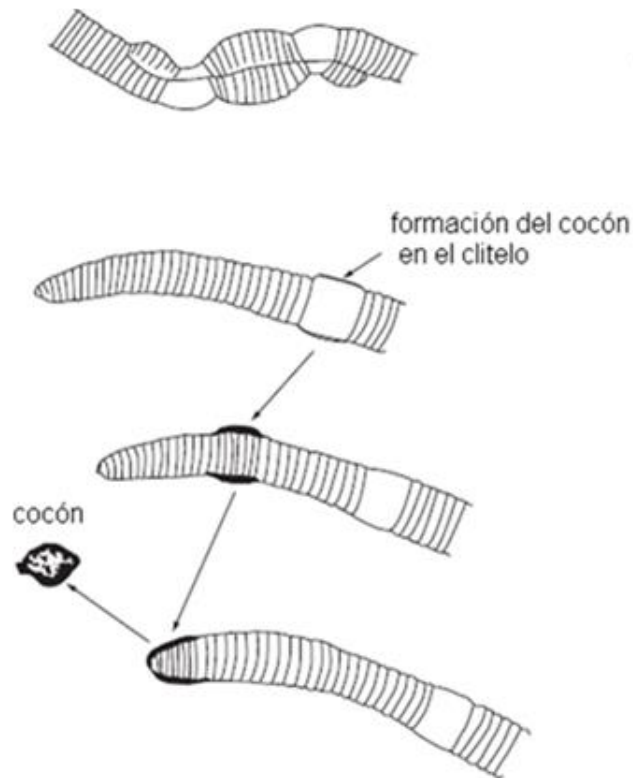


Fig. 13. Reproducción de lombrices (adaptado de Coleman et al., 2017).

3.4 La lombriz de tierra *Eisenia andrei*

Entre todas las especies de lombrices, *Eisenia andrei* (Fig. 14) es uno de los organismos estándar más usados en ecotoxicología terrestre (OECD, 1984; ISO, 2012a). Dentro de las ventajas que presenta esta especie, está la facilidad con que se pueden criar en el laboratorio y el hecho de que se cuenta con una extensa base de datos sobre los efectos que en ellas producen numerosas sustancias químicas. La lombriz *E. andrei*, conocida también como lombriz del compost, pertenece al phylum *Annelida*, clase *Clitellata*, subclase *Oligochaeta*, orden *Haplotaxida*, superfamilia *Lumbricoidea*, familia *Lumbricidae*. Por su distribución poblacional en el suelo, se la considera epígea, ya que suele encontrarse en las capas superiores (Storer, 1979).

Su principal característica morfológica es la presencia de segmentos externos e internos en su cuerpo, es hermafrodita y cuando es adulta se observa una protuberancia epidérmica denominada clitelo, en el que se forman los capullos en los cuales son depositados los huevos. Esta especie se desarrolla bien en suelos de pH de 5 a 7, y a temperaturas de 20 a 28 °C. *E. andrei* es también un organismo de fácil manejo en el laboratorio ya que no contrae enfermedades, tiene un ciclo reproductivo corto (alcanza su madurez sexual en aproximadamente 2 meses) y es extremadamente prolífica (deposita cada 7 a 10 días un cocón con un contenido que fluctúa entre 2 y 20 embriones) (Santamaría, 1996). Esta importante función puede ser afectada por la presencia de sustancias químicas y/o contaminantes en el suelo (Campos Verona, 2013).



Fig. 14. Lombriz *Eisenia andrei* (obtenido de <https://ect.de/standardisation/oecd-activities/>).

4 Hipótesis y Objetivos

4.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las hipótesis planteadas fueron:

1. Las NPs pueden alcanzar sistemas terrestres.
2. Las NPs pueden ejercer efectos deletéreos a nivel ecotoxicológico y a la vez influir en el destino ambiental de otras sustancias químicas presentes y/o contaminantes.
3. Algunas NPs pueden afectar la biodisponibilidad y bioacumulación de otras sustancias químicas contaminantes.

4.2 OBJETIVO GENERAL

En base a los antecedentes detallados, el objetivo general del presente trabajo consistió en evaluar los efectos tóxicos de NPs sintéticas, específicamente NPs de goethita, y su influencia en el destino y efectos tóxicos de contaminantes orgánicos y metálicos en sistemas terrestres.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar físico-químicamente a las NPs.
2. Investigar aspectos relacionados con la toxicocinética de las NPs, especialmente su absorción y eliminación en el organismo seleccionado (lombrices *Eisenia andrei*).
3. Investigar la posible ocurrencia de efectos deletéreos sobre los mecanismos de defensa antioxidante de *E. andrei* expuestas a NPs.
4. Investigar posibles efectos neurotóxicos en lombrices expuestas a NPs.
5. Investigar la interacción de las NPs con otras sustancias químicas contaminantes, que pueden encontrarse en los suelos, ya sean de naturaleza metálica (Cd, Pb) u orgánica (pesticida organofosforado).

II. Materiales y Métodos



5 Organismos utilizados en los bioensayos

Para los bioensayos se utilizaron lombrices pertenecientes a la especie *Eisenia andrei*. De acuerdo con lo señalado en la Introducción, diversas organizaciones de estandarización internacionales han seleccionado a esta especie como organismo apropiado para el monitoreo de sistemas terrestres (OECD, 1984; ISO, 2012a).

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo, fue de suma importancia contar con animales de experimentación confiables en cuanto a su estado de salud y capacidad de respuesta. Las lombrices utilizadas pertenecen a una colonia que se mantiene desde 1997 en los laboratorios de Toxicología y Química Legal, FCEN-UBA, en condiciones controladas de temperatura y humedad (22 ± 2 °C, 85% de humedad). Se las alimenta periódicamente con materia orgánica estable (Casabé et al., 2007).

En todos los bioensayos realizados se utilizaron lombrices adultas, con el clitelo desarrollado, de al menos 3 meses de edad, con un peso individual de 300-500 mg (OECD, 1984). Previo a los ensayos, las lombrices se depuraron 24 h sobre papel de filtro húmedo, para permitirles evacuar su contenido gastrointestinal.

6 Nanopartículas utilizadas

Se trabajó con una suspensión comercial conteniendo 20% (p/v) de NPs de goethita (número de producto: 720704, Sigma-Aldrich, Argentina). Según especificaciones del fabricante el rango nominal de tamaño de partícula es menor a 100 nm y el pH de la suspensión se encuentra en el rango de 3,4-4,0.

La caracterización de las NPs de goethita se realizó por microscopía de barrido electrónico (SEM) (Carl Zeiss modelo NTS- Supra 40, Alemania; Centro de Microscopía Avanzada, FCEN-UBA) paralelamente a un análisis de energía dispersiva de rayos X (EDX) para determinar semi-cuantitativamente la composición elemental de las mismas. Estas especificaciones fueron confirmadas, además, por microscopía de transmisión electrónica (TEM) (Gigena et al., 2016).

Para los bioensayos, las suspensiones de trabajo se prepararon por dilución en agua bidestilada de la suspensión comercial sonicada por 30 min. El pH de las suspensiones se encontraba entre 3,5-4.

A modo de comparación, se trabajó además con goethita no-nano de origen comercial (número de producto: 71063, Sigma-Aldrich, Argentina). Las suspensiones para los bioensayos se prepararon de la misma forma que para goethita nano.

7 Bioensayos de exposición

7.1 Exposición en papel

Se desarrolló una metodología por adaptación de la Norma OECD 207 (OECD, 1984). Este tipo de ensayos permite estudiar efectos por exposición superficial. Las lombrices se colocaron en viales de vidrio recubiertos con papeles de filtro Whatman Nº 1 de 60 cm², impregnados con las sustancias a evaluar. Los papeles fueron secados bajo campana (**Fig. 15**) antes de disponerlos en viales. Se colocó una lombriz por vial adicionando 1 mL de agua bidestilada para mantener la humedad. Cada vial se tapó con una tela de nylon para permitir la entrada de oxígeno. Los viales se colocaron en posición horizontal para forzar a la lombriz a tener contacto con el papel, y se mantuvieron en oscuridad durante el período de exposición, en un ambiente climatizado a 22 ± 2 °C.

Paralelamente, los organismos controles fueron expuestos a papeles de filtro humedecidos solo con 1 ml de agua bidestilada. Al término de los bioensayos, los organismos fueron lavados 3 veces con agua bidestilada y pesados. Las lombrices destinadas a determinaciones bioquímicas fueron almacenadas a -70 °C hasta su procesamiento. Los anélidos destinados a estudios de incorporación de goethita y metales fueron sometidos a una destrucción de materia orgánica por vía húmeda.

7.2 Exposición a Suelo Artificial (SA)

El SA ha sido utilizado en numerosos estudios ecotoxicológicos. Es un sustrato ideal para tener un enfoque más real de la exposición de los organismos del suelo a los compuestos seleccionados.

En nuestro laboratorio, el SA fue preparado según métodos estandarizados por la agencia ambiental de Canadá (Environment Canada, 2007). Básicamente, su composición consistió en 70% (p/p) de arena industrial de cuarzo (conteniendo más del 50% en peso de las partículas con un tamaño de 0,05-0,2 mm), 20% (p/p) de caolín (conteniendo no menos del 30% (p/p) de arcilla coloidal de caolinita) y 10% turba de *sphagnum*, sin remanente de plantas visible.

A esta mezcla se le agregó 0,3-1% (p/p) de CaCO₃ grado analítico, pulverizado, hasta obtener un pH inicial de 6,0 ± 0,5. El pH se determinó en una suspensión 1: 5 (suelo: agua bidestilada, p/v) después de agitar vigorosamente durante 5 min y esperar al menos 2 h de acuerdo a la norma ISO 10390 (ISO, 2005).

Los componentes secos del suelo se mezclaron utilizando una procesadora eléctrica, preparando siempre cantidades de suelo suficientes para completar un experimento en su totalidad. Los suelos se pasaron por un tamiz de 2 mm, se secaron a 105 °C y se almacenaron hasta su utilización.

Al iniciarse los ensayos, el contenido de humedad se ajustó entre 40-60% de la capacidad de retención acuosa (CRA, cantidad de agua que retiene el suelo después de saturación completa, en porcentaje de masa seca) según la norma ISO DIS 11268-2 (ISO, 2012b) e IRAM 29121-1 (IRAM, 2017). Durante los ensayos, el contenido de humedad del suelo se mantuvo constante mediante el agregado de agua destilada. También se controló que el pH se mantuviera constante al principio y al final de los mismos. Las lombrices seleccionadas se aclimataron previamente durante 1-3 días en SA. Los ensayos se llevaron a cabo bajo ciclos controlados de luz-oscuridad (16 h/8 h), a 22 ± 2 °C. Los organismos controles fueron expuestos al SA humedecido sólo con agua bidestilada.

Al terminar los bioensayos las lombrices se colocaron individualmente en cajas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada por 24 h para que depuraran su contenido

gastrointestinal. Luego fueron pesadas y sometidas a una destrucción de materia orgánica por vía húmeda.

7.3 Bioensayos con 2-cloroacetamida

El bioensayo con 2-cloroacetamida sirve como una referencia para determinar que la sensibilidad de los organismos utilizados no ha cambiado de manera significativa. Por ello, la susceptibilidad de la población se controló periódicamente determinando la CL_{50} de 2-cloroacetamida en papel, tal como lo recomiendan los protocolos de la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD, 1984). Se expusieron lombrices (10 individuos por nivel de exposición) a distintas concentraciones de 2-cloroacetamida (1, 2 y 4 $\mu\text{g cm}^{-2}$) por 72 h. Los organismos controles fueron expuestos a papeles de filtro humedecidos solo con 1 ml de agua bidestilada. Al término de los mismos se registró la mortalidad, y se calculó La CL_{50} mediante el programa EPA Probit Analysis Program (versión 1.5).

8 Exposición de lombrices *E. andrei* a NPs de goethita

8.1 Ingreso de NPs de goethita

8.1.1 Bioensayos en Papel

Para investigar la incorporación de NPs en *E. andrei* por vía superficial (a través de los epitelios), las lombrices ($n = 6$) se expusieron durante 24, 48 y 72 h a 50 $\mu\text{g cm}^{-2}$ de NPs de goethita, según lo descrito en 7.1.

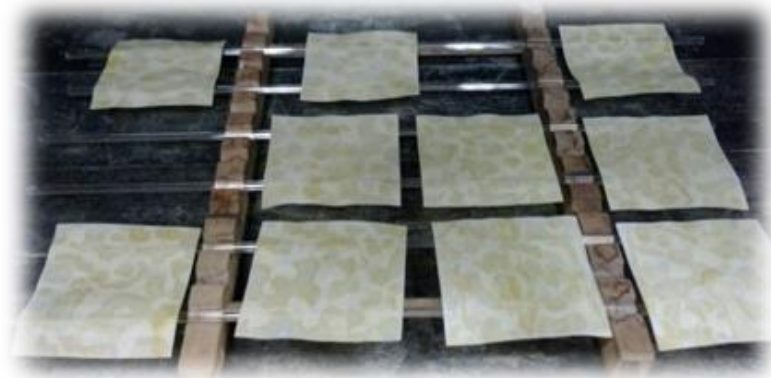


Fig. 15. Impregnado de papeles con NPs de goethita.

Adicionalmente, se investigó la incorporación de goethita no-nano. Para ello, las lombrices (n = 6) se expusieron 72 h a papeles de filtro impregnados con 50 $\mu\text{g cm}^{-2}$ de goethita no-nano. La solución de trabajo se preparó de la misma forma que para nano goethita. Al finalizar el ensayo, los organismos se sometieron a una destrucción oxidativa de la materia orgánica y posterior medición de los niveles de hierro por espectroscopía de absorción atómica de acuerdo a lo descrito en **8.1.3**.

8.1.2 Bioensayo en Suelo Artificial

Para investigar la incorporación de NPs en *E. andrei* simultáneamente por las vías de ingestión y contacto superficial, los organismos se expusieron a un SA, al cual se le adicionaron distintas suspensiones de nano-goethita de manera que la concentración final resultara igual a 10, 100 y 1000 $\mu\text{g NPs g}^{-1}$ peso seco, de acuerdo a lo descrito en **7.2**. Se utilizaron potes de 200 mL conteniendo 100 g de SA adicionado con las NPs y se dispusieron cuatro organismos por pote (**Fig. 16**). Se realizaron 3 réplicas por cada nivel de NPs. El tiempo de exposición fue de 10 y 28 días.



Fig. 16. Exposición de *E. andrei* a NPs de goethita en suelo artificial.

8.1.3 Ingreso de NPs de goethita. Análisis de los niveles de hierro

Al término de los bioensayos, cada lombriz fue colocada individualmente en tubos de vidrio de borosilicato de 25 mL de capacidad conteniendo 5 mL de HNO₃ concentrado por g de tejido y digerida durante 8 h a 100 °C para proceder a la destrucción de la materia orgánica. Para el blanco de reactivo se colocaron en un tubo 5 mL de HNO₃ concentrado y se procedió de igual manera. Terminado este proceso, el residuo fue filtrado por papel de filtro y transferido a un tubo graduado. El volumen final fue llevado a 5 mL con solución de HNO₃ 1% (v/v). Las muestras se analizaron por espectrometría de absorción atómica (AAS) en un equipo 575 AA Varian, utilizando una llama de aire-acetileno y una lámpara de deuterio para corregir el ruido de fondo. Los valores de concentración del metal fueron expresados en microgramos de hierro por gramo de tejido (peso húmedo). El límite de detección fue de 0,10 µg Fe g⁻¹.

Todo el material de vidrio fue prelavado con una mezcla conteniendo 5% de HNO₃ (v/v) y 5% de HCl (v/v) por al menos 24 h y luego enjuagado con abundante agua destilada.

Previo a los bioensayos se determinaron las condiciones óptimas para cuantificar los niveles de Fe en los oligoquetos. Se colocaron lombrices *E. andrei* provenientes del cultivo (n = 3) en tubos de vidrio de borosilicato y se adicionó una concentración conocida de NPs de goethita. Seguidamente, se procedió a la digestión con HNO₃ concentrado por 8 h a 100 °C para su posterior medición por AAS. Este tratamiento demostró ser efectivo ya que la recuperación de Fe fue de 98 ± 12%.

8.2 Investigación de parámetros relacionados con procesos de estrés oxidativo

Se midieron biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos en lombrices ($n = 5$) expuestas a papeles de filtro impregnados con suspensiones de NPs de goethita ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) a distintos tiempos (24, 48 y 72 h).

Para las determinaciones enzimáticas, al término de los bioensayos los organismos fueron homogeneizados (1:3 p/v) en *buffer* Tris 100 mM, pH 7,5. Los homogenatos se centrifugaron a $9.000 \times g \times 30 \text{ min}$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) y los sobrenadantes se utilizaron como fuente de enzimas.

Para medir los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH), las lombrices provenientes del bioensayo se homogeneizaron (1:7 p/v) en *buffer* Tris 100 mM, EDTA 5 mM (pH 8): ácido fosfórico (25%) (en una proporción 3,75:1). El ácido fosfórico se utilizó como agente precipitante de proteínas. Los homogenatos se centrifugaron a $9.000 \times g \times 30 \text{ min}$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), y los niveles de GSH y GSSG se midieron en el sobrenadante (ver sección **8.2.3**).

Las proteínas se determinaron por la técnica de Lowry et al., (1951) utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

8.2.1 Actividad de Catalasa

La actividad de la enzima CAT se determinó utilizando el método descrito por Saint-Denis et al., (1998) el cual mide la variación de absorbancia a 240 nm debida a la dismutación del H_2O_2 a través del tiempo. En celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro doble haz se colocaron: 960 μl de H_2O_2 en *buffer* Tris 100 mM pH 7,5 y 40 μl de la fuente enzimática diluida (1:10 en *buffer* Tris 100 mM pH 7,5). Como blanco de reacción se utilizaron 2 ml de *buffer*. Las determinaciones se realizaron por duplicado, a pH 7,0 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, y con la concentración de H_2O_2 dentro del rango 9,2 a 10,3 mM.

La velocidad de desaparición de H_2O_2 es proporcional a la cantidad de CAT contenida en la muestra (coeficiente de extinción $\epsilon = 0,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles por minuto por mg de proteína}$.

8.2.2 Actividad de Glutación S-transferasa

Se empleó el método descrito por Habig et al., (1974) que mide los cambios de absorbancia a 340 nm, cuando se usa clorodinitrobenzenceno (CDNB) y GSH como sustratos. En celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro doble haz se colocaron: *buffer* fosfato 100 mM pH 6,5; 10 μ l de la fuente enzimática; 50 μ l de GSH 50 mM y 20 μ l de CDNB 50 mM en acetonitrilo, (volumen final = 1 ml). Como blanco de reacción se utilizó la misma mezcla de incubación en ausencia de CDNB, igualando el volumen final con el agregado de *buffer*. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

La formación del conjugado GS-DNB puede ser detectado a 340 nm, $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig y Jakoby, 1981). Los resultados se expresaron como nmoles de conjugado por min por mg proteína.

8.2.3 Niveles de Glutación Oxidado y Reducido

Para evaluar alteraciones en las defensas antioxidantes de naturaleza no enzimática en los anélidos expuestos a NPs de goethita se determinaron las concentraciones de GSH y GSSG por adaptación del método propuesto por Hissin y Hilf, (1976). Las mediciones se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro de fluorescencia con lector de placas Pherastar FS (BMG Labtech), usando el reactivo fluorescente o-ftaldehído (OPT) el cual forma un complejo con el GSH (a pH = 8) o GSSG (a pH = 12). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 340 y 420 nm respectivamente. El GSH debe complejarse con N-etilmaleimida (NEM) para que no interfiera en la medición del GSSG.

Los niveles de GSH y GSSG se calcularon utilizando las curvas de calibración correspondientes y se expresaron como % GSH o GSSG respecto del total (GSH + GSSG).

Puesta a punto del método:

El método fluorométrico propuesto por Hissin y Hilf para medir GSH y GSSG está diseñado para lecturas en cubetas; además en dicho estudio utilizaron hígado de rata como fuente enzimática. Por lo que el protocolo debió ser adaptado y puesto a punto para realizarlo en placas de pocillos y con tejidos de lombrices. Para ello se realizaron homogenatos con

organismos provenientes del cultivo de acuerdo a lo especificado en **8.2**. Se trabajó con los sobrenadantes postmitocondriales de acuerdo a la **Fig. 17**.

La solución de NEM (concentración final 0,04 M) se preparó en NaOH (0,1 N).

La solución de OPT (concentración final 0,02 M) se preparó en etanol.

Paralelamente se realizó una curva de calibración de GSH y de GSSG utilizando reactivos de calidad analítica (Sigma-Aldrich, Argentina). Las soluciones de GSH y GSSG se prepararon en el momento y se realizaron curvas de calibración para cada día de medición.

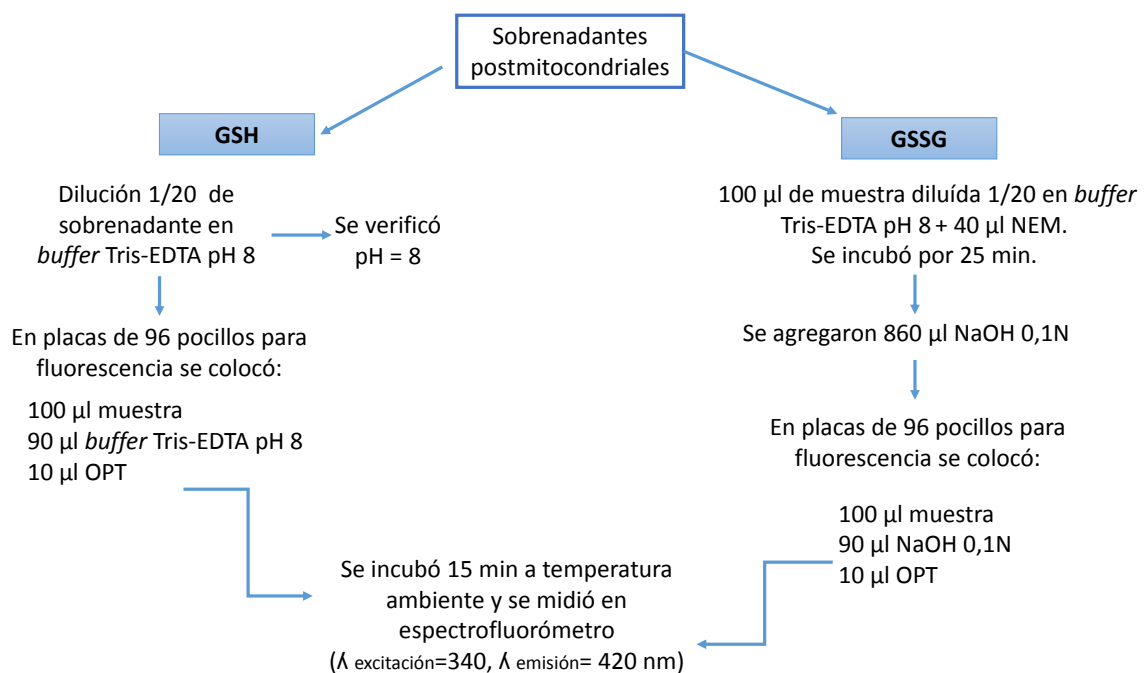


Fig. 17. Esquema de trabajo para la medición de GSH y GSSG.

8.2.4 Evaluación de capacidad antioxidante total

El análisis de la capacidad antioxidante total (TOSC) ha demostrado ser una herramienta confiable para evaluar cualitativamente la resistencia biológica a los efectos tóxicos de las EROs. Constituye un índice integrador para investigar el impacto de los contaminantes ambientales sobre el estado celular *redox*.

Se determinó la capacidad antioxidante total contra radicales peroxilo siguiendo el procedimiento descrito por Regoli y Winston, (1999). Se utilizaron lombrices provenientes

de la exposición a papeles de filtro impregnados con NPs. Los homogenatos fueron preparados en una solución *buffer* Tris 100 mM pH 7,5 y se centrifugaron a 9.000 x g por 30 min a 4 °C. El precipitado fue descartado y se utilizaron los sobrenadantes postmitocondriales. Los radicales peroxilos se generaron a partir de la homólisis térmica del 2,2'-azobisaminopropano (ABAP), lo cual produce la oxidación del ácido α -ceto- γ -metilbutírico (KMBA) para generar etileno. El etileno se analizó utilizando la técnica de espacio-cabeza en un equipo de cromatografía gaseosa. Las reacciones se efectuaron en viales sellados en un volumen final de 1,0 mL. La mezcla de reacción contenía 20 mM ABAP; 0,2 mM KMBA; 0,1 mM de solución *buffer* fosfato pH 7,4 y una alícuota del sobrenadante del homogenato. La reacción fue iniciada mediante la inyección del ABAP en los viales, los cuales fueron inmediatamente incubados a 35 °C.

La producción de etileno fue analizada a través del tiempo tomando con una jeringa alícuotas de 1 mL de la fase gaseosa la cual fue inyectada en un cromatógrafo gaseoso (Agilent 6890N GC, CA, USA) equipado con una columna Q-Plot (30 m de largo y 0,53 mm de diámetro interno, marca Supelco), utilizando un detector de ionización de llama.

Las temperaturas del horno, del inyector y del detector fueron 35, 180 y 250 °C, respectivamente. Como gas transportador se usó nitrógeno a un flujo de 4,7 mL/min. La formación de etileno fue cuantificada como el área bajo la curva cinética.

Los valores de TOSC fueron cuantificados a partir de la ecuación: $TOSC = 100 - (AM/AC \times 100)$, donde AM y AC eran las áreas de las curvas que mejor se ajustaban a los puntos experimentales durante el curso de la reacción para la muestra (AM) y el control de reacción (AC), respectivamente. Un valor de TOSC = 0 indica que la muestra no exhibe ninguna capacidad antioxidante, de manera que la formación de etileno resulta máxima, o sea que $AM/AC = 1$. Por el contrario, un valor de TOSC = 100 indicaría que la muestra tiene la capacidad para inhibir completamente la formación de etileno ($AM/AC=0$).

8.2.5 Evaluación de daño por procesos de estrés oxidativo

Peroxidación de Lípidos

Se estimó por la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs, según sus siglas en inglés), cuantificadas como equivalentes de MDA, por una adaptación del método de Kikugawa et al., (1990). Se miden aldehídos formados en la peroxidación de lípidos, a través del color obtenido ($\lambda = 532 \text{ nm}$) por formación de un complejo con el ácido tiobarbitúrico (TBA) a $95 \text{ }^\circ\text{C}$.

Al término de los bioensayos los organismos fueron homogeneizados (1:3 p/v) en *buffer* Tris 100 mM, pH 7,5. Los homogenatos se centrifugaron a $9.000 \times g \times 30 \text{ min}$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) y los sobrenadantes se utilizaron para medir los TBARS. Para ello se colocaron 175 μl de cada muestra en tubos *ependorf* (con la tapa agujereada). A cada tubo se le agregó 1,3 ml del reactivo de MDA conteniendo TBA 0,38%; HCl 0,25 N y ácido tricloroacético 50%. Para prevenir la formación adicional de MDA durante el procedimiento por oxidación de ácidos grasos poliinsaturados o por descomposición de lípidos oxidados, se agregó butilhidroxitolueno (BHT, 680 μM) a la mezcla de reacción antes de procesarla, y posteriormente se llevaron los tubos a baño maría por 45 min. Luego se enfriaron en baño de hielo y se centrifugaron a $8.000 \times g \times 10 \text{ min}$. Los precipitados fueron descartados y se utilizaron los sobrenadantes para la medición.

En paralelo se realizaron dos blancos: uno de ellos sin homogenato (blanco de TBA) y el otro sin TBA (blanco de tejido, para eliminar el error en la medición por la presencia de pigmentos que pudieran absorber en la misma región que el complejo MDA-TBA).

La concentración de TBARS se estimó mediante el coeficiente de extinción del complejo MDA-TBA ($156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmoles del complejo producido por mg de proteína.

9 Interacción de NPs de goethita con metales

9.1 Análisis de metales. Bioensayos en papel

Para el estudio de metales y NPs, los papeles de filtro fueron impregnados con 50 μg NPs cm^{-2} (de acuerdo a lo descrito en **8.1.1**), se dejaron secar bajo campana y se dispusieron en viales. Luego se adicionó 1 mL de soluciones equimolares de Cd o Pb de tal manera que las concentraciones finales en los papeles de filtro fueran de 0,40 μg Cd cm^{-2} y 0,74 μg Pb cm^{-2} . Las diluciones de Cd se prepararon a partir de una solución 1.000 mg L^{-1} de $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ en agua bidestilada. Las diluciones de Pb se prepararon a partir de una solución 773 mg Pb L^{-1} de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en agua bidestilada. Al término del bioensayo se midieron los niveles de Fe, Cd y Pb en las lombrices por AAS (de acuerdo a lo descrito en **8.1.3**). Los límites de detección por gramo de tejido húmedo fueron 0,2 μg para Cd y 0,5 μg para Pb. Los valores de los blancos de reactivos se encontraron siempre por debajo de los límites de detección.

10 Interacción de NPs de goethita con contaminantes orgánicos (clorpirifos).

Para estos estudios se utilizó CPF PESTANAL[®], 99,9% puro (Sigma-Aldrich). Para trabajar con una concentración de CPF que inhibiera entre un 45 y 55% la actividad de la enzima AChE se realizaron ensayos previos con lombrices expuestas a distintas concentraciones de CPF (0,1; 0,5; 0,75 y 1 $\mu\text{g cm}^{-2}$) por 72 h y se midió la actividad de AChE. Se decidió trabajar con una concentración de CPF de 0,75 $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Posteriormente, se expusieron lombrices ($n = 5$) por 24, 48 y 72 h a papeles de filtro (de acuerdo a lo descrito en **8.1.1**) impregnados con NPs (50 $\mu\text{g cm}^{-2}$) y con la mezcla de NPs+CPF (50 μg NPs cm^{-2} + 0,75 μg CPF cm^{-2}). Se utilizaron lombrices expuestas solamente a CPF como indicador positivo de inhibición, y lombrices expuestas únicamente a los solventes como control del experimento. Se realizaron tres bioensayos independientes.

El esquema del bioensayo se diagramó en dos etapas. En la primera, se impregnaron los papeles con 1 ml de solventes acuosos (H_2O y suspensión de NPs disueltas en agua bidestilada), mientras que en la segunda etapa se colocaron 1ml de solventes orgánicos (acetona y solución de CPF preparada en acetona) de acuerdo a los distintos tratamientos

(**Tabla 3**). Una vez secos se colocaron los papeles en los viales y se humedecieron con 1 ml de agua bidestilada previo a disponer las lombrices en los viales.

Tabla 3. Esquema del Bioensayo: Impregnación de Papeles.

	1º día	2º día
	Solventes Acuoso	Solventes Orgánicos
Control de experimento	H ₂ O	Acetona
CPF	H ₂ O	CPF
NPs	NPs	Acetona
NPs+CPF	NPs	CPF

10.1 Actividad de Acetilcolinesterasa

Al término de los bioensayos los organismos fueron homogeneizados (1:3 p/v) en *buffer* Tris 100 mM pH 7,5. Los homogenatos se centrifugaron a 9.000 x g x 30 min (4 °C) y los sobrenadantes se utilizaron como fuente de enzima. Adicionalmente, se midió la actividad de AChE en los pellets, para lo cual se resuspendieron en 500 µl de *buffer* Tris 100 mM pH 7,5.

La actividad de AChE se evaluó por adaptación del método de Ellman et al., (1961) usando DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) como cromógeno e yoduro de acetiltiocolina (AsChI) como sustrato. Las determinaciones se realizaron por duplicado en *buffer* Tris 50 mM pH 8, 0,25 mM de DTNB y 12 mM de AsChI. La actividad se monitoreó a 412 nm y se corrigió por hidrólisis espontánea del sustrato. La actividad específica se calculó usando el coeficiente de extinción molar del producto (13,6 mM⁻¹cm⁻¹). Los resultados se expresaron como nmoles de producto por min por mg de proteína.

10.2 Actividad de Carboxilesterasas

La actividad de CES en *E. andrei* se evaluó por adaptación de método de Ferrari et al., (2007) usando p-nitrofenilbutirato como sustrato. La fuente de enzimas se obtuvo de acuerdo a lo explicado en **10.1**.

Las reacciones se llevaron a cabo en 1,32 ml de *buffer* fosfato 100 mM pH 8,0 conteniendo 5% de acetona y 1 mM de p-nitrofenilbutirato. Las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad se monitoreó a 400 nm y la actividad específica se calculó usando el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol ($18,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmoles de producto por min por mg de proteína.

10.3 Ingreso de nano-goethita en presencia de CPF

Para investigar la incorporación de NPs de goethita en *E. andrei* en presencia del OP CPF, las lombrices (n=6) se expusieron durante 24, 48 y 72 h a papeles de filtro impregnados con la mezcla de NPs de goethita + CPF ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2} + 0,75 \mu\text{g CPF cm}^{-2}$), según lo descrito en **8.1.1** y **10**. Al finalizar el ensayo los organismos se sometieron a una destrucción oxidativa de la materia orgánica y posterior medición de los niveles de hierro por AAS de acuerdo a lo descrito en **8.1.3**.

10.4 Estudios espectroscópicos UV-Visible

Se realizaron estudios espectroscópicos UV-Visible a fin de estudiar las posibles interacciones entre NPs de goethita y CPF en fase acuosa.

Para ello, una solución de 5 mg L^{-1} de CPF se puso en contacto con 10 mg L^{-1} de NPs de goethita. La solución fue agitada en *vortex* para lograr un mejor contacto entre la superficie de las NPs y la solución del pesticida. Se obtuvo el espectro de la mezcla luego de 5, 10, 15 y 20 min de incubación a temperatura ambiente.

Para evaluar la interacción de CPF con goethita no-nano y así poder comparar los resultados obtenidos con nano goethita se procedió de acuerdo a lo descrito anteriormente. Una

solución de 5 mg L⁻¹ de CPF se puso en contacto con 10 mg L⁻¹ de goethita no-nano, se agitó con *vortex* y al cabo de 20 min se obtuvo el espectro.

10.5 Estudios de Microscopía

Se realizaron análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la mezcla de NPs+CPF en un microscopio Carl Zeiss (modelo NTS- Supra 40, Alemania) para estudiar posibles cambios en la morfología de la misma. Se analizó también una muestra de la solución madre de CPF en acetona (1150 mg L⁻¹). Paralelamente se realizó un análisis de energía dispersiva de rayos X (EDX) para verificar semi-cuantitativamente la composición elemental de las muestras.

11 Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm D.E. (desviación estándar).

Para evaluar el ingreso de NPs en *E. andrei* tanto en bioensayos en papel como en SA; así como los parámetros bioquímicos medidos, se realizaron ANOVAs de un factor y las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la prueba de Tukey, con el software InStat Graph Pad versión 3.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Se utilizó un nivel de significación de 0,05. Previamente al ANOVA, los datos fueron evaluados para normalidad y homogeneidad de la varianza con el *test* de Kolmorov-Smirnov y Bartlett respectivamente.

Para evaluar la influencia de las NPs en la acumulación de Cd y Pb; así como el ingreso de goethita no-nano en *E. andrei* se usó el *test* T de Student con el software InStat Graph Pad versión 3.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Se utilizó un nivel de significación de 0,05.

Los gráficos dosis-respuesta de la actividad de AChE y CES en lombrices expuestas a CPF y los cálculos de concentración efectiva media fueron realizados con el software OriginPro 9.0 (OriginLab, Northampton, MA).

Se utilizó el programa estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.R-project.org/>) para el análisis de las actividades de AChE y CES. Los valores obtenidos en tres experimentos independientes se analizaron mediante *boxplots* para evaluar la simetría de los datos. Se optó por agrupar los valores de los experimentos. Posteriormente, los valores de los distintos tratamientos se analizaron utilizando ANOVA de un factor y las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando el *test* a posteriori de Tukey. Se utilizó un nivel de significación de 0,05. Previamente los datos fueron analizados para normalidad y homocedasticidad de la varianza con el *test* de Kolmorov-Smirnov y Bartlett respectivamente (Sokal y Rohlf, 2002).

III. Resultados



12 Caracterización de NPs de goethita

En la **Fig. 18** se muestran imágenes obtenidas por SEM, correspondientes a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita con diferentes magnificaciones. Éstas exhibieron una forma acicular, con una longitud promedio del eje mayor de $99,98 \pm 5,73 \text{ nm}$. Con la técnica de EDX se pudo confirmar la composición de las mismas, la cual resultó consistente con goethita, presentando elevado contenido de Fe y O (**Tabla 4** y **Fig. 19**).

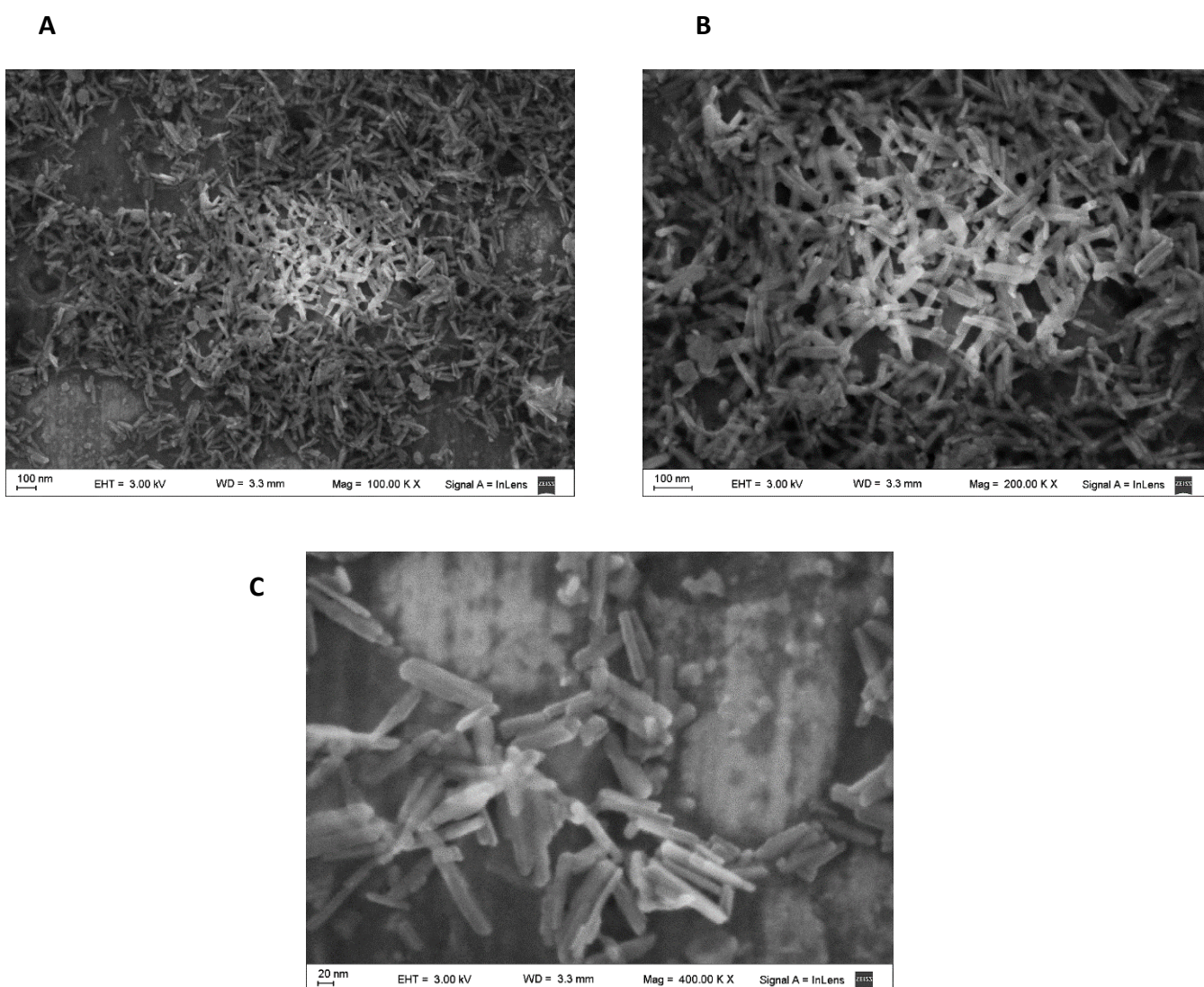


Fig. 18. Imágenes obtenidas por SEM de suspensión de NPs de goethita (10 mg L^{-1}) con diferentes magnificaciones A) 100.000 X B) 200.000 X, y C) 400.000 X.

Elemento	% en peso	% atómico
C	3,32	7,17
O	41,26	66,86
Si	0,26	0,24
Fe	54,82	25,45
S	0,34	0,28
Total	100,00	-

Tabla 4. Análisis elemental por EDX de la suspensión de NPs de goethita (10 mg L^{-1}).

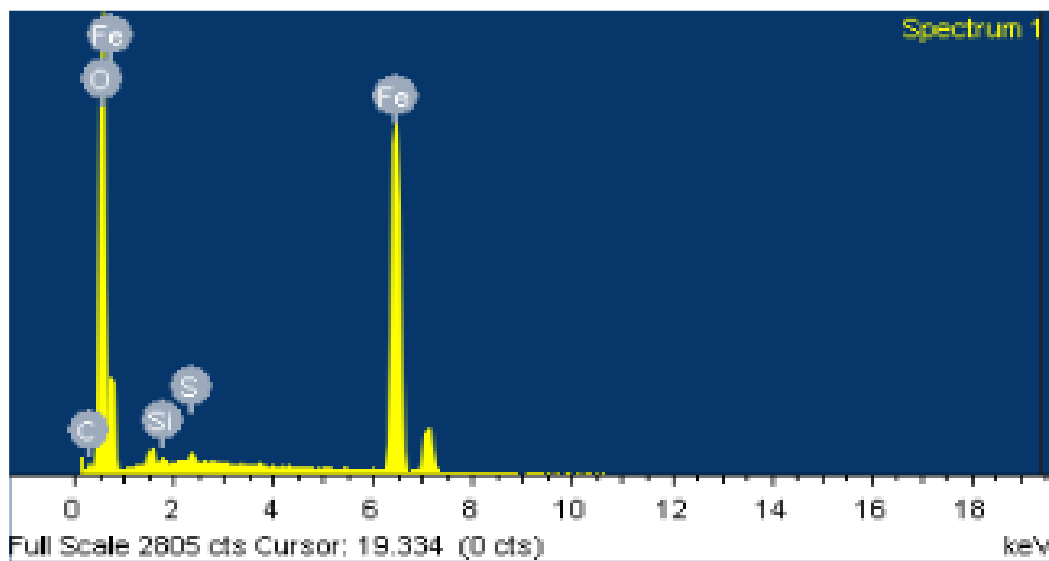


Fig. 19. Espectro EDX de la suspensión de NPs de goethita (10 mg L^{-1}).

La presencia de C y S se puede adjudicar a la composición de la cinta utilizada como soporte para las observaciones. La presencia del Si se debería a impurezas provenientes del tubo de vidrio que contenía la suspensión de NPs de goethita.

13 Bioensayos con 2-cloroacetamida

Con el objetivo de comprobar que la sensibilidad de los organismos utilizados no se modificaba con el tiempo, se realizaron bioensayos de toxicidad periódicamente con 2-cloroacetamida, ya que ésta es la sustancia de referencia elegida por la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (US-EPA) (Greene et al., 1989; Yeardley et al., 1995) para ensayos de toxicidad con lombrices terrestres.

En la **Tabla 5** se observan los valores de CL_{50} de 2-cloroacetamida para lombrices expuestas en papel en distintos periodos de tiempo, calculadas por análisis probit (EPA Probit Analysis Program, versión 1.5) correspondientes a 72 h de exposición. Los resultados indican que la sensibilidad del cultivo a la respuesta del tóxico de referencia no varió con el tiempo.

Año	CL_{50} ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Intervalo de confianza 95%
2013	3,27	2,45 - 4,95
2014	2,84	2,12 - 4,01
2015	3,04	2,31 - 4,10
2016	2,83	2,21 - 3,63

Tabla 5. Valores de CL_{50} de 2-cloroacetamida de lombrices expuestas en papel (72 h) en distintos periodos de tiempo.

14 Ingreso de goethita en *E. andrei*

14.1 Bioensayos en papel

14.1.1 NPs de goethita

Se realizaron ensayos utilizando papel como medio soporte, exponiendo a los organismos a un único nivel de nano-goethita ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) en forma aguda para analizar los valores de Fe a diferentes tiempos de exposición (**Fig. 20**). Se encontró que los niveles de este metal aumentaron significativamente durante las primeras 24 h y 48 h, 40% y 84% respectivamente, ($p < 0,05$), para luego descender significativamente (52%) con respecto a los controles una vez

transcurridas 72 h de exposición ($p < 0,05$). En organismos controles, los niveles de Fe no presentaron cambios estadísticamente significativos durante el tiempo de análisis ($p > 0,05$).

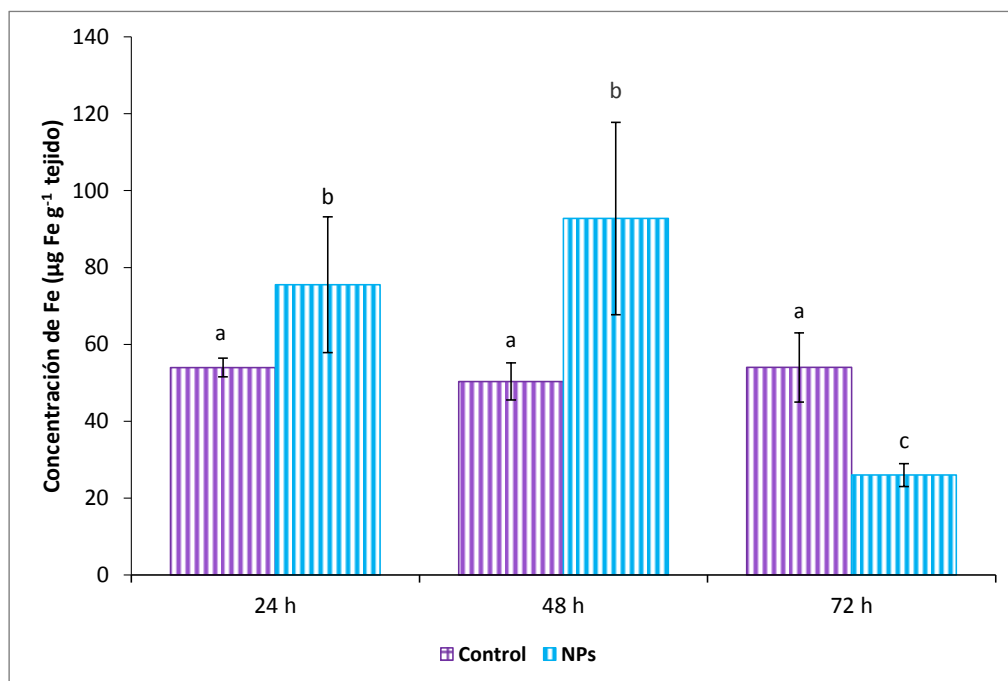


Fig. 20. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* expuestas por distintos tiempos a NPs de goethita ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) en papel. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por cada tiempo. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

14.1.2 Goethita no-nano

Los valores de Fe en lombrices expuestas (72 h) a papeles impregnados con de goethita no-nano ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) se presentan en la **Fig. 21**.

A diferencia de los anélidos expuestos a nano-goethita, no se registraron diferencias significativas entre las lombrices expuestas y los organismos controles ($p > 0,05$).

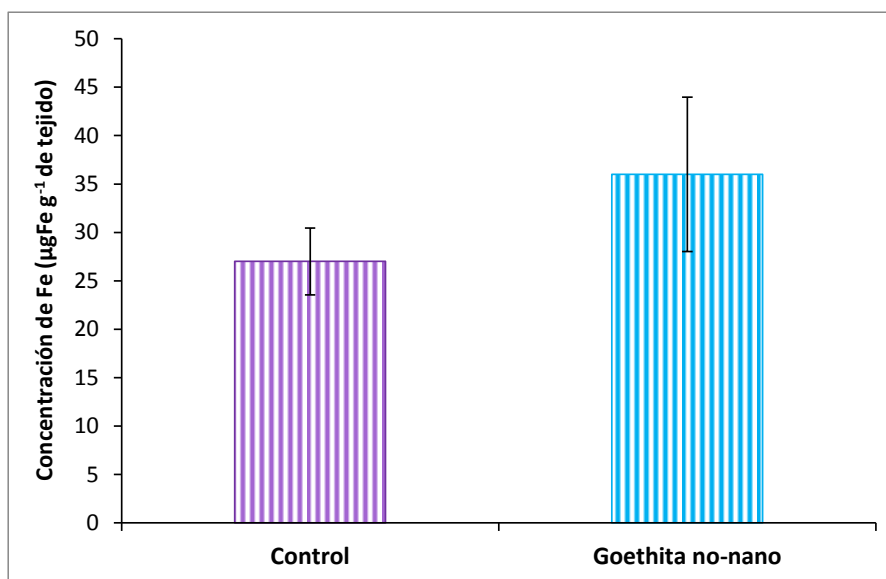


Fig. 21. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* expuestas por 72 h a una suspensión de goethita no-nano ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$). Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por grupo.

14.2 Bioensayos en Suelo Artificial

Se realizaron ensayos en SA exponiendo los organismos a distintos niveles de nano-goethita (10, 100 y 1000 $\mu\text{g NPs g}^{-1}$ de SA) durante 10 días. Si bien las normas (Environment Canada, 2007; US-EPA, 2012) recomiendan un período de exposición mayor (28 días), se prefirió limitar estos bioensayos a 10 días de exposición. Frente a tiempos mayores (18 días) se observó un descenso significativo en el contenido basal de Fe en organismos controles que disminuía a un valor igual a $44,6 \pm 11,1 \mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (**Fig. 22**), representando aproximadamente un 56% respecto del valor basal tras 10 días de exposición.

Los valores de concentración de Fe en lombrices expuestas a distintos niveles de suspensiones de NPs en SA durante 10 días se presentan en la **Fig. 23**. Con respecto a los organismos controles, los niveles de Fe en *E. andrei* resultaron significativamente menores. La menor concentración de Fe se observó en los ejemplares expuestos a las dos mayores concentraciones de NPs, registrándose una disminución de 53% y 56%, respectivamente, en relación a los controles.

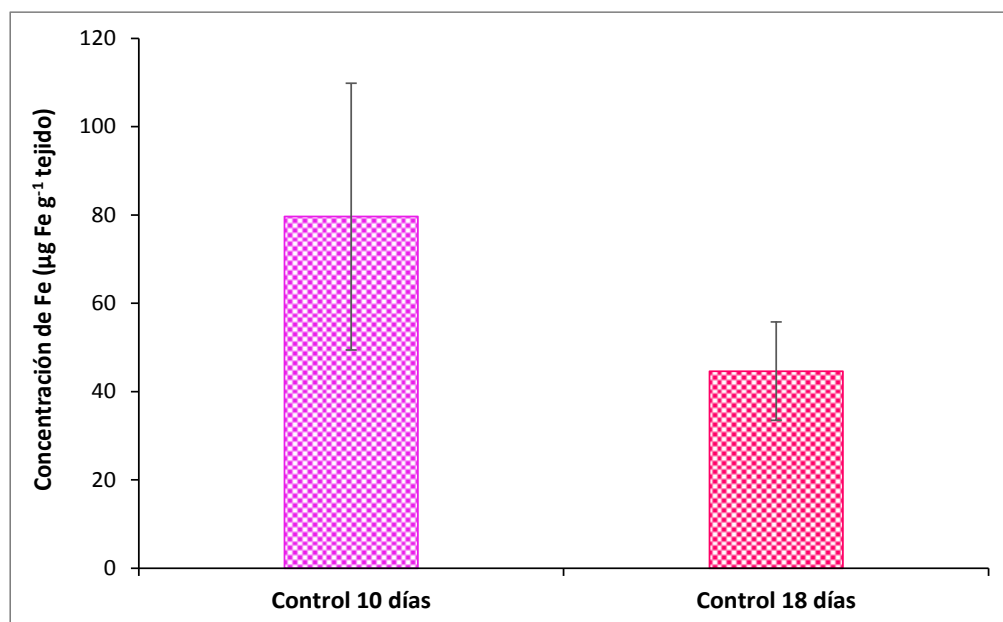


Fig. 22. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* a suelo artificial durante 10 y 18 días. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por tiempo.

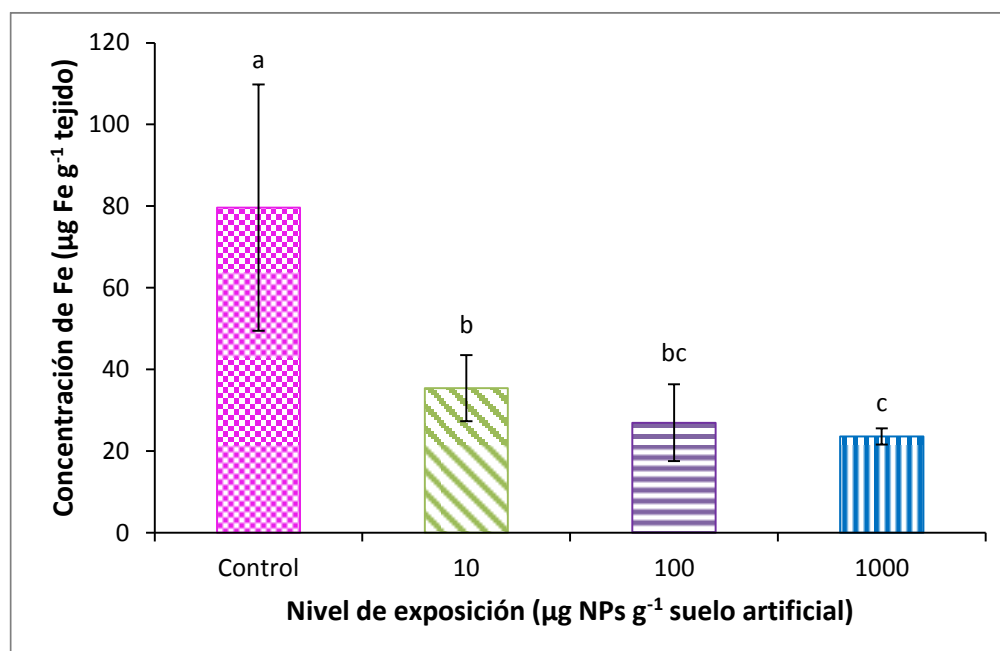


Fig. 23. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* expuestas a distintos niveles de NPs de goethita en suelo artificial durante 10 días. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por nivel. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

15 Parámetros relacionados con procesos de estrés oxidativo en *E. andrei* expuestas a NPs de goethita

A continuación se presentan los resultados de distintos parámetros medidos en lombrices expuestas por distintos tiempos (24, 48 y 72 h) a papeles de filtro impregnados con suspensiones de NPs de goethita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$).

15.1 Actividad de Catalasa (CAT)

Los valores de actividad CAT en lombrices expuestas a NPs de goethita a distintos tiempos se muestran en la **Fig. 24**. No se observaron diferencias significativas a 24 h y 72 h. Sin embargo, se registró una disminución (20%) en la actividad de esta enzima a las 48 h de exposición ($p < 0,05$).

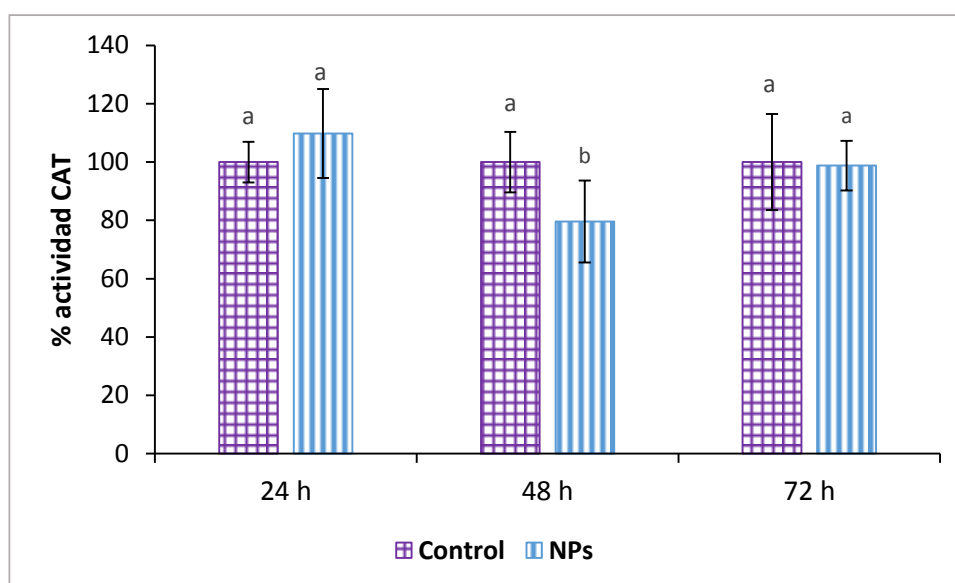


Fig. 24. Actividad de CAT en lombrices expuestas a NPs ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) a distintos tiempos. Los resultados se expresan como % de actividad catalasa respecto del control y representan el promedio \pm la desviación estándar de 5 lombrices por tiempo y tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Valores Control ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$): 24 h: $56,41 \pm 3,92$; 48 h: $69,68 \pm 7,25$; 72 h: $53,23 \pm 8,76$.

15.2 Actividad de Glutati3n-S-Transferasa (GST)

En la **Fig. 25** se muestra la actividad de GST de lombrices expuestas a NPs de goethita. No se registraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima en organismos expuestos a NPs en ninguno de los tres tiempos estudiados (24, 48 y 72 h) ($p > 0,05$).

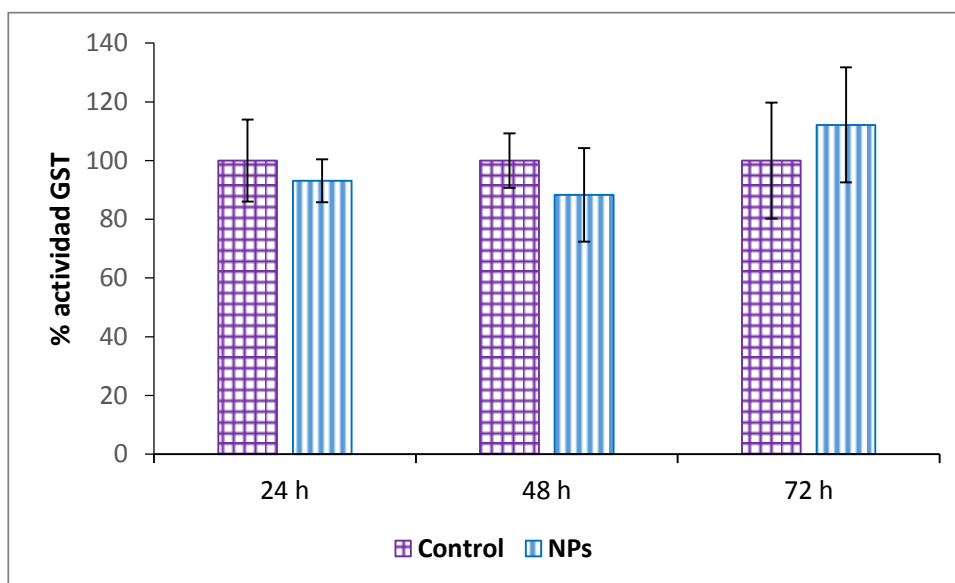


Fig. 25. Actividad de GST en lombrices expuestas a NPs ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) a distintos tiempos. Los resultados se expresan como % de actividad de GST respecto del control y representan el promedio \pm la desviaci3n est3ndar de 5 lombrices por tiempo y tratamiento. Valores Control ($\text{nmol mg prote3na}^{-1} \text{ min}^{-1}$): 24 h: $181,20 \pm 25,32$; 48 h: $277,51 \pm 25,71$; 72 h: $217,09 \pm 42,81$.

15.3 Niveles de Glutati3n Oxidado (GSSG) y Reducido (GSH)

En la **Fig. 26** se muestran los porcentajes relativos de GSH y GSSG hallados en lombrices expuestas a NPs de goethita por 24, 48 y 72 h. Se registr3 un ligero aumento, estad3sticamente no significativo, en los porcentajes de GSSG tanto en organismos controles como expuestos a NPs por 48 y 72 h con respecto a los organismos controles o expuestos a NPs por 24 h. Sin embargo, la exposici3n a NPs no modific3 significativamente los porcentajes de GSH o de GSSG o la relaci3n GSH/GSSG (**Tabla 6**) con respecto al control correspondiente a ninguno de los tiempos ensayados, ($p > 0,05$).

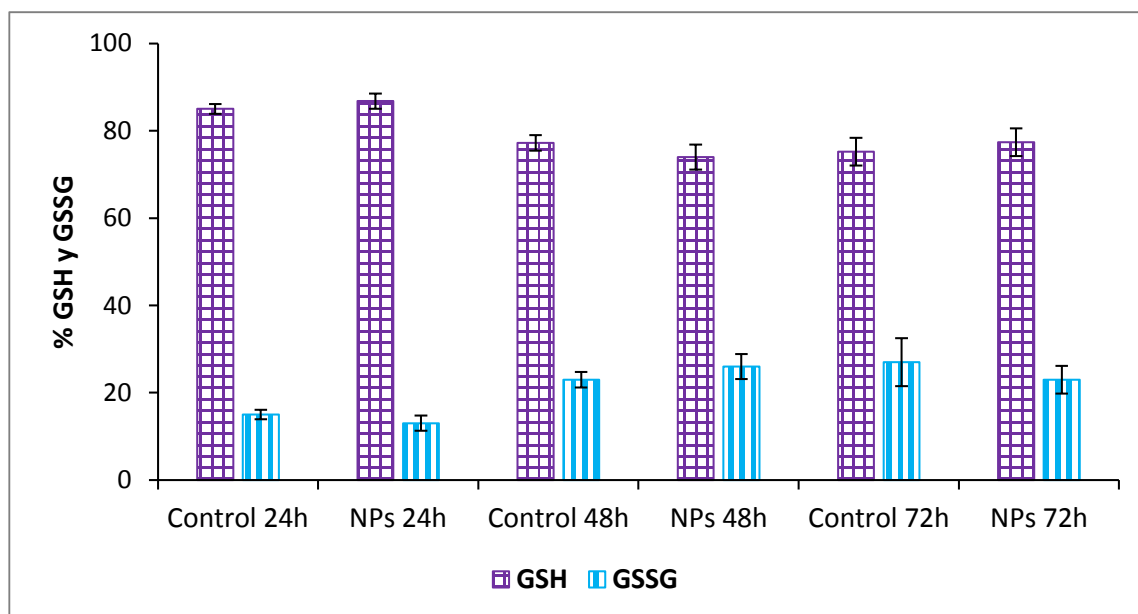


Fig. 26. Valores de GSH y GSSG en lombrices *E. andrei* expuestas a NPs ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) a distintos tiempos. Los resultados se expresan como % GSH o GSSG respecto del total (GSH + GSSG) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 5 lombrices por tiempo y tratamiento. Valores Control GSH ($\mu\text{mol g tejido}^{-1}$ (peso húmedo)): 24 h: $3,19 \pm 0,12$; 48 h: $1,59 \pm 0,18$; 72 h: $0,98 \pm 0,27$. Valores Control GSSG ($\mu\text{mol g tejido}^{-1}$ (peso húmedo)): 24 h: $0,58 \pm 0,06$; 48 h: $0,47 \pm 0,03$; 72 h: $0,32 \pm 0,07$.

Tratamientos	GSH/GSSG
Control 24 h	5,6 \pm 0,5
NPs 24 h	6,3 \pm 0,8
Control 48 h	3,4 \pm 0,2
NPs 48 h	2,9 \pm 0,4
Control 72 h	3,1 \pm 0,6
NPs 72 h	3,4 \pm 0,7

Tabla 6. Relación GSH /GSSG en lombrices *E. andrei* expuestas a NPs de goethita por distintos tiempos.

15.4 Capacidad antioxidante total (TOSC)

Los valores resultantes del ensayo de TOSC se presentan en la **Fig. 27**. En comparación con los organismos controles, se observó un descenso estadísticamente significativo (20%) en la capacidad antioxidante total de aquellos organismos expuestos por 72 h a papeles de filtro impregnados con $50 \mu\text{g cm}^{-2}$ de NPs de goethita ($p < 0,05$).

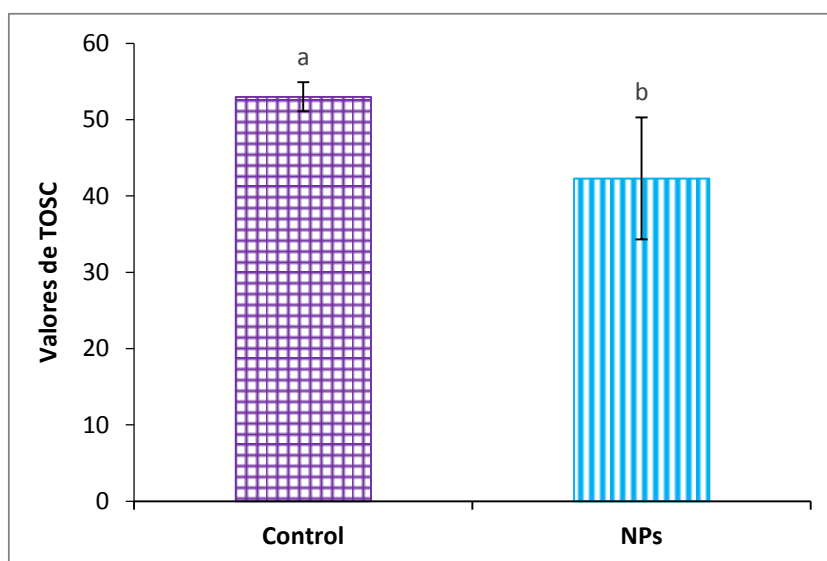


Fig. 27. Valores del ensayo de TOSC en lombrices *E. andrei* expuestas por 72 h a una suspensión de NPs de goethita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$). Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por grupo. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

15.5 Daño por procesos de estrés oxidativo: Peroxidación de lípidos

La **Fig. 28** muestra los niveles de peroxidación lipídica, estimados como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, en *E. andrei* expuestas a $50 \mu\text{g cm}^{-2}$ de NPs de goethita a distintos tiempos.

No se registraron diferencias significativas en los niveles de TBARS en lombrices expuestas por 24 h y 48 h a NPs. Sorprendentemente se observó una disminución estadísticamente significativa (47%) en los niveles en lombrices expuestas a NPs por 72 h respecto de los organismos controles.

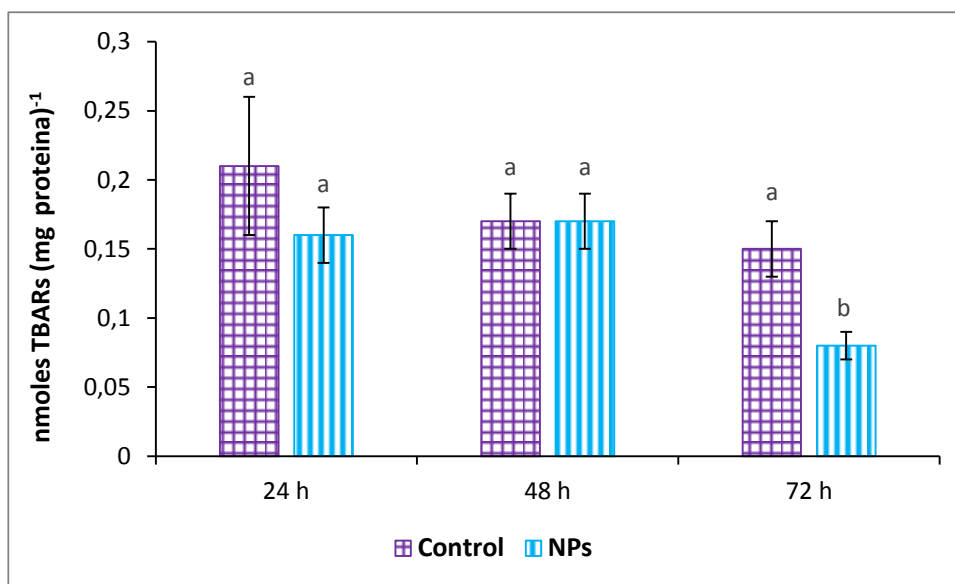


Fig. 28. Niveles de TBARS en *E. andrei* expuestas a NPs de goethita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) a distintos tiempos. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de 5 lombrices por tiempo. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

16 Interacción de NPs de goethita con contaminantes

Antes del estudiar las posibles interacciones resultantes entre las NPs y otros contaminantes se procedió a elegir niveles subletales frente a cada compuesto. Se optó por el bioensayo en papel y la concentración de NPs se fijó en $50 \mu\text{g cm}^{-2}$.

16.1 Metales: Cd y Pb

16.1.1 Elección de la concentración de trabajo

Previo a la exposición de *E. andrei* a mezclas de metales con NPs, se realizaron ensayos en papel a distintas concentraciones de Cd a fin de seleccionar una concentración de trabajo subletal. Por recomendación de literatura, se seleccionaron distintos niveles de exposición. Se expusieron lombrices a $0,4 - 2 - 10 - 16,6 \mu\text{g Cd cm}^{-2}$ por 72 h. Se observó 100% de mortalidad a la mayor concentración ensayada, mientras que a las demás concentraciones no se registró mortalidad.

La **Fig. 29** muestra los niveles de Cd en función del nivel de exposición. Los resultados mostraron una correlación de tipo logarítmica entre los niveles de exposición y el contenido del metal incorporado ($r = 0,99$). Para estudiar la influencia de las NPs de goethita en la incorporación de metales se eligió trabajar con la concentración de exposición más baja.

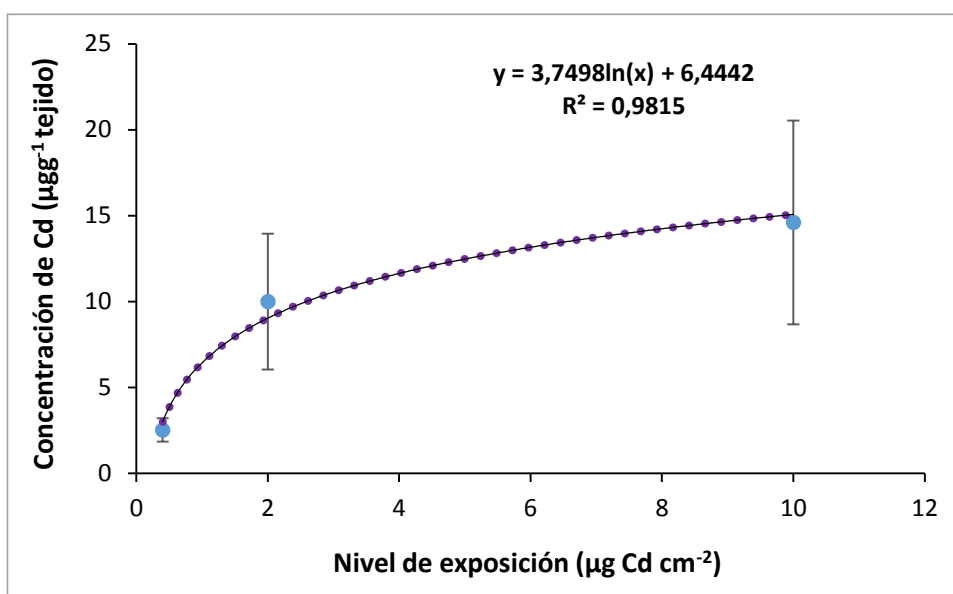


Fig. 29. Curva de incorporación de Cd en función del nivel de exposición. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 5 lombrices por nivel. Tiempo de exposición: 72 h.

Para fines comparativos, se eligió trabajar con una concentración de Pb equimolar a la de Cd ($2,14 \cdot 10^{-4}$ M; equivalente a $0,74 \mu\text{g Pb cm}^{-2}$). A este nivel no se registró mortalidad de los organismos al cabo de 72 h de exposición.

16.1.2 Influencia de nano-goethita en el ingreso de Cd

En la **Fig. 30** se muestran los niveles de Cd en lombrices expuestas por 72 h a Cd ($0,4 \mu\text{g Cd cm}^{-2}$) en presencia o ausencia de NPs de goethita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) utilizando papel como medio soporte. Los valores de Cd en lombrices controles no se incluyen ya que se encontraron siempre por debajo del límite de detección (Cd: $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido).

Frente a este metal se observó un descenso significativo por efecto de las NPs, que alcanzó el 50% en el contenido de Cd ($p < 0,05$).

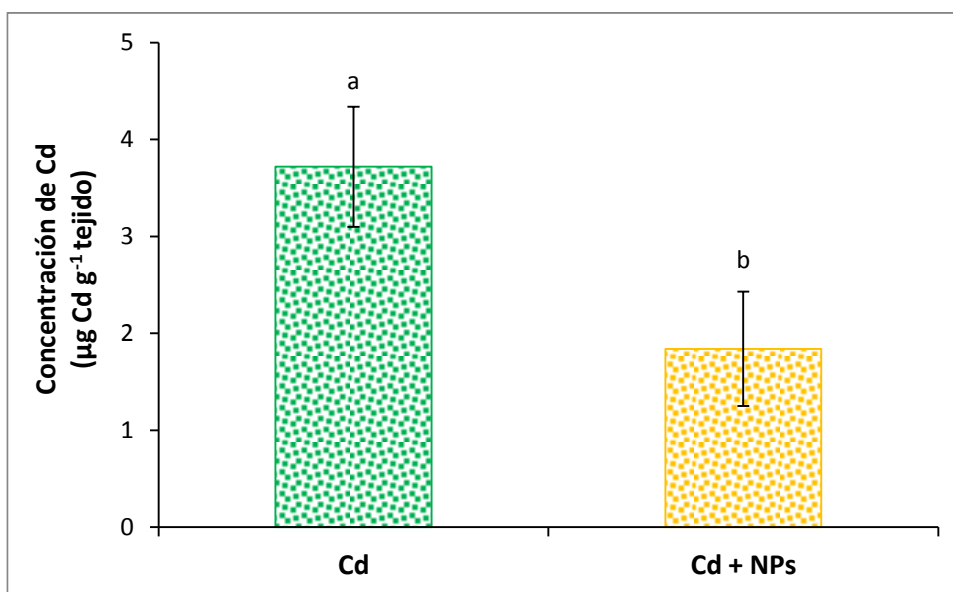


Fig. 30. Valores de concentración de Cd en lombrices *E. andrei* expuestas en papel por 72 h al metal ($0,4 \mu\text{g Cd cm}^{-2}$) en presencia y ausencia de NPs de goethita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$). Los resultados se expresan en $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por grupo. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

16.1.3 Influencia de nano-goethita en el ingreso de Pb

En la **Fig. 31** se muestran los niveles de Pb en lombrices expuestas por 72 h a Pb ($0,74 \mu\text{g Pb cm}^{-2}$) en presencia o ausencia de NPs de goethita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) utilizando papel como medio soporte. Los valores de Pb en lombrices controles no se incluyen ya que se encontraron siempre por debajo del límite de detección (Pb: $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido).

Frente a este metal se observó también un descenso significativo por efecto de las NPs de goethita, que alcanzó el 35% en el contenido de Pb ($p < 0,05$).

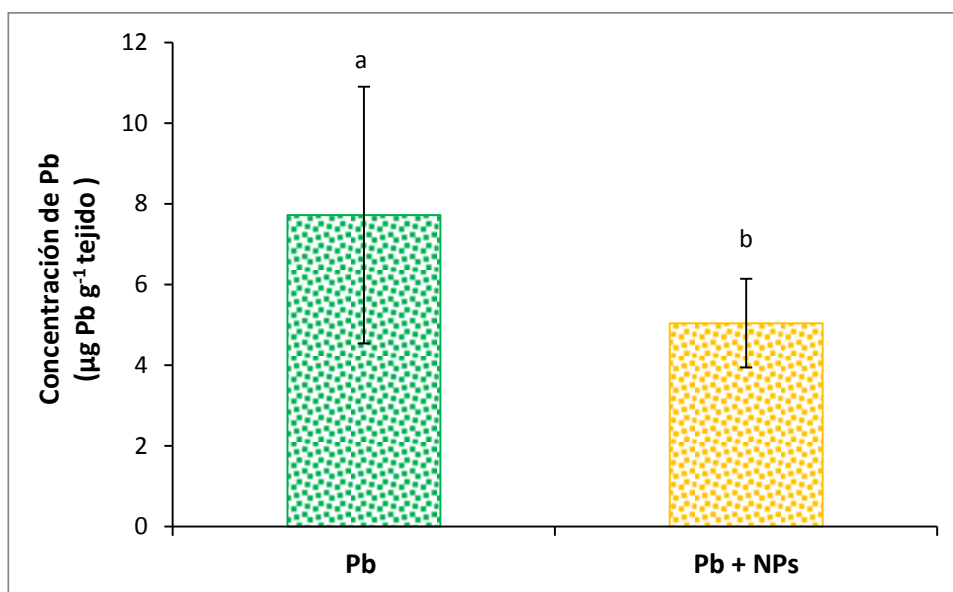


Fig. 31. Valores de concentración de Pb en lombrices *E. andrei* expuestas en papel por 72 h al metal ($0,74 \mu\text{g Pb cm}^{-2}$) en presencia y ausencia de NPs de goethita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$). Los resultados se expresan en $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por grupo. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

16.1.4 Ingreso de nano-goethita en presencia de metales

En la **Fig. 32** se muestran los valores de concentración de Fe de lombrices expuestas por 72 h a papeles de filtro impregnados con mezclas de metal (Cd o Pb) + NPs de goethita, así como también los valores de lombrices expuestas solamente a NPs o a los metales en ausencia de NPs.

Los niveles de Fe disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) en los organismos expuestos solamente a las NPs o a Cd, observándose en ambos casos una disminución de alrededor del 50% en el contenido de Fe respecto de los controles. En cambio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en los valores de Fe de los organismos expuestos a Pb o a las mezclas de los metales + NPs con respecto de los organismos controles.

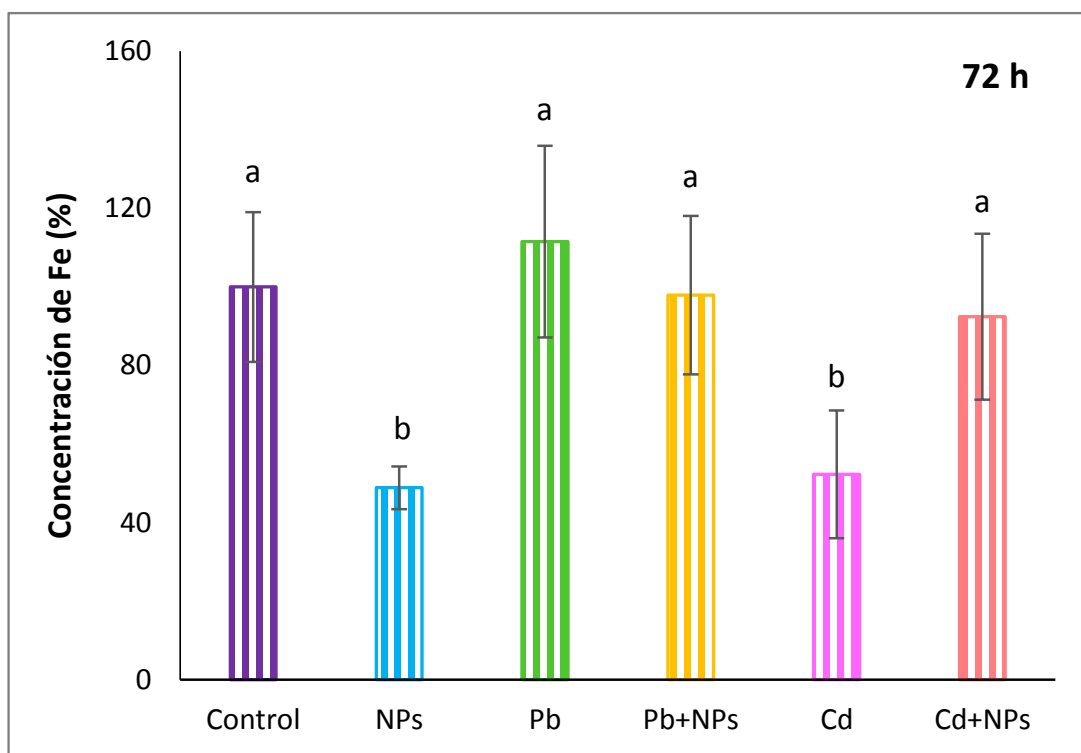


Fig. 32. Valores de Fe de lombrices expuestas por 72 h a papeles de filtro impregnados con mezclas de metal (Cd o Pb)+NPs de goethita, y con Cd, Pb o NPs solamente. Los resultados se expresan como % de Fe respecto del control y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Valor Control: $54 \pm 9 \mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo).

16.2 Clorpirifos (CPF)

16.2.1 Estudios de interacción CPF – NPs por espectroscopía UV-vis y SEM

Dado que en nuestros ensayos se utilizaron papeles de filtro impregnados con la mezcla de NPs y CPF, resultaba dificultoso el estudio de la interacción entre ellos en dicho medio. Por esta razón, se propuso investigar qué cambios podrían verificarse en solución.

16.2.1.1 Estudios por espectroscopía UV-visible

Para poder estudiar las posibles interacciones entre las NPs de goethita y el pesticida CPF en solución acuosa se realizaron los espectros de una suspensión de NPs de goethita (10 mg NPs L⁻¹), de una solución de CPF (5 mg L⁻¹) y de la mezcla NPs+CPF respectivamente.

Se eligió una concentración de 10 mg L⁻¹ de NPs de goethita debido a que ésta ya había sido utilizada en nuestro laboratorio en bioensayos con invertebrados acuáticos (la lombriz *Lumbriculus variegatus* y el gasterópodo *Biomphalaria glabrata*) (Gigena et al., 2016). La concentración de CPF (5 mg L⁻¹) se fijó teniendo en cuenta los valores utilizados por Zalat et al. (2014).

En la **Fig. 33** se muestran los espectros del CPF, de la suspensión de NPs, y de la mezcla NPs+CPF. Al comparar el espectro de absorbancia del CPF (**Fig. 33 A**) con el de la mezcla (**Fig. 33 C**) se puede observar que el pico a 260 nm, correspondiente al máximo de absorbancia del pesticida, se redujo en un 50% por la adición de NPs. Esta disminución ocurrió en los primeros 5 minutos de incubación de la mezcla a temperatura ambiente. La incubación por tiempos más prolongados (hasta 20 minutos) no modificó los resultados obtenidos a los 5 minutos (**Fig. 33 D**). Es de destacar que en los espectros de la mezcla no se observaron picos adicionales a los presentes en los espectros de CPF y de la suspensión NPs.

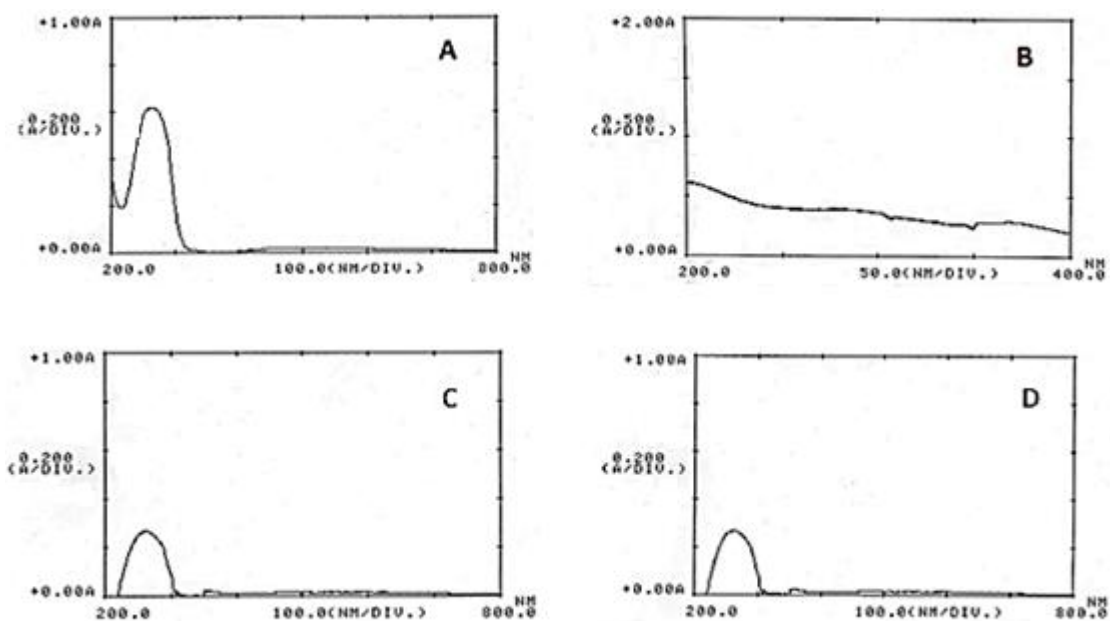


Fig. 33. Espectros UV-visible de: A) CPF B) NPs de goethita, C) y D) mezcla NPs+CPF luego de 5 min y 20 min de incubación a temperatura ambiente respectivamente. Concentración de CPF: 5 mg L^{-1} , concentración de NPs: 10 mg L^{-1} .

Cuando se procedió a realizar un segundo agregado de NPs a la mezcla inicial de tal forma de aumentar la relación NPs/CPF al doble, se observó que el pico de absorbancia del CPF a 260 nm desaparecía totalmente (**Fig. 34**).

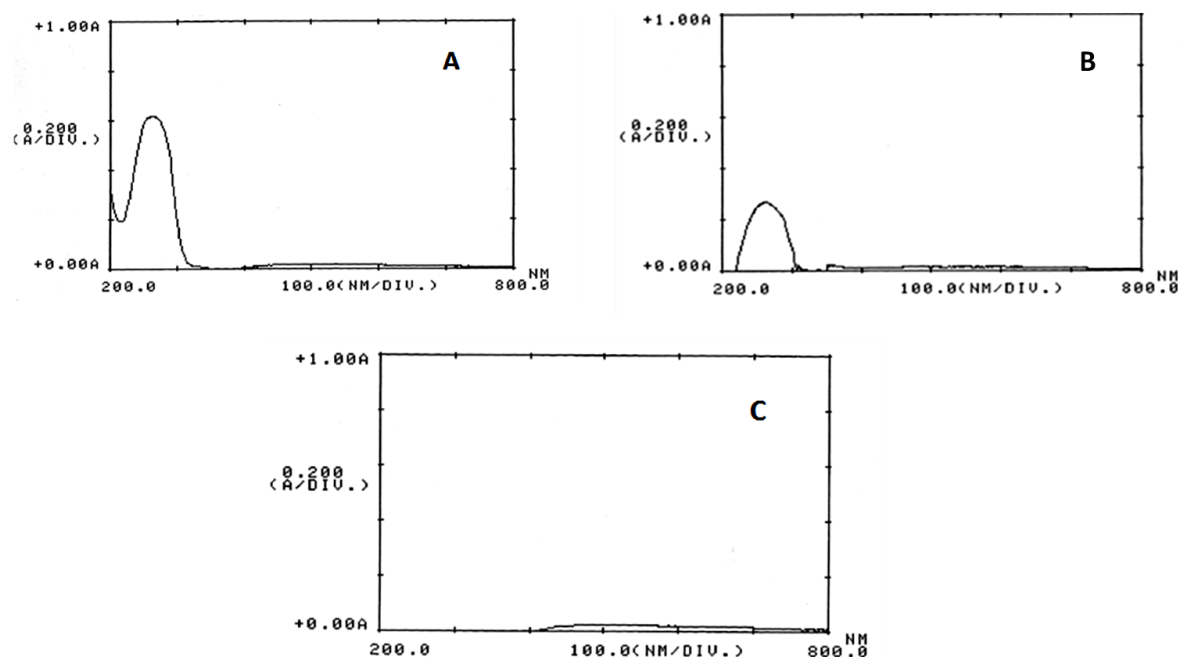


Fig. 34. Espectros UV-visible de A) CPF (5 mg L^{-1}), B) mezcla de NPs+CPF (10 mg NPs L^{-1} y 5 mg CPF L^{-1}) y C) mezcla de NPs+CPF luego del segundo agregado de NPs (Concentración final: 20 mg NPs L^{-1} y 5 mg CPF L^{-1}). Tiempo de incubación a temperatura ambiente: 20 min.

16.2.1.1.1 Interacción de CPF con goethita no-nano

A fin de comparar lo observado con nano-goethita con su análogo a macroescala, se mezclaron 10 mg L^{-1} de goethita no-nano con 5 mg L^{-1} de CPF. Se obtuvo el espectro al cabo de 20 min. Luego se realizó un segundo agregado de goethita no-nano y se volvió a registrar el espectro al cabo de 20 minutos.

En la **Fig. 35** se muestran los espectros de CPF, goethita no-nano, y de la mezcla goethita no-nano + CPF luego del primer y segundo agregado. En ambos casos se observó una leve disminución en la absorbancia de la mezcla con respecto al clorpirifos solo. Asimismo, en el segundo caso el descenso en la absorbancia fue más marcado respecto del primer agregado.

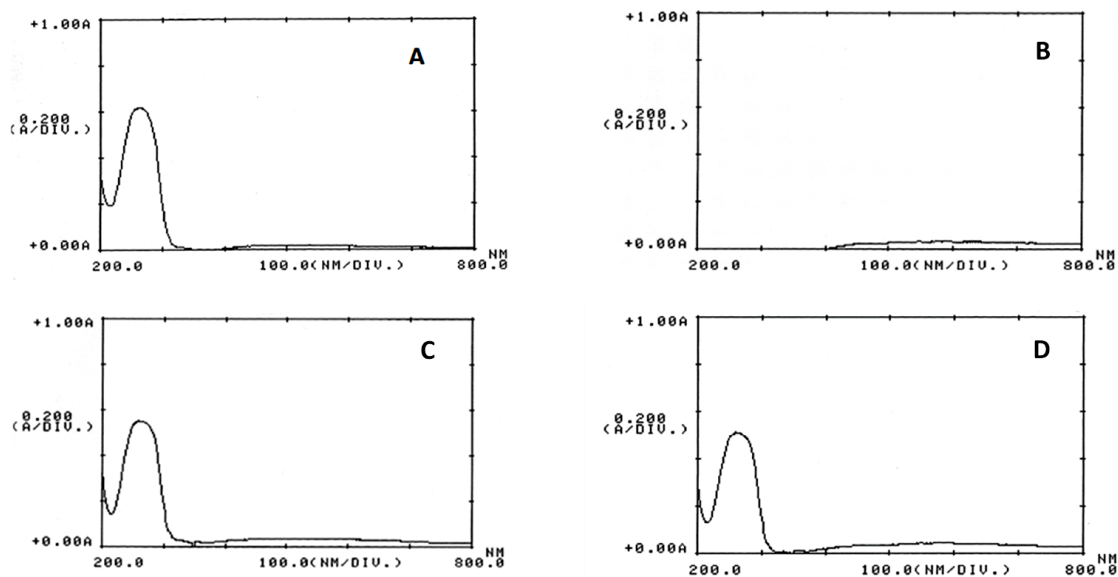


Fig. 35. Espectros UV-Visible de A) CPF (5 mg L^{-1}), B) goethita no-nano, C) mezcla de goethita no-nano + CPF (10 mg L^{-1} goethita no-nano y 5 mg CPF L^{-1}), D) mezcla de goethita no-nano + CPF luego del segundo agregado de goethita (Concentración final: 20 mg L^{-1} de goethita no-nano y 5 mg CPF L^{-1}). Tiempo de incubación a temperatura ambiente: 20 min.

16.2.1.2 Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la **Fig. 36** se observan las imágenes tomadas con microscopía SEM de NPs de goethita y de la mezcla NPs+CPF. Las **Fig. 36 A** y **Fig. 36 B** corresponden a una suspensión de NPs de 10 mg L^{-1} de goethita, mientras que las **Fig. 36 C, D** y **E** son de una mezcla de 5 mg L^{-1} de CPF y 10 mg L^{-1} de NPs, tomadas con distintas magnificaciones.

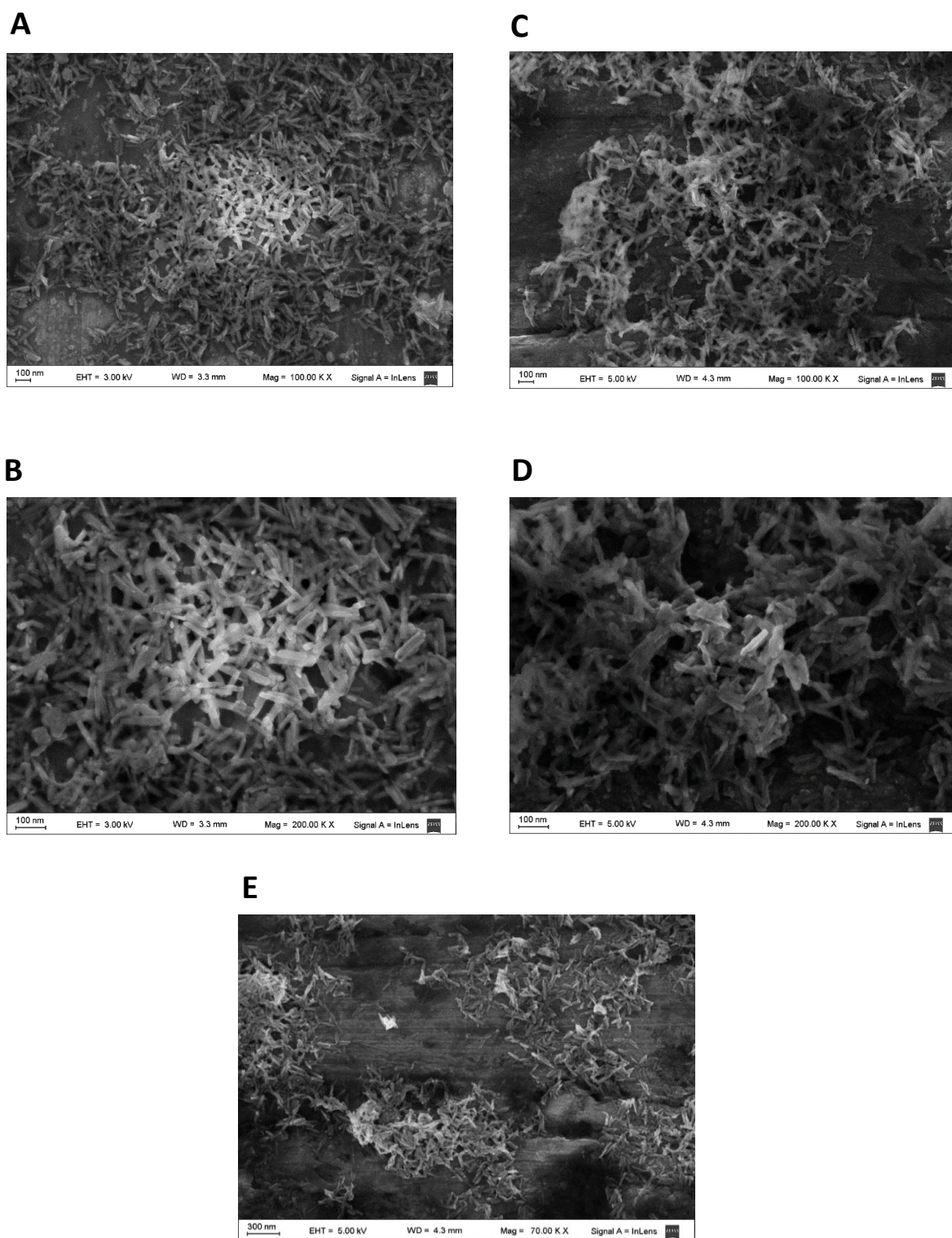


Fig. 36. Imágenes SEM de A) suspensión de NPs de goethita en 100.000 X, B) suspensión de NPs de goethita en 200.000 X, C) mezcla NPs+CPF en 100.000 X, D) mezcla NPs+CPF en 200.000 X E) mezcla NPs+CPF en 70.000 X. Concentración de CPF: 5 mg L⁻¹, concentración de NPs: 10 mg L⁻¹.

En las **Fig. 36 A y B** se observan los bastones característicos de goethita con una distribución uniforme. En las **Fig. 36 C y D** se observan que las partículas de nano-goethita se encuentran más agregadas debido a la adición del pesticida. La **Fig. 36 E** fue tomada con menor magnificación para apreciar mejor la agregación.

Por otra parte, el análisis por EDX de la mezcla de NPs y CPF reveló la presencia de los elementos Fe, O, S, Ca, Na, Si, P y Cl (**Fig. 37 y Tabla 7**). Al comparar estos resultados con los obtenidos con NPs solas (**Fig. 18, Tabla 4**) y con CPF solo (**Fig. 38, Tabla 8**) se puede inferir que el P y el Cl da cuenta de la presencia de CPF. El S proviene en parte de la cinta utilizada en los estudios, pero mayoritariamente se debe a la presencia de CPF. El Na y Ca también provendrían de la solución de CPF, mientras que el Si se debe a impurezas provenientes de los frascos de vidrio que contenían a la solución madre de CPF y a la suspensión de NPs.

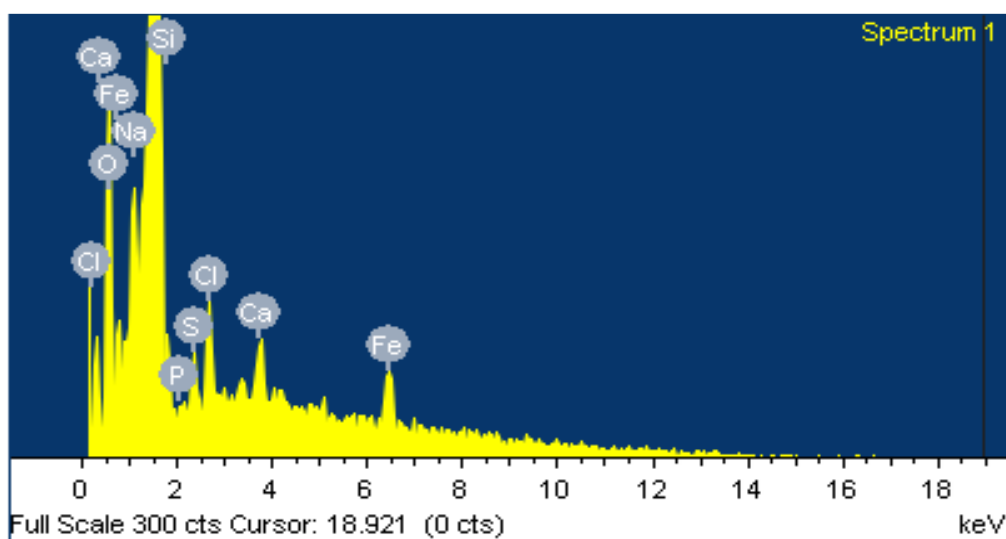


Fig. 37. Espectro EDX de la mezcla de NPs+CPF. Concentración de NPs: 10 mg L^{-1} , concentración de CPF: 5 mg L^{-1} .

Elemento	% en peso	% atómico
O	54,92	71,18
Na	11,75	10,60
Si	8,49	6,27
S	2,88	1,86
Cl	6,15	3,60
Fe	11,48	4,26
Ca	4,32	2,24
Total	100	-

Tabla 7. Análisis elemental EDX de la mezcla NPs+CPF. Concentración de NPs: 10 mg L⁻¹, concentración de CPF: 5 mg L⁻¹

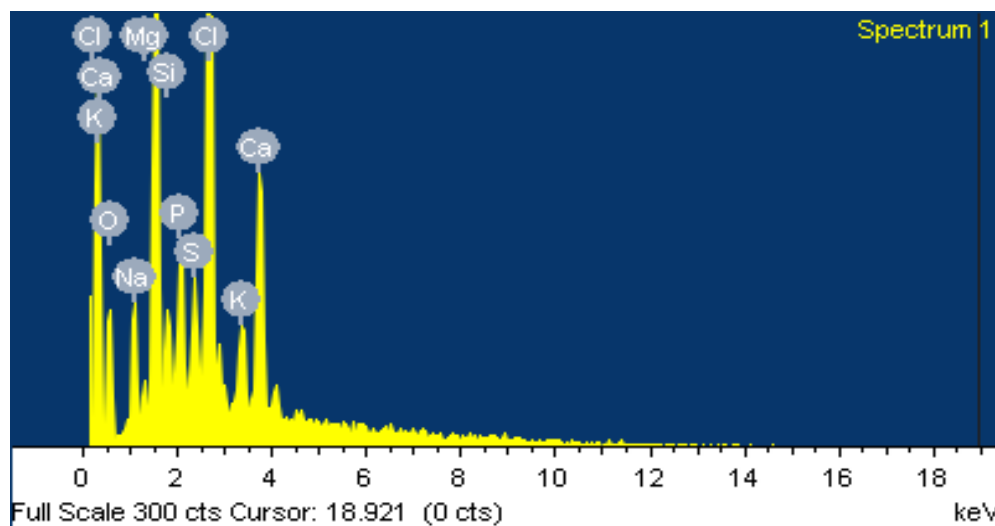


Fig. 38. Espectro EDX de la solución madre de CPF, concentración: 1150 mg L⁻¹.

Elemento	% en peso	% atómico
O	36,39	54,23
Na	6,24	6,47
Mg	2,11	2,07
Si	3,58	3,04
P	5,24	4,03
S	4,01	2,98
Cl	24,03	16,16
K	4,85	2,96
Ca	13,55	8,06
Total	100	-

Tabla 8. Análisis EDX de la solución madre de CPF, concentración: 1150 mg L⁻¹.

16.2.2 Estudios *in vivo*

Dado que se observó interacción entre las NPs de goethita y CPF, se diseñaron experimentos tendientes a estudiar si la co-exposición a CPF y NPs modificaba los efectos que produce el CPF y/o alteraba el ingreso de NPs de goethita en *E. andrei*.

16.2.2.1 Elección de la concentración de trabajo

Como se indicó en la sección de Materiales y Métodos, se decidió trabajar con una concentración de CPF que inhibiera un 45 - 55% la actividad de la enzima AChE. Para ello, se realizaron ensayos previos con lombrices expuestas a distintas concentraciones de CPF (0; 0,1; 0,5; 0,75 y 1 $\mu\text{g cm}^{-2}$) por 72 h y se midió la actividad de AChE. Adicionalmente, se midió como parámetro de toxicidad secundario la actividad de CES. Los resultados se muestran en las **Fig. 39** y **Fig. 40**.

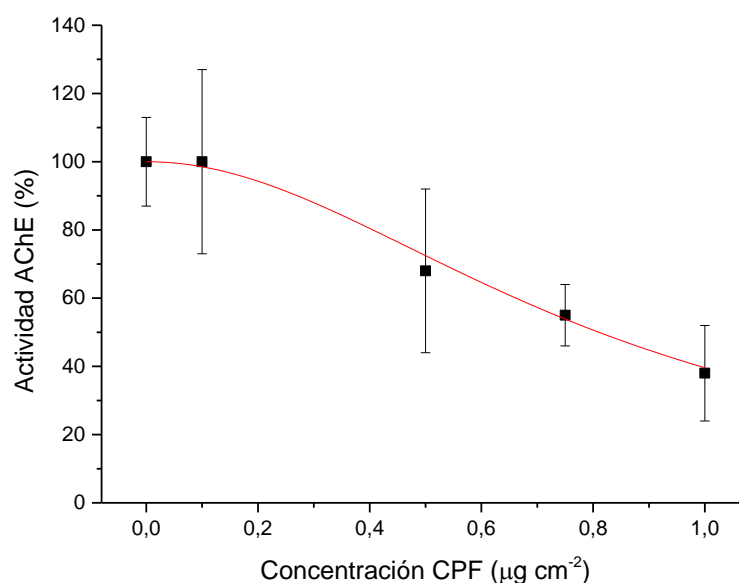


Fig. 39. Efectos de concentraciones crecientes de CPF sobre la actividad de AChE de lombrices *E. andrei*. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de al menos 3 lombrices por nivel. Valor control ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$): $80,25 \pm 10,75$. Tiempo de exposición: 72 h.

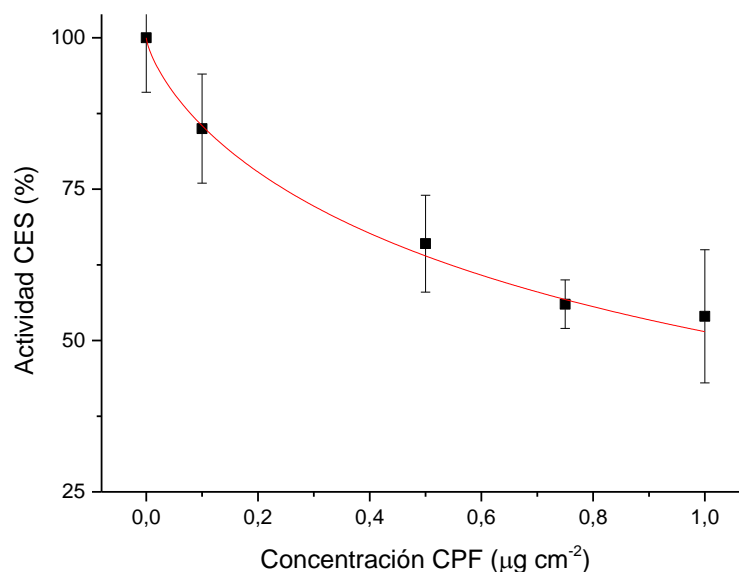


Fig. 40. Efectos de concentraciones crecientes de CPF sobre la actividad de CES de lombrices *E. andrei*. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de al menos 3 lombrices por nivel. Valor control ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$): $99,53 \pm 8,93$. Tiempo de exposición: 72 h.

Las curvas para ambas enzimas se ajustaron al modelo logístico de regresión no lineal de acuerdo a la ecuación:

$$y = \frac{A_2 + (A_1 - A_2)}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

En la **Tabla 9** se muestran los cuatro parámetros calculados, el r^2 y la concentración efectiva media (CE_{50}) de CPF en papel para la actividad de AChE, así como también los parámetros y el r^2 para la curva de actividad de CES. La CE_{50} para CES no fue calculada dado que la actividad a la máxima concentración ensayada fue mayor al 50% del control.

Enzima	Modelo	A ₁	A ₂	X ₀	p	r ²	CE ₅₀ (µg cm ⁻²)
AChE	Logístico	100	0	0,81 \pm 0,02	2,00 \pm 0,26	0,994	0,81 \pm 0,02
CES	Logístico	100	0	1,08 \pm 0,07	0,74 \pm 0,08	0,992	-

Tabla 9. Parámetros de ajuste y CE_{50} para las relaciones dosis-respuesta de las enzimas AChE y CES en *E. andrei* expuestas a CPF

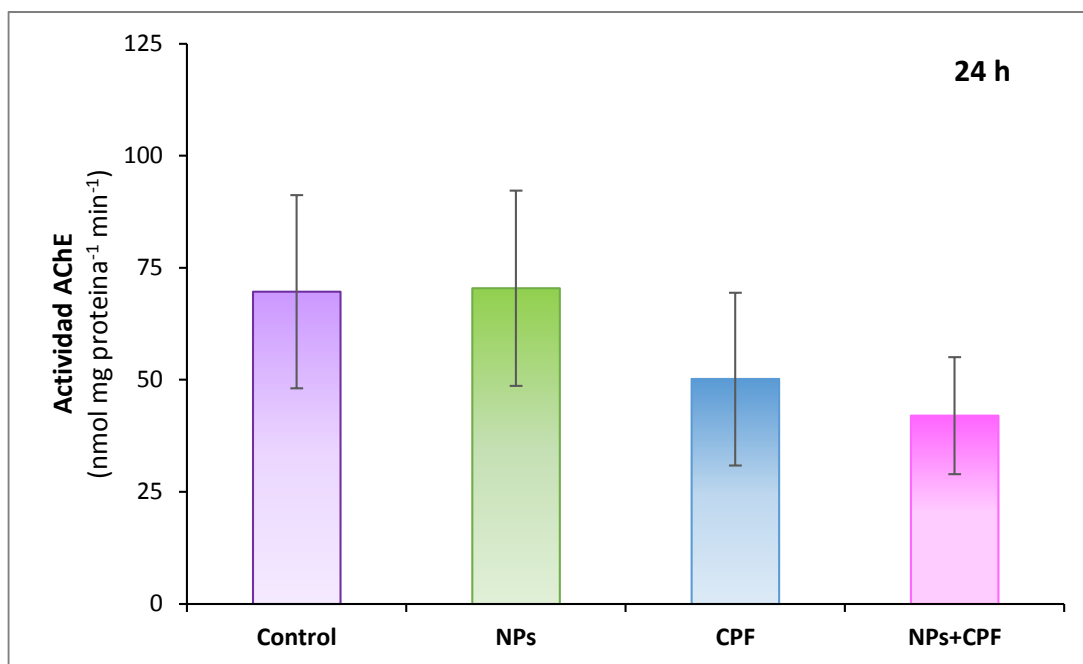
Para los siguientes ensayos se eligió trabajar con una concentración de $0,75 \mu\text{g cm}^{-2}$ ya que es la concentración que inhibió la actividad de AChE dentro del rango buscado y con menor dispersión de datos. A esa concentración de trabajo, la actividad de CES presentó una inhibición del 44%.

16.2.2.2 Interacción entre nano-goethita y CPF

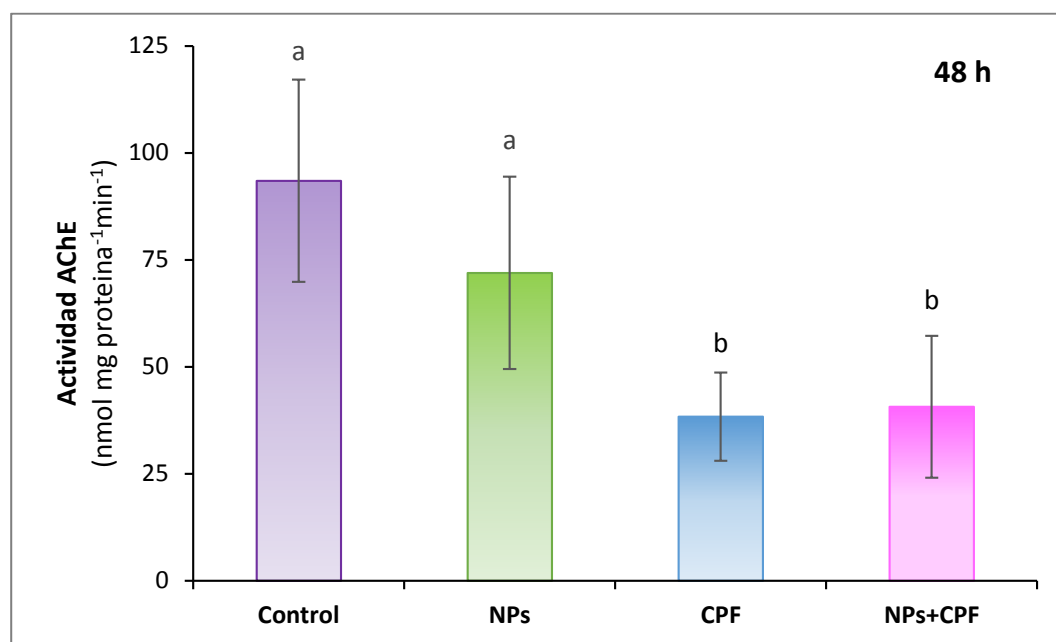
16.2.2.2.1 Actividad de Acetilcolinesterasa

En la **Fig. 41** se muestran los resultados de la evaluación de la actividad de AChE en sobrenadantes de lombrices expuestas a distintos tiempos a NPs de goethita, CPF y a la mezcla de NPs y CPF (NPs+CPF). A las 24 h de exposición (**Fig. 41 A**), se registró una disminución no significativa (28%; $p > 0,05$) en la actividad de AChE en lombrices expuestas solamente a CPF, mientras que en las lombrices expuestas solamente a NPs no se registraron diferencias significativas en la actividad de este enzima respecto del control ($p > 0,05$). En cambio, la actividad de AChE en lombrices expuestas a la mezcla de NPs+CPF se inhibió un 40% ($p < 0,05$).

A)



B)



C)

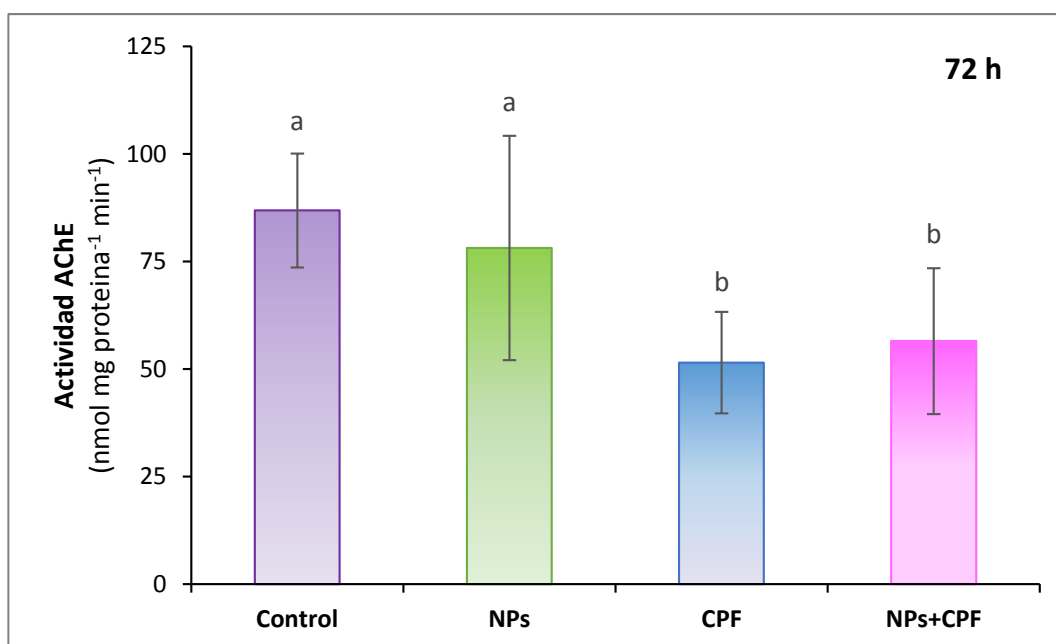


Fig. 41. Actividad de AChE en sobrenadantes de lombrices expuestas NPs, CPF y a la mezcla de NPs+CPF por A) 24 h B) 48 h y C) 72 h. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes, $n=12$. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Concentración de NPs: $50 \mu\text{g cm}^{-2}$; concentración de CPF: $0,75 \mu\text{g cm}^{-2}$.

A las 48 h de exposición (**Fig. 41 B**) se observaron aumentos en los porcentajes de inhibición de AChE en lombrices expuestas a CPF y a la mezcla de NPs+CPF con respecto a las 24 h de exposición. La actividad de AChE a las 48 h se inhibió un 60% y 56% en los ensayos con CPF y NPs+CPF respectivamente ($p < 0,05$) respecto de los controles. Al igual a lo observado a las 24 h, las lombrices expuestas a NPs de goethita no registraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima respecto del control ($p > 0,05$). A las 72 h de exposición (**Fig. 41 C**), la actividad de AChE solo se inhibió en lombrices expuestas a CPF y a la mezcla (44% y 35% respectivamente; $p < 0,05$).

Adicionalmente, se evaluó la actividad de AChE en los *pellets* resultantes de la centrifugación de los homogenatos a $9.000 \times g$. En la **Fig. 42** se muestra la actividad específica en *pellets* y sobrenadantes de las muestras provenientes de lombrices controles. La actividad de AChE en los controles resultó ser en el *pellet* similar a la medida en el sobrenadante. Para estudiar si la actividad de AChE en el *pellet* mostraba valores similares de inhibición por CPF que la medida en el sobrenadante, se analizó la actividad de esta enzima en los *pellets* de lombrices expuestas por 48h y 72 h a CPF y a la mezcla NPs+CPF y se calculó la relación de actividades en *pellet*/sobrenadante (**Fig. 43 A y B**). A las 48 h, la inhibición de la enzima resultó ser mayor en los sobrenadantes que en los *pellets* ($p < 0,05$). A las 72 h sólo se observó una mayor inhibición en los sobrenadantes en el caso de las lombrices expuestas solamente a CPF ($p < 0,05$).

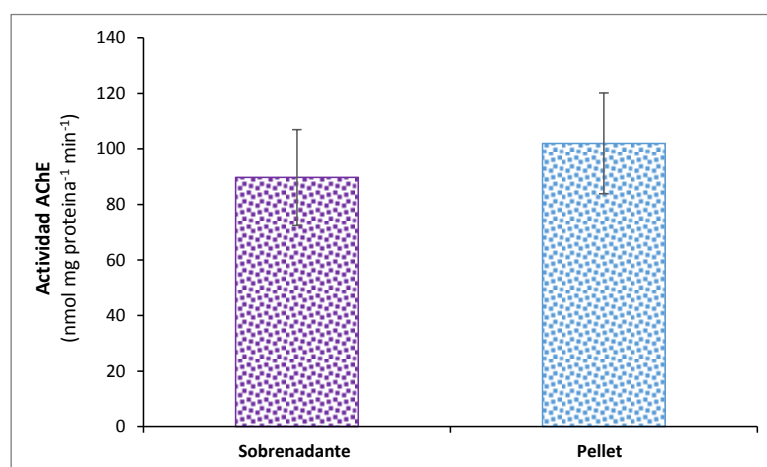
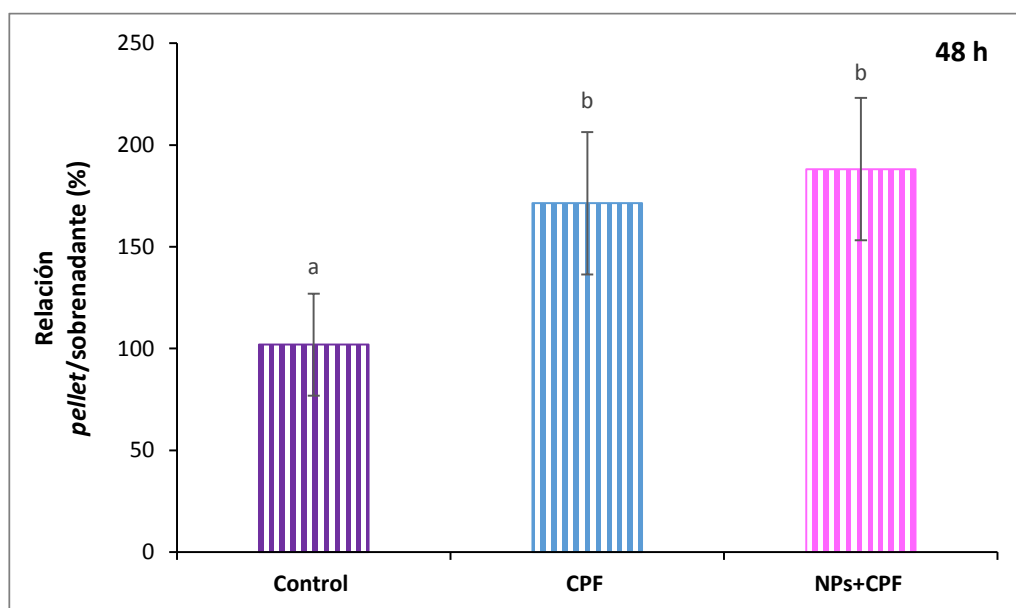


Fig. 42. Actividad de AChE en *pellets* y sobrenadantes de lombrices controles. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de 4 experimentos independientes, $n=20$. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A)



B)

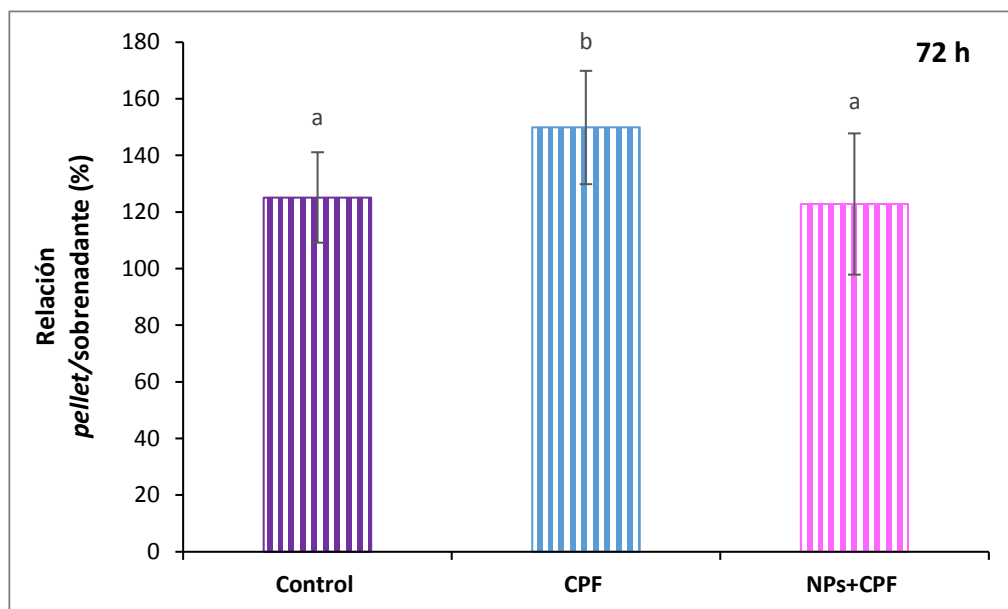


Fig. 43. Relación de la actividad de AChE en *pellets* y sobrenadantes de lombrices expuestas a CPF y a la mezcla de NPs+CPF. A) Relación *pellet*/sobrenadante en lombrices expuestas 48 h. B) Relación *pellet*/sobrenadante en lombrices expuestas 72 h. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes, $n=9$. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

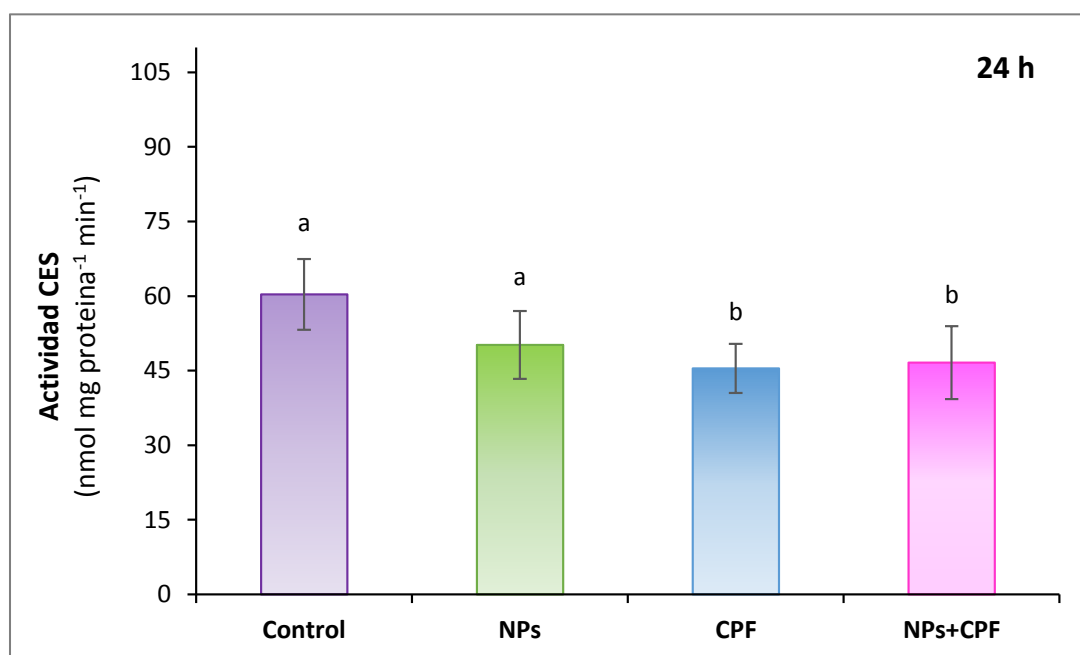
16.2.2.2.2 Actividad de carboxilesterasas

En la **Fig. 44** se muestran los resultados de la actividad de CES en lombrices expuestas por 24, 48 y 72 h a NPs de goethita, CPF y a la mezcla de NPs y CPF (NPs+CPF).

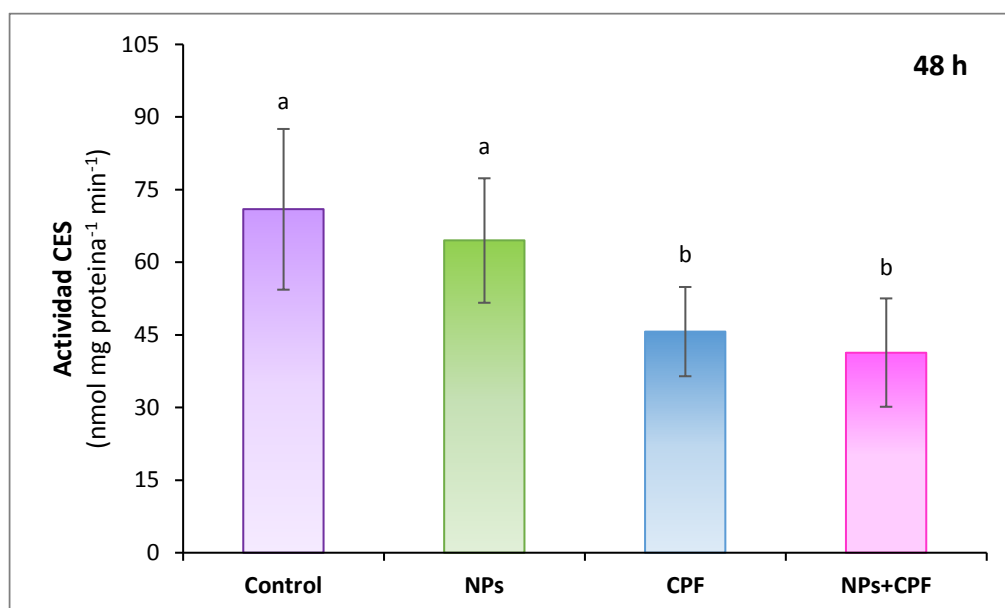
En todos los tiempos estudiados las lombrices expuestas a NPs de goethita no presentaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima respecto del control ($p > 0,05$). Sin embargo, en las lombrices expuestas a la mezcla NPs+CPF se registró una disminución significativa en la actividad de CES con respecto a los organismos controles ($p < 0,05$).

A las 24 h se observó un 22% de inhibición, mientras que a 48 h y 72 h de exposición la inhibición fue de 42% y 47% respectivamente. Además, a todos los tiempos ensayados la inhibición de CES inducida por la mezcla resultó similar a la inhibición observada en lombrices expuestas solamente a CPF.

A)



B)



C)

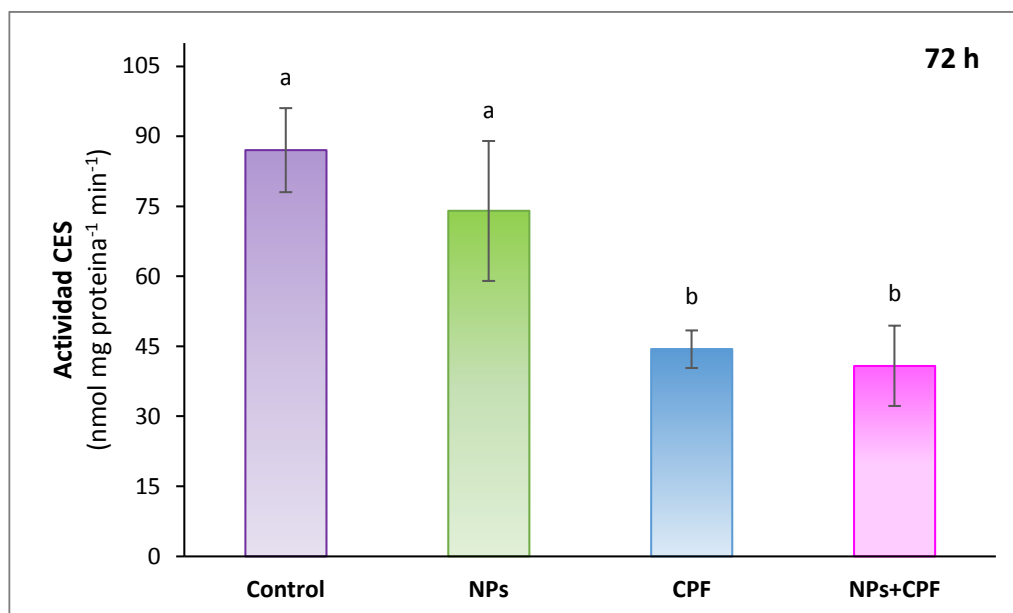


Fig. 44. Actividad de CES en lombrices expuestas a NPs, CPF y a la mezcla de NPs+CPF por A) 24 h B) 48 h y C) 72 h. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes, $n=12$. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Concentración de NPs: $50 \mu\text{g cm}^{-2}$; concentración de CPF: $0,75 \mu\text{g cm}^{-2}$.

16.2.2.2.3 Síntomas de toxicidad en lombrices *E. andrei* expuestas a NPs, CPF, y a la mezcla de NPs+CPF

Se observó que la apariencia de los individuos expuestos por 72 h a NPs de goethita (**Fig. 45 b**) se asemejaba al de las lombrices controles (**Fig. 45 a**). En contraste, los individuos expuestos a CPF (**Fig. 45 c y d**) se encontraban enrollados en sí mismos, mostrando falta de movimiento y contracción de todo el cuerpo y en algunos casos decoloración. Las lombrices expuestas a la mezcla de NPs+CPF (**Fig. 45 e**) también presentaron características similares, aunque sólo presentaban una de sus extremidades enrolladas.

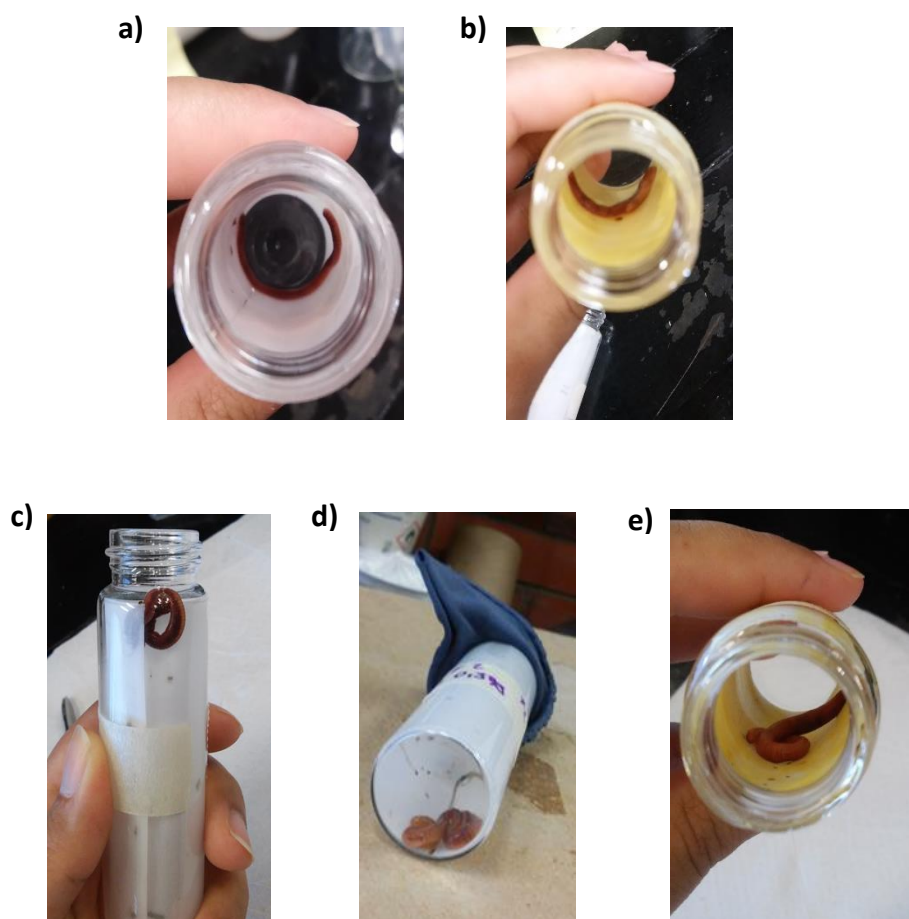


Fig. 45. Lombrices *E. andrei* expuestas por 72 h a papeles de filtro impregnados con a) agua destilada (control) b) NPs de goethita, c) y d) CPF, e) mezcla NPs+CPF. Concentración de CPF: $0,75 \mu\text{g cm}^{-1}$, concentración de NPs: $50 \mu\text{g cm}^{-1}$.

16.2.2.3 Ingreso de nano-goethita en presencia de CPF

En la **Fig. 46 A y B** se muestran los valores de concentración de Fe en lombrices expuestas por 24 h y 48 h a la mezcla de NPs+CPF. No se registraron diferencias significativas ($p>0,05$) en los valores de Fe de organismos expuestos a la mezcla respecto del control tras 24 h de exposición. En cambio, a las 48 h se observó un aumento significativo (41%; $p<0,05$) en el contenido de Fe en los oligoquetos expuestos a la mezcla.

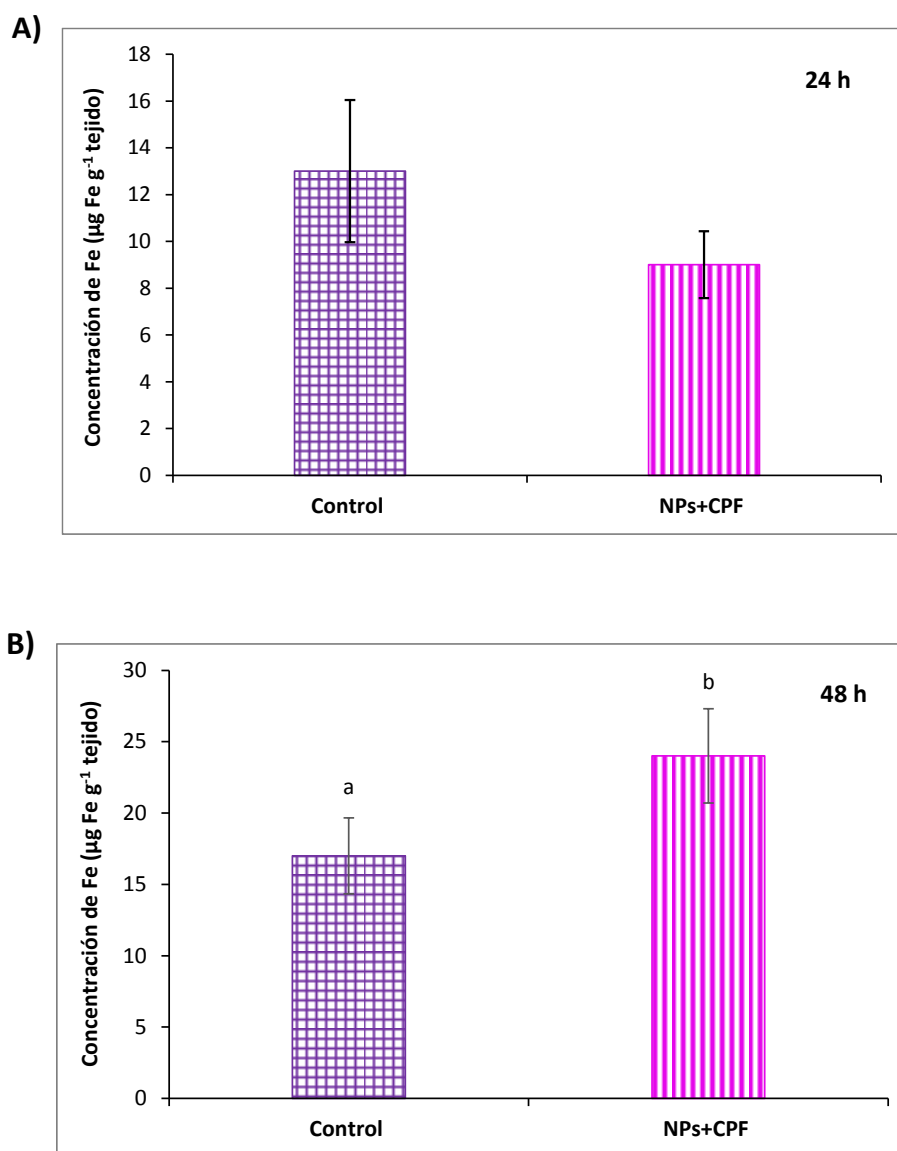


Fig. 46. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* expuestas a la mezcla binaria de NPs+CPF a A) 24 h y B) 48 h. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por tiempo y tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$). Concentración de NPs: $50 \mu\text{g cm}^{-2}$; concentración de CPF: $0,75 \mu\text{g cm}^{-2}$.

En la **Fig. 47** se muestra los valores de concentración de Fe en lombrices expuestas por 72 h a la mezcla de NPs+CPF. Se incluyeron además valores de organismos expuestos al insecticida solamente. Se registró un aumento significativo (65%; $p < 0,05$) en los valores de Fe de los organismos expuestos a la mezcla. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de lombrices expuestas a CPF solamente en relación a los organismos controles.

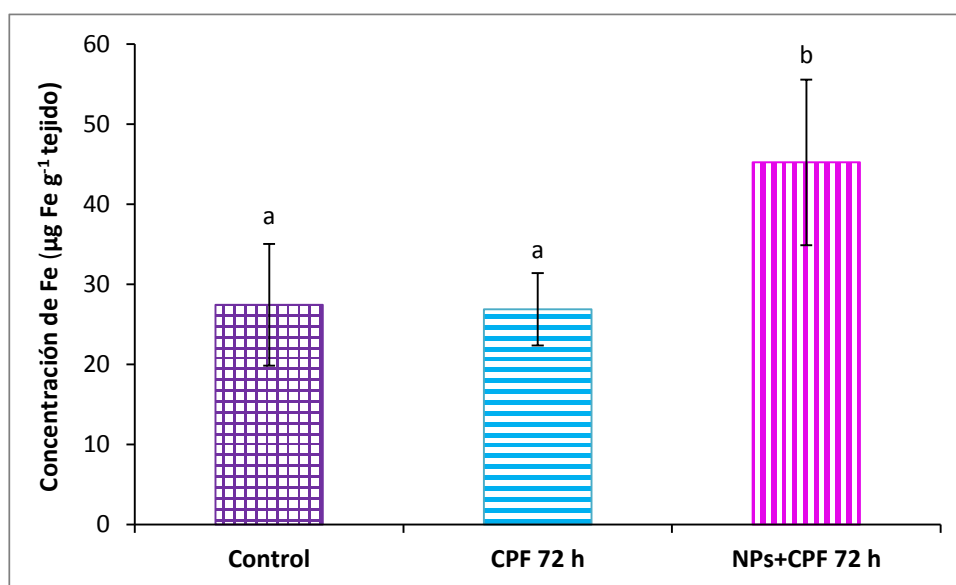


Fig. 47. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* expuestas por 72 h a CPF y a la mezcla binaria de NPs+CPF. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el promedio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Concentración de NPs: $50 \mu\text{g cm}^{-2}$; concentración de CPF: $0,75 \mu\text{g cm}^{-2}$.

IV. Discusión



17 Ingreso de goethita en *E. andrei*

El ingreso de las NPs de goethita en *E. andrei* se investigó mediante el análisis del contenido de Fe como parámetro indicador de exposición. Es necesario reconocer que, hasta el momento, no se dispone de metodologías suficientemente eficaces para cuantificar a las NPs con exactitud (Handy et al., 2008). Por esta razón, cuando se utilizan NPs de metales y/o de sus óxidos u oxihidróxidos, los análisis del contenido de dichos elementos constituyen una aproximación ampliamente empleada (Croteau et al., 2011; Hu et al., 2012; Jo et al., 2012; Ates et al., 2015).

Para este trabajo se emplearon dos tipos de medio soporte para realizar los bioensayos. En un caso se recurrió a un medio estandarizado constituido por suelo artificial, donde las lombrices fueron expuestas por un período de 10 días a distintos niveles de suspensiones de NPs. Contrario a lo esperado, los niveles de Fe presentes en los organismos expuestos resultaron siempre menores a los niveles basales encontrados en los organismos controles. Por otra parte, no se observó una clara correlación entre los niveles de Fe detectados en los organismos con los niveles de exposición, ya que entre las dos concentraciones más bajas (10 y 100 $\mu\text{g NPs g}^{-1}$ suelo) y las dos más altas (100 y 1000 $\mu\text{g NPs g}^{-1}$ suelo) no se observaron diferencias significativas entre sí. Si bien las normas recomiendan un período de exposición mayor para evaluar toxicidad mediante estudios de exposición crónica (28 días) (US-EPA, 2012), se prefirió limitar estos bioensayos a 10 días de exposición. Frente a tiempos mayores se observó un descenso significativo en el contenido basal de Fe en organismos controles. A comparación de los suelos naturales, el suelo artificial carece de los nutrientes en calidad y cantidad suficiente para mantener un estado de salud óptimo de las lombrices durante períodos prolongados. Por esta razón, se prefirió efectuar los bioensayos durante períodos más cortos.

Los ensayos que emplean papeles de filtro impregnados con sustancias cuya toxicidad se pretende determinar, constituyen una alternativa avalada desde hace tiempo por organismos internacionales (OECD, 1984). Estos bioensayos permiten evaluar el ingreso de sustancias químicas por contacto, es decir, por vía dérmica. Esta ruta de exposición puede desempeñar un rol importante para el ingreso de diversos metales en lombrices terrestres (Vijver et al., 2003).

En cambio, los bioensayos que recurren al uso de suelo artificial, además de considerar la posibilidad de ingreso por contacto, permiten evaluar fundamentalmente la incorporación por ingestión. En los ensayos por contacto la normativa recomienda efectuar las exposiciones en forma aguda por un período de 48 horas, y eventualmente de hasta 72 h ya que al usar papel como medio soporte los organismos carecen completamente de la disponibilidad de cualquier tipo de nutrientes. Para estos bioensayos se decidió fijar un nivel subletal de exposición ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) y cuantificar los niveles de Fe cada 24 h. Inicialmente, tras 24 y 48 h de exposición, se observó un incremento significativo respecto a los valores basales presentes en organismos controles. Sin embargo, tras 72 h de exposición se registró un marcado descenso en los valores de Fe en las lombrices. Por un lado, estos resultados demuestran que durante las primeras 48 h, las lombrices fueron capaces de incorporar las NPs. Además, con esta técnica se podría descartar que dichos incrementos en el contenido de Fe observados en los dos primeros tiempos de exposición fueran debidos a la presencia transitoria de NPs en el tracto gastrointestinal de los organismos ya que la vía de ingestión no está disponible. Sin embargo, el descenso de los niveles de Fe observado tras 72 h de exposición en los bioensayos utilizando papeles de filtro impregnados en conjunto con los descensos registrados en los bioensayos en los cuales se empleó suelo artificial no son fáciles de explicar. Podría sugerirse que más allá de que las lombrices estén expuestas a las NPs por ingestión o por vía dérmica, se estaría verificando el primer proceso de la toxicocinética, es decir que estaríamos en presencia de una verdadera absorción. Como consecuencia de esta absorción, se desencadenaría una serie de efectos sistémicos que conducirían a la excreción de una parte de los niveles basales de Fe. Dicha excreción podría tener lugar incluso a niveles de NPs menores a las ensayadas en los experimentos con suelo artificial, por cuanto de acuerdo a **Fig. 23** no se encontró una buena correlación entre el contenido de hierro y la concentración de nano-goethita.

Frente a los descensos encontrados en los niveles de Fe en organismos expuestos a las NPs de goethita cabría preguntarse si el mismo efecto podría observarse en lombrices expuestas a goethita no-nano (o macro goethita). Sin embargo, los óxidos y oxihidróxidos de Fe son prácticamente insolubles a valores de pH fisiológicos. Por otro lado, la baja solubilidad de goethita dificulta el análisis de especies iónicas. Por consiguiente, en escala macro, es de esperar que su incorporación en los organismos sea despreciable, dado que se considera que

el ingreso de iones metálicos se verifica fundamentalmente a través de las especies iónicas disueltas (Peijnenburg et al., 1999).

Para verificar esto, las lombrices fueron expuestas por 72 h a papeles impregnados con goethita no-nano y se utilizó la misma concentración que para nano goethita ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$). A diferencia de lo observado con las lombrices expuestas a NPs, el contenido de Fe en los organismos expuestos no difirió significativamente respecto a los organismos controles. En este sentido, Bernard et al., (2010) tampoco observaron cambios en el contenido corporal de dicho metal en lombrices terrestres aún frente a exposiciones crónicas a suelos con distintos niveles de contaminación de Fe.

Debido a las dificultades que presenta el estudio de NPs manufacturadas en medios complejos, existen pocos datos sobre la exposición de la biota del suelo a estas partículas y su comparación con su análogo a macro escala. En cambio, sí se han realizado algunos estudios con ciertas NPs metálicas y sales de dichos metales. Algunos investigadores han estudiado el ingreso y la acumulación de NPs de Au y de iones Au^{3+} (como HAuCl_4) en *E. andrei* expuestas a suelo artificial (Unrine et al., 2010). En ambos casos, la acumulación fue dependiente de la concentración de exposición y fue mayor para Au^{3+} . Asimismo, lombrices expuestas a NPs de Ag y a AgNO_3 mostraron un comportamiento similar (Shoults-Wilson et al., 2011). Se observó mayor acumulación de Ag en las lombrices expuestas a AgNO_3 que en las expuestas a las NPs.

18 Parámetros relacionados con procesos de estrés oxidativo en *E. andrei* expuestas a NPs de goethita

El estudio de biomarcadores da una visión más completa de cómo los organismos se ven afectados por la fracción biodisponible de contaminantes presentes en el ambiente (Gastaldi et al., 2007). Se considera que son señales de alerta temprana que pueden utilizarse en la evaluación del riesgo de contaminación ambiental. El uso de indicadores subletales de estrés como biomarcadores constituye un enfoque que es potencialmente útil para evaluar la respuesta de un solo organismo o de una población de organismos a contaminantes (Cataldo et al., 2011). Uno de los factores que pueden incidir sobre los parámetros bioquímicos es el tiempo de exposición de los individuos durante el bioensayo (Novais et al., 2011; Gomes et al., 2012), por lo que es importante incluir distintos tiempos de exposición dentro de los límites de los ensayos estandarizados.

En este trabajo se determinó la actividad de CAT (enzima antioxidante), la actividad de GST (enzima detoxificante), y los niveles de GSH y GSSG en lombrices expuestas a papeles impregnados con NPs de goethita por 24, 48 y 72 h.

CAT es ubicua en arqueas, procariontes y eucariotas (Xiong et al., 2013). En las lombrices de tierra, la actividad de CAT se divide entre el citosol del cloragocito, células involucradas en el sistema inmune, (60-70%), y los peroxisomas del epitelio intestinal (30-40%). En ausencia de contaminantes, una de las funciones principales de CAT de los cloragocitos es la eliminación de H₂O₂ que surge de la interacción entre hemo-proteínas sanguíneas y oxígeno (Prentø, 1987).

En nuestros experimentos, la actividad de CAT disminuyó a las 48 h de exposición, pero retornó a valores controles luego de 72 h. La mayoría de los estudios publicados reportaron alteraciones en la actividad de CAT en lombrices terrestres expuestas en forma aguda a diferentes NPs metálicas, registrando tanto aumento como disminución en la actividad de esta enzima (Gomes et al., 2012, 2015; Lebedev et al., 2015). En particular, Tsyusko et al., (2012) reportaron una disminución en la actividad de CAT en lombrices *E. fétida* expuestas a NPs de Ag en suelo artificial por 3 días, retornando a valores controles luego de 7 días de

exposición. Si bien se trata de otras NPs y otros tiempos de exposición, nuestros resultados siguen esta tendencia.

En cuanto a la actividad de GST, ésta no se vio afectada a ningún tiempo de exposición. Gomes et al., (2012) midieron la actividad de GST en el anélido terrestre *Enchytraeus albidus* expuesto a suelo artificial adicionado con NPs de Cu por 4 días. Y en estudios posteriores lo hicieron en lombrices *E. fétida*, pero utilizando NPs de Ag (Gomes et al., 2015). En ninguno de los dos casos se observaron cambios en la actividad de esta enzima, lo cual concuerda con nuestros resultados.

El mantenimiento de la relación entre GSH y GSSG es esencial para las funciones normales del metabolismo celular. Muchos estudios establecen que la relación GSH/GSSG es un buen indicador del nivel de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lange et al., 2002; Zitka et al., 2012; Stanicka et al., 2015). Por ejemplo, Gomes et al., (2012) midieron el contenido de GSH y GSSG en *E. albidus* expuestos a suelo artificial contaminado con NPs de Cu. No observaron cambios en los niveles de GSH y GSSH tras 2 días de exposición. En cambio, registraron una disminución significativa en los niveles de GSH tras 4 días de exposición a las 2 concentraciones de NPs ensayadas, mientras que los niveles de GSSG aumentaron significativamente respecto del control. Por otro lado, Hu et al., (2012) midieron los niveles de GSH en lombrices *E. fétida* expuestas a suelo artificial contaminado con NPs de Ag. El contenido de GSH fue significativamente mayor que en el grupo control, especialmente en el grupo expuesto a la mayor concentración.

Nuestros resultados indican que los niveles de GSH no se vieron afectados por el tratamiento con NPs de goethita a los tiempos de exposición ensayados. Los niveles de GSSG aumentaron luego de 48 y 72 h de exposición, Sin embargo, esto ocurrió tanto en organismos controles como expuestos. Este aumento conllevó una disminución en la relación GSH/GSSG y podría estar relacionado en mayor medida al estrés sufrido por las lombrices durante el bioensayo que a la exposición a las NPs. O bien, también podría ser una respuesta temprana al estrés oxidativo, que fue transitoria gracias a la rápida respuesta del GSH, que permitió mantener la homeostasis *redox*.

Con respecto al ensayo de la capacidad antioxidante total (TOSC), tras una exposición por 72 h se observó una significativa disminución respecto a los valores de organismos controles. Este ensayo permite estimar en forma integral el nivel de las defensas de un tejido u organismo, sean de carácter enzimático o no enzimático. De acuerdo a Regoli et al., (2002), el análisis de la capacidad antioxidante provee una mirada global de la susceptibilidad de ciertos organismos a sufrir procesos de estrés oxidativo. Un descenso en los valores refleja que ese tejido u organismo está sujeto a un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, de manera que se encuentra más susceptible para sufrir procesos de estrés oxidativo. Además, estos cambios en la capacidad antioxidante apoyan la teoría de que el mecanismo de acción de las NPs, y en particular de las de goethita, se podría verificar por alteraciones en la homeostasis celular *redox* (Hoet y Boczkowski, 2008).

Cuando las defensas antioxidantes resultan superadas por las EROs se pueden producir efectos nocivos principalmente sobre los lípidos, las proteínas y/o los ácidos nucleicos de los organismos expuestos al contaminante. Dentro de las EROs se destaca el radical $\cdot\text{OH}$. Éste se forma durante la reacción de Fenton (**Fig. 48**), es extremadamente reactivo y ataca a la mayoría de los componentes celulares. En los sistemas vivos la reacción que genera radicales $\cdot\text{OH}$, además de la reacción de Fenton, es conocida como la reacción de Haber-Weiss (**Fig. 49**) (Kehrer, 2000; Nimse y Pal, 2015), la cual se genera en presencia de anión $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y es catalizada por Fe^{3+} . En este trabajo, el daño oxidativo se evaluó mediante el contenido de lípidos peroxidados medidos como TBARs.

Algunos autores describieron alteraciones en el contenido de lípidos peroxidados en lombrices terrestres expuestas a diversas NPs. Gomes et al., (2012) midieron el contenido de TBARs en el anélido *E. albidus* expuesto a suelo artificial contaminado con NPs de Cu. No observaron variaciones en los niveles de TBARs a ningún tiempo de exposición. En un trabajo más reciente, Gomes et al., (2015) analizaron el contenido de lípidos peroxidados en *E. fétida* expuestas a suelo artificial contaminado con NPs de Ag. En este caso, los autores observaron un aumento en los niveles conforme aumentaba el tiempo de exposición y concentración de NPs.

Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en los niveles de TBARs de lombrices tratadas con NPs de goethita respecto del control luego de 24 h y 48 h de exposición. Esto indicaría que no se estarían produciendo procesos de estrés oxidativo a estos tiempos de exposición. En cambio, a las 72 h se registró una disminución significativa en los niveles de TBARs en lombrices expuestas a NPs. Esto podría relacionarse con los valores de Fe presentes en estas lombrices (sección 14.1). A este tiempo de exposición se registró una disminución en los niveles de este metal en los anélidos expuestos a NPs. Esto podría implicar un descenso en la producción del radical $\cdot\text{OH}$, lo cual derivaría en bajos niveles de peroxidación lipídica. También podría deberse a la catabolización del MDA.

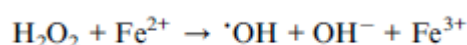


Fig. 48. Reacción de Fenton

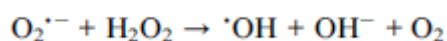


Fig. 49. Reacción de Haber-Weiss

No obstante, se requieren estudios adicionales incorporando indicadores que midan otros productos terminales del daño oxidativo, como ser daño al ADN y proteínas, con el propósito de obtener un panorama más completo.

19 Interacción de NPs de goethita con contaminantes

19.1 Metales: Cd y Pb

Se determinó la influencia de las NPs de goethita en la incorporación de otros metales tóxicos, en particular de Cd y Pb, frecuentes contaminantes en sistemas acuáticos y terrestres, no sólo por sus aplicaciones en la industria metalúrgica. Como se mencionó en la Introducción, en suelos, la contaminación por Cd puede derivarse también del uso de fertilizantes a base de fosfatos que naturalmente estén contaminados con el elemento o por el descarte de baterías de Cd-Ni sin tratamiento (UNEP: United Nations Environment Programme 2010; Syers y Cisse

2000). Este metal se caracteriza por su elevada toxicidad y alto potencial de acumulación en la biota (UNEP: United Nations Environment Programme, 2010a). Por su parte, la presencia de Pb puede ser consecuencia del rellenado de suelos con residuos contaminados (uso de lodos y/o sedimentos provenientes del dragado de ríos), de la liberación de desechos de baterías (UNEP: United Nations Environment Programme, 2010b) e incluso de residuos de disparos de armas de fuego (Luo et al., 2014).

Se han realizado diversos estudios de acumulación de metales pesados en lombrices terrestres (Morgan y Morris, 1982; Morgan y Morgan, 1988; van Gestel et al., 1993; Heikens et al., 2001; Hobbelen et al., 2006; Li et al., 2010; González-Alcaraz y Van Gestel, 2016), por citar algunos. Según la bibliografía, el Cd y el Pb tienen distintos patrones de acumulación en *E. andrei*. Sin embargo, ambos metales tienden a acumularse mayormente en la sección posterior de la lombriz, en particular, en el tracto digestivo y en el tejido cloragógeno. Esto podría estar relacionado con los cuerpos marrones que se forman en el fluido celómico de los segmentos posteriores de la lombriz (Morgan et al., 1989). El tejido cloragógeno contiene dos tipos de gránulos, llamados cloragosomas (Karaca et al., 2010). El primer tipo de gránulos consiste en complejos ricos en fosfatos, conteniendo Ca y en menor medida Zn. Estos complejos unen metales como el Pb por un proceso que involucra el intercambio con el Ca asociado a la matriz. El segundo tipo de gránulos contiene ligandos ricos en grupos tioles, principalmente proteínas de bajo peso molecular denominadas metalotioneínas. El Cd se une a estas proteínas y los gránulos que contienen Cd se denominan cadmosomas. Con el tiempo, las células cloragógenas aumentan de tamaño, se separan del epitelio y liberan los cloragosomas al fluido celómico, desde donde estos últimos se eliminan a través de los nefridios. Además, se conoce que los invertebrados terrestres son capaces de regular, hasta un cierto grado, la acumulación de metales esenciales como el Cu, el Zn y el Fe (Dallinger, 1993; van Gestel et al., 1993).

Debido a su particular estructura, caracterizada por una gran área superficial y los grupos funcionales (hidroxilos) presentes en los sitios activos superficiales, la goethita, ya sea en escala nano como macro, exhibe un alto potencial como adsorbente de sustancias químicas, incluyendo cationes de metales contaminantes (Plathe et al., 2013; Liu et al., 2014b). No obstante, esta adsorción depende en gran medida de factores tales como el pH, la fuerza

iónica, el contenido de materia orgánica del suelo; la temperatura del medio; la concentración de los metales que pueden adsorberse; la presencia de otros iones que puedan competir por los sitios de unión; los efectos de envejecimiento, por citar los más relevantes (Mustafa et al., 2004; Orsetti et al., 2006; Liu et al., 2014a). Por otra parte, esos mismos factores pueden afectar el estado de agregación de las NPs así como sus cargas superficiales (Xu et al., 2015). La mayoría de los estudios encarados hasta el momento se han dedicado a investigar los potenciales mecanismos y las variables que pueden influir en los procesos de adsorción-desorción entre goethita y metales, sin considerar los efectos sobre organismos. Algunos estudios señalan que la adsorción de Pb sería mayor que la de Cd (Liu et al., 2014b). Por otra parte, también se ha demostrado que algunas NPs pueden facilitar el ingreso de metales contaminantes en la biota (Zhang et al., 2007; Hartmann et al., 2012). Nuestros resultados indican que efectivamente los organismos de la especie *E. andrei* son capaces de incorporar cantidades apreciables de ambos elementos por vía dérmica. Sin embargo, en presencia simultánea de NPs, se observaron descensos comparables para ambos metales (50% en Cd y 35% en Pb) frente a concentraciones equimolares de exposición. Estos resultados reflejan que la biodisponibilidad de ambos metales habría disminuido en presencia de las NPs de goethita para *E. andrei*. Por otro lado, también es posible que el ingreso de NPs haya acelerado la remoción de los cloragosomas de la cavidad celómica, incrementando de esa forma la eliminación de Pb y Cd.

Cuando se evaluó la influencia de Cd y Pb en los niveles de Fe en lombrices expuestas a los metales Cd o Pb solos se observó que las lombrices expuestas a Cd registraron una disminución en los niveles de Fe. Esto indicaría que la acumulación de Cd en los cadmosomas del tejido cloragógeno podría estar activando mecanismos de excreción que afectarían los niveles del metal esencial. A diferencia de lo observado con Cd, no se observó descenso en los niveles de Fe en las lombrices tratadas con Pb. Recientemente se ha reportado que la exposición por vía dérmica de *E. fétida* a Cd indujo la expresión dosis-dependiente del mRNA de metalotioneínas en celomocitos con un factor máximo de inducción de 11, mientras que en el caso de las expuestas a Pb la inducción fue mucho menor, con un factor cercano a 2 (Homa et al., 2015). Como se indicó anteriormente, el Pb se asociaría preferentemente a los gránulos ricos en fosfatos desplazando al Ca. Estas diferencias en los procesos de

acumulación de Cd y Pb podrían estar relacionadas con el efecto diferencial de ambos metales sobre la regulación de los niveles de Fe.

Cuando se determinó la influencia de Cd y Pb en los niveles de Fe en lombrices expuestas a mezclas de los metales y NPs de goethita se observó que, a diferencia de lo que ocurrió con las lombrices expuestas sólo a NPs, los niveles de Fe no disminuyeron sino que mostraron un nivel de Fe similar a los controles. Esto evidencia que en los individuos expuestos a las mezclas, la presencia de los metales impidió la excreción de una parte de los niveles basales de Fe. En este sentido, se podría plantear que los oligoquetos podrían estar liberando al fluido celómico los metales tóxicos localizados en los cloragosomas, eliminándolos a través de los nefridios (Dallinger, 1993) y no así al metal esencial.

19.2 Clorpirifos

En primer lugar, nos propusimos estudiar la interacción entre las NPs de goethita y el pesticida CPF en solución, debido a que en nuestros ensayos *in vivo* se utilizaron papeles de filtro impregnados con la mezcla de NPs+CPF, y resultaba complejo el estudio de su interacción en este medio. También se estudió la interacción de goethita no-nano y CPF a fin de comparar resultados.

En la región UV/visible, el pico máximo de absorción del CPF en solución acuosa fue de 260 nm, el cual concuerda con el valor reportado por Nair y Pradeep, (2007). Al analizar los espectros de mezclas de NPs+CPF luego de distintos tiempos de incubación se observó que al cabo de 5 min el pico de absorbancia del CPF en la mezcla se redujo en un 50%. Luego de un segundo agregado de NPs se observó la desaparición de dicho pico, mientras que el espectro de la mezcla de goethita no-nano y CPF no se modificó luego de 20 min de incubación. Nair y Pradeep, (2007) propusieron un sistema de remoción de CPF y malatión del agua utilizando NPs de Ag y Au adsorbidas sobre alúmina activada. Observaron que la reducción en absorbancia del CPF fue abrupta en los estadios iniciales, lo cual coincide con nuestros resultados, ya que la reducción del CPF del 50% ocurrió durante los primeros 5 min de incubación.

Para profundizar el estudio de la interacción de CPF con NPs de goethita en solución se realizaron estudios de microscopía SEM y posterior análisis por EDX. Las imágenes obtenidas por SEM evidenciaron la agregación de las NPs inducidas por CPF. El análisis EDX confirmó la presencia de CPF en la superficie de las NPs. Esto sugiere que habría una interacción superficial entre estas partículas y el pesticida. Lisha et al., (2009) también observaron agregación al exponer NPs de Au adsorbidas sobre alúmina con CPF. En estudios más recientes, Bootharaju y Pradeep, (2012) observaron en imágenes TEM de la mezcla de CPF y NPs de Ag y Au adsorbidas sobre alúmina que las partículas se encontraban agregadas, al igual que en nuestros estudios y en los reportados por Lisha et al., (2009). Al analizar NPs Ag y Au solas (sin soporte de alúmina), estos autores también observaron agregación después de la adición del CPF, aunque ésta resultó ser mayor frente a las NPs de Ag. El análisis EDX indicó la presencia de Ag, S, P y Cl en la mezcla, confirmando así la adsorción del pesticida a las NPs.

En segundo lugar, se realizaron bioensayos de exposición a distintos tiempos de acuerdo a lo detallado en la sección **10** a fin de estudiar los efectos *in vivo* de la mezcla de NPs de goethita y CPF en *E. andrei*. Si bien el problema de la toxicidad de mezclas de sustancias químicas y las interacciones entre sustancias tóxicas se identificó hace más de 30 años (Cooney et al., 1983) y ha sido ampliamente revisado en los últimos años (Holmstrup et al., 2010; Laskowski et al., 2010; van Gestel et al., 2010; Bednarska et al., 2013; Grech et al., 2017), los efectos de sustancias químicas con diferentes modos de acción han sido poco investigados en invertebrados terrestres. En la literatura se encuentran información de estudios realizados en lombrices *Lumbricus terrestris* expuestas a una mezcla binaria de Ni(II) y CPF (Lister et al., 2011); también en *E. andrei* expuestas a una mezcla de Cu(II) y glifosato (Zhou et al., 2012). Además, en estudios realizados en otros invertebrados del suelo también se evaluaron interacciones entre metales e insecticidas. Bednarska y Kaszowska, (2014) estudiaron los efectos de mezclas de Ni(II) y CPF en el escarabajo de tierra *Pterostichus oblongopunctatus*, mientras que Broerse y van Gestel, (2010) analizaron efectos de mezclas de Ni(II) y CPF en la colémbola *Folsomia candida*. Sin embargo, hasta al momento, no se han reportado estudios acerca de los efectos de mezclas de NPs metálicas y pesticidas OPs en especies edáficas.

Para estudiar las posibles interacciones entre las NPs de goethita y CPF se evaluó la actividad de la enzima AChE. La determinación de la inhibición de ChEs es un importante punto final subletal en la evaluación de exposición y efecto de la contaminación por plaguicidas OPs y carbamatos. En estudios realizados por Caselli et al., (2006) se caracterizó la actividad de estas enzimas en *E. andrei* y se encontró que están principalmente representadas por la AChE.

En la bibliografía se reportan numerosos estudios de los efectos de OPs en lombrices terrestres. La mayoría de las investigaciones se centran en el estudio individual de pesticidas (Booth et al., 1998; Booth y O'Halloran, 2001; Collange et al., 2010; Velki y Hackenberger, 2012, 2013b, 2013a). Aunque también se encuentran investigaciones de mezclas binarias de OPs (Stepić et al., 2013; Chen et al., 2014).

Por otro lado, hay escasa información acerca de los efectos de NPs en ChEs de organismos del suelo. En estudios realizados por Hu et al., (2013) con lombrices *E. andrei* expuestas a nanotubos de carbono adsorbidos sobre nonilfenol no se registraron modificaciones en la actividad de AChE respecto a los controles. Sin embargo, Wang et al. (2009) han demostrado que algunas NPs son capaces de alterar *in vitro* la actividad de AChE. Estos investigadores examinaron la adsorción e inhibición de esta enzima por diferentes NPs, como nanotubos de carbono, NPs de SiO₂, TiO₂, Al, Cu, entre otras. La actividad de la enzima se redujo en todos los casos.

Nuestros resultados evidencian que la actividad de AChE no se vio afectada en las lombrices expuestas a NPs de goethita a ningún tiempo ensayado, lo cual concuerda con lo reportado por (Hu et al., 2013) para nanotubos de carbono. Mientras que en los oligoquetos expuestos a la mezcla de NPs+CPF se observó una marcada disminución en la actividad de la enzima a todos los tiempos ensayados, al igual que en los expuestos únicamente a CPF. Los niveles de inhibición se vieron acompañados con signos visibles de neurotoxicidad. Recientemente, Bednarska et al., (2017) reportaron los efectos en la actividad de AChE de lombrices *E. fétida* expuestas a mezclas de Cu(II) y CPF en suelo artificial. La actividad de AChE en lombrices expuestas a CPF solo y a la mezcla de Cu y CPF fue similar. Si bien nuestros resultados siguen la tendencia observada por Bednarska et al., (2017) para lombrices expuestas a Cu y CPF, no se puede trazar comparaciones, ya que en nuestro caso al tratarse de NPs metálicas, la naturaleza de la mezcla cambia.

Adicionalmente se evaluó la actividad de las CES en lombrices expuestas a NPs, CPF y a la mezcla binaria de NPs y CPF. Las CES comprenden un grupo de enzimas con baja especificidad de sustrato. Se han reportado con frecuencia como más sensibles a OPs que las ChEs en invertebrados (Wheelock et al., 2008). Se ha demostrado además que esta sensibilidad depende del sustrato utilizado en el ensayo (Laguerre et al., 2009; Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009). Sin embargo, las CES no están directamente implicadas en el mecanismo de acción tóxica de OPs mientras que las ChEs sí, lo cual explicaría el número reducido de investigaciones ecotoxicológicas que incluyen estudios de actividad de CES. Algunos autores centraron sus investigaciones en las especies *E. andrei* y *E. fétida*. (Oien y Stenersen, 1984; Oneto et al., 2005; Velki y Hackenberger, 2012, 2013a), mientras que otros lo hicieron en *L. terrestris* (Haites et al., 1972).

Los resultados de nuestro estudio de CES siguen la misma tendencia observada con AChE. Las NPs de goethita no inhibieron la actividad de CES de *E. andrei* a ningún tiempo ensayado. Mientras que la mezcla de NPs+CPF inhibió la actividad de CES a todos los tiempos de exposición, al igual que las lombrices expuestas solamente a CPF. La inhibición fue mayor conforme aumentaba el tiempo de exposición. Se torna difícil la comparación con datos de la bibliografía debido a que en los homogenatos de tejido total pueden encontrarse diversas isoenzimas con actividad de CES, por lo que existen distintos sustratos para medir su actividad. Sin embargo, nuestros resultados utilizando el sustrato p-nitrofenilbutirato concuerdan con la observación de que la actividad de CES de la lombriz de tierra medida con el sustrato feniltioacetato parecería ser igualmente sensible que la actividad de ChEs a la inhibición de OPs (Oneto et al., 2005), lo que justificaría su uso en un enfoque de biomarcadores múltiples para evaluar la exposición a OPs y a mezclas de OPs y NPs.

Por último, se evaluó el ingreso de nano-goethita en presencia de CPF. Si bien, como se dijo anteriormente, hasta el momento no se reportaron estudios acerca de NPs y pesticidas OPs en invertebrados del suelo, en la literatura se encuentran diversas investigaciones acerca del ingreso de metales en presencia de pesticidas en lombrices terrestres. El estudio de Lister et al., (2011) realizado en *L. terrestris* expuestas a una mezcla binaria de Ni(II) y CPF mostró que el ingreso del metal siguió el mismo patrón que en el caso de la exposición al níquel. Por otro lado, Zhou et al., (2012) demostraron que el ingreso de Cu(II) fue despreciable en *E. fétida*

por efecto de la presencia simultánea de glifosato. En estudios recientes, Bednarska et al., (2017) registraron acumulación de cobre en *E. fétida* expuestas tanto a mezclas de Cu(II) y CPF como a Cu solo. También se estudiaron interacciones entre metales y pesticidas en otros invertebrados. Bednarska y Kaszowska, (2014) demostraron que el patrón temporal de la concentración interna de Ni(II) en el escarabajo terrestre *P. oblongopunctatus* dependía de la concentración de CPF en su alimento. La toxicocinética del Ni(II) fue similar para los escarabajos expuestos únicamente a níquel y a los expuestos a una mezcla con baja concentración de CPF, pero fue diferente para los organismos expuestos a Ni(II) mezclado con una alta concentración del pesticida. En estas condiciones, el CPF disminuyó los niveles de Ni en los organismos.

En nuestro caso, los resultados indican que a las 48 h se registró un aumento en el contenido de Fe en los oligoquetos expuestos a la mezcla de NPs+CPF, lo cual concuerda con lo observado en lombrices expuestas únicamente a NPs de goethita (ver sección **14.1**). Sin embargo, a diferencia del descenso observado en estas últimas a las 72 h, se registró un marcado aumento en los valores de Fe de lombrices expuestas a la mezcla binaria. Por lo que el ingreso de NPs de goethita en *E. andrei* expuestas a una mezcla de NPs y CPF no siguió el mismo patrón que el de las lombrices expuestas solamente a NPs de goethita. Este fenómeno podría atribuirse a que el CPF estaría interfiriendo en algunos de los procesos involucrados en la toxicocinética del Fe.

V. Conclusiones



En base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral surgen las siguientes conclusiones:

Los bioensayos de contacto usando papeles de filtro impregnados con suspensiones de nanopartículas resultaron una alternativa rápida y sencilla para la evaluación del ingreso de nanopartículas de goethita y de posibles parámetros biomarcadores, y para estudiar la influencia de dichas nanopartículas en la biodisponibilidad y toxicidad de contaminantes orgánicos (CPF) y metálicos (Cd y Pb).

El bioensayo en suelo artificial constituye una alternativa más representativa de las condiciones ambientales, y nos permitió corroborar los resultados obtenidos en los bioensayos en papel para el ingreso de nanopartículas de goethita.

Los valores de Fe en organismos expuestos a las nanopartículas de goethita en papel (72 h) o en suelo artificial (10 días) resultaron siempre menores a los valores basales, sugiriendo efectos sistémicos que pueden relacionarse con las alteraciones registradas en algunos de los parámetros bioquímicos seleccionados. La actividad de CAT (48 h), los valores de TOSC (72 h) y los niveles de TBARs (72 h) se vieron afectados por exposición a las nanopartículas.

Se investigó la interacción de las nanopartículas de goethita con otras sustancias químicas contaminantes. En primer lugar, se estudiaron las interacciones con dos clásicos elementos no esenciales: Cd y Pb. Comparando con los valores de concentración de dichos metales en lombrices expuestas únicamente a cada elemento, los organismos expuestos a la mezcla binaria metal-nanopartículas presentaron descensos comparables para ambos contaminantes. En consecuencia, las nanopartículas de goethita influyeron negativamente en el ingreso de Cd y Pb en *E. andrei*. En términos porcentuales, los descensos no resultaron tan altos como para sustentar el empleo directo de estas NPs en procesos de remediación. Sin embargo, tampoco fueron tan bajos como para descartarlo. Por consiguiente, estos resultados podrían constituir un punto de referencia para futuras investigaciones, ya sea modificando algunas de las propiedades físico-químicas de estas NPs (como por ej. su tamaño) o bien introduciendo diversos grupos funcionales sobre la superficie.

Al analizar los contenidos de Fe en las lombrices expuestas a las mezclas binarias de metales (Cd o Pb) y nanopartículas, se observó que éstos fueron similares a los de los controles. Se

concluye así que debido a la presencia simultánea de nanopartículas y metales no se registró el efecto sistémico desencadenado cuando los organismos estuvieron expuestos únicamente a las nanopartículas de goethita.

En cuanto al pesticida organofosforado clorpirifos, los estudios UV-vis y SEM-EDX de la mezcla de nanopartículas y clorpirifos en solución dieron cuenta de la existencia de una interacción superficial entre estas partículas y el pesticida.

En cuanto a los estudios *in vivo* en papel, las actividades de la AChE y de las CES de lombrices *E. andrei* expuestas a la mezcla binaria de nanopartículas y clorpirifos se vieron inhibidas a todos los tiempos de exposición, en proporciones similares a las expuestas únicamente a clorpirifos. En cambio, las actividades enzimáticas en los oligoquetos expuestos solo a las nanopartículas fueron comparables a las registradas en organismos controles. Esto demostró que estas partículas no produjeron efectos neurotóxicos en los oligoquetos, y que la inhibición de la actividad de las enzimas, en todos los casos, se debió fundamentalmente a la presencia del pesticida pese a las interacciones superficiales anteriormente mencionadas.

Además, las lombrices expuestas a la mezcla binaria presentaron un aumento en los niveles de Fe luego de 72 hs de exposición, lo cual difiere del patrón observado en las lombrices expuestas únicamente a nanopartículas. Esto evidenció que el clorpirifos, al igual que los metales Cd y Pb, estarían interfiriendo con algunos de los procesos involucrados en la toxicocinética del Fe.

Estos resultados demuestran que las nanopartículas de goethita pueden afectar a las especies edáficas, en particular a las lombrices *E. andrei*, y evidencian las complejas interacciones que pueden verificarse con otros contaminantes preexistentes en el ambiente. Representan además un aporte a los estudios de nanopartículas en ambientes terrestres, que aún son escasos debido a que el suelo es un ecosistema complejo, cuyos componentes modulan la biodisponibilidad y, por ende, los efectos tóxicos de las NPs.

VI. Bibliografía



- Aldridge, W. N. Serum Esterases I: Two Types of Esterase (A and B) Hydrolysing p-Nitrophenyl Acetate, Propionate and Butyrate, and a Method for Their Determination. *Biochem. J.* **1953**, *53*, 110–117.
- Alloway, B. Essentials of Medical Geology: Revised Edition. *Essentials Med. Geol. Revis. Ed.* **2013**, 351–373.
- Amde, M.; Liu, J. fu; Tan, Z. Q.; Bekana, D. Transformation and Bioavailability of Metal Oxide Nanoparticles in Aquatic and Terrestrial Environments. A Review. *Environ. Pollut.* **2017**, *230*, 250–267.
- Arrigo, A.-P. Gene Expression and the Thiol Redox State. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27* (9–10), 936–944.
- Ates, M.; Arslan, Z.; Veysel, D.; Daniels, J.; Ibrahim, O. F. Accumulation and Toxicity of CuO and ZnO Nanoparticles Through Waterborne and Dietary Exposure of Goldfish (*Carassius Auratus*). *Environ. Toxicol.* **2015**, *30*, 119–128.
- Baskaran, S.; Kookana, R. S.; Naidu, R. Degradation of Bifenthrin, Chlorpyrifos and Imidacloprid in Soil and Bedding Materials at Termiticidal Application Rates. *Pestic. Sci.* **1999**, *55* (12), 1222–1228.
- Bednarska, A. J.; Kaszowska, J. Combined Effect of Nickel and Chlorpyrifos on the Ground Beetle *Pterostichus Oblongopunctatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *108*, 242–248.
- Bednarska, A. J.; Jevtić, D. M.; Laskowski, R. More Ecological ERA: Incorporating Natural Environmental Factors and Animal Behavior. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2013**, *9* (3), e39–e46.
- Bednarska, A. J.; Choczyński, M.; Laskowski, R.; Walczak, M. Combined Effects of Chlorpyrifos, Copper and Temperature on Acetylcholinesterase Activity and Toxicokinetics of the Chemicals in the Earthworm *Eisenia Fetida*. *Environ. Pollut.* **2017**, *220*, 567–576.
- Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (14), 4218–4244.
- Bernard, F.; Brulle, F.; Douay, F.; Lemièrre, S.; Demuyne, S.; Vandenberghe, F. Metallic Trace

Element Body Burdens and Gene Expression Analysis of Biomarker Candidates in *Eisenia Fetida*, Using an “Exposure/Depuration” Experimental Scheme with Field Soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2010**, 73 (5), 1034–1045.

Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, 5 (1), 9–19.

Blair, A.; Ritz, B.; Wesseling, C.; Beane Freeman, L. Pesticides and Human Health. *Occup. Env. Med* **2015**, 72 (2), 81–82.

Booth, L. H.; O’Halloran, K. A Comparison of Biomarker Responses in the Earthworm *Aporrectodea Caliginosa* to the Organophosphorus Insecticides Diazinon and Chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, 20 (11), 2494–2502.

Booth, L. H.; Heppelthwaite, V.; Eason, C. T. Cholinesterase and Glutathione S-Transferase in the Earthworm *Aporrectodea Caliginosa* as Biomarkers of Organophosphate Exposure. In *Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference*; New Zealand Plant Protection Society Inc, 1998; pp 138–142.

Bootharaju, M. S.; Pradeep, T. Understanding the Degradation Pathway of the Pesticide, Chlorpyrifos by Noble Metal Nanoparticles. *Langmuir* **2012**, 28 (5), 2671–2679.

Borm, P.; Klaessig, F. C.; Landry, T. D.; Moudgil, B.; Pauluhn, J.; Thomas, K.; Trottier, R.; Wood, S. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part V: Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicol. Sci.* **2006**, 90 (1), 23–32.

Bouché, M. B. Strategies Lombriciennes. *Ecol. Bull.* **1977**, 122–132.

Bozich, J. S.; Lohse, S. E.; Torelli, M. D.; Murphy, C. J.; Hamers, R. J.; Klaper, R. D. Surface Chemistry, Charge and Ligand Type Impact the Toxicity of Gold Nanoparticles to *Daphnia Magna*. *Environ. Sci. Nano* **2014**, 1 (3), 260–270.

Broerse, M.; van Gestel, C. A. M. Mixture Effects of Nickel and Chlorpyrifos on *Folsomia Candida* (Collembola) Explained from Development of Toxicity in Time. *Chemosphere* **2010**, 79 (9), 953–957.

Brown, G. G.; Barois, I.; Lavelle, P. Regulation of Soil Organic Matter Dynamics and Microbial Activity in the Drilosphere and the Role of Interactions with Other Edaphic Functional

Domains. *Eur. J. Soil Biol.* **2000**, *36* (3), 177–198.

Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2* (4), MR17-MR71.

Campos Verona, S. Evaluación de Toxicidad de Metales En Suelos Del Valle de Toluca Empleando Como Indicador *Eisenia Andrei*, Universidad Autónoma del estado de México, 2013.

Canesi, L.; Ciacci, C.; Balbi, T. Interactive Effects of Nanoparticles with Other Contaminants in Aquatic Organisms: Friend or Foe? *Mar. Environ. Res.* **2015**, *111*, 128–134.

Carod Benedico, E. Insecticidas Organofosforados: “De La Guerra Química Al Riesgo Laboral y Doméstico.” *Medifam* **2002**, *12* (5), 51–62.

Casabé, N.; Piola, L.; Fuchs, J.; Oneto, M. L.; Pamparato, L.; Basack, S.; Giménez, R.; Massaro, R.; Papa, J. C.; Kesten, E. Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field. *J. Soils Sediments* **2007**, *7* (4), 232–239.

Caselli, F.; Gastaldi, L.; Gambi, N.; Fabbri, E. In Vitro Characterization of Cholinesterases in the Earthworm *Eisenia Andrei*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *143* (4), 416–421.

Cataldo, J. R.; Hidalgo, M. E. L.; Neaman, A.; Gaete, H. O. Use of Molecular Biomarkers in *Eisenia Foetida* to Assess Copper Toxicity in Agricultural Soils Affected by Mining Activities. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2011**, *11* (3), 57–70.

Chen, C.; Wang, Y.; Zhao, X.; Wang, Q.; Qian, Y. Comparative and Combined Acute Toxicity of Butachlor, Imidacloprid and Chlorpyrifos on Earthworm, *Eisenia Fetida*. *Chemosphere* **2014**, *100*, 111–115.

Cocca, C.; Ventura, A.; Nuñez, M.; Randi, A. El Organofosforado Clorpirifos Como Disruptor Estrogénico y Factor de Riesgo Para El Cáncer de Mama. *Acta Toxicológica Argentina* **2016**, *23* (3), 142–152.

Colangelo, C. H.; Abbiatti, H. . *Contaminación Ambiental: Análisis Multidisciplinario*; Ediciones Praia: Buenos Aires, Argentina, 2003.

Coleman, D. C.; Callaham Jr, M. A.; Crossley Jr, D. A. *Fundamentals of Soil Ecology* -, 3rd ed.;

Academic Press, 2017.

Colgan, A.; Hankard, P. K.; Spurgeon, D. J.; Svendsen, C.; Wadsworth, R. A.; Weeks, J. M. Closing the Loop: A Spatial Analysis to Link Observed Environmental Damage to Predicted Heavy Metal Emissions. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22* (5), 970–976.

Collange, B.; Wheelock, C. E.; Rault, M.; Mazzia, C.; Capowiez, Y.; Sanchez-Hernandez, J. C. Inhibition, Recovery and Oxime-Induced Reactivation of Muscle Esterases Following Chlorpyrifos Exposure in the Earthworm *Lumbricus Terrestris*. *Environ. Pollut.* **2010**, *158* (6), 2266–2272.

Cooney, J. D.; Beauchamp, J.; Gehrs, C. W. Effects of Temperature and Nutritional State on the Acute Toxicity of Acridine to the Calanoid Copepod, *Diaptomus Clavipes* Schacht. *Environ. Toxicol. Chem.* **1983**, *2* (4), 431–439.

Cornelis, G.; Hund-Rinke, K.; Kuhlbusch, T.; van den Brink, N.; Nickel, C. Fate and Bioavailability of Engineered Nanoparticles in Soils: A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2014**, *44* (24), 2720–2764.

Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties Reactions Occurrence and Uses*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003.

Croteau, M. N.; Misra, S. K.; Luoma, S. N.; Valsami-Jones, E. Silver Bioaccumulation Dynamics in a Freshwater Invertebrate after Aqueous and Dietary Exposures to Nanosized and Ionic Ag. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (15), 6600–6607.

Curieses, S. P.; García-Velasco, N.; Urionabarrenetxea, E.; Sáenz, M. E.; Bilbao, E.; Di Marzio, W. D.; Soto, M. Responses to Silver Nanoparticles and Silver Nitrate in a Battery of Biomarkers Measured in Coelomocytes and in Target Tissues of *Eisenia Fetida* Earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2017**, *141* (March), 57–63.

Dallinger, R. Strategies of Metal Detoxification in Terrestrial Invertebrates. *Ecotoxicol. Met. Invertebr.* **1993**, No. January 1993, 245–289.

Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: A Review. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20* (3), 407–428.

Dickinson, D. A.; Forman, H. J. Cellular Glutathione and Thiols Metabolism. *Biochem.*

Pharmacol. **2002**, 64 (5–6), 1019–1026.

Domènech, X.; Peral, J. *Química Ambiental de Sistemas Terrestres*; Editorial Reverté: Barcelona, 2006.

Dowling, A. P. Development of Nanotechnologies. *Nano Today* **2004**, 7 (12), 30–35.

DTU Environment. The Nanodatabase <http://nanodb.dk/en/> (accessed Mar 6, 2018).

EC. *Commission Recommendation of 18 October 2011 on the Definition of Nanomaterial*; 2011; Vol. L275.

Edwards, C. A.; Lofty, J. R. *Biology of Earthworms*, 2nd ed.; Chapman & Hall: London, UK, 1977.

Edwards, C. A.; Bohlen, P. J. The Effects of Toxic Chemicals on Earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, 125, 24–95.

Edwards, C. A.; Bohlen, P. J. *Biology and Ecology of Earthworms.*; Chapman & Hall, 1996.

Edwards, C. A. (Clive A. *Earthworm Ecology*; CRC Press, 2004.

Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7 (2), 88–95.

Environment Canada. *Biological Test Methods: Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms (Eisenia Andrei, Eisenia Fetida, or Lumbricus Terrestris)*; 2007.

European Commission, H. and C. P. D.-S. *The Appropriateness of Existing Methodologies to Assess the Potential Risks Associated with Engineered and Adventitious Products of Nanotechnologies*; 2006; Vol. 246.

Fergusson, J. E. *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*; Pergamon Press, Inc.: USA, 1990.

Ferrari, A.; Venturino, A.; Pechén de D'Angelo, A. M. Effects of Carbaryl and Azinphos Methyl on Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Detoxifying Enzymes. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2007**, 88 (2), 134–142.

Fissan, H. *Nachhaltige Nanotechnologie*, Ferdinand.; Paderborn, 2008.

Forman, H. J. Hydrogen Peroxide: The Good, The Bad, and the Ugly. In *Oxidant in Biology, a*

question of balance; Valacchi, G., Davis, P., Eds.; Springer, 2008.

Fukuto, T. R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245–254.

García, I.; Dorronsoro, C. Contaminación Por Metales Pesados. In *Tecnología de Suelos*; Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola, 2005.

Gastaldi, L.; Ranzato, E.; Capri, F.; Hankard, P.; Pérès, G.; Canesi, L.; Viarengo, A.; Pons, G. Application of a Biomarker Battery for the Evaluation of the Sublethal Effects of Pollutants in the Earthworm *Eisenia Andrei*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146* (3), 398–405.

van Gestel, C. A. M.; Dirven-van Breemen, E. M.; Baerselman, R. Accumulation and Elimination of Cadmium, Chromium and Zinc and Effects on Growth and Reproduction in *Eisenia Andrei* (Oligochaeta, Annelida). *Sci. Total Environ.* **1993**, *134*, 585–597.

van Gestel, C. A. M.; Jonker, M.; Kammenga, J. E.; Laskowski, R.; Svendsen, C. *Mixture Toxicity: Linking Approaches from Ecological and Human Toxicology*; CRC Press, 2010.

Van Gestel, C. A. M.; Van Brummelen, T. C. Incorporation of the Biomarker Concept in Ecotoxicology Calls for a Redefinition of Terms. *Ecotoxicology* **1996**, *5* (4), 217–225.

Gigena, J.; Martínez, M. L.; Zbihlel, G. M.; Alonso, P. R.; Cochón, A. C.; Verrengia Guerrero, N. R. Investigating the Uptake and Some Subcellular Effects of Manufactured Goethite Nanoparticles on *Lumbriculus Variegatus*. *Expert Opin. Environ. Biol.* **2016**, *4* (2), 2–9.

Giuffré, L.; Romaniuk, R. I.; Marbán, L.; Ríos, R. P.; García Torres, T. P. Public Health and Heavy Metals in Urban and Periurban Horticulture. *Emirates J. Food Agric.* **2012**, *24* (2), 148–154.

Gomes, S. I.; Novais, S. C.; Gravato, C.; Guilhermino, L.; Scott-Fordsmand, J. J.; Soares, A. M.; Amorim, M. J. Effect of Cu-Nanoparticles versus One Cu-Salt: Analysis of Stress Biomarkers Response in *Enchytraeus Albidus* (Oligochaeta). *Nanotoxicology* **2012**, *5390* (November), 1–10.

Gomes, S. I. L.; Hansen, D.; Scott-Fordsmand, J. J.; Amorim, M. J. B. Effects of Silver Nanoparticles to Soil Invertebrates: Oxidative Stress Biomarkers in *Eisenia Fetida*. *Environ. Pollut.* **2015**, *199*, 49–55.

- Gong, P.; Perkins, E. J. Earthworm Toxicogenomics: A Renewed Genome-Wide Quest for Novel Biomarkers and Mechanistic Insights. *Appl. Soil Ecol.* **2016**, *104* (2015), 12–24.
- González-Alcaraz, M. N.; Van Gestel, C. A. M. Metal/Metalloid (As, Cd and Zn) Bioaccumulation in the Earthworm *Eisenia Andrei* under Different Scenarios of Climate Change. *Environ. Pollut.* **2016**, *215*, 178–186.
- Goswami, L.; Kim, K. H.; Deep, A.; Das, P.; Bhattacharya, S. S.; Kumar, S.; Adelodun, A. A. Engineered Nano Particles: Nature, Behavior, and Effect on the Environment. *J. Environ. Manage.* **2017**, *196*, 297–315.
- Grech, A.; Brochot, C.; Dorne, J.-L.; Quignot, N.; Bois, F. Y.; Beaudouin, R. Toxicokinetic Models and Related Tools in Environmental Risk Assessment of Chemicals. *Sci. Total Environ.* **2017**, *578* (November), 1–15.
- Greenberg, H.; Ye, X.; Wilson, D.; Htoo, A. K.; Hendersen, T.; Liu, S. F. Chronic Intermittent Hypoxia Activates Nuclear Factor-KB in Cardiovascular Tissues in Vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343* (2), 591–596.
- Greene, J. C.; Bartels, C. L.; Warren-Hicks, W. J.; Parkhurst, B. R.; Linder, G. L.; Peterson, S. A.; Miller, W. E. *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Wastes. EPA/600/3-88/029.*; Corvallis, OR., 1989.
- Greenwood, N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements*, 2 edition.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 2001.
- Guo, H.; Barnard, A. S. Naturally Occurring Iron Oxide Nanoparticles: Morphology, Surface Chemistry and Environmental Stability. *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1* (1), 27–42.
- Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferases. In *Methods in Enzymology*; 1981; Vol. 77, pp 6319–6322.
- Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249* (22), 7130–7139.
- Haites, N.; Don, M.; Masters, C. . Heterogeneity and Molecular Weight Inter- Relationships of the Esterase Isoenzymes of Several Invertebrate Species. *Comp. Biochem. Physiol.* **1972**, *42B*, 303–332.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Antioxidant Defences. Free Radicals in Biology and Medicine*, 3^o edition.; Oxford University Press: Oxford, 1999.

Handy, R. D.; Henry, T. B.; Scown, T. M.; Johnston, B. D.; Tyler, C. R. Manufactured Nanoparticles: Their Uptake and Effects on Fish - A Mechanistic Analysis. *Ecotoxicology* **2008**, *17* (5), 396–409.

Hartmann, N. B.; Legros, S.; Von der Kammer, F.; Hofmann, T.; Baun, A. The Potential of TiO₂ Nanoparticles as Carriers for Cadmium Uptake in *Lumbriculus Variegatus* and *Daphnia Magna*. *Aquat. Toxicol.* **2012**, *118–119*, 1–8.

He, C.; Hu, Y.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Effects of Particle Size and Surface Charge on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31* (13), 3657–3666.

Heikens, A.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Hendriks, A. J. Bioaccumulation of Heavy Metals in Terrestrial Invertebrates. *Environ. Pollut.* **2001**, *113* (3), 385–393.

Hirano, T.; Tamae, K. Earthworms and Soil Pollutants. *Sensors* **2011**, *11* (12), 11157–11167.

Hissin, P. J.; Hilf, R. A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal. Biochem.* **1976**, *74* (1), 214–226.

Hobbelen, P. H. F.; Koolhaas, J. E.; van Gestel, C. A. M. Bioaccumulation of Heavy Metals in the Earthworms *Lumbricus Rubellus* and *Aporrectodea Caliginosa* in Relation to Total and Available Metal Concentrations in Field Soils. *Environ. Pollut.* **2006**, *144* (2), 639–646.

Hodkinson, I. D.; Jackson, J. K. Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Reference to Mountain Ecosystems. *Environ. Manage.* **2005**, *35* (5), 649–666.

Hoet, P.; Boczkowski, J. What's New in Nanotoxicology? Brief Review of the 2007 Literature. *Nanotoxicology* **2008**, *2* (3), 171–182.

Holmstrup, M.; Bindesbøl, A. M.; Oostingh, G. J.; Duschl, A.; Scheil, V.; Köhler, H. R.; Loureiro, S.; Soares, A. M. V. M.; Ferreira, A. L. G.; Kienle, C.; et al. Interactions between Effects of Environmental Chemicals and Natural Stressors: A Review. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408* (18), 3746–3762.

- Homa, J.; Rorat, A.; Kruk, J.; Cocquerelle, C.; Plytycz, B.; Vandebulcke, F. Dermal Exposure of *Eisenia Andrei* Earthworms: Effects of Heavy Metals on Metallothionein and Phytochelatin Synthase Gene Expressions in Coelomocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* **2015**, *34* (6), 1397–1404.
- Hu, C.; Li, M.; Wang, W.; Cui, Y.; Chen, J.; Yang, L. Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on Earthworm *Eisenia Fetida*: Responses of the Antioxidant System, Acid Phosphatase and ATPase. *Toxicol. Environ. Chem.* **2012**, *94* (4), 732–741.
- Hu, C.; Cai, Y.; Wang, W.; Cui, Y.; Li, M. Toxicological Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes Adsorbed with Nonylphenol on Earthworm *Eisenia Fetida*. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2013**, *15* (11), 2125.
- Hussein, A. K. Applications of Nanotechnology in Renewable Energies - A Comprehensive Overview and Understanding. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *42*, 460–476.
- Hyeon, T.; Manna, L.; Wong, S. S. Sustainable Nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5755–5757.
- IARC. *Cadmium and Cadmium Compounds in Plastics*; 2012.
- IRAM. Efectos de Los Contaminantes En Lombrices. Parte 1 - Determinación de La Toxicidad Aguda En *Eisenia Fetida/Eisenia Andrei*. **2017**.
- ISO. ISO 10390:2005. *Soil Qual. pH*. **2005**.
- ISO. ISO 11268-1:2012. *Soil Qual. "Effects Pollut. earthworms Part 1 Determ. acute Toxic. to Eisenia fetida/Eisenia andrei"* **2012a**, 18.
- ISO. ISO 11268-2:2012. *Soil Qual. "Effects Pollut. earthworms -Part 2 Determ. Eff. Reprod. Eisenia fetida/Eisenia andrei"* **2012b**.
- Jambor, J. L.; Dutrizac, J. E. Occurrence and Constitution of Natural and Synthetic Ferrihydrite, a Widespread Iron Oxyhydroxide. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (7), 2549–2586.
- Jiang, J.; Oberdörster, G.; Biswas, P. Characterization of Size, Surface Charge, and Agglomeration State of Nanoparticle Dispersions for Toxicological Studies. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (1), 77–89.
- Jo, H. J.; Choi, J. W.; Lee, S. H.; Hong, S. W. Acute Toxicity of Ag and CuO Nanoparticle

Suspensions against *Daphnia Magna*: The Importance of Their Dissolved Fraction Varying with Preparation Methods. *J. Hazard. Mater.* **2012**, 227–228, 301–308.

Jokanovic, M.; Stepanovic Petrovic, R. Pyridinium Oximes as a Cholinesterase Reactivation. An Update of the Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. In *Frontiers in Medicinal Chemistry. Volume 8*; Bentham Science Publishers, 2016; pp 171–205.

Jouquet, P.; Dauber, J.; Lagerlöf, J.; Lavelle, P.; Lepage, M. Soil Invertebrates as Ecosystem Engineers: Intended and Accidental Effects on Soil and Feedback Loops. *Appl. Soil Ecol.* **2006**, 32 (2), 153–164.

Ju-Nam, Y.; Lead, J. Properties, Sources, Pathways, and Fate of Nanoparticles in the Environment. In *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity*; Xing, B., Vecitis, C. D., Senesi, N., Eds.; 2016; pp 99–117.

Kahru, A.; Dubourguier, H. C. From Ecotoxicology to Nanoecotoxicology. *Toxicology* **2010**, 269 (2–3), 105–119.

Kahru, A.; Ivask, A. Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 46 (3), 823–833.

Karaca, A.; Kizilkaya, R.; Turgay, O. C.; Cetin, S. C. Effects of Earthworms on the Availability and Removal of Heavy Metals in Soil. In *Soil Heavy Metals*; 2010; Vol. 19, pp 369–388.

Kehrer, J. P. The Haber – Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity. *Toxicology* **2000**, 149, 43–50.

Khot, L. R.; Sankaran, S.; Maja, J. M.; Ehsani, R.; Schuster, E. W. Applications of Nanomaterials in Agricultural Production and Crop Protection: A Review. *Crop Prot.* **2012**, 35, 64–70.

Kikugawa, K.; Kojima, T.; Kosugi, H. Major Thiobarbituric Acid-Reactive Substances of Liver Homogenate Are Alkadienals. *Free Radic. Res. Commun.* **1990**, 8 (2), 107–113.

Klassen, C. D.; Casarett, L. J.; Doull, J. *Casarett & Doull's TOXICOLOGY. The Basic Science of Poisons*, 8th ed.; Mc Graw Hill-Education: New York, NY, 2013.

Konishi, H.; Xu, H. F.; Guo, H. *Nature's Nanostructures*; Pan Stanford Publishing: Singapore, 2012.

Kookana, R. S.; Boxall, A. B. A.; Reeves, P. T.; Ashauer, R.; Beulke, S.; Chaudhry, Q.; Cornelis, G.; Fernandes, T. F.; Gan, J.; Kah, M.; et al. Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (19), 4227–4240.

Laguerre, C.; Sanchez-Hernandez, J. C.; Köhler, H. R.; Triebkorn, R.; Capowiez, Y.; Rault, M.; Mazzia, C. B-Type Esterases in the Snail *Xeropicta Derbentina*: An Enzymological Analysis to Evaluate Their Use as Biomarkers of Pesticide Exposure. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (1), 199–207.

Lange, A.; Ausseil, O.; Segner, H. Alterations of Tissue Glutathione Levels and Metallothionein mRNA in Rainbow Trout during Single and Combined Exposure to Cadmium and Zinc. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *131* (3), 231–243.

Laskowski, R.; Bednarska, A. J.; Kramarz, P. E.; Loureiro, S.; Scheil, V.; Kudłek, J.; Holmstrup, M. Interactions between Toxic Chemicals and Natural Environmental Factors - A Meta-Analysis and Case Studies. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408* (18), 3763–3774.

Lebedev, S.; Yausheva, E.; Galaktionova, L.; Sizova, E. Impact of Zn Nanoparticles on Growth, Survival and Activity of Antioxidant Enzymes in *Eisenia Fetida*. *Mod. Appl. Sci.* **2015**, *9* (10).

Lee Penn, R.; Erbs, J. J.; Gulliver, D. M. Controlled Growth of Alpha-FeOOH Nanorods by Exploiting-Oriented Aggregation. *J. Cryst. Growth* **2006**, *293* (1), 1–4.

Li, L.; Xu, Z.; Wu, J.; Tian, G. Bioaccumulation of Heavy Metals in the Earthworm *Eisenia Fetida* in Relation to Bioavailable Metal Concentrations in Pig Manure. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (10), 3430–3436.

Lisha, K. P.; Anshup; Pradeep, T. Towards a Practical Solution for Removing Inorganic Mercury from Drinking Water Using Gold Nanoparticles. *Gold Bull.* **2009**, *42* (2), 144–152.

Lister, L. J.; Svendsen, C.; Wright, J.; Hooper, H. L.; Spurgeon, D. J. Modelling the Joint Effects of a Metal and a Pesticide on Reproduction and Toxicokinetics in Lumbricid Earthworms. *Environ. Int.* **2011**, *37* (4), 663–670.

Liu, H.; Chen, T.; Frost, R. L. An Overview of the Role of Goethite Surfaces in the Environment. *Chemosphere* **2014a**, *103*, 1–11.

Liu, Y.; Tourbin, M.; Lachaize, S.; Guiraud, P. Nanoparticles in Wastewaters: Hazards, Fate and

- Remediation. *Powder Technol.* **2014b**, 255, 149–156.
- Livingstone, D. R. Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* **2001**, 42 (8), 656–666.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Lewis Farr, A.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Fenol Phenol Reagent. *Readings* **1951**, 193 (1), 265–275.
- Luo, W.; Verweij, R. A.; Van Gestel, C. A. M. Determining the Bioavailability and Toxicity of Lead Contamination to Earthworms Requires Using a Combination of Physicochemical and Biological Methods. *Environ. Pollut.* **2014**, 185, 1–9.
- Maloof, A. C.; Kopp, R. E.; Grotzinger, J. P.; Fike, D. A.; Bosak, T.; Vali, H.; Poussart, P. M.; Weiss, B. P.; Kirschvink, J. L. Sedimentary Iron Cycling and the Origin and Preservation of Magnetization in Platform Carbonate Muds, Andros Island, Bahamas. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2007**, 259 (3–4), 581–598.
- Marnett, L. J. Lipid Peroxidation—DNA Damage by Malondialdehyde. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, 424 (1–2), 83–95.
- Martin, J. P.; Black, J. H.; Hawthorne, R. M. *Earthworm Biology and Production 1. Circular 455*; Florida, USA, 1999.
- Maxwell, D. M. The Specificity of Carboxylesterase Protection against the Toxicity of Organophosphorus Compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, 114 (2), 306–312.
- Meister, A.; Anderson, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, 52, 711–760.
- Mellor, J. W. *Química Inorgánica Moderna*, Sexta edic.; 1958.
- Méndez Prieto, J.; González Ramírez, César, A.; Román, Gutiérrez, Alma, D.; Pietro García, F. Contaminación y Fitotoxicidad En Plantas Por Metales Pesados Provenientes de Suelos y Agua. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **2009**, 10, 17.
- Moore, J. K.; Doney, S. C.; Glover, D. M.; Fung, I. Y. Iron Cycling and Nutrient-Limitation Patterns in Surface Waters of the World Ocean. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **2002**, 49 (1–3), 463–507.
- Moore, M. N. Do Nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment? *Environ. Int.* **2006**, 32 (8), 967–976.

Morgan, A. J.; Morris, B. The Accumulation and Intracellular Compartmentation of Cadmium, Lead, Zinc and Calcium in Two Earthworm Species (*Dendrobaena Rubida* and *Lumbricus Rubellus*) Living in Highly Contaminated Soil. *Histochemistry* **1982**, *75*, 269–285.

Morgan, J. E.; Morgan, A. J. Earthworms as Biological Monitors of Cd, Cu, Pb, and Zn in Metalliferous Soils. *Environ. Pollut.* **1988**, *54* (2), 123–138.

Morgan, J. E.; Norey, C. G.; Morgan, A. J.; Kay, J. A Comparison of the Cadmium-Binding Proteins Isolated from the Posterior Alimentary Canal of the Earthworms *Dendrodrilus Rubidus* and *Lumbriculus Rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* **1989**, *92* (1), 15–21.

Mustafa, G.; Singh, B.; Kookana, R. S. Cadmium Adsorption and Desorption Behaviour on Goethite at Low Equilibrium Concentrations: Effects of PH and Index Cations. *Chemosphere* **2004**, *57* (10), 1325–1333.

Nair, A. S.; Pradeep, T. Extraction of Chlorpyrifos and Malathion from Water by Metal Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7* (6), 1871–1877.

Najafpour, M. M.; Salimi, S.; Hołyńska, M.; Allakhverdiev, S. I. A Highly Dispersible, Magnetically Separable and Environmentally Friendly Nano-Sized Catalyst for Water Oxidation. *Int. J. Hydrogen Energy* **2016**, *41* (8), 4616–4623.

Nakanishi, W.; Minami, K.; Shrestha, L. K.; Ji, Q.; Hill, J. P.; Ariga, K. Bioactive Nanocarbon Assemblies: Nanoarchitectonics and Applications. *Nano Today* **2014**, *9* (3), 378–394.

Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science (80-.)*. **2006**, *311*, 622–627.

Nimse, S. B.; Pal, D. Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms. *RSC Adv.* **2015**, *5* (35), 27986–28006.

Nørnberg, P.; Vendelboe, A. L.; Gunnlaugsson, H. P.; Merrison, J. P.; Finster, K.; Jensen, S. K. Comparison of the Mineralogical Effects of an Experimental Forest Fire on a Goethite/Ferrihydrite Soil with a Topsoil That Contains Hematite, Maghemite and Goethite. *Clay Miner.* **2009**, *44* (2), 239–247.

Novais, S. C.; Gomes, S. I. L.; Gravato, C.; Guilhermino, L.; De Coen, W.; Soares, A. M. V. M.;

- Amorim, M. J. B. Reproduction and Biochemical Responses in *Enchytraeus Albidus* (Oligochaeta) to Zinc or Cadmium Exposures. *Environ. Pollut.* **2011**, *159* (7), 1836–1843.
- Nowack, B.; Bucheli, T. D. Occurrence, Behavior and Effects of Nanoparticles in the Environment. *Environ. Pollut.* **2007**, *150* (1), 5–22.
- Oberdörster, G. Pulmonary Effects of Inhaled Ultrafine Particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2001**, *74* (1), 1–8.
- Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113* (7), 823–839.
- OECD. “OECD 207 -Earthworm, Acute Toxicity Tests.” *OECD Guidel. Test. Chem.* **1984**, *207* (April), 9.
- Oien, N.; Stenersen, J. Esterases of Earthworms III. Electrophoresis Reveals That *Eisenia Fetida* (Savigny) Is Two Species. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **1984**, *78* (2), 277–282.
- Oneto, M. L.; Basack, S. B.; Casabé, N. B.; Fuchs, J. S.; Kesten, E. M. Biological Responses in the Freshwater Bivalve *Corbicula Fluminea* and the Earthworm *Eisenia Fetida* Exposed to Fenitrothion. *Fresenius Environ. Bull.* **2005**, *14* (8), 716–720.
- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2003**, *13* (2), 57–149.
- Orsetti, S.; Quiroga, M. de las M.; Andrade, E. M. Binding of Pb(II) in the System Humic Acid/Goethite at Acidic PH. *Chemosphere* **2006**, *65* (11), 2313–2321.
- Pachapur, V.; Brar, S. K.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Nano-Ecotoxicology of Natural and Engineered Nanomaterials for Animals and Humans. In *Nanomaterials in the environment*; 2015; pp 421–437.
- Pachapur, V. L.; Dalila Larios, A.; Cledón, M.; Brar, S. K.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Behavior and Characterization of Titanium Dioxide and Silver Nanoparticles in Soils. *Sci. Total Environ.* **2016**, *563–564* (563–564), 933–943.
- Paoletti, M. G. The Role of Earthworms for Assessment of Sustainability and as Bioindicators. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1999**, *74* (1–3), 137–155.
- Paparella, C. V.; Pavesi, A. B.; Feldman, R. N.; Bouvet, B. R. Importancia de La Evaluación Del

- Estrés Oxidativo En El Semen Humano. *Arch Med Interna* **2015**, 37 (371), 7–14.
- Peijnenburg, W.; Praetorius, A.; Scott-Fordsmand, J.; Cornelis, G. Fate Assessment of Engineered Nanoparticles in Solids Dominated Media – Current Insights and the Way Forward. *Environ. Pollut.* **2016**, 218, 1365–1369.
- Peijnenburg, W. J.; Baerselman, R.; de Groot, A. C.; Jager, T.; Posthuma, L.; Van Veen, R. P. Relating Environmental Availability to Bioavailability: Soil-Type-Dependent Metal Accumulation in the Oligochaete *Eisenia Andrei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1999**, 44 (3), 294–310.
- Plathe, K. L.; von der Kammer, F.; Hassellöv, M.; Moore, J. N.; Murayama, M.; Hofmann, T.; Hochella, M. F. The Role of Nanominerals and Mineral Nanoparticles in the Transport of Toxic Trace Metals: Field-Flow Fractionation and Analytical TEM Analyses after Nanoparticle Isolation and Density Separation. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2013**, 102, 213–225.
- Prentø, P. Distribution of 20 Enzymes in the Midgut Region of the Earthworm, *Lumbricus Terrestris* L., with Particular Emphasis on the Physiological Role of the Chloragogen Tissue. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* **1987**, 87 (1), 135–142.
- Qiu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C. Surface Chemistry and Aspect Ratio Mediated Cellular Uptake of Au Nanorods. *Biomaterials* **2010**, 31 (30), 7606–7619.
- Rainbow, P. S. The Significance of Trace Metal Concentrations in Decapods. *Symp. Soc. Lond.*, **1988**, 59, 291–313.
- Rashid, K.; Sinha, K.; Sil, P. C. An Update on Oxidative Stress-Mediated Organ Pathophysiology. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 62 (October), 584–600.
- Regoli, F.; Winston, G. W. Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite, Peroxyl Radicals, and Hydroxyl Radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, 156 (2), 96–105.
- Regoli, F.; Gorbi, S.; Frenzilli, G.; Nigro, M.; Corsi, I.; Focardi, S.; Winston, G. W. Oxidative Stress in Ecotoxicology: From the Analysis of Individual Antioxidants to a More Integrated Approach. *Mar. Environ. Res.* **2002**, 54 (3–5), 419–423.

-
- Reinecke, S. A.; Reinecke, A. J. The Comet Assay as Biomarker of Heavy Metal Genotoxicity in Earthworms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *46* (2), 208–215.
- Rivero, P. J.; Urrutia, A.; Goicoechea, J.; Arregui, F. J. Nanomaterials for Functional Textiles and Fibers. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10* (1), 1–22.
- Roberts, T. L. Cadmium and Phosphorous Fertilizers: The Issues and the Science. *Procedia Eng.* **2014**, *83*, 52–59.
- Roca, N. Heavy Metal Background Levels in Rural Soils: A Case Study in Pampean Soils (Argentina). *Cienc. del Suelo* **2015**, *33* (2), 283–292.
- Romieu, I.; Lacasana, M.; McConnell, R. Lead Exposure in Latin America and the Caribbean. Lead Research Group of the Pan-American Health Organization. *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105* (4), 398–405.
- Sachindri, R.; Kalaichelvan, P. T. Ecotoxicity of Nanoparticles. *ISRN Toxicol.* **2013**, *2013* (March 2013), 1–11.
- Saint-Denis, M.; Labrot, F.; Narbonne, J. F.; Ribera, D. Glutathione, Glutathione-Related Enzymes, and Catalase Activities in the Earthworm *Eisenia Fetida Andrei*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1998**, *35* (4), 602–614.
- Sanchez-Hernandez, J. C. Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2006**, *188*, 85–126.
- Sanchez-Hernandez, J. C.; Wheelock, C. E. Tissue Distribution, Isozyme Abundance and Sensitivity to Chlorpyrifos-Oxon of Carboxylesterases in the Earthworm *Lumbricus Terrestris*. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (1), 264–272.
- Santamaría, R. S. Aspectos Biotecnológicos Del Proceso de Vermicomposteo y Su Aplicación Agronómica, Universidad Veracruzana, México, 1996.
- Sanvicens, N.; Marco, M. P. Multifunctional Nanoparticles - Properties and Prospects for Their Use in Human Medicine. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26* (8), 425–433.
- Savolainen, K.; Alenius, H.; Norppa, H.; Pylkkänen, L.; Tuomi, T.; Kasper, G. Risk Assessment of Engineered Nanomaterials and Nanotechnologies-A Review. *Toxicology* **2010**, *269* (2–3), 92–104.

- Schultz, C.; Powell, K.; Crossley, A.; Jurkschat, K.; Kille, P.; Morgan, A. J.; Read, D.; Tyne, W.; Lahive, E.; Svendsen, C.; et al. Analytical Approaches to Support Current Understanding of Exposure, Uptake and Distributions of Engineered Nanoparticles by Aquatic and Terrestrial Organisms. *Ecotoxicology* **2015**, *24* (2), 239–261.
- Schwabe, F.; Tanner, S.; Schulin, R.; Rotzetter, A.; Stark, W.; von Quadt, A.; Nowack, B. Dissolved Cerium Contributes to Uptake of Ce in the Presence of Differently Sized CeO₂ - Nanoparticles by Three Crop Plants. *Metallomics* **2015**, *7* (3), 466–477.
- Sharma, V. K.; Filip, J.; Zboril, R.; Varma, R. S. Natural Inorganic Nanoparticles – Formation, Fate, and Toxicity in the Environment. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (23), 8410–8423.
- Shi, Z.; Tang, Z.; Wang, C. A Brief Review and Evaluation of Earthworm Biomarkers in Soil Pollution Assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24* (15), 13284–13294.
- Shoultz-Wilson, W. A.; Reinsch, B. C.; Tsyusko, O. V.; Bertsch, P. M.; Lowry, G. V.; Unrine, J. M. Effect of Silver Nanoparticle Surface Coating on Bioaccumulation and Reproductive Toxicity in Earthworms (*Eisenia Fetida*). *Nanotoxicology* **2011**, *5* (3), 432–444.
- Silva, T.; Pokhrel, L. R.; Dubey, B.; Tolaymat, T. M.; Maier, K. J.; Liu, X. Particle Size, Surface Charge and Concentration Dependent Ecotoxicity of Three Organo-Coated Silver Nanoparticles: Comparison between General Linear Model-Predicted and Observed Toxicity. *Sci. Total Environ.* **2014**, *468–469*, 968–976.
- Sogorb, M. A.; Vilanova, E.; Carrera, V. Future Applications of Phosphotriesterases in the Prophylaxis and Treatment of Organophosphorus Insecticide and Nerve Agent Poisonings. *Toxicol. Lett.* **2004**, *151* (1), 219–233.
- Sokal, R.; Rohlf, J. *Introducción a La Bioestadística*; Reverté, 2002.
- Stanicka, J.; Landry, W.; Cotter, T. G. Oxidative Stress Biomarkers and ROS Molecular Probes. In *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*; 2015; Vol. 2, pp 353–374.
- Stankus, D. P.; Lohse, S. E.; Hutchison, J. E.; Nason, J. A. Interactions between Natural Organic Matter and Gold Nanoparticles Stabilized with Different Organic Capping Agents. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (8), 3238–3244.
- Stepić, S.; Hackenberger, B. K.; Velki, M.; Lončarić, Ž.; Hackenberger, D. K. Effects of Individual

and Binary-Combined Commercial Insecticides Endosulfan, Temephos, Malathion and Pirimiphos-Methyl on Biomarker Responses in Earthworm *Eisenia Andrei*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *36* (2), 715–723.

Storer, T. I. *General Zoology*, 6th ed.; McGraw-Hill College, 1979.

Syers, J. K.; Cisse, L. Regional Differences in the Inputs of Cadmium to Soils. In *SCOPE Workshop on Environmental Cadmium in the Food Chain: Sources, Pathways, and Risks'* Belgian Academy of Sciences, Brussels.; 2000; pp 13–16.

Thornton, I.; Davies, D. J. A.; Watt, J. M.; Quinn, M. J. Lead Exposure in Young Children from Dust and Soil in the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *89*, 55–60.

Titov, A. V.; Král, P.; Pearson, R. Sandwiched Graphene-Membrane Superstructures. *ACS Nano* **2010**, *4* (1), 229–234.

Tourinho, P. S.; van Gestel, C. A. M.; Lofts, S.; Svendsen, C.; Soares, A. M. V. M.; Loureiro, S. Metal-Based Nanoparticles in Soil: Fate, Behavior, and Effects on Soil Invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31* (8), 1679–1692.

Tsyusko, O. V.; Hardas, S. S.; Shoults-Wilson, W. A.; Starnes, C. P.; Joice, G.; Butterfield, D. A.; Unrine, J. M. Short-Term Molecular-Level Effects of Silver Nanoparticle Exposure on the Earthworm, *Eisenia Fetida*. *Environ. Pollut.* **2012**, *171*, 249–255.

UNEP: United Nations Environment Programme. *Final Review of Scientific Information on Cadmium*; 2010a.

UNEP: United Nations Environment Programme. *Final Review of Scientific Information on Lead*; 2010b.

Unrine, J. M.; Hunyadi, S. E.; Tsyusko, O. V.; Rao, W.; Shoults-Wilson, W. A.; Bertsch, P. M. Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia Fetida*). *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (21), 8308–8313.

US-EPA. Ecological Effects Test Guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test - EPA 850.62.00. **2012**, No. January, 19.

Vasseur, P.; Cossu-Leguille, C. Biomarkers and Community Indices as Complementary Tools for Environmental Safety. *Environ. Int.* **2003**, *28* (8), 711–717.

Velki, M.; Hackenberger, B. K. Species-Specific Differences in Biomarker Responses in Two Ecologically Different Earthworms Exposed to the Insecticide Dimethoate. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *156* (2), 104–112.

Velki, M.; Hackenberger, B. K. Different Sensitivities of Biomarker Responses in Two Epigeic Earthworm Species after Exposure to Pyrethroid and Organophosphate Insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2013a**, *65* (3), 498–509.

Velki, M.; Hackenberger, B. K. Inhibition and Recovery of Molecular Biomarkers of Earthworm *Eisenia Andrei* after Exposure to Organophosphate Dimethoate. *Soil Biol. Biochem.* **2013b**, *57* (November), 100–108.

Vijver, M. G.; Vink, J. P. M.; Miermans, C. J. H.; Van Gestel, C. A. M. Oral Sealing Using Glue: A New Method to Distinguish between Intestinal and Dermal Uptake of Metals in Earthworms. *Soil Biol. Biochem.* **2003**, *35* (1), 125–132.

Vunain, E.; Mishra, A. K.; Mamba, B. B. Dendrimers, Mesoporous Silicas and Chitosan-Based Nanosorbents for the Removal of Heavy-Metal Ions: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *86*, 570–586.

Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5761–5768.

Wang, J.; Chen, Z.; Chen, B. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Graphene and Graphene Oxide Nanosheets Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Graphene and Graphene Oxide Nanosheets. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 4817–4825.

Wang, Z.; Zhao, J.; Li, F.; Gao, D.; Xing, B. Adsorption and Inhibition of Acetylcholinesterase by Different Nanoparticles. *Chemosphere* **2009**, *77* (1), 67–73.

Wheelock, C. E.; Shan, G.; Ottea, J. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *J. Pestic. Sci.* **2005**, *30* (2), 75–83.

Wheelock, C. E.; Phillips, B. M.; Anderson, B. S.; Miller, J. L.; Miller, M. J.; Hammock, B. D. Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, *195*, 117–178.

WHO-IARC. *Inorganic and Organic Lead Compounds*; 2006; Vol. 87.

World Health Organization. *WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Chlorpyrifos (O,O-Diethyl O-3,5,6-Trichloro-2-Pyridyl Phosphorothioate)*; 2015.

Wu, X.; Cobbina, S. J.; Mao, G.; Xu, H.; Zhang, Z.; Yang, L. A Review of Toxicity and Mechanisms of Individual and Mixtures of Heavy Metals in the Environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (9), 8244–8259.

Xiong, W.; Sun, Y.; Zou, M.; Muhammad, R.-U.-H. Molecular Cloning, Characterization of CAT, and Eco-Toxicological Effects of Dietary Zinc Oxide on Antioxidant Enzymes in *Eisenia Fetida*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20* (3), 1746–1755.

Xu, C. yang; Deng, K. ying; Li, J. yu; Xu, R. kou. Impact of Environmental Conditions on Aggregation Kinetics of Hematite and Goethite Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2015**, *17* (10), 1–13.

Xue, Y.; Gu, X.; Wang, X.; Sun, C.; Xu, X.; Sun, J.; Zhang, B. The Hydroxyl Radical Generation and Oxidative Stress for the Earthworm *Eisenia Fetida* Exposed to Tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicology* **2009**, *18* (6), 693–699.

Yang, K.; Zhu, L. Z.; Xing, B. S. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Carbon Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (6), 1855–1861.

Yardley, R. B.; Lazorchak, J. M.; Pence, M. A. Evaluation of Alternative Reference Toxicants for Use in the Earthworm Toxicity Test. *Environ. Toxicol. Chem.* **1995**, *14* (7), 1189–1194.

Yin, H.; Casey, P. S.; McCall, M. J.; Fenech, M. Effects of Surface Chemistry on Cytotoxicity, Genotoxicity, and the Generation of Reactive Oxygen Species Induced by ZnO Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26* (19), 15399–15408.

Zalts, A. Metales, Ambiente y Las Sociedades Tecnológicas: ¿hacia Dónde Nos Dirigimos? *Química Viva* **2011**, *10* (2).

van der Zee, C.; Roberts, D. R.; Rancourt, D. G.; Slomp, C. P. Nanogoethite Is the Dominant Reactive Oxyhydroxide Phase in Lake and Marine Sediments. *Geology* **2003**, *31* (11), 993–996.

Zhang, Q.; Zhu, L.; Wang, J.; Xie, H.; Wang, J.; Han, Y.; Yang, J. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in the Earthworm *Eisenia Fetida* Induced by Low Doses of Fomesafen. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20* (1), 201–208.

Zhang, X.; Sun, H.; Zhang, Z.; Niu, Q.; Chen, Y.; Crittenden, J. C. Enhanced Bioaccumulation of Cadmium in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Chemosphere* **2007**, *67* (1), 160–166.

Zhao, Y.; Zhang, Z.; Feng, W. *Toxicology of Nanomaterials*; Wiley-VCH, 2016.

Zhou, C. F.; Wang, Y. J.; Yu, Y. C.; Sun, R. J.; Zhu, X. D.; Zhang, H. L.; Zhou, D. M. Does Glyphosate Impact on Cu Uptake by, and Toxicity to the Earthworm *Eisenia Fetida*? *Ecotoxicology* **2012**, *21* (8), 2297–2305.

Zitka, O.; Skalickova, S.; Gumulec, J.; Masarik, M.; Adam, V.; Hubalek, J.; Trnkova, L.; Kruseova, J.; Eckschlager, T.; Kizek, R. Redox Status Expressed as GSH:GSSG Ratio as a Marker for Oxidative Stress in Paediatric Tumour Patients. *Oncol. Lett.* **2012**, *4* (6), 1247–1253.